



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA,
OPTOMETRÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**Efectos "In Vitro" de tres
Extractos del Capullo del Gusano
de la Seda frente a la Radiación
Ultravioleta B**

D^a. Raquel Vicente-Ortega Sánchez

2015

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	5
III. ANTECEDENTES	8
A. CULTIVOS CELULARES	9
B. RADIACIÓN SOLAR. RADIACION ULTRAVIOLETA	20
C. FOTOPROTECCIÓN	33
D. ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD Y GENOPROTECCIÓN	48
E. EXTRACTOS DEL GUSANO DE LA SEDA	60
IV. OBJETIVOS	66
V. MATERIAL Y METODOS	68
A. MATERIAL	69
B. MÉTODOS	88
a. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	88
b. MÉTODO ESTADISTICO	102
VI. RESULTADOS	103
VII. DISCUSION	127
VIII. CONCLUSIONES	149
IX. BIBLIOGRAFÍA	167

I. RESUMEN

I. RESUMEN

Durante las últimas décadas la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la recreativa o intermitente, por lo que el **fotoenvejecimiento** afecta también a jóvenes que se exponen al sol sin protección o a fuentes ultravioleta artificiales para el bronceado rápido (Camacho, 2001), de ahí, la inversión millonaria que se realiza en Occidente en investigación de sustancias que eviten o retrasen los efectos del fotoenvejecimiento, tanto por estética como por el coste económico del tratamiento de las lesiones. En los últimos años, los aceites esenciales han suscitado gran interés debido a su capacidad antioxidante, que podría interferir en los mecanismos del fotoenvejecimiento, evitando la formación de radicales libres y potenciando el subsistema inmunológico cutáneo (Siegel, 2012).

En nuestro trabajo hemos ensayado tres extractos procedentes del capullo del gusano de la seda: fibroína, sericina e hidrolizado para conocer sus efectos “in vitro”:

- a) **Citotóxicos** (viabilidad y proliferación celular) sobre las líneas celulares: Vero, TRAMP-C1 y HaCaT.
- b) **Genotóxico** y **genoprotector** sobre sangre total humana.
- c) Sobre la **migración celular** y **protección frente a la radiación ultravioleta B** en la línea celular HaCaT.

En los ensayos de **CITOTOXICIDAD** sobre las **células Vero**, ni la fibroína ni el hidrolizado de seda fueron citotóxicos, mientras que la sericina provocó una disminución de la viabilidad celular dosis-respuesta significativa, moderadamente citotóxica. Las células **TRAMP-C1** mostraron valores de viabilidad celular a las 24 y 48 horas muy próximos a los controles (casi del 100%) por lo que ninguno de los extractos: **fibroína, sericina e hidrolizado de seda** presentaron acción anticancerosa sobre la línea celular TRAMP-C1 a las concentraciones estudiadas. El objetivo del ensayo de citotoxicidad para las células **HaCaT** fue ajustar las dosis de los extractos para poder utilizar la máxima concentración que admitiera el cultivo sin que afectara a su viabilidad y poder llegar hasta ese punto con el ensayo de fotoprotección y migración.

La **fibroína** no fue citotóxica hasta 0,1%, a partir del cual mostró cierto efecto citotóxico estadísticamente significativo dependiente de la dosis. La **sericina** resultó más citotóxica como también constatamos sobre la línea Vero. Este efecto comenzó a hacerse evidente con las concentraciones más bajas (0,05 y 0,1), alcanzando la IC 50 de forma temprana en 0,22% a las 24 horas y 0,16% a las 48 horas. El efecto negativo dosis-respuesta sobre el cultivo fue estadísticamente significativo a partir del 0,05%. El **hidrolizado de seda** mostró mejor comportamiento respecto a la viabilidad de estas células, con valores próximos e incluso superiores al 100% (control) en todas las concentraciones estudiadas a 24 y 48 horas. Por lo que el hidrolizado de seda no afecta a la viabilidad celular de esta línea.

En el ensayo de **GENOTOXICIDAD**, no existían diferencias estadísticamente significativas en el número de micronúcleos por 500 CB en las muestras tratadas con los tres extractos respecto a las controles. En el ensayo de **GENOPROTECCIÓN**, observamos disminución de MN/500 CB cuando se administraban los tratamientos (fibroína, sericina e hidrolizado de seda) previamente a la irradiación aunque ninguno mostró disminución estadísticamente significativa respecto al control irradiado. Por lo que parece existir tendencia a la protección frente al daño producido por la radiación X. En cuanto a la **MIGRACIÓN CELULAR**, el hidrolizado de seda no mostró diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones estudiadas (0'01 y 0'1 %) en relación a la migración de las células HaCaT.

El estudio de **FOTOPROTECCIÓN** presentó resultados significativos ($p < 0'001$) para el hidrolizado y la fibroína, resaltando el importante incremento de la viabilidad celular a las 24 y 48 horas causado por el hidrolizado de seda a las concentraciones 0,001; 0,01; 0,05 y 0,1, y la mínima intensidad de radiación ultravioleta ($0,08 \text{ J/cm}^2$), lo que consideramos de gran relevancia clínica por la facilidad de incorporación de una dosis tan baja de hidrolizado de seda a un producto fotoprotector.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano que sufre primordialmente alteraciones tras la exposición crónica a la radiación ultravioleta, que han sido denominadas como **fotoenvejecimiento** (Kligman, 1982), **dermatoheliosis** o también **envejecimiento cutáneo extrínseco** o **patológico**. Están caracterizadas por un envejecimiento más precoz, extenso, y sobre todo, de mayor gravedad, puesto que puede acabar en **fotocarcinogénesis** o desarrollo de cáncer cutáneo. Actualmente se acepta que, aunque el origen es multifactorial (factores endógenos, exógenos y epigenéticos), los mecanismos íntimos de producción de dichas alteraciones están relacionados con el daño oxidativo a nivel celular y tisular.

Estos hechos han supuesto un importante reto para la investigación científica, relacionado, por una parte con el desarrollo de diversos modelos experimentales “in vitro” de daño celular por irradiación UV y posterior estudio de los efectos fotoprotectores de diversas sustancias, puesto que la legislación vigente impide la realización de modelos con animales para el ensayo de sustancias que, como ocurre con los extractos ensayados en este trabajo, puedan ser utilizados posteriormente en productos cosméticos con fotoprotectores añadidos. En este sentido los cultivos celulares constituyen una alternativa para conocer los mecanismos celulares así como los cambios implicados tanto en el fenómeno del fotoenvejecimiento celular como de la fotoprotección.

Por otra parte, durante los últimos años ha ocurrido algo similar respecto a los productos o sistemas de fotoprotección, que ha llevado a un enorme desarrollo de nuevos protectores solares de naturaleza química así como de nuevas formulaciones de los de naturaleza física, aunque quizás lo mas novedoso corresponda al gran esfuerzo investigador en relación con los de naturaleza biológica y al ensayo de distintas sustancias de origen natural como los aceites esenciales. En nuestro trabajo hemos ensayado tres extractos correspondientes a este último grupo.

III. ANTECEDENTES

A. CULTIVOS CELULARES

HISTORIA

Claude Bernard a finales del siglo XIX, estableció por primera vez las bases teóricas para crear un sistema artificial en el que pudieran sobrevivir las células o tejidos extraídos de un organismo vivo, independientemente de él. No obstante, se considera a Ross Harrison, 1907, el iniciador de los cultivos de tejidos, puesto que fue quien comenzó a cultivar tejidos de anfibios. Durante esa época, la limitación más importante para el establecimiento de los cultivos era poder conseguir un medio nutritivo adecuado.

A principios del siglo XX, se inició el uso de los cultivos celulares y tisulares, que proporcionaron un método que permitía estudiar órganos y tejidos aislados del medio original, lo que hizo posible conocer mejor la composición, fisiología, metabolismo, bioquímica y biología molecular de los cultivos.

Constituyen un método que permite simplificar el estudio hasta determinados niveles aceptables, al eliminar las interacciones y variaciones que se presentan al experimentar con organismos completos. De hecho, el primer cultivo celular se llevó a cabo con la intención de estudiar el comportamiento de células animales, libres de las variaciones sistémicas que se originan en los animales, tanto durante la homeostasis como durante el estrés que ocurre en el transcurso del experimento (Harrison, 1907).

En 1910, Burrows y Carrel (Sharp, 1977) realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamíferos, así como el crecimiento de tumores sólidos, demostrando que la vida del cultivo puede continuarse mediante subcultivos. Estos autores incorporaron plasma a los medios de cultivo y, en sus primeros estudios, consiguieron el cultivo de pequeños fragmentos de tejidos o explantes.

No obstante, la posibilidad de realizar cultivos “in vitro” desde explantes primarios fue iniciada por Eagle y cols. en 1943. El primer intento se realizó con células de rana y con fibroblastos de ratón, aunque la posterior accesibilidad a tejidos animales como el embrión de huevo de gallina, proporcionó diversos tipos celulares en cultivos primarios, consiguiéndose incluso el desarrollo de roedores genéticamente puros, de cuyos embriones se podían obtener cultivos continuos.

Posteriormente, Gey (1952), demostró que a partir de tumores humanos podían surgir también líneas celulares continuas, (células HELA procedentes de un adenocarcinoma humano), lo que permitió profundizar en el conocimiento de la biología de la célula eucariota, en un entorno libre de las variaciones sistémicas que suelen ocurrir en el organismo animal “a la vez que” ampliaron enormemente los tipos celulares cultivables “in vitro”. Más recientemente, la aparición de las técnicas de biología molecular e ingeniería genética han ampliado aún más su utilización.

A partir de 1956, comenzaron a prepararse vacunas víricas multiplicando cultivos celulares, lo que eliminó la necesidad del sacrificio de animales para su producción. Todo esto permitió que los cultivos celulares pasaran del ámbito del laboratorio básico a ser utilizados también

por la industria biotecnológica, y en 1965, Harris y Watkins consiguieron los primeros híbridos de células humanas y de ratón. Una década después, en 1975, Kohler y Milstein describieron el mecanismo de obtención de los anticuerpos monoclonales.

Entre las múltiples aplicaciones de los cultivos se pueden citar:

- El mantenimiento y propagación de líneas tumorales.
- Los requerimientos nutricionales y de factores de crecimiento.
- El estudio de las interacciones célula-sustrato y célula-célula.
- Los estudios sobre la diferenciación y desdiferenciación celular.
- La manipulación genética de células eucarióticas.
- La obtención de sustancias del sobrenadante producidas por el cultivo (anticuerpos monoclonales, enzimas, factores de crecimiento).
- El mantenimiento y obtención de virus.
- El estudio del crecimiento y características antigénicas de una población celular.
- Los efectos citostáticos y citotóxicos de diversas sustancias, etc.

Además, desde el punto de vista práctico, en la clínica oncológica, los cultivos se pueden dedicar también al estudio del crecimiento, la viabilidad y la citotoxicidad en líneas celulares, a través de distintos métodos de evaluación directa e indirecta.

Para realizar todos estos procesos es necesario conseguir el crecimiento de las células "in vitro", para ello se ha de conseguir un ambiente lo más parecido al original. Este método, además de su aproximación al original, cuenta con la ventaja de ser controlable tanto a nivel físico (temperatura, pH, osmolaridad, presión parcial de O₂ y de CO₂, tipo de soporte físico y características de adhesividad, etc.), como a nivel nutricional (aminoácidos esenciales, bases nitrogenadas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, sales, enzimas, factores de crecimiento, etc.), e incluso a nivel de defensa frente a las infecciones (condiciones continuas de esterilidad, antibióticos, chequeos rutinarios de las líneas, etc.). Este conjunto de condiciones varía en función del tipo de cultivo, el tejido de origen y el método utilizado en su mantenimiento.

Cultivos en ensayos de citotoxicidad: La utilización de ensayos "in vitro" tuvo un hito de enorme interés en 1946 (fundamentalmente a partir del descubrimiento de la actividad antineoplásica de la mostaza nitrogenada), en el estudio de potenciales sustancias antineoplásicas, así como de las ya conocidas. En los primeros estudios se utilizaron explantes cultivados en medios indefinidos, y la valoración del efecto era principalmente cualitativa, lo que dio lugar a estudios poco reproducibles. Más tarde, la aparición de los medios semidefinidos y la utilización de células dispuestas en monocapa sobre vidrio, permitió el estudio de réplicas idénticas de muestras celulares en condiciones reproducibles, lo que a su vez permitió que pudieran cuantificarse los efectos de las drogas ensayadas, con lo que se consiguió una mayor reproductibilidad de los experimentos y una evaluación más precisa de sus efectos.

Eagle y Foley en 1956, utilizaron estas técnicas, junto con medidas del contenido proteico de células tratadas y no tratadas, observaron que existía relación entre las actividades “in vitro” e “in vivo” de los agentes neoplásicos, con lo que demostraron la validez del método.

Entre los primeros métodos que permitían la cuantificación del efecto de la droga, se encontraba el **ensayo de exclusión de colorante** con nigrosina (Kaltenbach, 1958), que fue posteriormente sustituido por otros colorantes vitales como azul de tripán y rojo neutro (Borenfreund, 1990). Sin embargo, el recuento en cámara hemocitométrica con colorantes vitales, posee una variabilidad en la estimación de la viabilidad celular mayor que otros métodos posteriormente desarrollados (Wilson, 1986).

Algunos ensayos de citotoxicidad ofrecen una interpretación instantánea de los resultados, como la exclusión de un colorante por las células muertas, o la liberación de Cr51 o fluoresceína por células marcadas, denominados ensayos de viabilidad y son utilizados para predecir la supervivencia, más que para medirla directamente. Estos ensayos son útiles, en general, para identificar células muertas, pero pueden sobreestimar la supervivencia a largo plazo. La mayoría implican ruptura de la membrana y muerte celular irreversible. Otros aspectos de la citotoxicidad, como la inhibición de procesos metabólicos, pueden cuantificarse más exactamente, pero la predicción de la supervivencia es menos segura, ya que muchas formas de inhibición metabólica pueden ser reversibles. En estos casos, la reducción de la supervivencia sólo puede deducirse si la disminución en los índices de incorporación de precursores en el DNA, RNA o proteínas se mantiene, después de transcurridos el equivalente a varios tiempos de duplicación de la población celular.

Con los métodos utilizados para medir la integridad celular se consigue una estimación del daño, instantáneo o progresivo, a corto plazo. Entre los primeros métodos se encuentran los ensayos de exclusión del colorante con nigrosina (Kaltenbach y cols. 1958), antes comentado, que posteriormente fue sustituida por otros colorantes vitales como el azul de tripán y el rojo neutro (Borenfreund, 1990).

Tipos de experimentos: La actual variedad de métodos para estudiar la viabilidad y toxicidad celular es tan amplia, que estos ensayos se clasifican en función del tiempo medio de duración del experimento y del sistema de evaluación, aunque ambas características suelen ir ligadas. Dendy (1981) los clasifica en tres grandes grupos:

- **test de corta duración**, donde la viabilidad se mide a los pocos minutos u horas de la exposición a la droga.
- **test de duración intermedia**, tras un periodo de 1-3 días.
- **test de larga duración**, en los que la viabilidad se determina después de 14-21 días de cultivo tras el tratamiento de las células con el antineoplásico

Otros métodos de evaluación de la viabilidad y efecto de las drogas, además del de exclusión de colorante (Kaltenbach y cols, 1958; Borenfreund, 1990), que aunque suelen ser muy sencillos resultan engorrosos y poco reproducibles, son:

- El ensayo clonogénico (Salmon y cols. 1978, Courtenay y Mills, 1978).
- La incorporación de marcadores radioactivos.
- La incorporación de Bromo desoxiuridina (BrdU).
- La liberación de Cr51.
- El contenido total de proteína.
- Los ensayos con MTT.

En los **ensayos clonogénicos** existen tres variantes fundamentales: el clonado en monocapa, clonado en agar de covertera o ensayo de Salmon y Hamburger (1977, 1978), y el ensayo de Courtenay (1978):

En el **clonado en monocapa**, después del tratamiento con la droga, se siembran nuevas placas a baja densidad y se dejan crecer hasta que se formen colonias que son contadas y comparadas con los controles adecuados.

El **clonado en agar de covertera** o ensayo de Salmon y Hamburger (1977, 1978) sigue el mismo principio (la pérdida o retención de la capacidad para formar clones), pero las células, tras su tratamiento, se mezclan con agar al 0,3%, vertiéndose sobre otra capa de agar más densa. Al cabo de 2 a 4 semanas se hace el recuento de colonias en muestras tratadas y controles.

El **ensayo de Courtenay** (1978) sólo difiere del anterior en la adición de una capa de células soporte o "feeder cells" (células homólogas tratadas con mitomicina C o radiaciones), antes de sembrar las células

tratadas y los controles. Este método logra una mayor eficiencia de formación de colonias, lo que es útil para aquellas líneas con poca capacidad clonogénica.

Otro sistema mide la tasa de incorporación de metabolitos marcados radiactivamente, como pueden ser los isótopos: ^{14}C de monosacáridos, ^{32}P y ^3H en aminoácidos, etc. Aunque el más utilizado es el marcaje con timidina tritiada (^3HT), ya que la incorporación de este marcador en el ADN evalúa la actividad proliferativa de la población celular, este método es adecuado para ensayos de media y larga duración, pero no para los de corta duración, ya que en estos no se dispone de tiempo suficiente, tras el tratamiento con la droga, para permitir la incorporación de los isótopos en las células indemnes al tratamiento, que de esta forma aparecerían como no proliferantes. Este método es, con diferencia, el más preciso y reproducible, aunque tiene el inconveniente de utilizar material radiactivo.

Otro **método** que utiliza isótopos radioactivos es el de **liberación de ^{51}Cr** , que se encuadra dentro de los de corta duración. Se utiliza frecuentemente en los estudios de citotoxicidad mediada por linfocitos, pero ha de realizarse en un plazo de unas 4 horas post-tratamiento, puesto que las células indemnes pueden expulsar o fijar de nuevo el ^{51}Cr liberado al medio.

Ensayos con MTT

Más recientemente se ha desarrollado un método colorimétrico, aplicable a casi todas las condiciones experimentales que tiene, junto a su precisión, similar a la del ensayo con timidina tritiada, la ventaja de no utilizar isótopos radioactivos y una importante simplificación del

experimento. Se trata de los llamados ensayos con MTT o MTA (MTT Assays). La primera aplicación de la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) se realizó en el campo de la microbiología, como colorante vital, donde forma cristales intracelulares de formazán de color azul. De igual forma, en eucariotas la enzima mitocondrial Succinato Deshidrogenasa, puede reducir el MTT a un producto coloreado insoluble (formazán) (Esq. 8). Puesto que esta enzima no se encuentra libre en el suero, no existe la posibilidad de que se enmascare su actividad.

MTT		FORMAZAN
AMARILLO	SUCCINATODESHIDROGENASA	AZUL
(soluble)		(insoluble)

Conversion del MTT en producto formazán coloreado.

La primera aplicación de esta sal, en la evaluación de la quimiosensibilidad de los cultivos celulares neoplásicos, fue llevada a cabo por Mosmann (1983), quien mantenía las células en cultivo en placas de microtitulación con medio normal suplementado con suero, y tras su exposición a las drogas elegidas, reponía el medio por otro nuevo sin droga, incubando durante 2-4 horas el MTT disuelto en medio de cultivo suplementado con suero, eliminando el medio con el MTT sobrante no metabolizado, directamente en el caso de los cultivos en monocapa, o tras la centrifugación para los cultivos en suspensión.

La solubilización del formazán se realizaba con una mezcla de isopropanol-medio (1:1 v/v) acidificada con HCl (0,004 N) para evitar la absorción típica del rojo fenol (500-600 μm) (habitual indicador de pH de

los medios de cultivo). Procedía entonces a la lectura de la placa a 620-630 μm de referencia y 570 μm de muestreo.

En un trabajo posterior (Denizot, 1986), el MTT se disuelve en RPMI, sin rojo fenol ni suero, a una concentración final de 1 mg/ml, que es utilizado como medio de incubación de MTT, y una vez eliminado el sobrante se solubilizaba con propanol o etanol puro. Con este sistema se evita la contribución del rojo fenol al espectro de absorción, la necesidad de acidificar el medio, que cambiaría las propiedades espectrofotométricas del MTT formazán, y la precipitación de las proteínas del suero, al solubilizarlo en estos alcoholes. Otra importante variación es la utilización de 690 μm como longitud de onda de referencia, pues a 620-630 μm el MTT no metabolizado tiene cierta absorbancia, mientras que a 690 μm , ni MTT ni formazán tienen absorbancia. Con estas pequeñas variaciones del método original, Denizot y col. (1986) consiguieron una mayor linealidad en las curvas patrón, un menor ruido de fondo y una fuerte correlación de los resultados con los obtenidos en los ensayos de incorporación de 3H-T.

A pesar de estas mejoras, la utilización de un medio sin indicador de pH y su eliminación del suero, supone un cambio en las condiciones de crecimiento del cultivo, que puede inducir alteraciones importantes en los resultados del experimento para algunas líneas. Además, la solubilización de los cristales de formazán es costosa con estos solventes.

La modificación que introdujeron Carmichael y col. (1987a, 1987b) fue básicamente la utilización de dos solventes distintos: DMSO (Dimetil Sulfóxido) para las líneas cultivadas en suspensión, y aceite mineral para cultivos en monocapa, utilizando 540 μm y 570 μm como longitudes de onda de lectura respectivamente. Se observó que, tanto el DMSO como el

aceite mineral, disuelven completamente el formazán y no inducen la precipitación de las proteínas del suero.

Posteriormente, los estudios de Alley y col. (1988), demostraron que no era necesario utilizar dos solventes distintos, puesto que el DMSO constituía un buen solvente, tanto para líneas cultivadas en suspensión como en monocapa, ya que en estas últimas, aunque se podía eliminar el medio, siempre quedaban unos 50 que eran más miscibles en DMSO que en aceite mineral. Asimismo, señalaron que la presencia de proteínas del suero en la mezcla final (DMSO más formazán), incrementaba hasta dos veces la absorbancia del formazán en la región de 500 a 600 μm , de forma que su coeficiente de eliminación molar aumentaba tres veces al añadir un 1% (v/v) de suero en la solución final.

De esta forma se demostró, no solo que el DMSO era el disolvente idóneo para los ensayos de MTT, sino que, además, la presencia de rojo fenol y/o suero en el medio no perjudica la sensibilidad del experimento, aumentándola incluso en el caso del suero, estableciendo un estándar que puede ser utilizado para cultivos en suspensión y en monocapa.

En estos trabajos, se puso de manifiesto una fuerte correlación con los resultados obtenidos con el ensayo clonogénico y de exclusión de colorante (Carmichael y col, 1987a, 1987b), con el ensayo de contenido celular de proteína (Alley, 1988) y con los de incorporación de timidina tritiada (Arnould, 1990a), llegando en ocasiones a mostrar una mayor sensibilidad que dichos métodos.

B. RADIACIÓN SOLAR

El hombre, desde su aparición sobre la tierra, ha tenido conciencia de la importancia del Sol en su vida, por lo que lo ha reverenciado y, desde los tiempos más remotos, lo ha considerado como fuente de vida e incluso Dios principal, lo que algunos antropólogos han denominado Teología Solar.

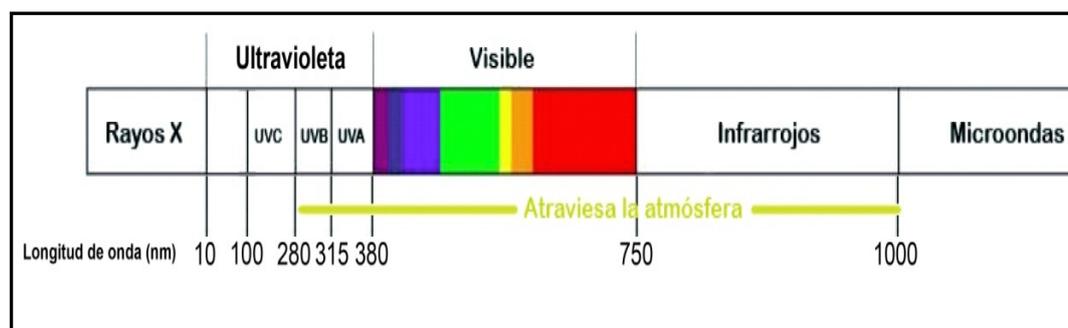
El culto al Sol está documentado con numerosísimos ejemplos, no solo en culturas primitivas, sino en otras más elaboradas como el Antiguo Egipto, Mesopotamia, Grecia, Roma, Persia, India, China y las civilizaciones Precolombinas, simbolizándolo en diferentes divinidades que ponían de manifiesto su importancia vivificadora. El faraón Amenhotep IV (1379 – 1372 a.C.) instauró el culto monoteísta al Sol, apartando a todos los demás dioses existentes en aquel momento. Como consecuencia de ello, cambió su nombre y se llamó a sí mismo Akhenaton (el que sirve a Aton, el Sol).

En Persia el Sol corresponde al dios Mitra (Sol invicto), que fue incorporado por los romanos y del que existen templos o mitrarios en numerosos lugares, especialmente en Roma. La religión mitraica fue el principal competidor del Cristianismo en los primeros tiempos. Mientras que los griegos tenían dos divinidades que representaban al Sol, Helios y Apolo, éste último era el padre de Esculapio, dios de la Medicina. También hay ejemplos de ritos de la adoración al Sol entre los incas, los aztecas y los bramanes de la India (Abad, 1999).

La humanidad le debe al Sol la luz, la energía, el calor, en definitiva, la vida: sin él no tendría lugar la fotosíntesis de la que dependen las plantas y los humanos no podrían fijar el calcio en los huesos o sintetizar la vitamina D en la piel. Así mismo está presente continuamente en nuestro entorno: rige las horas, los días, las estaciones e incluso influye en el estado de ánimo.

Sin embargo, con los beneficios del sol también se conocieron rápidamente sus inconvenientes (Müller, 1997). Así, los egipcios se protegían del sol con un cucurucho colocado sobre la cabeza que contenía sebo y mirra y que, al fundirse por el calor, se derramaba por la cabeza y por el cuerpo, protegiendo a la piel. Los hipocráticos consideraban la helioterapia como un remedio para consolidar las fracturas, pero también era útil para tratar otros males como la hidropesía, la ciática, la elefantiasis, el asma y otros males del riñón o del útero. Durante la Edad Media, Avicena fue un defensor de las propiedades curativas del sol y de los baños en general. Existe una innumerable lista de remedios para las quemaduras solares, a base de aceites, sebo, mirra, heliotropo, vinagre, etc. Estos serían los primeros filtros de protección frente al sol (Vicente, 1999).

La radiación solar llega a la tierra en forma de emisiones electromagnéticas. El espectro solar está formado por radiaciones de distinta longitud de onda, cuya energía es inversamente proporcional a su longitud de onda (Sánchez-Saldaña, 2002).



Características de las radiaciones del espectro solar según (Honeyman, 2002):

Radiación		Longitud de Onda	Energía
		nm	Kcal/Einstein
Infra rojo	Lejano	10.000	2.86
	Cercano	1.000	28.60
Luz Visible	Rojo	700	40.8
	Anaranjado	620	46.1
	Verde	530	49.3

Las diferentes bandas de la radiación visible corresponden a los distintos colores del espectro según (Montero, 2008): el límite entre las diferentes partes del espectro ultravioleta se han fijado en:

El límite inferior de la radiación UV a 200 nm corresponde al de la acción ionizante sobre las moléculas.

El límite entre UVC y UVB se sitúa, según el límite de su presencia en la radiación solar, a nivel de la superficie terrestre.

El límite entre UVB y UVA corresponde al límite de absorción de los ácidos nucleicos.

El límite entre UVA y visible corresponde a la iniciación de las reacciones fotoquímicas en la retina con la visión de los colores.

La **Radiación Ultravioleta** supone entre el 5 y el 10% de toda la energía del espectro solar, del que la luz visible supone el 50% y la infrarroja el 40%; pero estos pueden variar por distintos factores como la latitud, altitud, capa de nubes, polución, concentración de la capa de ozono, estación del año y ángulo del cenit solar, e incluso según las horas del día.

Las radiaciones ultravioleta que llegan a la superficie terrestre suponen alrededor del 7% de las radiaciones solares. El 6,7% corresponden a la RUVA y el 0,3% a la RUVB; mientras que la radiación UVC es absorbida por la capa de ozono (Montero, 2008).

A su vez la RUV se compone de varias bandas de emisión con características y efectos diferentes (Montero, 2008):

- La **banda UV-A** (320-400 μm): Se denomina también región de onda larga o cercana a la infrarroja, posee mayor capacidad de penetración en la piel, pudiendo llegar hasta la dermis. Tiene bajo poder eritematígeno y es la responsable de la pigmentación directa, ya que actúa oxidando la melanina, produciendo el

bronceado inmediato y tardío de la piel, con o sin eritema. Asimismo, se le atribuye el fotoenvejecimiento, la fotosensibilidad cutánea y la inmunosupresión.

- La franja UVA I es menos eritematógena y melanógena que la franja UVA II. Esta última tiene efectos similares a la radiación UVB respecto a la inducción de reacción de quemadura solar, pigmentación y proliferación de melanocitos. Se encuentra, asimismo, en fuentes de luz artificial como las lámparas de vapor de mercurio y los fluorescentes. Se utilizan para fototerapia y fotoquimioterapia y tienen la capacidad de atravesar el cristal.

La puvaterapia, es decir, el uso de la combinación de psoralenos orales más radiación ultravioleta A (PUVA) se introdujo en 1974 en el tratamiento de varias patologías cutáneas, especialmente en psoriasis y linfomas cutáneos de células T. De modo que la pigmentación que solía presentarse en los pacientes, dio lugar al desarrollo de los centros de bronceado rápido con radiación UVA, que se utilizan con la finalidad cosmética de broncearse rápidamente. Se creyó no nocivo para la piel, aunque la experiencia ha demostrado que no es así (Torras, 2004).

Según Camacho (2001), con sólo dos semanas de exposición a RUV A, se producen las mismas alteraciones moleculares que en las personas con exposiciones frecuentes al sol, que pueden llevar al desarrollo del cáncer de piel (Whitmore, 2001), e incluso melanomas (Wang, 2001; Scherschun, 2001). Por eso se puede afirmar que no existe el "bronceado artificial seguro" puesto que, aunque las lámparas no emitieran RUV-B, 30 minutos de exposición a RUV-A equivalen a todo un día expuesto al Sol de la playa, según Hanke (2000).

Existen además otras razones para la protección frente a la RUV A según Camacho (2001):

- La cantidad de RUV A que alcanza la epidermis y la dermis es 20 veces mayor que la de RUV B, ya que no se filtra por la capa de ozono.
- La RUV A no se modifica por las condiciones ambientales.
- Como tienen mayor longitud de onda penetran más profundamente en la piel.
- No se bloquean, como la RUV B, por el cristal.

Todo ello lleva a la seguridad de que la RUV A juega un papel importante en el fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis. Se ha considerado que la radiación UVB es la única responsable del eritema por radiación ultravioleta (RUV). La radiación UVA también lo puede producir, aunque se requiere una dosis de 500 a 1.000 veces superior. El eritema provocado por RUV A es inmediato, y máximo al final de la exposición; sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que se forma. Parece que el ADN es el cromóforo mayor de las radiaciones UVB y UVC. Por tanto, el daño del ADN puede coincidir con el eritema.

- **La banda UV-B (290-320 μm):** es conocida también como radiación de la quemadura solar. A dosis moderadas estimula la formación de vitamina D, pero también causa eritema solar y desencadena la verdadera pigmentación de la piel con formación de melanina. Origina engrosamiento del estrato córneo,

disminución de la capacidad del sistema inmunológico y cáncer cutáneo. A nivel ocular produce irritación de la conjuntiva y la córnea. Está presente en fuentes artificiales de luz como las lámparas de vapor de mercurio. Es filtrada por el cristal, pero no por el cristal de cuarzo ni el agua.

La RUV B causa mutaciones en los oncogenes y genes supresores de tumores que pueden originar cáncer de piel: carcinomas basocelulares y espinocelulares; mientras que la RUV-A origina daño en el ADN mediante una reacción de fotosensibilidad que produce alteraciones cromosómicas, lo que daría lugar a citotoxicidad y carcinogénesis, que son la causa más importante de la presentación del melanoma, como ha sido demostrado en modelos animales y cultivo de células cutáneas humanas (Camacho, 2001).

- **La banda UV-C (100-290 μm):** es la de menor longitud de onda, se denomina también radiación germicida y está presente solo a gran altitud, pues afortunadamente es absorbida por la capa de ozono, ya que es letal para todos los seres vivos. Es eritematógena, mutagénica y carcinogénica en animales de experimentación. Al ser absorbida totalmente por la capa de ozono y filtrada por el oxígeno, no llega a la superficie terrestre. Sin embargo, se produce artificialmente y se encuentra en las lámparas de xenón y las de vapor de mercurio. Estas radiaciones son bloqueadas por el cristal de las ventanas. Por su poder germicida se utiliza en la esterilización bacteriana del aire. El personal que está en contacto con esta longitud de onda debe usar gafas de protección, porque produce irritación de la conjuntiva y la córnea. Provoca eritema visible en la piel después de 6 horas, y el bronceado que produce es suave.

Los **rayos Infrarrojos** corresponden a las radiaciones del espectro solar responsables del efecto calórico del sol y además aumentan la capacidad eritematogena de la radiación ultravioleta.

La **luz solar** produce daño cutáneo porque las radiaciones ultravioletas son absorbidas por el ADN, ARN, proteínas, lípidos de las membranas y organelas celulares de la epidermis y dermis, incluyendo el sistema vascular. Estos efectos de las radiaciones solares son acumulativos y dosis-dependiente, relacionados con la duración, frecuencia y calidad e intensidad de la radiación y conducen, como efecto inmediato, a la liberación de mediadores de la inflamación como la histamina, prostaglandinas y citocinas (Sánchez-Saldaña, 2002).

Los efectos biológicos de la radiación ultravioleta son provocados por la acumulación de energía en las células irradiadas, provocando la formación de radicales libres de oxígeno. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peroxilo ($R-OO\cdot$) se forman secuencialmente a partir del oxígeno (Benavente-García, 2002) y, si no son rápidamente inactivados, oxidan distintas moléculas (Benavente-García, 2002; Rithidech, 2005a; Alcaraz, 2009).

La radiación ionizante genera grandes cantidades de radical hidroxilo, muy reactivo y el más citotóxico, que, rápidamente, provoca la peroxidación de los lípidos (Alcaraz, 2009). A pesar de que, durante la vida de la célula, se generan grandes cantidades de estos mismos radicales en las distintas reacciones celulares, los ROS formados por el depósito de energía de la radiación ionizante se diferencian de los endógenos en su frecuencia de aparición y localización (Alcaraz, 2009).

En condiciones normales la célula está expuesta a la acción de los radicales, por lo que al mismo tiempo dispone de sistemas antioxidantes endógenos y enzimas capaces de reparar los daños. Sin embargo, en caso de la generación masiva de ROS, como ocurre a causa de la radiación ionizante, estos sistemas se saturan y el estrés oxidativo puede causar citotoxicidad radioinducida (daños cromosómicos y mutaciones) o, incluso, la muerte de la célula (Rithidech, 2005a).

La radiación ultravioleta, incluso a dosis bajas, es capaz de aumentar la actividad y la unión al DNA de NF- κ B en células hematopoyéticas y en distintas líneas tumorales (leucemia, cáncer de cabeza y cuello, mama, colon, próstata, etc.). (Garg, 2005; Kim, 2005a; Rithidech, 2005b; Brzoska, 2009). Este factor de crecimiento causa el incremento de la expresión de moléculas antiapoptóticas (Bcl-2), promoviendo parcialmente la resistencia a los efectos tóxicos de la radiación (Kim, 2005a; Watanabe, 2007). En el estudio de Kim, 2005a de tratamiento de células de cáncer de próstata con un inhibidor del proteasoma, bloqueó la degradación de I κ B y, por tanto, la actividad de NF- κ B, sensibilizándolas a la radiación.

El mecanismo de acción de este proceso parece ser multifactorial. Por un lado, las roturas que la radiación causa en el DNA disparan varias vías de señalización que convergen en la activación de NF- κ B; una de ellas está mediada por la quinasa mutada en ataxia telangiectasia (ATM), un activador de NF- κ B que, además, regula la actividad de proteínas reparadoras del DNA e implicadas en el ciclo celular (Bakkenist, 2003; Brzoska, 2009). La activación de ATM puede generar señales a favor de la supervivencia o a favor de la apoptosis, según la intensidad del daño genotóxico o los perfiles de expresión génica de la célula (Brzoska, 2009).

Por otro lado, los ROS formados por la radiación UV, oxidan los centros catalíticos de las fosfatasa celulares, modificando así, el equilibrio entre formas de receptores de membrana y quinasas citosólicas fosforiladas/defosforiladas (Kamata, 2005), lo que pone en marcha cascadas de señalización hacia el núcleo. Una de las más importantes, que implica la activación de quinasas como algunas MAPK o la quinasa inductora de NF- κ B (NIK), provoca la activación de ese factor de transcripción (Brzoska, 2009). Otra vía implica la translocación al núcleo, inducida por ROS, de ciertas proteínas, entre ellas IKK, que forman complejos con ATM (Wu, 2005; Wu, 2006; Wu, 2007); el complejo ATM-IKK vuelve al citoplasma, donde activa a NF- κ B. Asimismo, en ocasiones se generan cantidades de ROS suficientes como para que activen directamente a NF- κ B (Brzoska, 2009).

Los radicales libres, además de su importancia como causantes de daños celulares, han sido propuestos como activadores de distintas moléculas, como las caspasas, las MAPK y AP-1 (Brzoska, 2009). Debido a sus efectos sobre las cascadas de señalización mencionadas, la radiación ionizante causa la expresión de COX-2 y la consiguiente síntesis de PGE₂, lo que se ha relacionado con un aumento de la radiorresistencia (Tessner, 2004).

El exceso de radicales libres provoca una cascada de eventos que conlleva el deterioro progresivo de la estructura y función celulares, al oxidar distintas biomoléculas celulares. Una de las principales dianas es, de nuevo, el DNA; los ROS provocan rotura de hebras del DNA, entrecruzamientos de las proteínas asociadas, y la oxidación de las bases del DNA, fundamentalmente de la guanina, que da como resultado la

formación de 8-oxo-7,8-dihidroxi-2'deoxiguanina (8-oxo-dG), causante de mutaciones (Wilgus, 2003a; Svobodova, 2006; de Gruijl, 2008; Rundhaug, 2008).

Estos daños inducen la expresión de p53 y de p21, a través de las quinasas ATM, ATR, p38 y otras MAPK, en las 8-12 horas posteriores a la exposición; se detiene el ciclo celular para intentar reparar los daños genéticos y, si no es posible, la célula entra en apoptosis (Svobodova, 2006; Rundhaug, 2008). Sin embargo, las mutaciones o la pérdida del gen de p53, muy frecuentemente causadas por la radiación UV, eliminan este punto de control, aumentando la susceptibilidad de la piel a la fotocarcinogénesis (de Gruijl, 2008).

También el DNA mitocondrial sufre daños oxidativos; además, debido a la menor eficacia de los sistemas reparadores del orgánulo, acumula más mutaciones que el nuclear (Svobodova, 2006). Así, en la piel expuesta a RUV, se detecta con mayor frecuencia la delección de una zona del DNA mitocondrial, que contiene regiones codificantes de varios elementos de la cadena respiratoria. Este daño, además de afectar a la función mitocondrial, puede causar la acumulación de más ROS (Yaar, 2007).

Los ROS formados por la radiación UV, además, son capaces de atacar a las membranas celulares formando radicales lipoperoxilo y lipohidroperóxido, que también son especies reactivas y tienen una vida media mucho mayor (Nishigori, 2006; Svobodova, 2006; Bossi, 2008; Filip, 2009; Rhodes, 2009).. Oxidan los centros catalíticos de las fosfatasa celulares, entre ellas PTEN, alterando el equilibrio entre formas fosforiladas/defosforiladas de receptores y quinasas celulares (Yaar, 2007;

Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009). Esto causa la activación de los receptores de IL-1, TNF- α , insulina, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y EGF (Yaar, 2007); de las quinasas MAPK, PI3K / Akt (Mahns, 2004; Bachelor, 2005; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009; Huang, 2009), así como de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B (Reelfs, 2004; O'Dea, 2008; Brzoska, 2009). El AP-1, que es activado, además, por la liberación de ceramidas de las membranas oxidadas, aumenta la proliferación de queratinocitos, causando la hiperplasia epitelial típica del fotoenvejecimiento, e inhibe la síntesis de procolágeno de tipo I y III (Yaar, 2007).

La radiación UVA y UVB induce la expresión o activa a las enzimas del metabolismo del ácido araquidónico. Rhodes et al. (2009) han demostrado que, tras la exposición de piel humana a radiación UV, se produce una activación secuencial del metabolismo del ácido araquidónico. Así, a las 24 horas de la exposición, aumenta la expresión de COX-2, que sintetiza prostaglandinas vasodilatadores (E y F) en las 24-48 primeras horas, asociado al eritema.

La peroxidación lipídica activa la PLA2 (Bachelor, 2004). Los daños a las membranas, así como la activación de quinasas de señalización (Mahns, 2004; Bachelor, 2005; Kim, 2005a; Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009) aumentan la expresión de COX-2 (Mahns, 2004; Afaq, 2005; Bachelor, 2005; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Yaar, 2007; Harris, 2007b; Rundhaug, 2008), así como tras una exposición aguda a UV, sobre todo en la capa basal, causando un aumento de la proliferación y apoptosis de los queratinocitos (An, 2002; Tripp, 2003; Rundhaug, 2008).

El incremento de la incidencia del cáncer cutáneo, cuyo tratamiento supone un coste anual de unos 2900 millones de dólares en EEUU según Sharma, 2010, así como el interés de la sociedad de luchar contra el envejecimiento cutáneo, un mercado que movió unos 10.000 millones de dólares según Yaar, 2007, ha estimulado la investigación. En 1894 se estableció la relación entre la exposición solar y el cáncer de piel y, desde entonces, se ha identificado la radiación UV como el principal factor etiológico de los carcinomas cutáneos, responsable del 90% de estos tumores (Filip, 2009), además de provocar, aproximadamente, tres millones de casos de cataratas al año en todo el mundo (González, 2008). La radiación UV es un carcinógeno completo que causa eritema, edema, quemaduras, engrosamiento de la piel y aumento de la pigmentación tras exposiciones agudas e inmunosupresión, envejecimiento prematuro y carcinomas si la exposición es crónica (Filip, 2009; Nichols, 2010).

De ahí que la fotoprotección y la quimioprevención se hayan constituido en elementos profilácticos y terapéuticos esenciales en la lucha contra el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis (González, 2008; Filip, 2009), por lo que existe un enorme interés por el desarrollo y comercialización de nuevos compuestos fotoprotectores.

C. FOTOPROTECCIÓN

Aunque parece lógico pensar que la mejor protección solar correspondería a evitar la exposición al sol, la conclusión no puede ser evitar totalmente el sol, sino al contrario y en lo que existe consenso universal, lo que se debe hacer es practicar la denominada fotoprotección, puesto que el exceso de radiaciones solares provoca la presentación tanto de lesiones precancerosas como del cáncer de piel, especialmente en personas de edad media y avanzada, de piel clara, que han vivido y trabajado en climas soleados, aunque esta denominada "dermatoheliosis" se produce también en personas jóvenes que se exponen excesivamente al sol, sin protección, o a fuentes de luz ultravioleta artificiales para conseguir un bronceado rápido, lo que ocurría hasta hace poco mas frecuentemente en mujeres jóvenes (Camacho, 2001). De este modo durante las últimas décadas, la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la intermitente o de tipo recreativo.

La **FOTOPROTECCIÓN** está centrada en el uso de fotoprotectores, sustancias en cuya composición se incluyen filtros solares, que cumplen la misión de prevenir los daños causados por la radiación solar, lo que además, permite el proceso natural del bronceado, evitando sus riesgos y secuelas. Los principios generales de la fotoprotección corresponden a:

- **Absorción y disminución de la transmisión de RUV:** se realiza en el estrato córneo, mediante el uso de sustancias químicas absorbentes de RUV B (290-320 μm) y RUV A (320- 400 μm).

- **Aumento de la dispersión de RUV:** se produce en el estrato córneo y la epidermis, mediante el uso tópico de partículas micronizadas de dióxido de titanio, óxido de zinc o melanina.
- **Inactivación de los radicales libres** y formas reactivas de oxígeno: se producen en las células viables de la epidermis y dermis. Son inhibidos por antioxidantes y supresores de radicales libres. Al contrario de lo que sucede con los anteriores, este tipo de fotoprotección es de efectividad variable.
- **Bloqueo físico de los RUV:** se produce en la superficie cutánea y se realiza mediante sombrillas, sombreros y vestidos de nilón, poliéster y algodón, con efectividad de buena a excelente.

Existen diferentes tipos de fotoprotectores en función del tipo de filtro y su mecanismo de acción (Montero, 2008):

Químicos: los filtros solares más usados son los químicos u orgánicos. Sustancias de síntesis que actúan como cromóforos absorbiendo la energía transportada por un fotón incidente; posteriormente, las moléculas vuelven a su estado inicial, liberando el exceso de energía en forma de calor imperceptible, radiación fluorescente o transformación química en un isómero o fotoproducto potencialmente reactivo.

Cada filtro químico tiene un espectro de absorción determinado. Los filtros que absorben predominantemente la RUV B son los que se utilizan

con mayor frecuencia: PABA, octo-crylene, homosalate, 4-methylbenzylidene, camphor, ethylhexyl methoxycinnamate, phenylbenzimidazole sulfonic acid, etc. El espectro de absorción de otros filtros, que se emplean en combinación con los anteriores y que los están sustituyendo progresivamente en el mercado, incluye tanto la RUV B como la RUV A (con un pico de absorción en este rango): benzophenone-3, butylmethoxy-dibenzoyl met-hane, terephthalydene dicamphor sulfonic acid, drometrizole trisiloxane, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb® S), methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (Tinosorb® M), entre otros.

Físicos: o pantallas físicas, son polvos inorgánicos inertes, formados por pequeñas partículas de 180-190 μm de diámetro, compuestas por dióxido de titanio, óxido de zinc, óxido de hierro, óxido de magnesio, mica o talco. Actúan reflejando todas las radiaciones solares con independencia de su longitud de onda. Estas pantallas presentan el inconveniente de formar una máscara blanca, especialmente inestética a concentraciones superiores al 5%. La reflexión de la luz visible es menor en las formas micronizadas o ultrafinas, en las que el diámetro de las partículas varía entre 20 y 50 μm , lo que les confiere un aspecto más transparente, mejorando asimismo sus propiedades cosméticas. Son eficaces tanto para la radiación ultravioleta como para los rayos infrarrojos (Sánchez-Saldaña, 2002).

Biológicos: son sustancias que penetran los tejidos y refuerzan las células para que se defiendan mejor de la radiación. Tienen actividad antioxidante y, aplicadas tópicamente, disminuyen el estrés oxidativo inducido por la RUV. Potencian la protección de los filtros solares

convencionales, y disminuyen el daño celular. Entre estos, se encuentran sustancias que, como diversas vitaminas, presentan actividad antioxidante directa. Sin embargo, también existen otras sustancias que ejercen esta actividad antioxidante a través de su capacidad quelante del hierro (diferentes flavonoides) y sustancias que aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes de la piel (algunos oligoelementos). Estos filtros han demostrado su eficacia frente a los efectos de las RUV, pues son antioxidantes que evitan la formación de radicales libres y potencian el subsistema inmunológico cutáneo. Se están utilizando cada vez con más profusión, siendo las vitaminas A y E las más utilizadas en forma de palmitato o acetato, así como la vitamina C en sus diferentes variedades.

Administrados sistémicamente, los filtros biológicos tienen la ventaja de proporcionar una protección basal beneficiosa y permanente, que actúa independientemente del uso de la fotoprotección tópica. Constituyen una reserva antioxidante que protege a medida que la fotoexposición va agotando los antioxidantes naturales de la piel. Además evitan los problemas inherentes a la fotoprotección tópica, como la aplicación insuficiente de producto, poco respeto a los tiempos de reaplicación o la influencia del roce, agua o sudor. En ningún caso sustituyen a los fotoprotectores tópicos, sino que los complementan.

Organominerales: parecen representar el futuro de la “fotoprotección total”. Se trata de filtros capaces de actuar tanto por absorción como por reflexión e incluso, por una combinación de ambos: dispersión o scattering. Son filtros químicos pero insolubles, con lo que adquieren a la vez, las ventajas de los químicos (cosmeticidad) y de los

físicos (seguridad), siendo además de gran capacidad filtrante en el UVA (derivados del benzotriazol (Tinosorb® M).

De la combinación de estos tipos de filtros se puede obtener un fotoprotector cuya capacidad protectora viene determinada por el Factor de Protección Solar (FPS). La actual definición del factor de protección solar, en la que están basados la totalidad de los métodos de evaluación conocidos se fundamenta en los trabajos de Schulze (Montero, 2008) quien en 1956, definió el FPS como la relación entre la mínima dosis eritemática (MED) de la piel protegida con el producto y sin él, a las 24 horas de someterse a la irradiación (Schulze, 1956). Es un índice que da idea del tiempo que se puede permanecer expuesto al sol sin riesgo de quemadura. Algunos autores prefieren el término factor de protección, debido a que en su cálculo sólo se considera la respuesta eritemática (es decir, la respuesta a RUV B) a las 24 horas (Pons, 1995).

Los protectores solares no evitan el daño solar, ya que se ha demostrado que las dosis suberitematosas de RUV causan una variedad de cambios moleculares (incluyendo daños en el ADN) en estas células. No obstante, el espectro de la RUV que llega a las células viables, se ve alterado por el protector solar aplicado tópicamente. Aunque no puede haber duda acerca de la eficacia de los protectores solares para la prevención del eritema, se plantea la cuestión de los posibles efectos acumulativos de dosis suberitematosas crónicas y el aumento de la exposición de las células de la piel para las longitudes de onda más largas de RUV. El reto principal de los protectores solares, tiene que ver con su capacidad de proteger las células contra los efectos de la radiación UVA. Estos efectos pueden ser los daños directos (oxidaciones de bases) o los

efectos sobre el sistema inmunológico de la piel; sin embargo, no existe un método aceptado de manera uniforme para la evaluación de la protección a RUV-A (Gasparro, 2010).

Los recientes avances tecnológicos han producido una nueva generación de filtros solares UVA estables de espectro completo, que usados con regularidad pueden reducir el riesgo de fotoenvejecimiento y cáncer cutáneo (Thomas, 2013), tales como el Avobenzona que es, probablemente, el fotoprotector con el más amplio y eficaz espectro frente a RUV A. Sin embargo es inestable cuando se expone a la luz solar.

Para la elección del fotoprotector más adecuado se deben tener en cuenta varios factores:

- **Individuales:** fototipo cutáneo (Fitzpatrick), edad, situaciones especiales (embarazo, patologías, tratamientos farmacológicos, antecedentes familiares de melanoma, etc.).
- **Medioambientales:**
 - **Latitud:** en el ecuador los rayos inciden sobre la Tierra de forma perpendicular, la radiación será más intensa al acercarse a los polos.
 - **Altitud:** a mayor altitud más intensidad de radiación.
 - **Estación del año:** en verano se está más cerca del sol por tanto la radiación es mayor.

- **Climatología:** las nubes dejan pasar el 90 % de la RUV pero no IR; aunque desaparece el efecto calórico, hay que seguir las normas básicas de la fotoprotección, aun en días nublados.
- **Reflexión:** el agua, la nieve y la arena reflejan la radiación solar por lo que a la radiación habrá que sumar la reflejada.
- **Dependientes del producto:** como crema, loción, gel, gel-crema, stick, spray, dry-oil, espuma, compacto) y además influirán otros aspectos como su inocuidad, estabilidad, resistencia y acción prolongada (water-resistant, waterproof y sweatproof). Pero sobre todo, lo más importante es elegir el fotoprotector que asegure una buena absorción de las radiaciones nocivas a las que se vaya a exponer.

La protección proporcionada por la protección solar se relaciona además de la correcta selección del fotoprotector también con la cantidad del producto aplicado. La aplicación de una cantidad adecuada de protector solar es, con mucho, el factor más importante en su eficacia (Thomas, 2013). El factor de protección solar de los filtros solares se estudia usando un espesor de 2 mg/cm^2 . Se ha demostrado que una nueva aplicación o el uso de un FPS muy alto (70-100) pueden compensar, en parte, la discrepancia entre la cantidad de protector solar aplicado durante la prueba y el necesario en realidad así como que la aplicación de protección solar puede ser mejorada con la educación de los consumidores (Petersen, 2013)

Sustancias con propiedades fotoprotectoras: a lo largo de la historia, se han ido desarrollando nuevas “fórmulas” que ayuden a retrasar o mejorar la importancia de los problemas estéticos que ocurren durante el proceso del envejecimiento. Se puede actuar a nivel tópico, aplicando sustancias activas antiglicantes y antioxidantes que consigan disminuir de forma significativa el acúmulo de sustancias tóxicas, para devolver la funcionalidad a la piel y contribuir a romper y frenar el tan temido proceso del envejecimiento cutáneo (Prieto, 2010).

En 1950, Harman fue el primero en proponer la “Teoría del envejecimiento celular inducido por radicales libres”. Desde entonces, el desarrollo de productos farmacéuticos que los contienen, principalmente enfocados hacia el tratamiento del envejecimiento cutáneo, ha sufrido un crecimiento acelerado y numerosos estudios han demostrado sus efectos benéficos respecto a su capacidad fotoprotectora y anticarcinogénica (Ramos, 2010).

Los principales activos empleados en las fórmulas antienvjecimiento han sido según Pons, 2008: antioxidantes y secuestradores de radicales libres, quelantes de iones ferrosos, regeneradores y reparadores, enzimas y antienzimas, protectores inmunológicos, activos antiglicosilación, aceites esenciales hidratantes, y otros fotoprotectores. Recientemente se han comercializado fotoprotectores orales que contienen distintos principios activos, principalmente antioxidantes, que pueden regenerar la capacidad antioxidante del organismo perdida por la exposición solar.

Los antioxidantes se han utilizado durante siglos en las culturas antiguas y modernas para las diversas enfermedades.

Los antioxidantes son sustancias que pueden proteger del estrés oxidativo endógeno y exógeno al eliminar los radicales libres. La mezcla de antioxidantes de vitamina C, vitamina E, pycnogenol y aceite de onagra inhibe significativamente la formación de arrugas por RUV B crónica, a través de una inhibición significativa de la actividad de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y aumento de la síntesis de colágeno (Cho, 2007). Asimismo se comercializan antioxidantes tópicos para prevenir daño en la piel inducido por RUV y el envejecimiento, así como para tratar las arrugas y el eritema debido a la inflamación (Allemann, 2009).

La formulación se basa principalmente en la utilización del bloqueador del primer radical de oxígeno superóxido dismutasa (SOD), que se forma en el tejido cutáneo y actúa sobre el radical superóxido, convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La formulación de los antioxidantes administrados tópicamente deben cumplir dos requisitos:

1. El producto debe ser estable, ya que los antioxidantes pueden oxidarse e inactivarse antes de llegar al órgano diana.
2. Deben ser adecuadamente absorbidos por la piel, llegar a su objetivo en la forma activa y permanecer allí el tiempo suficiente para poder ejercer los efectos deseados.

En este sentido, es importante tener en cuenta también los productos o moléculas con propiedades antioxidantes, que pueden ser utilizadas como ingredientes cosméticos anti envejecimiento.

Estos compuestos incluyen, mezclas de vitaminas antioxidantes, el licopeno, extractos vegetales ricos en polifenoles (extractos de *Polypodium leucotomos* o de té verde) y de flavonoides, como la genisteína, que combinan la acción antioxidante con la antiinflamatoria (González, 2008).

Además, es bien conocido que la administración tópica de antioxidantes (formulaciones con vitamina C) que puede obtenerse a partir de alimentos como las frutas cítricas en las que predomina en su forma reducida, el ácido ascórbico, han demostrado efectos beneficiosos en la prevención de los daños solares mediante la reducción de células de quemaduras solares y la disminución de eritema por RUV A y RUV B. La adición de vitamina C tópica a cualquier protector solar, frente a RUV A o RUV B, ha demostrado asimismo mejora en la protección al sol y ser útil para secuestrar las especies oxidativas inducida por la radiación ultravioleta (Allemann, 2009). En un trabajo en humanos, los polifenoles del té verde redujeron el edema y la infiltración leucocitaria inducidos por la radiación UV (Nichols, 2010).

El grupo más importante corresponde al formado por los antioxidantes fenólicos, como son el α -tocoferol o vitamina E y sus derivados, como acetato de tocoferol, nicotinato de tocoferol, acetyl salicilato de tocoferol, dioleil tocoferil metil silanol, tocoferil ascorbil fosfato, liposomas cargados con α -tocoferol y ácido úrico. De igual forma, cabe destacar la importancia antioxidante de diversos flavonoides extraídos del mundo vegetal, como son la rutina, miricetina, kaempferol y quercetina, entre otros. E incluso dentro de este grupo, extractos vegetales, como *Mimosa tenuiflora*, *Silybum marinum*, *Medulat prele*, *Medulat auberpine* y la vitamina C y sus derivados, como el palmitato de ascorbilo, linoleato de

ascorbilo, ácido ascórbico oxietileno, que son obtenidos para una mejor estabilidad de la mencionada vitamina C.

El **licopeno**, un carotenoide que se encuentra en las frutas rojas y en algunos vegetales bajo la piel, siendo responsable de su color rojo. Es un poderoso antioxidante que reduce la peroxidación lipídica, evita el eritema causado por la radiación UV en la piel, así como aumenta la protección a corto plazo (quemaduras solares) y los efectos acumulativos de la exposición al sol (Goswami, 2013) tienen efecto protector frente a la radiación RUV (Pinnell, 2003).

También es frecuente la utilización de una coenzima de la cadena respiratoria, la ubiquinona **coenzima Q10**, cuya aplicación tópica produce un potente efecto antieritematogénico capaz de reducir la formación de radicales libres. Para ciertos formuladores parece ser mucho más interesante la incorporación a las fórmulas cosméticas de ingredientes que posean una actividad antielastasa y antihialuronidasa (en el caso de este último, se utiliza el extracto de vid y el extracto de mimosa tenuiflora a dosis comprendidas entre 3 y 5%) (McDaniel, 2005; Allemann, 2009).

Asimismo, se ha investigado ampliamente el uso de polifenoles (polifenoles del té verde, resveratrol, curcumina, genisteína, silimarina, quercetina, apigenina, etc.) como fotoprotectores tópicos (Yaar, 2007; González, 2008). Numerosos compuestos vegetales han demostrado proteger frente a los daños causados por RUV B, entre ellos el resveratrol, los ácidos cafeico y ferúlico, la apigenina, la genisteína, la quercetina, el EGCG, la epicatequina, la silibina, y la silimarina (extracto de *Sylibum marianum*) y extractos de *Ginkgo biloba*, *Polypodium leucotomos* o *Prunella vulgaris*. Sin embargo, solamente unos pocos (ácido carnósico,

quercetina, epicatequina, EGCG, silimarina, extractos de *P. leucotomos* o *P. vulgaris*) parecen proteger frente a RUV A (Svobodova, 2006).

El **té verde** es una bebida muy popular, así como un antioxidante, que se extrae de la planta *Camellia Sinensis*. Existen 4 catequinas polifenólicas principales, de las cuales, la 3-galato epigalocatequina (EGCG) es la más abundante y biológicamente activa. GTP se puede administrar bien por vía oral o tópica. Con diversos estudios “in Vitro” e “in vivo”, el té verde es probablemente el antioxidante más estudiado (Afac, 2006). Los polifenoles del té verde (GTP) no sólo poseen actividad antioxidante, sino que también actúan como agentes antiinflamatorios y anticancerígenos. Así, en aplicación tópica, los GTP han demostrado que suprimen la quimio y la fotocarcinogénesis en ratones y que contribuyen a evitar el daño oxidativo inducido por RUV y la inducción de la matriz de las metaloproteinasas. Como con la mayoría de los antioxidantes, no existen ensayos clínicos controlados y la concentración de fenoles en los diferentes productos no está estandarizada. A pesar de esto, existen en el mercado distintos tipos de formulaciones cosméticas según su forma farmacéutica o galénica (Wang, 1991). En un trabajo en humanos, los polifenoles del té verde redujeron el edema y la infiltración leucocitaria inducidos por la radiación UV (Nichols, 2010).

La **Silimarina** es un flavonoide polifenólico natural derivado de la planta del cardo mariano, *Silybum Marianum*. Su componente principal silibina (silibinina) se considera la más activa biológicamente, con potentes propiedades antioxidantes. Diversos estudios han demostrado efectos fotoprotectores al aplicarla tópicamente, antes o inmediatamente después de la radiación UV, por lo que parece razonable incluirla entre los protectores solares (Allemann, 2009)

CoffeeBerry® (FutureCeuticals VDF) es el nombre propio para un antioxidante extraído del café arábica *Coffea*. Se ha demostrado que es un antioxidante más fuerte que el té verde, extracto de granada, vitaminas C y E.41. Contiene polifenoles bien conocidos por sus propiedades antioxidantes. En 2007, fue lanzado un producto que contiene polifenoles CoffeeBerry® 1% (Revaléskin TM, Laboratorios)

El **resveratrol** es un compuesto antioxidante polifenólico que se encuentra en las uvas, nueces, frutas y vino tinto, entre otros. Estudios “in vitro e in vivo” han demostrado que, cuando se aplica tópicamente, el resveratrol protege contra el daño cutáneo, e inhibe el estrés oxidativo mediados por RUV B. No obstante, no existe demostración científica de sus efectos sobre la piel humana y el fotoenvejecimiento, aunque se incluye en algunos productos que dicen tener beneficios antienvjecimiento (Afac, 2006).

Las **semillas de uva** (*Vitis Vinifera*), son ricas en proantocianidinas, potentes antioxidantes, pertenecientes a la familia de los flavonoides. Presentan fuerte poder inhibidor de radicales libres, más incluso que las vitaminas C y E. Mittal, et al. (2003), sugirieron un posible mecanismo antioxidante de la fotoprotección de las proantocianidinas de semillas de uva (SGP), que han demostrado su capacidad de inhibir la deplección de los componentes antioxidantes que induce la radiación de UVB.

Los **extractos de granada** (*Punica Granatum*), en concreto los componentes fenólicos, tienen potente actividad antioxidante. La aplicación tópica del extracto de cáscara in vivo, demostró su capacidad de restaurar las actividades enzimáticas de la catalasa, peroxidasa y superóxido

dismutasa. “In vitro”, el extracto de fruta ha demostrado mejorar el daño mediado por RUV A y proteger contra los efectos adversos de la radiación RUV B. El extracto de granada está disponible en diversos productos de cuidado de la piel (Afac, 2006), ha demostrado que su incorporación a fórmulas fotoprotectoras mejora el daño de las quemaduras solares (Goswami, 2013, Pacheco- Palencia, 2008)

La **genisteína** es una isoflavona derivada de la soja con capacidad para inhibir el daño oxidativo de ADN inducido por RUV. La genisteína, ya sea aplicada por vía tópica o suplementada por vía oral, ha demostrado proteger eficazmente la piel humana contra el fotodaño inducido en la piel por RUV-B. Se incluye en diversos productos como cremas hidratantes faciales, protectores solares y otras formulaciones de cuidado de piel que pretenden proveer efectos antienvjecimiento (Afac, 2006).

El **Pycnogenol®** es el nombre de un extracto estandarizado extraído de la corteza del pino marítimo francés (*Pinus Pinaster*). Su uso terapéutico ya fue descrito en el Siglo IV, y usado desde Hipócrates en enfermedades inflamatorias, así como para la cicatrización de heridas. Posee una acción antirradicales libres muy potente, pues más del 65% de sus componentes son polifenoles y procianidinas, aunque el mayor componente son las catequinas (Prieto, 2010).

Las hojas de **Aloe Vera** y *A. Barbadensis* son el origen del gel de aloe, que se utiliza ampliamente en cosmética para hidratación y revitalización. Bloquea los rayos UVA y UVB. La bradiquiinasa es la enzima que detiene las quemaduras de sol al estimular la intervención del sistema inmune, por lo que puede actuar como un filtro solar (Goswami, 2013).

Los **Aceites esenciales** son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y de ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Un aceite esencial está constituido por cientos de sustancias distintas. Generalmente los componentes mayoritarios son hidrocarburos terpénicos (sin aroma o con poco aroma) y los minoritarios son los responsables del aroma característico del aceite esencial y quedan englobados en distintas familias químicas. Estos son: hidrocarburos terpénicos, aldehídos, ácidos (acético, palmítico), alcoholes (linalol, geraniol, mentol); fenoles, ésteres, cetonas y otros componentes (como éteres, derivados nitrogenados, sulfuros, tioéteres, tioésteres). En menor concentración se encuentran sustancias químicas volátiles, responsables principales del aroma global del aceite esencial.

Otros componentes del aceite esencial no están relacionados con su aroma (ceras, ácidos, etc.), pero sí pueden tener su importancia para determinadas aplicaciones y pueden actuar como conservantes, antibióticos o fijadores del aroma en el aceite esencial. Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con aroma propio e incluso “virtudes curativas únicas” (Goswami, 2013).

D. ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD Y GENOPROTECCIÓN.

Entre los métodos utilizados se encuentra el denominado **ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**:

Los micronúcleos se han definido como estructuras o cuerpos pequeños y redondos, inmersos en el citoplasma y visiblemente separados del núcleo celular. Dichos cuerpos son similares al núcleo en cuanto a su forma, estructura y características de coloración (Almassy, 1987) y se denominan así por su reducido tamaño en comparación con el del núcleo.

Las primeras observaciones de cuerpos intracitoplasmáticos de material nuclear, atribuidos a daño cromosómico inducido por la radiación, se describieron hace varias décadas en el esperma de ratón y en células meristemáticas de la raíz de algunas plantas (Thoday, 1951). Posteriormente, se han descrito también en hematología como cuerpos de Howell-Jolly, o gránulos esféricos, en el interior de los eritrocitos policromatófilos, de origen nuclear, secundarios al daño cromosómico.

Los micronúcleos pueden originarse de fragmentos acéntricos, que no pueden incorporarse a los núcleos hijos durante la división celular por carecer de centrómero (Sasaki y Norman, 1966; Heddle y Carrano, 1977), pero también pueden estar formados por cromosomas completos que quedan fuera del núcleo durante la mitosis, por un fallo en el eje mitótico o por configuraciones complejas de cromosomas que causan problemas durante la anafase (Schmid, 1975, 1976).

Actualmente, se considera que la formación de micronúcleos, puede inducirse por agentes clastogénicos o por inhibidores mitóticos. El tamaño del micronúcleo se ha utilizado para conocer su origen, de forma que la mayoría de micronúcleos inducidos por agentes clastogénicos, son generalmente más pequeños que aquellos inducidos por tóxicos del eje mitótico (Yamamoto y Kikuchi, 1980; Valadaud-Barrieu, 1983).

Pincu (1984) estimó que el 80% de micronúcleos en linfocitos irradiados con radiación gamma, tienen un contenido de DNA menor del 5 % del contenido del núcleo en la interfase, lo que implicaría, para algunos autores, un origen de fragmentos acéntricos. Los restantes micronúcleos, con un contenido de DNA entre el 6-20 % del contenido del núcleo principal, se supone que se han originado principalmente como resultado de defectos en el eje mitótico. La mayoría de los micronúcleos pueden originarse del DNA durante la fase S (Nusse y Kramer, 1984; Pincu, 1984) y aunque lo pueden hacer, incluso cuando el núcleo principal no esté en la fase S (Obe, 1975; Pincu, 1984). El tamaño de los micronúcleos inducidos por radiación ionizante se encuentra fundamentalmente en los de tamaño más pequeño ($6-12 \mu\text{m}^2$) (Hogstedt y Karlsson, 1985).

Debido a su origen, el número de micronúcleos es dependiente directamente de la proliferación celular. De tal forma que aparecen hacia el final de la primera división mitótica, tras la exposición a la radiación, aunque el mayor número puede aparecer en las siguientes divisiones y acumularse en el citoplasma durante un cierto periodo de tiempo. Después se observa un descenso rápido de la frecuencia de micronúcleos, debido sobre todo a la muerte de las células aberrantes, así como a la dilución de las células micronucleadas con el resto de células normales. La producción radioinducida de micronúcleos la describió por primera vez Evans, 1959,

en células de raíz de habas irradiadas con radiación gamma y neutrones rápidos. Sin embargo, la utilidad de los micronúcleos para comprobar el efecto mutágeno de algunas sustancias la propuso Schroeder, 1970, mucho más tarde, mediante el recuento de anomalías nucleares en la médula ósea de roedores, para detectar el daño inducido "in vivo" (test de anomalía nuclear).

Posteriormente, diversos estudios han desarrollado el test de micronúcleos para frotis de médula ósea (Schmid y cols., 1971; Ledebur y Schmid, 1973; Heddle, 1973). Desde entonces se ha utilizado en ensayos "in vivo" de gran variedad de agentes químicos y físicos, para conocer su capacidad mutágena. La técnica se basa en el recuento de micronúcleos en el eritrocito policromatófilo (eritrocito joven de la médula ósea, que ha expulsado el núcleo principal, sin llegar a expulsar los restos nucleares con micronúcleos (Schmid, 1975). Este método se extendió posteriormente a los reticulocitos que circulan en sangre periférica, donde resulta tan sensible como el realizado en médula ósea, al mismo tiempo que muestra algunas ventajas tales como su mayor simplicidad, junto a la posibilidad de repetición, al no precisar el sacrificio de los animales para su realización (Macgregor y cols., 1980). Sin embargo, la menor vida media de los reticulocitos respecto a los linfocitos, limita su utilización como indicador de exposiciones crónicas de baja intensidad, por lo que el test de micronúcleos en linfocitos se puede aplicar en diversos tipos de exposiciones (Stopper y cols. 2005).

Countryman y Heddle en 1976 describieron el método de detección de micronúcleos en linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica, que rápidamente se aplicó en estudios "in vitro" e "in vivo" de poblaciones humanas sometidas a agentes peligrosos, tóxicos o mutágenos.

Otro test de micronúcleos útil fue desarrollado para estudios animales de células epiteliales del colon como células diana para cánceres intestinales (Heddle y cols, 1982). Desde entonces el test de los micronúcleos, con múltiples variantes, se ha utilizado con éxito en gran variedad de células en cultivo, como por ejemplo, en células exfoliadas de la mucosa bucal, para estudios humanos de exposiciones "in vivo" a agentes asociados con la inducción de cáncer de la cavidad oral (Stich y cols, 1982; Stich y Rosin, 1983).

En un estudio realizado por Watanabe (2004) en pacientes sometidos a tratamiento con I131, se objetivó una mayor sensibilidad en la detección del daño citogenético inducido por la radiación, utilizando el test de micronúcleos específico en linfocitos B, con respecto al test de micronúcleos en linfocitos utilizado habitualmente. Para la realización de este test, fue necesario el aislamiento de los linfocitos B con técnicas inmunomagnéticas.

Cronológicamente, se han desarrollado técnicas con citoplasma destruido (Huber y cols., 1983; Hogstedt, 1984), con citoplasma conservado (Almassy y cols., 1987), técnicas de estimulación con Bromiouridina (Pincu y cols., 1984) y posteriormente con Cytochalasina B (bloqueo citocinético), en donde se estudian los micronúcleos que aparecen solo tras la primera división celular (Fenech y Morley, 1985a; Huber y cols., 1983), habiéndose utilizado todos para determinar y cuantificar el efecto tóxico de diferentes agentes químicos y físicos sobre el material genético (Floyd y Cassoni, 1994).

Ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre humana: ante los problemas que presentaba el test de micronúcleos en médula ósea de ratón, surgió la idea de realizar este test en linfocitos de sangre periférica humana (Countryman y Heddle, 1976), en lugar de en eritrocitos policromatófilos de médula ósea. Esta variación presentó mayores ventajas, como una mayor simplicidad y posibilidad de repetición con un menor esfuerzo. No obstante, desde que fue descrita, la técnica ha sufrido una serie de modificaciones:

a.- Cultivo de linfocitos con citoplasma destruido: Countryman y Heddle proponen por primera vez en 1976 un método para la demostración de micronúcleos inducidos por radiación, en preparaciones de cultivos de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica. Debido al tratamiento hipotónico al que se sometían las células, esta técnica producía principalmente núcleos linfoblásticos sin citoplasma reconocible. Ante esto, los micronúcleos se encontraban más o menos separados del núcleo y para establecer la asociación entre los micronúcleos y los núcleos principales se adoptaron criterios auxiliares, como el de que los micronúcleos deberían estar situados a una distancia máxima de 3-4 veces el diámetro nuclear. Se observó también que la frecuencia de micronúcleos aumentaba conforme se elevaba el tiempo de cultivo, obteniéndose el máximo recuento de micronúcleos a las 84 o 96 horas de comienzo, estableciéndose este momento como el idóneo para realizar la determinación de su número.

b.- Cultivo de linfocitos con citoplasma conservado: con el método tradicional de preparación de los linfocitos, el citoplasma se destruye durante el tratamiento hipotónico, pero en 1979, Iskander presentó un método que preservaba el citoplasma cambiando la presión osmótica de

la solución hipotónica de 77 mosmoles (utilizada en las técnicas convencionales) por otra de 285 mosmoles, casi la concentración de una solución isotónica. Huber en 1983 utilizaron 200 mosmoles con enfriamiento de células fijadas al portaobjetos que conserva el citoplasma y permite identificar los micronúcleos, su distribución celular (Huber y cols., 1983) y asociación con la célula que lo ha producido.

Los micronúcleos corresponden a fragmentos acéntricos, o cromosomas que no se incorporaron al núcleo hijo durante la mitosis, esto indica que la expresión de micronúcleos es altamente dependiente de la cinética de reproducción celular. La proporción de linfocitos que se dividen en cultivo depende, no solo de la respuesta a agentes mutágenos, sino también de variaciones interindividuales e intraindividuales. Por tanto, la estandarización del tiempo de cultivo, para obtener una respuesta máxima después del tratamiento clastogénico, es muy difícil. Para superar esta dificultad se desarrolló el procedimiento modificado de coloración denominado "arlequín" (Huber y Eauchinger, 1990).

c.- Procedimiento modificado de coloración arlequín: Pincu (1984) modificó la técnica FPG de coloración arlequín (Perry y Wolff, 1974), que facilita la identificación de los linfocitos proliferantes, con los núcleos de color azul, y los no proliferantes con núcleos rojos. Los micronúcleos sólo se cuentan en las células con núcleos azules.

d.- Cultivo celular de linfocitos: en general, los linfocitos de sangre periférica son un indicador o sustrato sensible al daño cromosómico radioinducido. Su utilización, según Evans y O'Riordan (1975), tiene diversas ventajas:

- La mayoría de los linfocitos circulantes están en fase de reposo G₀ o G₁ del ciclo celular, y presentan en el momento de la exposición, una población celular sincrónica.
- Los linfocitos de sangre periférica tienen un periodo de vida largo, 3 años (DOLPHIN, 1973); esto junto con la falta de proliferación "in vivo", permite que el daño no reparado permanezca almacenado hasta que las células sean estimuladas para dividirse en cultivos celulares "in vitro" y, en cierta forma, constituyen "la memoria" del daño radioinducido.
- Las muestras de sangre pueden obtenerse de forma fácil y repetida en sujetos expuestos, así como transportadas y almacenadas fácilmente. Sólo se necesitan unas gotas de sangre para un análisis y el experimento de micronúcleos puede realizarse con poca cantidad de sangre por cultivo (0,1-1 ml) según el procedimiento utilizado (Countryman y Heddle, 1977a), siendo el cultivo de linfocitos a partir de sangre totalidóneo en los estudios de dosimetría biológica (IAEA, 2001).
- En cultivo, los linfocitos de sangre periférica pueden ser estimulados fácilmente a dividirse, por lo que son una fuente excelente de células en mitosis.
- Además, los linfocitos de sangre periférica inducidos a multiplicarse, no representan una población celular uniforme,

sino, una mezcla de varias subpoblaciones, fácilmente distinguibles, que difieren en sus respuestas a mitógenos, la cinética de proliferación, y respuesta a mutágenos.

- El mitógeno más comúnmente utilizado, la fitohemaglutinina, estimula a los linfocitos, que en su mayoría son Linfocitos T, y su respuesta es fácilmente influenciada por reacciones inmunológicas que pueden variar según algunas características del donante.

e.- Conservación del citoplasma celular: la posibilidad de detección e identificación de los micronúcleos, es más precisa si se realiza en células que mantienen su citoplasma intacto, que se denomina habitualmente como "citoplasma conservado" (Hogstedt, 1984). Esta conservación se consigue utilizando una solución de cloruro potásico (KCl) de 285 miliosmoles, que es más suave que la solución hipotónica de 77 miliosmoles utilizada comúnmente (Iskander, 1979). La conservación del citoplasma elimina los problemas previos entre la ubicación o distribución de los micronúcleos con sus núcleos maternos, que hasta entonces se realizaba en base a la distancia entre los dos.

f.- Técnicas de coloración utilizadas: las características de tinción de los micronúcleos son similares a las del núcleo principal de la célula.

Las preparaciones de linfocitos para el análisis de micronúcleos se han teñido tradicionalmente con Giemsa, con lo que el micronúcleo tiene el mismo color o ligeramente más claro que el núcleo principal (Countryman

y cols 1976). En ocasiones, los micronúcleos pueden confundirse con otras partículas intracitoplasmáticas, que también se colorean con Giemsa y presentan una forma similar (ver Figura 2). Este problema puede evitarse realizando la tinción de las preparaciones con Feulgen (Huber y cols., 1983).

Posteriormente se ha utilizado una tinción fluorescente de naranja de acridina, que se utilizó originalmente para la observación de micronúcleos inducidos por colchicina en cultivos celulares (Starr, 1963) y que se adoptó 20 años después para la detección de micronúcleos en plantas (Hayashi y cols., 1983), células de pulmón de hámster (Lasne y cols., 1984) y linfocitos humanos de sangre periférica (Almassy y Koteles, 1984; Almassy y cols., 1986a, b).

g.- Criterios de recuento de micronúcleos: los criterios del recuento de micronúcleos deben establecerse antes del comienzo y mantenerse sin cambios a través de todo el análisis. Hay varios criterios básicos que se aplican para todas las situaciones y que están claramente establecidos por (Almassy y cols., 1987; Prosser y cols., 1988; IAEA, 2001):

- El micronúcleo tiene que presentar la misma estructura y coloración que el núcleo principal.
- Debe ser más pequeño, de modo que no debe superar la mitad del tamaño del núcleo principal o dos veces la longitud del cromosoma más largo.

- Debe ser redondo o esférico y estar visiblemente separado del núcleo principal.
- No debe mostrar refracción visible a la luz, lo que lo diferencia de otros tipos de partículas no nucleares.
- Debe mostrar reacción positiva al Feulgen u otra tinción específica del DNA.
- Debe ser contado exclusivamente en las células con citoplasma conservado.
- Su frecuencia debe seguir la cinética de la división celular.

Criterios de identificación de micronúcleos: resulta imprescindible determinar algunos factores que son fundamentales para la detección e identificación precisa de los micronúcleos. Estos factores esenciales para determinar el número y características de los micronúcleos son:

- La selección de la duración del cultivo celular.
- La conservación del citoplasma celular mediante un tratamiento hipotónico apropiado.
- La buena resolución de la coloración.

Tiempo de cultivo celular: el tiempo de cultivo modifica el número de micronúcleos observados en la muestra (Fenech y Morley, 1986; Almassy y cols., 1987). El momento más precoz en el que pueden observarse los micronúcleos es al final de la primera división celular,

cuando se originan, bien de fragmentos acéntricos o de cromosomas que no se incorporaron a los núcleos hijos durante la división mitótica.

Puesto que los linfocitos en fase de proliferación no son una población sincronizada y todos los micronúcleos no aparecen precozmente, el número de estos puede incrementarse tras periodos de cultivo más prolongados. En linfocitos humanos, el momento de máxima frecuencia se alcanza entre la segunda y la tercera división celular; es decir, después de 72 horas de cultivo. En momentos más tardíos, la frecuencia de aparición de los micronúcleos alcanza un periodo de transición y, al final, disminuyen ostensiblemente. Esto parece ser debido a la dilución de las células micronucleadas con la población creciente de células normales y con la pérdida de células aberrantes (Almassy y cols., 1987). En condiciones normales es habitual el estudio de los micronúcleos a las 72 horas del comienzo del cultivo, aunque este periodo podría ser ajustado cada vez que ocurran anomalías en la proliferación celular.

La técnica de micronúcleos ha sido validada a nivel mundial en 1999 y considerada como un biomarcador efectivo de daño en el DNA. Para la validación se creó un proyecto de colaboración internacional de frecuencia de micronúcleos en poblaciones humanas (HUMN: Human Micronucleus Project), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de micronúcleos, obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo. Los objetivos de este proyecto fueron:

- Identificar las fuentes y niveles de variabilidad capaces de influir en la frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos humanos.

- Comparar las distintas técnicas utilizadas para establecer un protocolo estándar.
- Realizar un estudio prospectivo por parte de todos los laboratorios implicados.
- Intentar establecer la asociación entre la frecuencia de micronúcleos y enfermedades como el cáncer como factor pronóstico (Fenech, 1999; Bonassi, 2001).

La edad es la variable demográfica más importante que afecta al índice de micronúcleos, con un efecto directo significativo sobre la aparición de micronúcleos (Fenech y Morley, 1986; Joksic, 2004). También se ha observado que la frecuencia basal se ve afectada por factores dietéticos como la deficiencia de ácido fólico y los niveles plasmáticos de vitamina B12 y homocisteína, e incluso por la mayor o menor tendencia de las células hacia la apoptosis (Fenech, 1999); con respecto al hábito tabáquico, no se ha observado ninguna relación entre este y la frecuencia basal de micronúcleos.

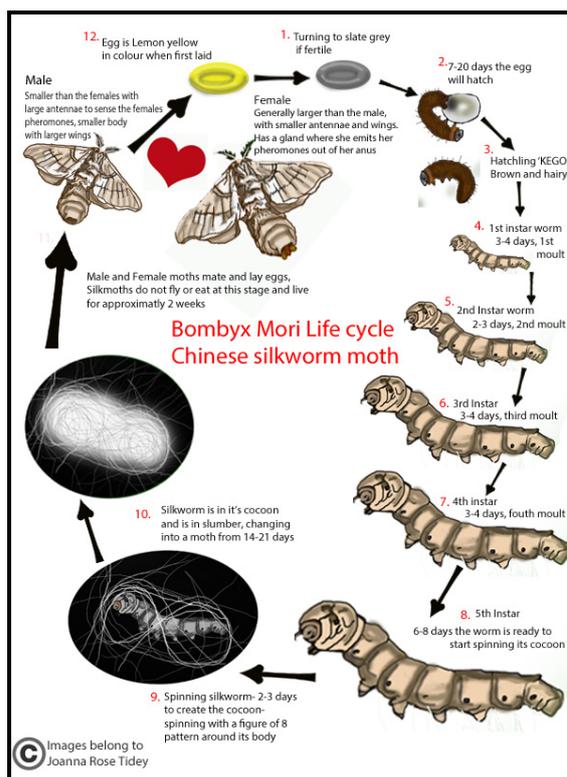
Estudios realizados por diferentes autores han puesto de manifiesto que, las exposiciones cortas a dosis bajas de radiación ionizante, pueden producir respuestas adaptativas que estimulan los procesos reparativos en linfocitos (Therens y cols., 2002). Los resultados obtenidos por otros autores confirman la existencia de una respuesta adaptativa a la radiación en las personas expuestas de forma crónica (Akleev y cols., 2004; Joksic y Petrovic, 2004a; Pelevina y cols., 2004, Serebrianyi y cols., 2004).

E. EXTRACTOS PROCEDENTES DEL GUSANO DE LA SEDA.

En nuestro trabajo hemos estudiado **cuatro extractos** procedentes del gusano de la seda (**bombix mori**):



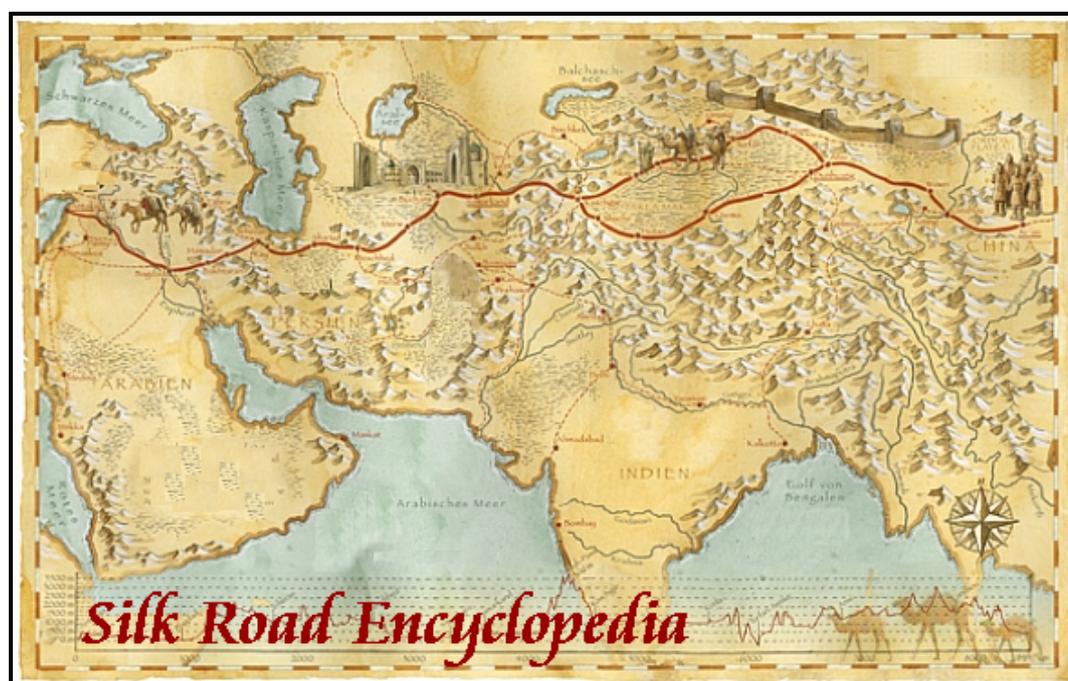
El gusano de la seda, también conocido como la larva de la polilla de la seda doméstica común, procede de China, desde donde se extendió a Europa y Asia occidental en el siglo VI d.C. Existen distintas variedades y la más importante produce tres generaciones al año. El color de la polilla adulta surgida del gusano de seda es amarillo o blanco amarillento. Tiene el cuerpo grueso y peludo y mide alrededor de 3,8 cm. La hembra deposita unos 300-400 huevos azulados en cada puesta que se adhieren a la superficie por medio de una sustancia gomosa segregada por la propia hembra. Tras la puesta, la hembra muere y poco después el macho. A los 10 días las larvas salen del huevo, midiendo alrededor de 0,6 por 7,5 cm de longitud cuando llegan a la madurez, con un color gris amarillento o gris oscuro. Se alimentan de hojas de morera, que produce seda de mayor calidad, de lechuga o de naranjo de Luisiana.. A las seis semanas de salir del huevo, el gusano de seda común deja de comer y empieza a tejer el capullo.



La seda es segregada por las glándulas sericígenas del gusano (*Bombyx mori* L.), y la utiliza para elaborar el capullo, una estructura cerrada de protección, donde ocurre la metamorfosis de larva a adulto. Antes de que el gusano de seda pase del estado de oruga al de crisálida o ninfa, segrega a su alrededor un capullo oval de unos 2,5 cm de largo, consistente en un hilo de seda continuo, que puede medir hasta 1.500 metros. Una vez tejido, el gusano de seda atraviesa una fase de inactividad de alrededor de dos semanas antes de emerger en forma de polilla adulta. Sin embargo, al salir la polilla del capullo, lo desgarrar, de forma que lo inutiliza para su uso comercial, por lo que en la producción industrial de la seda, sólo se permite la salida del número de polillas necesarias para perpetuar la especie. Al resto se las mata mediante calor (por hornos o ebullición).

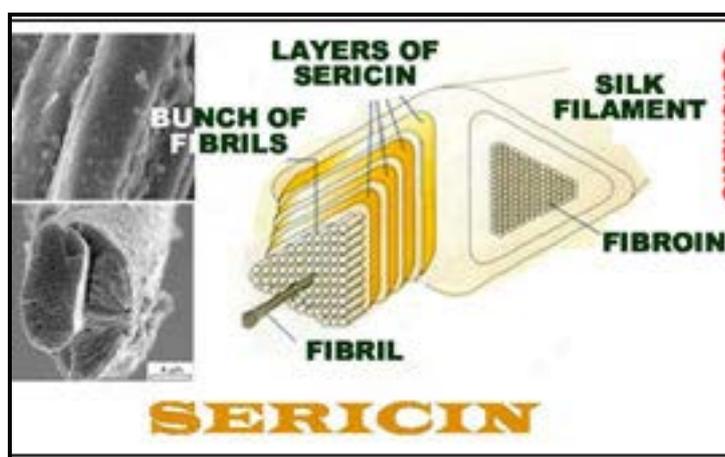
En el s. II a.C. se abrió la mayor ruta mundial de comercio, denominada "Ruta de la Seda", que abarcaba desde el este de China hasta

el mar Mediterráneo. Durante miles de años, largas caravanas de asnos o camellos recorrieron esos caminos para comerciar con Oriente, la India y Arabia, a través de las que llegaban las especias y la seda de China. En el año 300 d.C. el secreto de la producción de la seda se había transmitido por los mercaderes a la India y a Japón, extendiéndose después por Asia, pero durante tres milenios China la exportó con exclusividad. En la Edad Media comenzó a extenderse el uso de la seda en Europa occidental y después se extendió a los Estados Unidos. En el siglo XVIII, Inglaterra lideraba la producción europea, gracias a las innovaciones en su industria textil, entre ellas contar con mejores telares de seda, telares mecánicos y con el estampado con rodillos. El proceso de industrialización alcanzó su cúspide en el siglo XIX. Entre 1855 y 1865, una epidemia, la enfermedad de Pébrine causada por un pequeño parásito, provocó grandes estragos en la industria y fue el científico Louis Pasteur quien descubrió que se podía prevenir a través de un simple examen microscópico de las polillas adultas.



En la actualidad no existe en estado silvestre y se cultivo con fines económicos e industriales. La producción de seda es una combinación de técnicas antiguas y modernas y sus características únicas están sirviendo para reactivar su investigación y uso industrial en aplicaciones biotecnológicas. China vuelve a ser el principal productor de seda natural, mientras que en América es Brasil quien ocupa el lugar preponderante. (http://cienciay-salud.laverdad.es/6_3_48.html).

El hilo de seda antes citado, está compuesto de dos proteínas: una, la fibroína es una proteína polimérica y lineal, que constituye el 70% del peso del capullo. La otra proteína es la sericina, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína (Cenis, 2008). La fibroína consta de capas de láminas beta antiparalelas. Su estructura primaria se compone principalmente de la secuencia recurrente (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala). La proporción de glicina y alanina contribuye a la estructura rígida de seda (resistencia a la tracción).



La fibroína se dispone en tres estructuras llamadas seda I, II y III. La seda I es la forma natural de la fibroína, tal como es emitida desde las glándulas de seda de *Bombyx Mori*. La seda II es la disposición de las moléculas fibroína de la seda hilada, que tiene una mayor resistencia y se

utiliza a menudo en diversas aplicaciones comerciales. La seda III es la estructura recién descubierta de fibroína. Se forma principalmente en soluciones de fibroína en una interfaz (de aire y agua, de agua y aceite, etc.).

La seda es mucho más resistente que un cable de acero de similar grosor y muchísimo más elástica. La combinación de rigidez y resistencia hace que el material sea aplicable en diversas áreas, incluyendo la biomedicina y la fabricación textil. Además, presenta características que la hacen muy interesante como biomaterial (Cenis, 2008):

- a) Es un material de naturaleza proteica, altamente biocompatible, de modo que no produce rechazo ni respuesta inflamatoria en los tejidos donde se injerta.
- b) Presenta una gran resistencia mecánica a la tracción, junto a una gran flexibilidad.
- c) Es biodegradable, pero a un ritmo más lento que otros biomateriales orgánicos, lo que permite mejor consolidación de los tejidos y en alrededor de dos años se reabsorbe totalmente.
- d) Puede elaborarse en diferentes configuraciones, según las necesidades: geles, films, matrices porosas 3D, microfibras y microesferas.
- e) Su producción es sencilla y sostenible. La cría del gusano de seda es sencilla y de bajo coste.

- f) Presenta una superficie altamente reactiva con grupos carboxilo a los que se pueden unir de forma covalente péptidos como el RGD (8), hormonas como la PTH (8), y factores de crecimiento como la BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) (4, 5, 7). Estas proteínas favorecen, de forma muy significativa, tanto la adhesión como el desarrollo de los cultivos celulares implantados sobre la matriz.

La **sericina** es un albuminoide proteico (formula empírica $C_{15}H_{25}N_{5}O_6$ de Grover), insoluble en agua fría, que recubre los dos filamentos de fibroína de la seda cruda. Se descompone fácilmente en varios aminoácidos, los más importantes alanina, tirosina, glicocola y leucina. La sericina es normalmente desechada en el proceso textil, aunque tiene diversas aplicaciones en medicina y sobre todo en cosmética, pues es especialmente rica en serina, un aminoácido capaz de retener el agua y regular por tanto el grado de hidratación de la piel y del cabello.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

1°. Evaluar los efectos de los extractos del capullo del gusano de la seda: **fibroína, sericina e hidrolizados** sobre la proliferación y citotoxicidad de las líneas celulares **Vero, TRAMP-C1 y HaCaT**.

2°. Estudiar los efectos **genotóxico** y **genoprotector** de dichos extractos sobre **sangre total humana**.

3°. Medir la actividad de los extractos citados sobre la **migración celular** en la línea **HaCaT**.

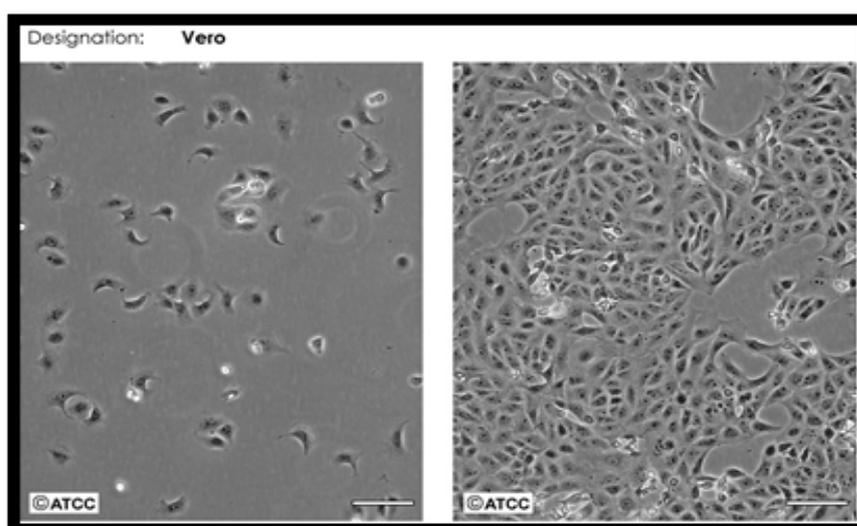
4°. Analizar, en la línea **HaCaT**, los posibles **efectos protectores** de dichos extractos frente a la **radiación ultravioleta B**.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

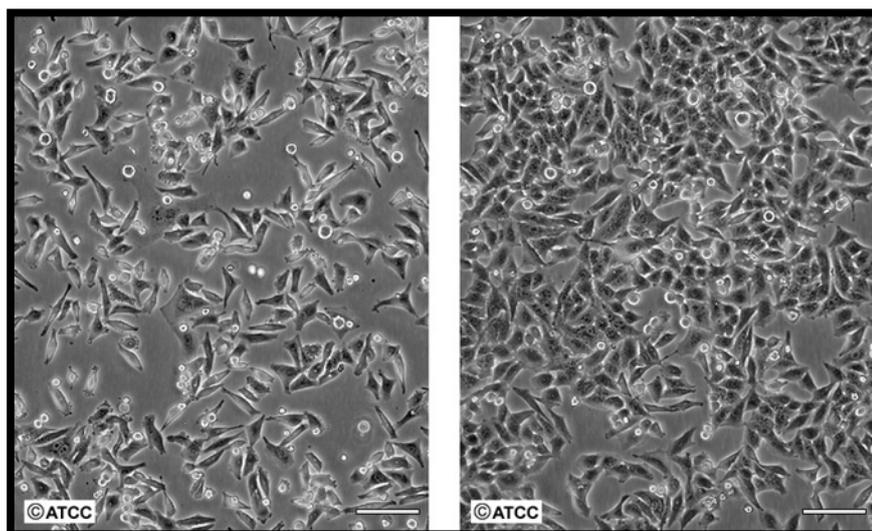
A. MATERIAL

1. LINEAS CELULARES

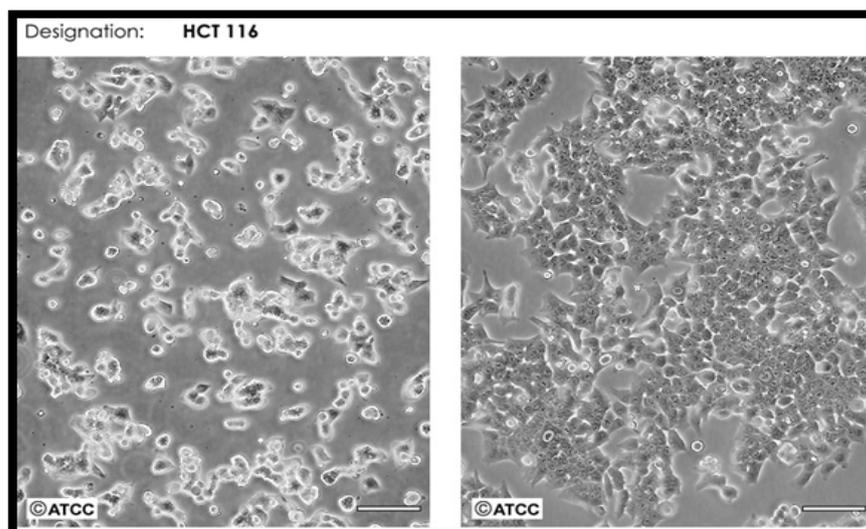
- **Vero: ATCC, EEUU.**
 - **TRAMP-C1: ATCC, EEUU.**
 - **HaCaT**, queratinocitos cutáneos humanos. **ATCC, EEUU.**
 - **Sangre humana** procedente de donantes sanos. **UM**
- La línea celular **Vero** (E C C C) corresponde a células adherentes epiteliales de túbulo renales del riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Fue establecida en 1962 por Yasumura y Kawakita en la Universidad de Chiba, Japón. Se trata de una línea celular continua no transformada y muy estable, libre de agentes contaminantes o infecciosos. Desde entonces, su utilización se ha extendido a numerosos laboratorios de todo el mundo, debido fundamentalmente a que durante décadas ha constituido el sustrato para la obtención de la vacuna de la poliomielitis.



- Línea celular de carcinoma de próstata de ratón transgénico **TRAMP-C1 (ATCC, EEUU)**: fue obtenida en 1996 de un tumor primario desarrollado en la cepa transgénica de ratones TRAMP (Foster, 1997). Estos ratones, procedentes de la cepa C57BL/6, fueron diseñados para expresar un fragmento del material genético, en concreto una proteína específica del epitelio prostático del antígeno T grande del virus SV40, mediante el promotor del gen de la probasina de rata. Todos los machos TRAMP desarrollan, de forma espontánea y uniforme tras la pubertad, todo el espectro tumoral de la próstata, desde la displasia intraglandular a la neoplasia, que semeja totalmente la patogenia del cáncer de próstata en humanos (Greenberg, 1995).



- La línea **HaCaT, (ATCC, EEUU)**, de queratinocitos cutáneos humanos que procedían de la piel de un individuo caucasiano, norteamericano, voluntario de 27 años.



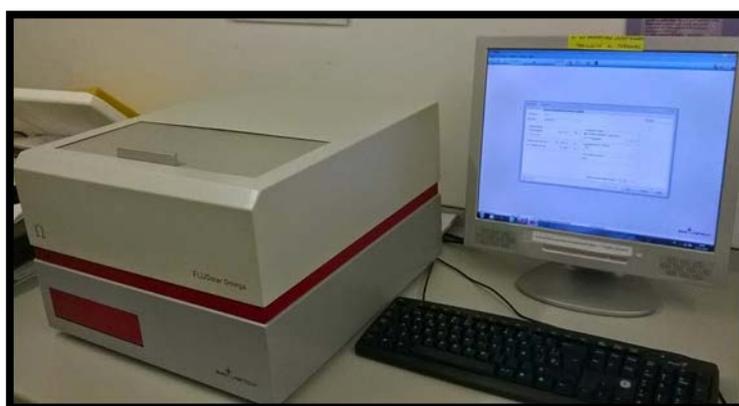
- La **Sangre humana** procedía de 4 donantes, 2 mujeres y dos hombres de entre 20 y 25 años, supuestamente sanos (no fumadores y sin enfermedad conocida), voluntarios y alumnos de la Universidad de Murcia (UMU), que firmaron la correspondiente autorización para poder utilizar sus muestras sanguíneas.

2. APARATOS

Cabina de flujo laminar vertical Cultair ASB tipo II



- **Lector de placas de 96 pocillos** (Servicio de Cultivo de Tejidos, Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), Universidad de Murcia) modelo Multiskan MCC/340P (Labsystems, Finlandia), que realiza medidas de absorbancia en placas múltiples de 96 pocillos, y que dispone de los siguientes filtros: 340, 380, 405, 520, 550, 560 y 690 nm.



- **Microscopio óptico** Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon corp., Japón) equipado con contraste de fases y fluorescencia (filtros para ultravioleta (excitación (Ex): 330-380 nm; espejo dicroico (Di): 400 nm; filtro de barrera (Ba): 435 nm), azul (Ex: 470-490 nm; Di: 510 nm; Ba: 435 nm) y verde (Ex: 510-560 nm; Di: 580 nm; Ba: 610 nm)).(Servicio de Cultivo de Tejidos (SAI), Universidad de Murcia).

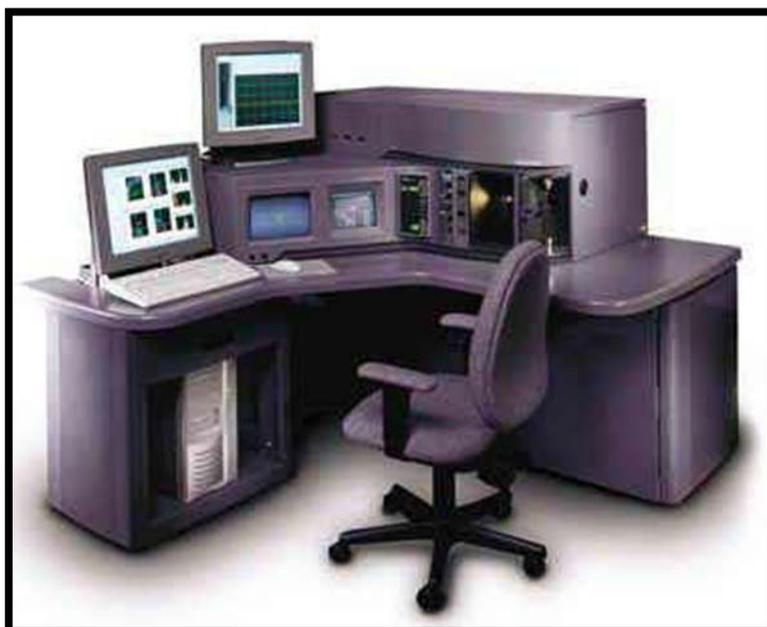


- **Fotomicroscopio** Leica DM 4000B. Cátedra de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. UMU.



- **Citómetro de flujo** modelo FACSsort (Becton Dickinson, EEUU), equipado con láser de argón de 15 mW a 488 nm y detectores para fluorescencia.





- **Dosímetros de termoluminiscencia** formados por cristales de fluoruro de litio con Mg, Cu, P (GR-200r, ConquerorElectronicsTechnology Co. Ltd, China), proporcionados y analizados por el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) del Ministerio de Industria y Energía, para determinar las dosis de radiación utilizadas.
- **Irradiador de rayos X** de la marca YXLON (YXLON International AS, Dinamarca) de 200 kV y 4,5 mA (Servicio de Radioprotección y Residuos, SAI, Universidad de Murcia), que consta de una unidad control modelo SMART 583 E y un tubo de rayos X modelo SMART 200 E.

- **Irradiador UVB (312 nm):0,08 y 0,24 J/cm²**(Vostalova, 2010).



3. REACTIVOS

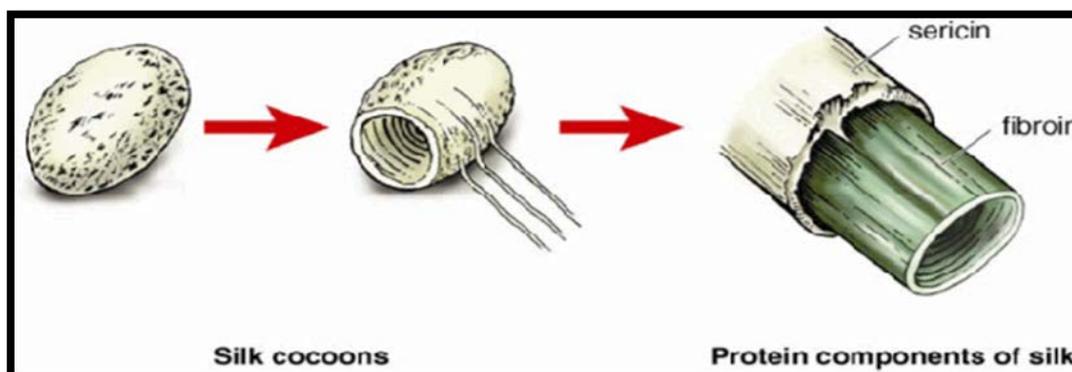
- El **Medio mínimo de Eagle** modificado por Dulbecco (DMEM), el **Medio RPMI 1640** y el **F-10**, la **glutamina**, la **dehidroandrosterona**, la **insulina**, la **penicilina**, la **estreptomicina**, el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (**MTT**), el dimetil sulfóxido (**DMSO**), el **Hoechst 33258**, el **PBS**, la **estaurosporina**, la **ribonucleasa A** (RNasa) pancreática bovina, el **yoduro de propidio**, la **fitohemaglutinina** y la **citochalasin B** procedían de **Sigma** (Sigma Co., España).
- El suero bovino fetal (**SBF**) y el **Nu-Serum de Gibco** (EEUU) y **BD** (EEUU), respectivamente.
- El **ácido acético glacial** y el **etanol** se obtuvieron de **Scharlau** (Scharlab S.L., España).
- El **metanol** procedía de **Panreac** (España).
- La **heparina sódica** al 5% se obtuvo de **Laboratorios Rovi** (España).

4. EXTRACTOS DEL GUSANO DE LA SEDA



Los agentes ensayados en nuestro estudio fueron suministrados amablemente por el laboratorio PRONAMED (Productos Naturales del Mediterráneo, S.L.) de Murcia y correspondieron a:

- **Aceite de crisálida del gusano de la seda** (Código A1-64 684. Pureza: 20%).
- **Fibroína** (3,5% pureza) (Masa Molecular: 325).
- **Sericina** (0,2% pureza).
- **Hidrolizado de Seda** (código A1-20 478).



Obtención de los extractos:

1. Aceite de crisálida del gusano de la seda (*bombix mori*).

Es un extracto graso cuyos principales componentes son los ácidos grasos, saturados e insaturados, de los que destacan:

- ácido linoleico (55,4%)
- ácido palmítico (18,4%)
- ácido oléico (18%)
- ácido esteárico (8,2%)

Además contiene aminoácidos (288 mg/100 g) como la treonina, valina, ácido glutámico, fenilalanina, serina, alanina y lisina, y oligoelementos como fósforo (232 ppm), zinc (207 ppm), sodio (79 ppm), potasio (375 ppm), magnesio (3 ppm), calcio (12 ppm). También vitaminas A y D.

El extracto de la crisálida del gusano de seda se obtiene mediante extracción con acetato de etilo, con el siguiente procedimiento:

- Una vez muertas las crisálidas tratando los capullos con calor seco, se extraen, cortando los capullos.
- En un recipiente cerrado, se deja macerar la crisálida en acetato de etilo a temperatura ambiente durante 24-48 horas.

- Se realiza un filtrado para eliminar restos y el filtrado se destila para eliminar el disolvente.
- El resto purificado que queda en el depósito del destilador se mantiene 8 días en autoclave Machatan con vacío, a 40°C, para que no quede ningún resto de disolvente. Se obtiene una pasta cerosa que se disuelve en aceite de almendras en distintas proporciones en el momento de su utilización.

La fórmula del utilizado correspondía a:

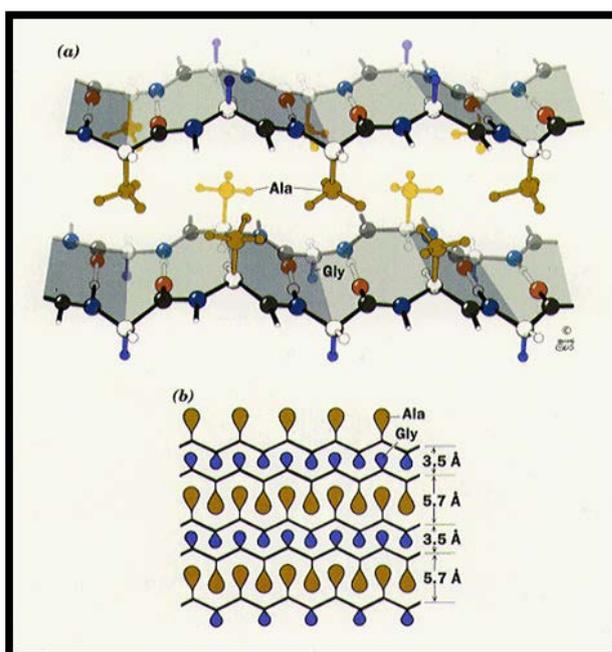
Aceite de almendras dulces36,45%
Vaselina líquida / parafina líquida30,00%
Miristato de isopropilo15,00%
Aceite del gusano de la seda al 20%8,00%
Estol 15275,00%
Vitamina F5,00%
Alfa-bisabobol0,30%
Vitamina E0,25%

Estudio de la estabilidad térmica: el punto terminal se determinó a los 222 °C para la muestra sin antioxidante y a 239°C en el de la muestra con vitamina E. Por lo que el antioxidante provee al aceite de 17 grados más de estabilidad cuando se somete a un aumento de temperatura.

Además, durante el calentamiento del aceite de crisálida, se ha demostrado que éste sufre una variación positiva de $8,24\% \pm 1\%$ de promedio en su densidad. El índice de refracción presenta una variación de $0,0155 \pm 0,005$ unidades, siendo estos valores de incremento en el caso del aceite con vitamina D, similares dentro del error evaluado.

En cuanto a los parámetros de acidez y peróxidos, el aceite de crisálida solo o con antioxidante, es estable tras el calentamiento lo que indica su estabilidad a la hidrólisis y a la peroxidación lipídica hasta los 200 °C por el periodo de 2 horas de calentamiento. El análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases - espectrometría de masas es un indicador fundamental para demostrar que los ácidos grasos no sufren variación significativa durante el calentamiento en todos los casos $\pm 1\%$.

2. Fibroína.

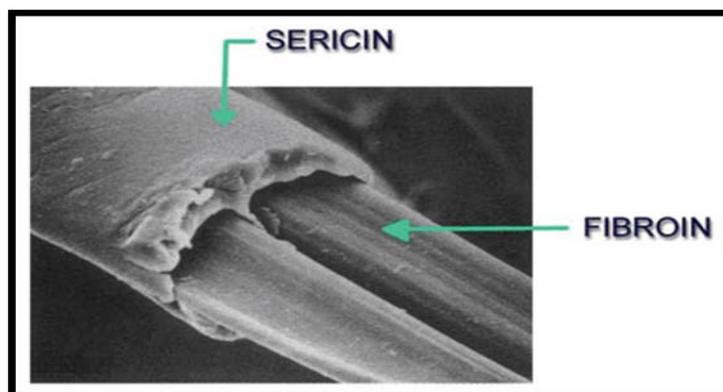


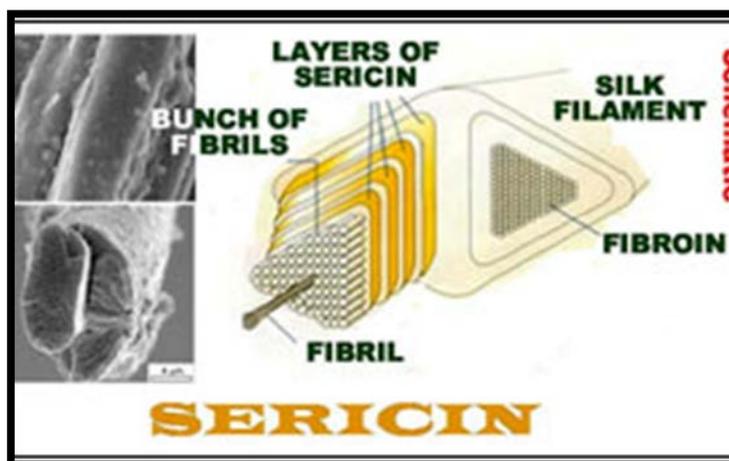
Para su obtención lo más definida y purificada posible se utilizó el siguiente protocolo:

- Una vez muertos mediante calor seco, los capullos son cortados y troceados para facilitar la extracción de la fibroína.

- Se elimina la sericina mediante ebullición de los capullos con una solución de Na_2CO_3 0.02M a 100°C durante 1h.
- Se enfría, quedando la fibroína como una masa de hebras, que es separada fácilmente de la solución de sericina. Se lava en agua destilada 2 veces y se deja secar a temperatura ambiente. La fibroína seca presenta una textura similar al algodón.
- Se disuelve para purificarla con LiBr 9.3M a 60°C , en una proporción del 20%(p/v), se dializa la solución en agua destilada durante 2 o 3 días, en membrana de 3.500 Mw y queda una solución de un 4% de fibroína.

3. Sericina





Para su obtención se procedió:

- Una vez muertos son troceados los capullos.
- Se solubiliza la sericina mediante ebullición de los capullos con una solución de Na_2CO_3 0.02M a 100°C durante 1 hora.
- La fibroína queda insoluble en forma de fibras y el resto corresponde a sericina. Se dializa con agua destilada durante 1 día en membrana de 3.500 Mw para eliminar el carbonato sódico con una concentración del 2% aproximadamente que puede ser aumentada mediante desecación o liofilización.

4. Hidrolizado de seda

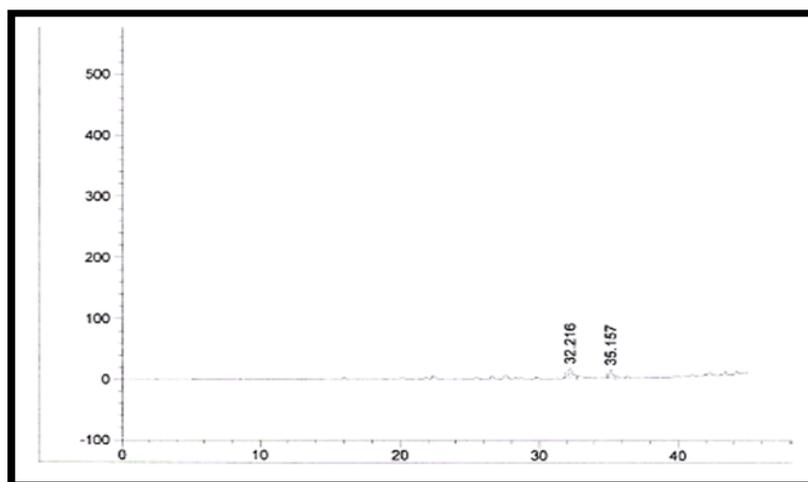
- Una vez muertos los capullos de seda mediante calor seco, son cortados para separar la crisálida del capullo que de esta forma queda separado en dos mitades. Se lavan para eliminar restos de hojas y suciedad y se desecan de nuevo.
- Se colocan los capullos en una solución acuosa de Hidróxido Sódico al 10% hasta la ebullición y completada la hidrólisis (para

que no queden restos apreciables de los capullos, que muestran un aspecto uniforme) (20-30 min).

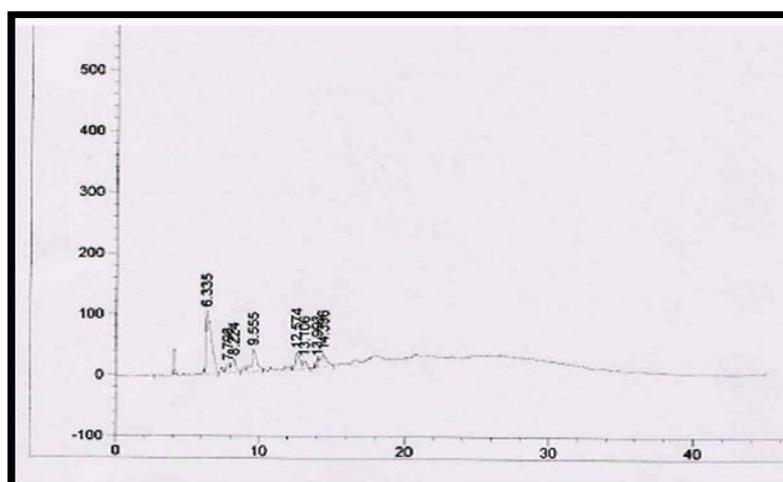
- Se realiza la neutralización hasta alcanzar un pH 7, con un ácido orgánico (cítrico).
- Se filtra para eliminar impurezas y restos insolubles.
- Se añade una mezcla de conservantes (0,3% Metil paraben; 0,1% y 0,2% Propil paraben; 0,2% Imidazolinil urea), que garanticen su estabilidad microbiológica y una vida útil significativa para su utilización industrial.

Por otro lado, se procedió a determinar, en primer lugar, las principales **características físico-químicas** de los cuatro extractos obtenidos en la primera actividad del proceso:

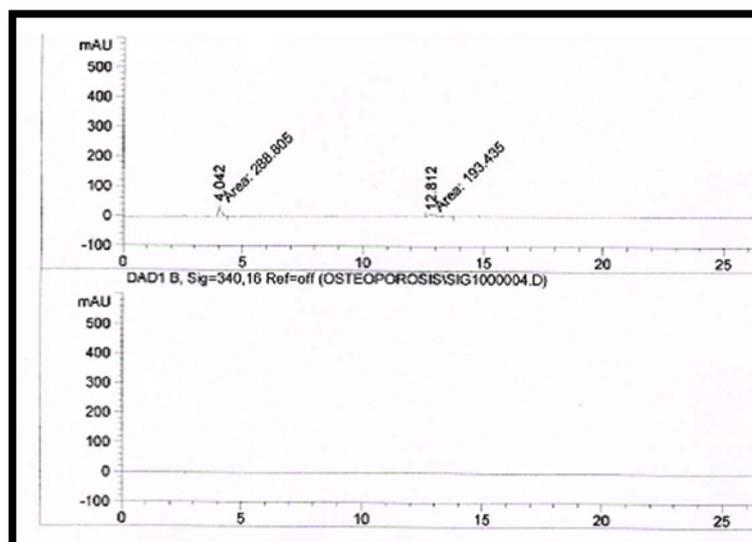
1. Aceite de crisálida: compuesto oleoso de muy bajo contenido en agua (Karl Fisher: 0,7%) con escasa presencia de compuestos polifenólicos poco polares, en torno a 15-25 mg/kg. La estructura de estos compuestos muestra un esqueleto básico relacionado con cafeoil derivados. Su contenido en sales inorgánicas es de $< 0.01\%$.



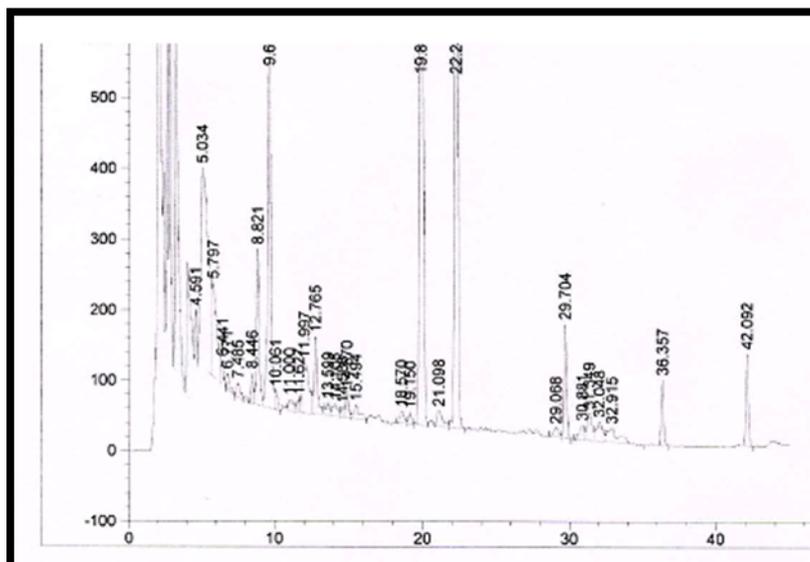
2. Fibroína: compuesto líquido (Karl Fisher: 96%); baja-media concentración de sólidos (4%) y especies fenólicas de alta polaridad, concretamente, en torno a 150-200 mg/kg. La estructura de estos compuestos muestra un esqueleto básico relacionado con derivados monofenólicos. Su contenido en sales inorgánicas es $< 0.1\%$.



3. Sericina: compuesto líquido (Karl Fisher: 98%) con baja concentración de sólidos (2%) y especies fenólicas, de alta polaridad, concretamente, en torno a 15-20 mg/kg. La estructura de estos compuestos muestra un esqueleto básico relacionado con derivados monofenólicos. Su contenido en sales inorgánicas es del $< 0.1\%$.



4. Hidrolizado de seda: compuesto líquido (Karl Fisher: 72,03%), de todos los extractos estudiados es el que presenta la mayor concentración de sólidos (27,9%) y especies fenólicas de media y alta polaridad, concretamente, en torno a 200-300 mg/kg. La estructura de estos compuestos muestra un esqueleto básico relacionado con derivados monofenólicos y se detecta la presencia de pequeñas cantidades de flavan-3-ols. Su contenido en sales inorgánicas es del 5.82%.



El extracto de crisálida resultó ser hidrófobo debido a su naturaleza lipídica. Este hecho determinó que no fuera usado en ninguno de los estudios diseñados, ya que no permitía su adición al medio de cultivo.

B. MÉTODOS

a) PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En primer lugar, procedimos a preparar una solución stock de cada extracto con masa molecular conocida, teniendo en consideración la pureza de cada principio activo, de modo que la disolución resultante quedara expresada en moles por litro.

Test de osmolaridad

Cualquier sustancia extraña adicionada al medio de cultivo en un experimento sobre células, es susceptible de alterar el potencial osmótico al que están sometidas las células en su medio nutritivo, lo que puede modificar los resultados del experimento. Para evaluar si la modificación osmótica que provoca la sustancia a ensayar es significativa, elaboramos una disolución de fibroína a 50 μM y un control únicamente con DMEM. Analizamos estas dos muestras en un osmómetro de vapor de vacío y comparamos los resultados obtenidos, concluyendo que la fibroína a 50 μM no modifica el potencial osmótico del medio y por tanto no introducirá alteraciones en los resultados finales.

Método de cultivo.

Establecimos los cultivos a partir de viales criocongelados en nitrógeno líquido a -196°C . Descongelamos los viales rápidamente en un baño a 37°C , pasando el contenido del vial a un frasco de cultivo de 75 cm^2 con 10 mL de medio de cultivo fresco. Cuando las células se habían fijado al sustrato, pasadas 24 horas, sustituimos el medio por medio fresco para

eliminar el crioprotector (dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%) que contenía el vial.

Mantenimiento y conservación de los cultivos.

Todas las líneas se conservaron mediante dos formas: **cultivo masivo** y **criocongelación**. Para el cultivo masivo usamos frascos de 75 cm² y el medio adecuado según la línea celular. Todo el instrumental utilizado fue esterilizado previamente y realizamos la manipulación de las células en cabinas de flujo laminar vertical Cultair ASB tipo II. Para el cultivo masivo usamos frascos de 75 cm² y el medio adecuado según la línea celular y suplemento de SBF. Todo el instrumental utilizado fue esterilizado previamente, añadiendo los antibióticos, estreptomina y penicilina: 100 ug/ml y 100 u/mol respectivamente. Realizamos la manipulación de las células en cabinas de flujo laminar vertical Cultair ASB tipo II. Los frascos se mantuvieron constantemente a 37° C, humedad relativa del 98% y atmósfera enriquecida con un 5% de Co₂ en una estufa de cultivo cytoperm de Haerus (Germany). Controlamos el crecimiento celular diariamente mediante un microscopio invertido de contraste de fases **Nikon** modelo **Diaphot-TM** cambiando el medio de cultivo cada vez que el indicador de pH señalaba que se había agotado (2-3 días).

Para realizar los subcultivos, tratamos los cultivos confluentes con 3 ml de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.25% y 0.25%, respectivamente) durante 2-5 minutos a 37°C. Tras despegar las células mediante agitación y añadir 5 ml de medio suplementado con suero bovino fetal, fueron centrifugadas a 214 g durante 10 minutos (TRAMP-C1) a temperatura ambiente para eliminar la tripsina. Resuspendimos el sedimento en 2 ml de medio fresco para realizar el conteo de células vivas

con azul tripán en una cámara hemocitométrica, comprobando que la viabilidad celular media fuera como mínimo del 99%. A partir de la densidad así obtenida calculábamos el inóculo necesario para el subcultivo o para los ensayos.

Comprobamos regularmente la ausencia de *Mycoplasma spp.* en todas las líneas celulares utilizadas mediante la tinción de fluorescencia directa del ADN con **Hoechst 33258**.

Para restablecer los cultivos a partir de los viales congelados, se procedía descongelándolos rápidamente en un baño a 37°C con agitación suave; cuando el hielo desaparecía se pasaban a un recipiente con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se continuaba en la cabina de flujo, donde todo el contenido se vaciaba en un solo frasco conteniendo un volumen del medio y suero adecuados, diez veces mayor que el vial para reducir en esta proporción la concentración de DMSO. Cuando se estimó conveniente, se midió la viabilidad celular mediante recuento con azul tripan. A las 24 horas se renovó el medio. En las líneas con una adhesividad menor o con una peor recuperación, durante los primeros días se suplementó el medio con una proporción de SBF mayor (5-10 % más).

Para el cultivo de la línea TRAMP-C1 hemos utilizado el medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa, tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con suero bovino fetal (5%) y Nu-Serum (5%), glutamina (4 mM), dehidroandrosterona (10 nM), insulina (10 mg/ml), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y atmósfera con el 8% de CO₂.

Condiciones de los ensayos.

Para los experimentos de inhibición y crecimiento en las líneas, se tomaron células de los frascos de cultivo en condiciones de crecimiento exponencial y sin alcanzar la confluencia. Para las curvas de crecimiento se inocularon a una densidad de 2500 células por pocillo, en placas NUNC de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano para cultivos "in vitro", con 200 μ l de medio suplementado con SBF por pocillo, dejando las filas periféricas sin utilizar y con 300 μ l de agua destilada esterilizada para reducir la evaporación. Las placas se mantuvieron en estufa en las mismas condiciones que los frascos de 75 cm². En los tratamientos, las células se sembraron a la densidad mas adecuada a la duración de los ensayos, y no se iniciaron nunca hasta 24 horas después de la siembra para permitir la completa adhesión celular al fondo de los pocillos.

Medida del crecimiento y muerte celular (Test de citotoxicidad y proliferación).

El método que se utilizó para medir la evolución de los cultivos controles y tratados fue el basado en el **MTT**, adaptado a nuestras condiciones de trabajo a partir de los estudios de Carmichael (1987a) y Alley (1988). Para ajustar el ensayo a nuestras condiciones, se determinaron las longitudes de onda de lectura y de referencia idóneas para medir el MTT formazán producido por el cultivo. Comprobamos la linealidad entre intensidad de coloración producida por el MTT formazán y el número de células en cultivo para cada línea, y realizamos un ajuste del número de células adecuado para trabajar en pocillos en función de la duración del tratamiento.

El procedimiento que se siguió para realizar el ensayo con el MTT, tanto para los experimentos de crecimiento como en los de tratamiento, fue el siguiente:

- Centrifugar las placas a 1000 r.p.m. durante 10 minutos, eliminando casi todo el medio de los pocillos de las placas.
- Reemplazar con 200 μ l de medio fresco con SBF por pocillo.
- Añadir 50 μ l de MTT (8 mg/ml \rightarrow 1,6 mg/ml) en cada pocillo.
- Incubar durante 4 horas en la estufa (37°C y 5% de CO₂).
- Centrifugar a 1000 r.p.m. 10' y eliminar el medio y el MTT soluble no metabolizado con la micropipeta sin tocar el fondo.
- Añadir 100 μ l de DMSO puro en cada pocillo comenzando por la columna del blanco.
- Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Pasar la placa al lector Multiskan MCC/340P, con doble longitud de onda para registrar los resultados.

Para determinar la longitud de onda a la que se produce la máxima absorción del MTT formazán se utilizó la ecuación, que responde a una distribución de Lorentz, empleada para calcular picos en cromatografías, ajustándola a nuestros resultados experimentales. También calculamos qué longitud de onda proporcionaba la máxima absorbancia con el menor coeficiente de variación.

Para determinar la relación intensidad frente al número de células, se realizaron placas para cada una de las líneas, al realizar un ensayo del MTT para un rango de células de 100.000 células/pocillo a 90 células/pocillo. Se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson y se realizó la regresión lineal entre ambos.

Test de citotoxicidad y proliferación con Vero y HaCaT.

El test colorimétrico de formación de sales de formazano (MTT) permite evaluar cuantitativamente el grado de inhibición de la proliferación y viabilidad en un cultivo celular tras la aplicación de una sustancia problema.

Utilizamos placas de 96 pocillos de fondo plano con capacidad máxima de 300 µl por pocillo y sembramos 1.600 células/pocillo para asegurar un crecimiento exponencial durante todo el ensayo. Dicha población inicial permite que las células adheridas dispongan de espacios libres en cada pocillo para que tengan lugar divisiones celulares a lo largo de todo el ensayo. Este requisito es indispensable en este tipo de ensayos, en el que tratamos de determinar si distintas concentraciones de una determinada sustancia influyen sobre la capacidad natural de las células de propagarse mediante mitosis sucesivas formando una monocapa de células en toda la superficie disponible. Existen dos factores fundamentales relacionados con esta condición, que limitan la fiabilidad de este ensayo si no se tienen en cuenta. Por un lado, la fisiología natural de las células les permite dividirse únicamente mientras dispongan de espacio adyacente disponible, de modo que al establecerse un contacto con células vecinas se desencadena una cascada de señalización intracelular que envía moléculas señal al interior del núcleo que interfieren en el ciclo celular con el

resultado final de una detención de los mecanismos de mitosis y metabolismo relacionado. Por otro lado, y como consecuencia de la detención del ciclo de mitosis, los análisis colorimétricos realizados después de alcanzada la confluencia en cada pocillo serán menos significativos.

Pasadas 24 horas tras la siembra de las células, aplicamos las distintas concentraciones de cada extracto (hidrolizado de seda, fibroína y sericina) a los pocillos con las células en crecimiento. En el caso de las células Vero y HaCaT, las concentraciones utilizadas fueron **0,001%, 0,01%, 0,05%, 0,1% y 0,25%**. Por cada placa dispusimos 6 réplicas de cada concentración y 12 réplicas control sin tratamiento. Realizamos el ensayo a tres tiempos: **24, 48 (HaCaT) y 72 horas (Vero)** desde la aplicación de los extractos. Mantuvimos todas las placas a una temperatura de 37°C, 90% humedad relativa y un 7'5% CO₂ en estufa durante los periodos de incubación.

Pasado cada periodo de tiempo correspondiente, eliminamos completamente el medio de cada pocillo y agregamos a cada pocillo 200 µl de DMEM sin suplementos nutritivos y 50 µl de una disolución de MTT a 5 mg/ml, alcanzando una concentración final en cada pocillo de 1 mg/ml de MTT. Dejamos incubar durante 4 horas en oscuridad a 37°C.

Vaciamos los pocillos dejando sólo las células adheridas al fondo de los pocillos y procedimos a disolver el formazano, sintetizado en el interior celular, gracias a la adición de 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo. Tras una agitación de 10 minutos a 80 rpm procedimos a la **lectura de absorbancia** en un lector de placas (Multiskan MCC/340P) a longitudes de onda 570 nm y 690 nm.

Obtuvimos la **IC 50 e IC 90** de cada uno de los extractos mediante el ajuste de una recta de regresión a la representación del porcentaje medio de viabilidad respecto al control frente a las diferentes concentraciones empleadas.

Actividad antioxidante “*in vitro*”.

En primer lugar realizamos un estudio específico sobre la actividad antioxidante, centrado en evaluar la capacidad de protección de ácidos grasos omega-3, en concreto ácido linoléico conjugado (CLA). Se han empleado dos modelos diferentes, uno de ellos, TBARS, y el otro una modificación específica del método Rancimat.

Primer Modelo: Es el más ampliamente utilizado en este tipo de investigaciones, emplea un modelo de oxidación de CLA en medio hidroalcohólico, en el que se mide la generación de malonildialdehido (MDA).

Segundo Modelo: Hemos realizado una modificación específica del método Rancimat, en el que se han ajustado las condiciones de oxidación (caudal de aire y temperatura) para permitir una duración suficiente de ensayo para oxidación de CLA, en concreto 22-24 horas.

Estudios de genotoxicidad.

Los ensayos de genotoxicidad se han realizado sobre las muestras de sangre de los voluntarios sanos, previo consentimiento informado, de la siguiente forma:

La media de MN presentes en nuestras muestras control de donantes sanos para este rango de edad es de 11 ± 3 MN/500 CB, que coincide con la frecuencia de MN obtenida de este donante (10 MN/500 CB), por lo que consideramos que estas muestras eran aptas para la realización del estudio.

Previamente al estudio de las sustancias (hidrolizado de seda, fibroína y sericina), realizamos un control positivo, irradiando de 1mL de esta sangre con 2 Gy de rayos X y estudiamos la presencia de MN provocados por la irradiación.

Se han ensayado dos volúmenes diferentes (20 y 40 μ l) de las distintas disoluciones de fibroína, sericina y extracto de crisálida a 25 micromolar que se han añadido a muestras de 1 ml de sangre del mismo donante que el de la muestra control. Posteriormente, se ha determinado la presencia de micronúcleos de cada una de las muestras, para comparar el efecto de los tratamientos frente a un generador de MN conocido (radiación X).

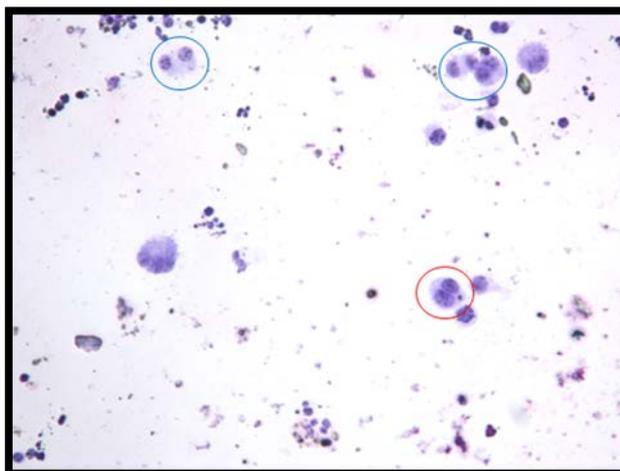
Estudios de genoprotección.

Las muestras de sangre procedían de los donantes sanos y fueron heparinizadas.

Diseño del ensayo: 1 ml de la muestra sirvió para realizar un control positivo y añadimos dos volúmenes 20 μ l de fibroína, sericina y extracto de crisálida a 25 micromolar, a tres muestras antes de la irradiación (“tratamiento pre-irradiación”) y a otras tres inmediatamente después de la radiación ionizante (“tratamiento post-irradiación”).

Método de irradiación: las muestras de sangre fueron expuestas a radiación X con **Irradiador de rayos XSMART 200E** (YXLON International, Hamburgo, Alemania), a un Kilovoltaje de 120 kV y un miliamperaje de 4.5 mA: la distancia foco-objeto fue de 74.5 cm y el tiempo de exposición de 29 segundos. La dosis total fue de 2 Gy \pm 3%. Las dosis de radiación fueron monitorizadas con el dosímetro universal UNIDOS®, con cámaras de ionización PTW Farne® TW 30010 (Freyburgo, Alemania).

Método de cultivo: el ensayo de micronúcleos (MN) fue llevado a cabo en sangre total humana después de la irradiación con rayos X (con y sin tratamientos), mediante el método de bloqueo citoquinético descrito por Fenech y Morley (1985) y adaptado por la IAEA. La sangre completa (1 mL) fue cultivada a 37°C durante 72 horas en 9 ml de medio F-10, que contiene un 15% de suero bovino fetal, 1,6% de fitohemaglutinina y 1% de penicilina/estreptomicina. Cuarenta horas después del inicio del cultivo celular, se añadió citochalcasina B a una concentración de $\mu\text{g/mL}$. A las 72 horas, las células sanguíneas fueron tratadas con una solución hipotónica (KCl, 0,075 M) durante 3 minutos y fijadas con metanol/ácido acético (3/1). Posteriormente se realizaron preparaciones sobre cristal secado al aire, que se tiñeron con May Grünwald-Giemsa.



Cultivo de linfocitos humanos con bloqueo citocinético, células binucleadas (halo azul) y célula con micronúcleo (halo rojo) (x400).

Recuento de micronúcleos (MN): se analizaron tres preparaciones microscópicas de cada muestra de sangre. En cada una, se contaron los MN presentes en al menos 3.000 células bloqueadas en citoquinesis. El contaje fue llevado a cabo por dos observadores con un microscopio óptico Zeiss (Oberkochen, Alemania), a 400 aumentos para el examen general de la preparación y de 1000 X para confirmar la presencia o ausencia de micronúcleos en las células bloqueadas, de acuerdo con los criterios descritos por Fenech (2007).

Estudio de fotoprotección frente a la radiación ultravioleta b (RUVb).

Los ensayos para estimar el efecto fotoprotector frente a la radiación ultravioleta se llevaron a cabo con un irradiador de RUVB que emite a 312 nm y que permite administrar una determinada dosis de radiación ultravioleta previamente seleccionada. Hemos estudiado dos intensidades: 0'24 y 0'08 J/cm², determinadas según Vostalova, 2010). La irradiación se

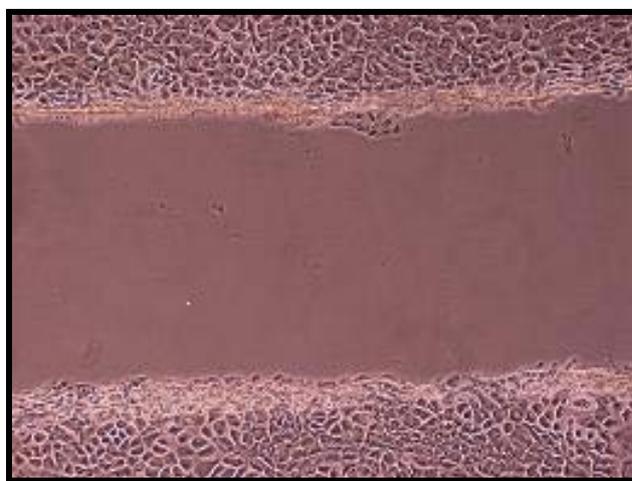
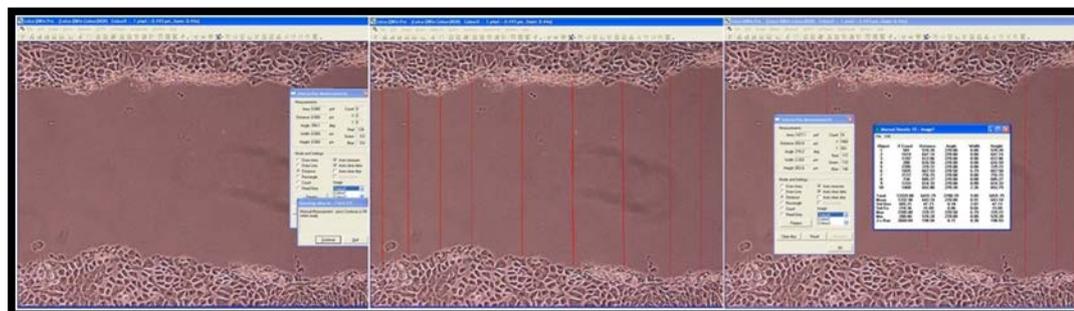
llevó a cabo retirando el medio y añadiendo 100 μ l de PBS para evitar la pérdida de intensidad de la radiación.

Las concentraciones ensayadas fueron **0,001%, 0,01%, 0,05%, 0,1% y 0'25%** del stock original facilitado por Pronamed (fibroína, sericina e hidrolizado de seda). La elección de estos valores viene impuesta por el efecto negativo del elevado potencial osmótico del hidrolizado de seda sobre el crecimiento de las células en cultivo concentraciones superiores a 0'5 % del stock.

Los tratamientos se añadían al cultivo 24 horas antes de la exposición a las radiaciones. En el momento previo a la exposición, se sustituía el medio por PBS e inmediatamente después de irradiar añadíamos medio nuevo con el tratamiento correspondiente en cada caso. La bibliografía indica que los efectos de la exposición a radiación ultravioleta de un cultivo celular se manifiestan a partir de 24–48 horas. Por tanto, las lecturas de absorbancia se han realizado 24 y 48 horas después de la irradiación.

Ensayo de Migración: para realizar este ensayo, cultivamos las células HaCaT a una densidad adecuada en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaron la confluencia. En ese momento, despejamos de células varias zonas (wounds) paralelas utilizando una punta estéril de pipeta de 300 μ l. Eliminamos el medio de cultivo para retirar las células despegadas y lavamos con medio fresco. Después, administramos los tratamientos por duplicado. En cada placa había dos pocillos control, dos pocillos con hidrolizado de seda al 0,01% y dos pocillos con hidrolizado de seda al 0,1%. Tomamos imágenes de las zonas despejadas, teniendo como

referencia marcas realizadas en el fondo del pocillo con rotulador permanente tras despejar las zonas (0 horas) y a las 4, 8, 12 y 24 horas.



El motivo de la elección del hidrolizado de seda para este ensayo fueron los resultados obtenidos en las pruebas previas de viabilidad celular y fotoprotección con queratinocitos, en las que observamos un comportamiento particularmente positivo del hidrolizado de seda con nulo efecto antiproliferativo en todas las concentraciones ensayadas, además de un destacado efecto fotoprotector con algunas de ellas. Por todo ello, enfocamos la atención en este extracto frente a fibroína y sericina para los ensayos de migración. La fibroína mostró efectos antiproliferativos a concentraciones elevadas en los ensayos y la sericina reveló ser marcadamente antiproliferativa con un claro efecto dosis-respuesta de tal modo que sería preceptivo modificar el rango de concentraciones con que

realizar los ensayos de migración y en tal caso los resultados interespecíficos obtenidos de los tres extractos de la seda serían poco comparables entre sí.

Análisis cuantitativo de la distancia de migración: Evaluamos la distancia recorrida por las células en cada fotografía mediante análisis de imagen (Sistema MIP-4, Digital Image System, Barcelona; Servicio de Análisis de Imagen, SAI, Universidad de Murcia). Para ello, todas las imágenes fueron transformadas a escala de grises y calibradas (X: 1,88679 μm ; Y: 1,88679 μm), tras lo que se tomaron 10 medidas del espacio libre de células, calculando después el valor medio. Determinamos la distancia de migración comparando el ancho del espacio libre en cada momento respecto a la medida de esa misma zona a tiempo cero, según la siguiente fórmula (Valster, 2005): Distancia de migración = $(A_0/2) - (A_t/2)$, donde A_0 es el ancho inicial del espacio libre de células y A_t es el ancho del espacio libre de células a tiempo t.

b) MÉTODO ESTADÍSTICO.

Se realizó en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, a través del software *ANOVA SPSS® v12.0* (SPSS® Inc, Chicago, USA) mediante el que efectuamos los siguientes procedimientos estadísticos:

Para el análisis de datos de los ensayos de viabilidad celular se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para dos factores ortogonales (tiempo y concentración), realizando una regresión lineal para el cálculo de los valores de IC50 e IC90. Los datos de los experimentos de apoptosis, del análisis del ciclo celular y de los estudios con radiación ionizante (test de micronúcleos y ensayos de viabilidad celular) fueron analizados mediante un análisis de varianza.

Para la migración se realizó un análisis de varianza de muestras repetidas, correspondiente a un diseño jerarquizado con dos factores principales (tiempo y tratamiento) y las réplicas como factor anidado dentro de los tratamientos. Los análisis se complementaron con el contraste de igualdad de medias y con el análisis con comparaciones entre pares de medias mediante el test de la mínima diferencia significativa (LSD).

Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

V. RESULTADOS

Previamente a la realización de los estudios definitivos, realizamos varios ensayos con el fin de determinar las condiciones óptimas para cada línea y método utilizados. Asimismo, procedimos al ajuste del ensayo de MTT y verificamos también la ausencia de contaminación por Mycoplasma.

AJUSTE DEL ENSAYO CON EL MTT

En cada una de las líneas celulares estudiadas, medimos la absorbancia del formazán metabolizado por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, a diferentes longitudes de onda. Observamos un máximo de absorbancia a 560-570 nm, asociado a los menores coeficientes de variación, eligiendo finalmente la mayor de las dos; 570 nm como longitud de onda de lectura.

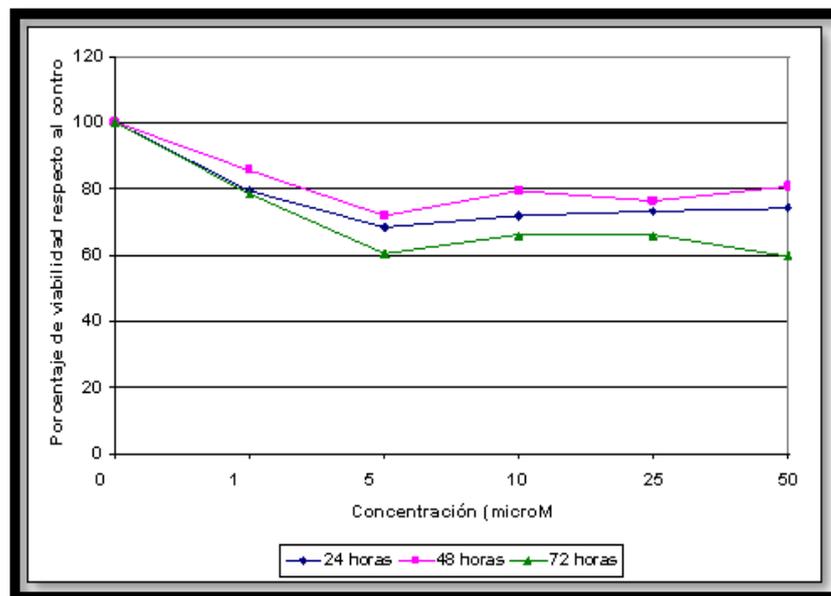
También observamos, que para nuestras condiciones de experimentación, existía una relación lineal entre el número absoluto de células vivas en el cultivo y la cantidad de MTT metabolizado acumulado en el interior de las células, que finalmente era solubilizado y liberado al añadir DMSO. Constatamos dicha relación para las tres líneas: Vero, TRAMP-C1 y HaCaT, con unos coeficientes de regresión de $r=0.99$, $r=0.98$ y $r=0.98$ respectivamente, manteniéndose dicha relación tanto en escala lineal como en la logarítmica.



DETECCIÓN DE MYCOPLASMA

Una vez teñidas las células con el colorante específico para el ADN (H33233, Hoecht, Alemania) procedimos a su estudio con el microscopio de fluorescencia, con el que observamos la distribución de la tinción para las diferentes líneas. En todos los casos, la fluorescencia era uniforme y estaba limitada al nucleolo que facilitaba su identificación, dado que los citoplasmas se disponían de forma aplanada y extendida sobre la placa de cultivo. Por lo que no existía contaminación con *Mycoplasma* spp. en ninguna de las líneas estudiadas.

Este ensayo se realizó en varias ocasiones a lo largo del estudio, resultando negativo para la presencia de ADN extranuclear. La existencia de dicho microorganismo tampoco se evidenció en las electronomicrografías.

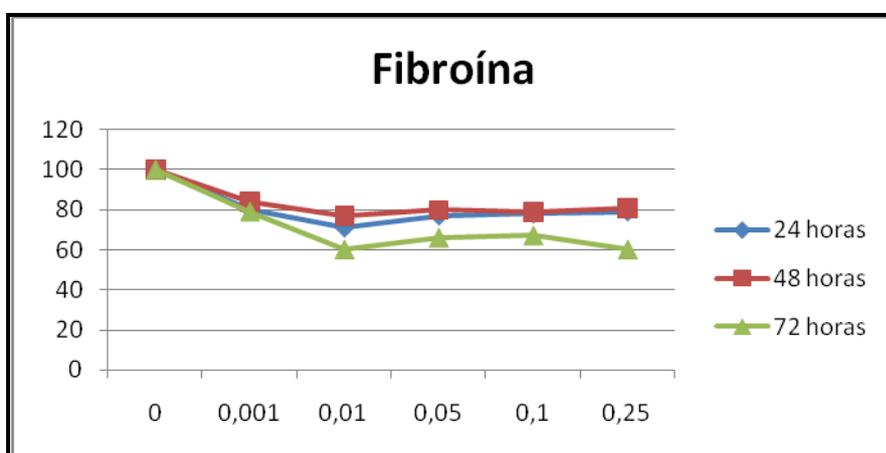
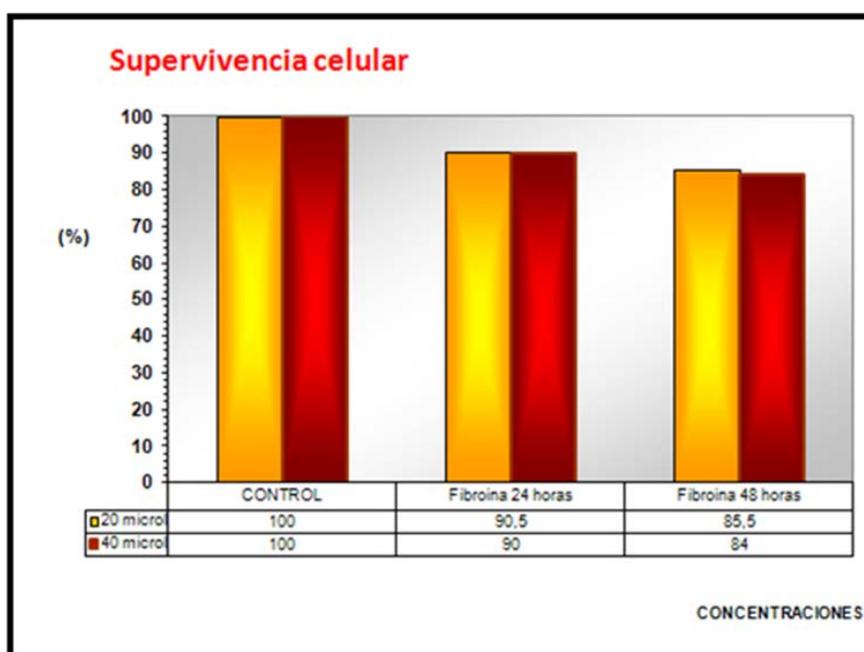


I. VIABILIDAD CELULAR Y CITOTOXICIDAD EN LA LÍNEA CELULAR VERO

A. LÍNEA CELULAR VERO:

1. FIBROÍNA

Observamos una escasa pérdida de viabilidad celular, sobre todo a las 72 horas, no bajando en ningún caso del 60% respecto al control.



El gráfico superior representa cómo afecta la concentración de **fibroína** al crecimiento y proliferación celular. Cada línea del gráfico muestra la evolución de la proliferación celular en cada uno de los tiempos estudiados.

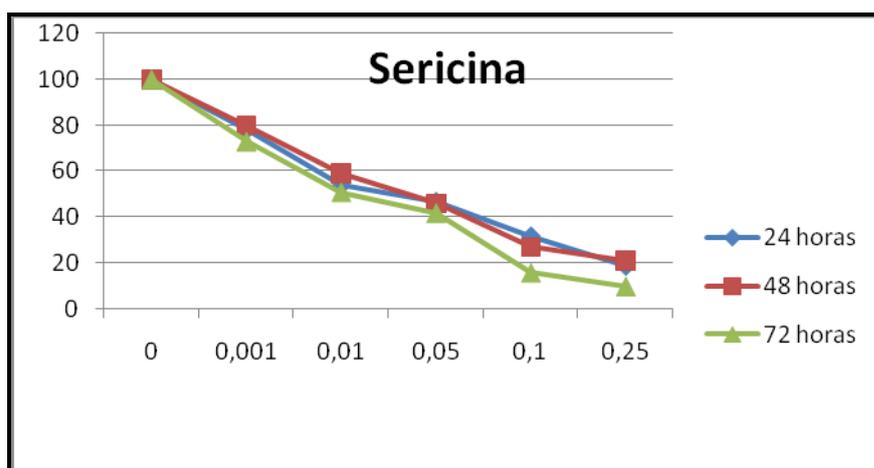
Los valores de IC₅₀ e IC₉₀ fueron:

Tiempo	IC 50	IC 90
24 horas	0,812%	1,579%
48 horas	1,056%	2,275%
72 horas	0,31%	0,74%

Los resultados obtenidos muestran la ausencia de efecto dosis-respuesta ($p > 0,05$) con unos valores de viabilidad que oscilaban entre el 60% y el 80 %.

2. SERICINA

Observamos una importante pérdida de viabilidad que se evidencia sobre todo a las 72h (10%) con la máxima concentración:



El gráfico superior representa cómo afecta la concentración de **sericina** al crecimiento y proliferación celular. Cada línea muestra cómo evoluciona la proliferación en cada uno de los tiempos estudiados.

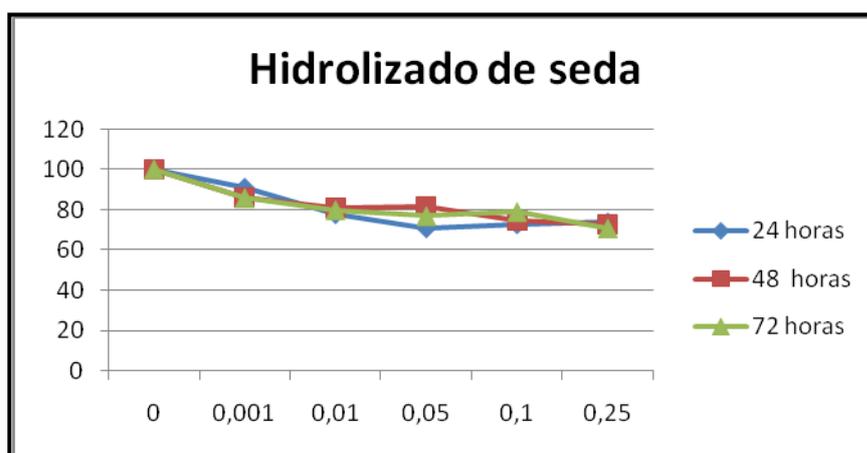
Los resultados obtenidos muestran la existencia de efecto dosis-respuesta ($p < 0,001$) con unos valores de viabilidad que van disminuyendo considerablemente conforme aumenta la concentración estudiada.

Los valores de IC_{50} e IC_{90} fueron:

Tiempo	IC_{50}	IC_{90}
24 horas	0,021%	0,338%
48 horas	0,035%	0,352%
72 horas	0,017%	0,25%

3. HIDROLIZADO DE SEDA

Los primeros ensayos realizados con diluciones porcentuales de entre 0,5 y 10% mostraron un freno de viabilidad en las concentraciones 2,5, 5 y 10%. Pero es debida al muy elevado potencial osmótico del extracto a esas concentraciones.

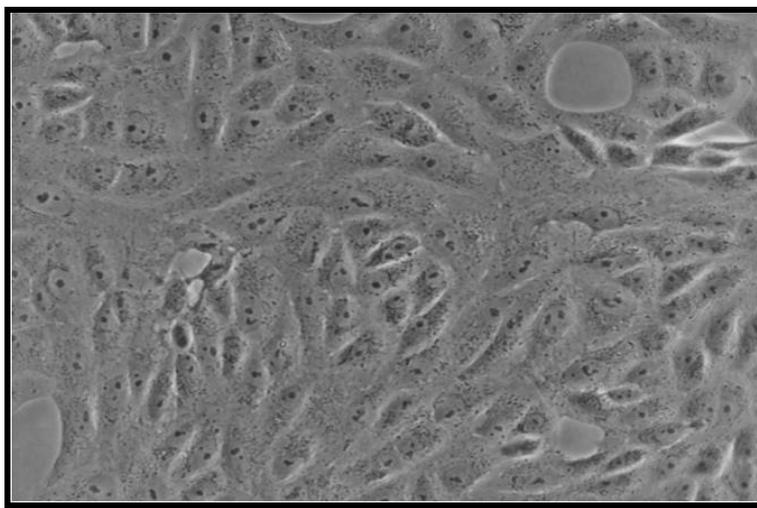


El gráfico representa cómo afecta la concentración de **hidrolizado de seda** al crecimiento y proliferación celular. Cada línea muestra cómo evoluciona la proliferación en cada uno de los tiempos estudiados.

Los resultados obtenidos muestran la ausencia de efecto dosis-respuesta ($p > 0,05$) con unos valores de viabilidad que rondan el 70% con la concentración máxima en los tres tiempos estudiados.

Los valores de IC₅₀ e IC₉₀ fueron:

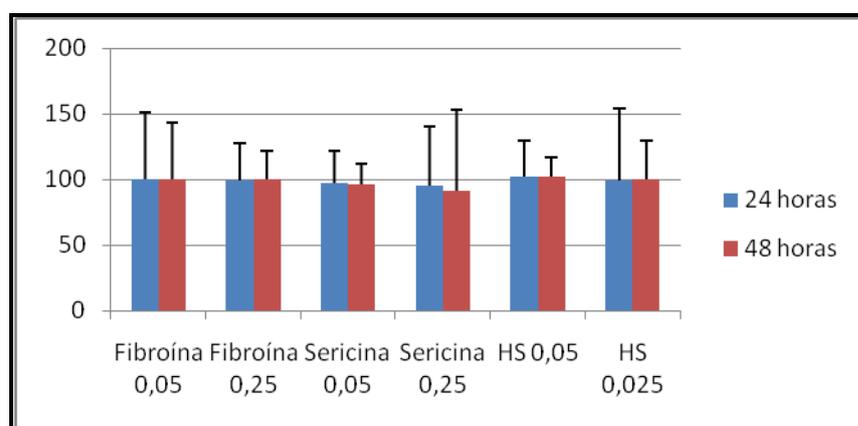
Tiempo	IC 50	IC 90
24 horas	0,791%	1,503%
48 horas	0,951%	2,05%
72 horas	0,38%	0,875%



B. LÍNEA CELULAR TRAMP-C1:

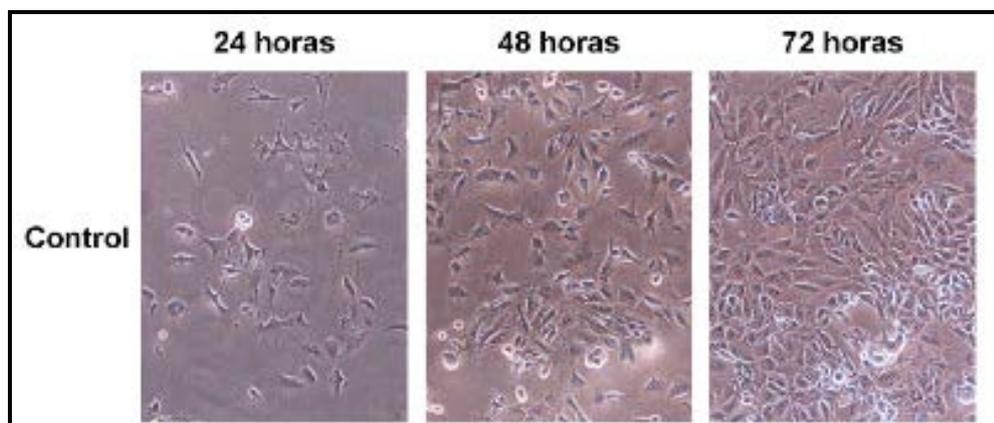
La determinación de la viabilidad celular y el efecto citotóxico de diferentes drogas u otras sustancias sobre líneas celulares cancerosas, es un ensayo reconocido por la comunidad científica internacional cuyo objetivo es estudiar si dichas sustancias son capaces de bloquear la proliferación o inducir la muerte celular, y por tanto, ser consideradas como agentes anti-cancerosos.

En la gráfica se expresa la viabilidad celular del cultivo tras 24 y 48 horas de incubación con los agentes:



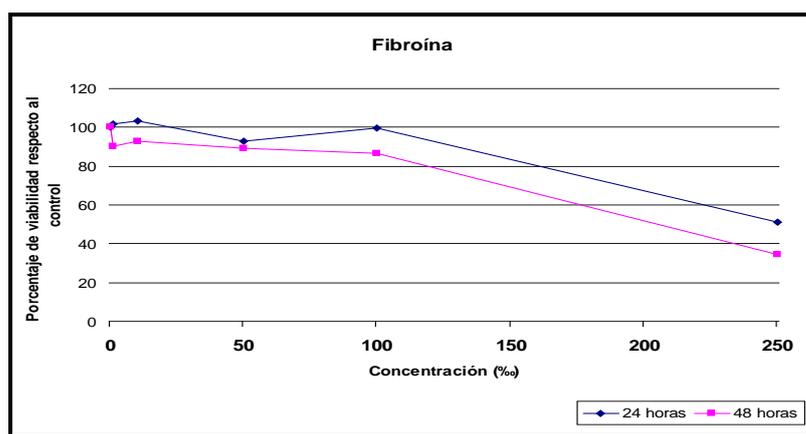
Podemos observar que las sustancias estudiadas no afectan a la viabilidad en ninguno de los tiempos estudiados, a las concentraciones ensayadas.

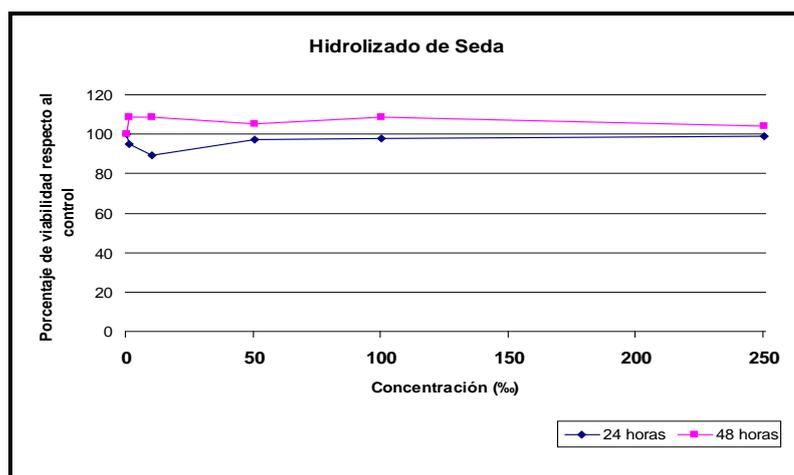
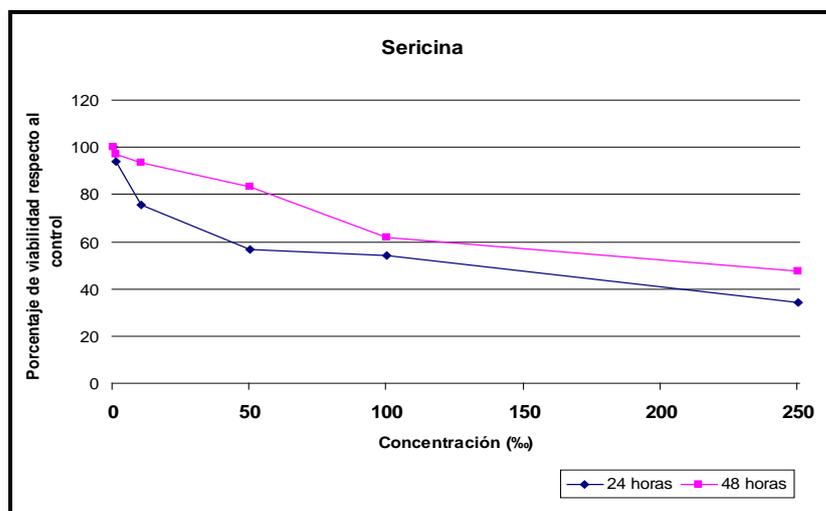
Los bajos valores de R^2 no permitieron calcular la IC 50 con un grado suficiente de precisión (superior al valor 0,5).



C. LÍNEA CÉLULAR HACAT

Las siguientes gráficas muestran cómo afectan diferentes concentraciones de cada producto al crecimiento y viabilidad celular respecto al control, al que se le asigna el valor 100





Los gráficos anteriores relacionan directamente los porcentajes de viabilidad con una escala lineal creciente de concentraciones de los extractos (1 ‰ – 250 ‰). Los puntos representan las concentraciones concretas utilizadas en el estudio. A partir de estas representaciones un programa estadístico elabora y ajusta una recta de regresión (no mostrada) a cada curva, además de facilitar un coeficiente de correlación lineal (R^2) que estima la bondad del ajuste. Gracias a estas manipulaciones estadísticas se calculan los IC_{50} de las regresiones lineales con un R^2 superior al valor 0,5.

El hidrolizado de seda a las concentraciones ensayadas no afectó a la viabilidad celular. En el caso de fibroína y sericina, se produjo un efecto dosis-respuesta estadísticamente significativo ($p < 0,001$) a partir de los valores de concentración 0,1% y 0,05%, respectivamente.

La siguiente tabla muestra los valores de IC50 expresados en porcentaje (peso/volumen):

	IC 50 (24h)	IC 50 (48h)
Fibroína	0,28%	0,21%
Sericina	0,22%	0,16%
Hidrolizado de seda	-----	-----

En el caso del hidrolizado de seda los bajos valores de R^2 no permiten calcular su IC 50 con el grado suficiente de precisión como para ser significativo.

II. GENOTOXICIDAD

La frecuencia de micronúcleos/500 células B (MN/500 CB) de la muestra control (varón adulto de 19 años de edad no fumador y supuestamente sano), fue de 10 MN/500 CB que corresponde a los valores normales de la población adulta estudiada en el laboratorio de radiología experimental para ese rango de edad.

La muestra que sirvió como control positivo (irradiada con 2 Gy de rayos X) presentó una frecuencia de presentación de MN de 26/500 CB, lo que supone un incremento significativo de la frecuencia esperada y presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la frecuencia presentada por las muestras controles ($p < 0,001$) y, por tanto no irradiadas. Estos resultados expresan el efecto genotóxico y mutagénico inducido por la radiación ionizante administrada.

1. FIBROÍNA

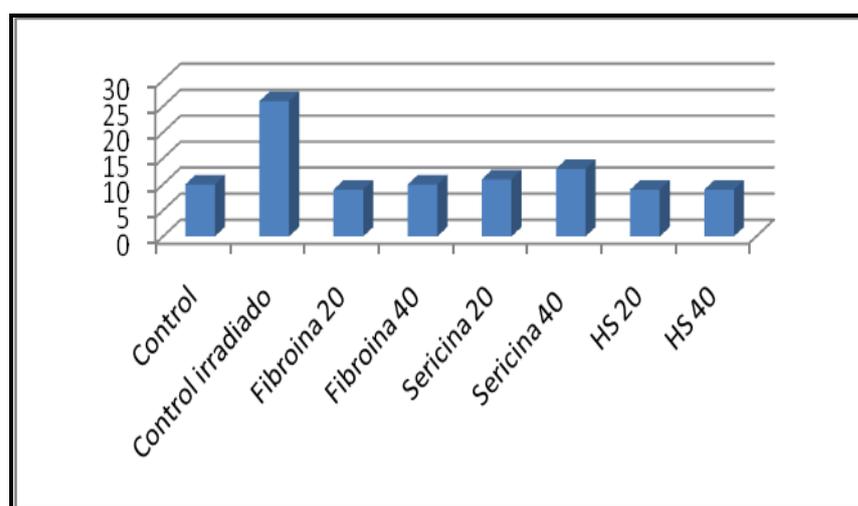
La frecuencia de MN de las muestras tratadas con fibroína fue de 9 MN/500 CB en las muestras tratadas con 20 microlitros y de 10 MN/500 CB para las muestras tratadas con 40 microlitros. Ambas frecuencias no presentaban diferencias significativas con las muestras controles ($p > 0,05$), lo que expresa la ausencia de efecto genotóxico de la fibroína.

2. SERICINA

La frecuencia de MN de las muestras tratadas con sericina fue de 11 MN/500 CB en las muestras tratadas con 20 microlitros y de 13 MN/500 CB para las muestras tratadas con 40 microlitros. Ambas frecuencias no presentaban diferencias significativas con las muestras controles ($p>0,05$), lo que expresa la ausencia de efecto genotóxico de la sericina.

3. HIDROLIZADO DE SEDA

La frecuencia de MN de las muestras tratadas con el hidrolizado de seda fue de 9 MN/500 CB tanto en las muestras tratadas con 20 microlitros como para las muestras tratadas con 40 microlitros. Esta frecuencia no presentaba diferencias significativas con las muestras controles ($p>0,05$), lo que expresa la ausencia de efecto genotóxico del hidrolizado de seda.



III. GENOPROTECCIÓN

El control positivo (muestra de sangre irradiada con 2 Gy de rayos X) presentó una frecuencia de presentación de micronúcleos de 26 MN/500CB, lo que supone un incremento significativo de la frecuencia esperada y presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la frecuencia presentada por las muestras controles ($p < 0,001$) y, por tanto no irradiadas. Estos resultados expresan el efecto genotóxico y mutagénico inducido por la radiación ionizante administrada.

1. FIBROÍNA

La frecuencia de presentación de MN en las muestras tratadas con fibroína administrada antes de la irradiación 20 mL de fibroína 25 μ M en 1 mL de sangre antes de la exposición de una dosis de 2 Gy de rayos X, fue de 22 MN/500 CB y en las muestras tratadas con fibroína tras la irradiación, fue de 24 MN/500/CB. Ambos resultados no presentaban diferencias significativas respecto a los de las muestras controles irradiadas con 2 Gy, lo que expresa la ausencia de efecto protector de la fibroína frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

2. SERICINA

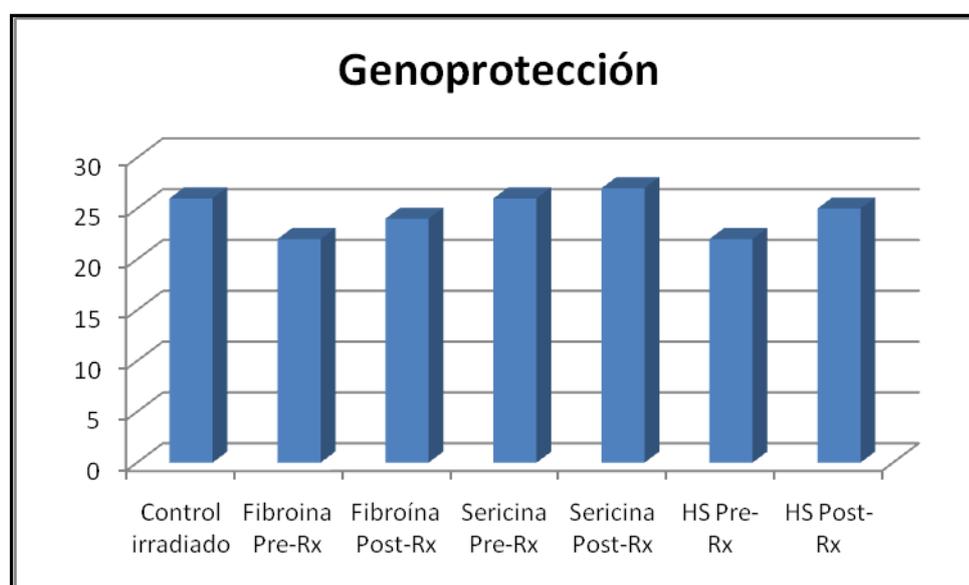
La frecuencia de presentación de MN en las muestras correspondientes al tratamiento con sericina administrado antes de la irradiación 20 mL de sericina 25 μ M en 1 mL de sangre antes de la

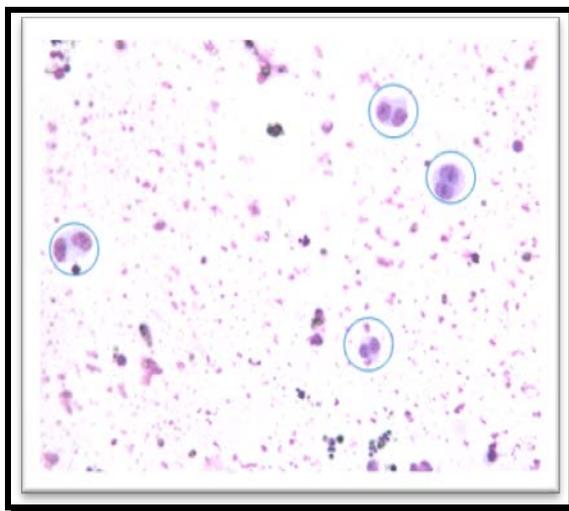
exposición de una dosis de 2 Gy de rayos X, fue de 26 MN/500 CB y en las muestras tratadas con la sericina tras la irradiación fue de 27 MN/500/CB.

Ambos resultados no presentaban diferencias estadísticamente significativas respecto a los de las muestras controles irradiadas con 2 Gy, lo que expresa la ausencia de efecto protector de la sericina frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

3. HIDROLIZADO DE SEDA

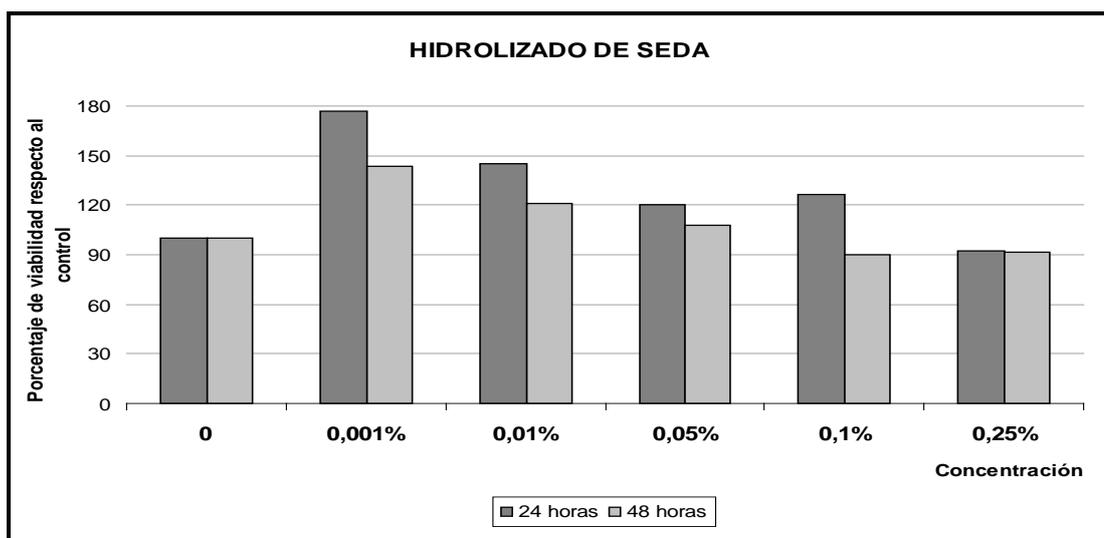
La frecuencia de aparición de MN en las muestras tratadas con hidrolizado de seda previamente a la irradiación 20 mL de HS 25 μ M en 1 mL de sangre antes de la exposición de una dosis de 2 Gy de rayos X, fue de 22 MN/500 CB mientras que en las muestras tratadas tras la irradiación fue de 25 MN/500/CB. Ambos resultados no presentaban diferencias significativas respecto a las muestras controles irradiadas con 2 Gy, lo que expresa la ausencia de efecto protector del hidrolizado de seda frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.



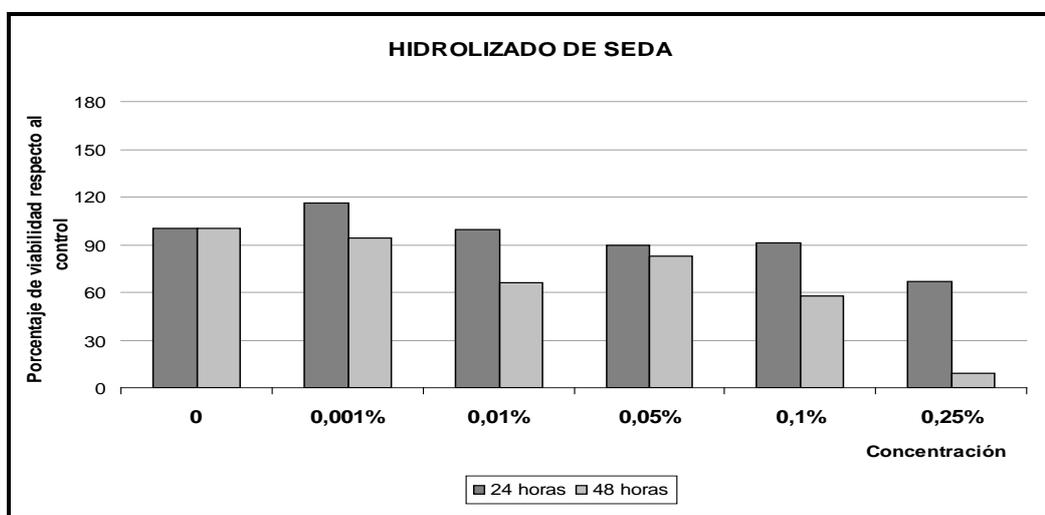


Cultivo de linfocitos humanos con bloqueo citoquinético células binucleadas, con un micronúcleo (círculo rojo) (x400).

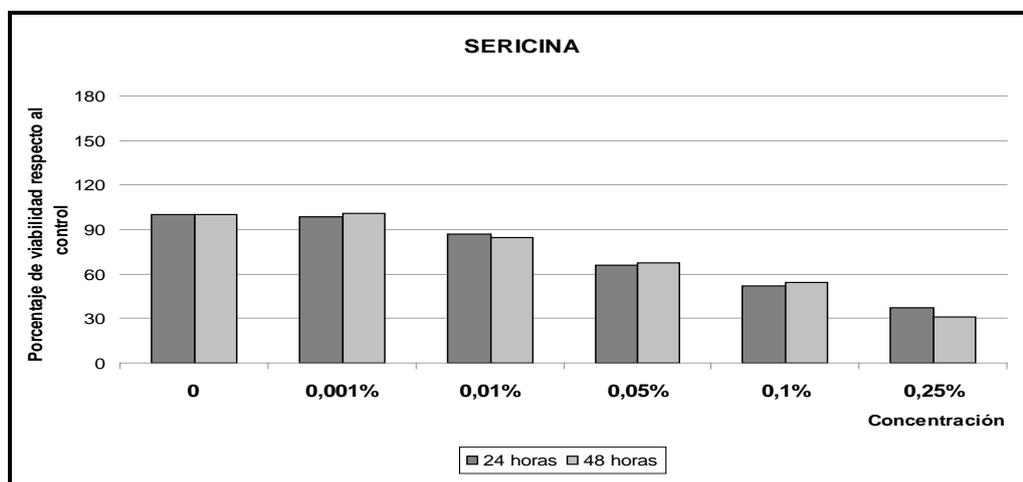
IV. PROTECCIÓN FRENTE A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN LA LÍNEA CÉLULAR HACAT



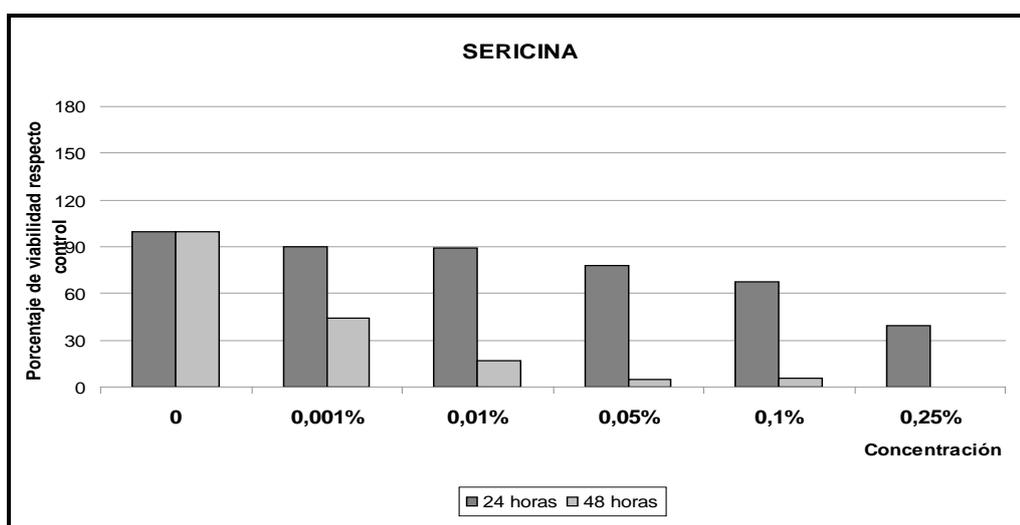
Efecto de la radiación UVB de 0'08 J / cm² de intensidad sobre la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con distintas concentraciones de hidrolizado de seda.



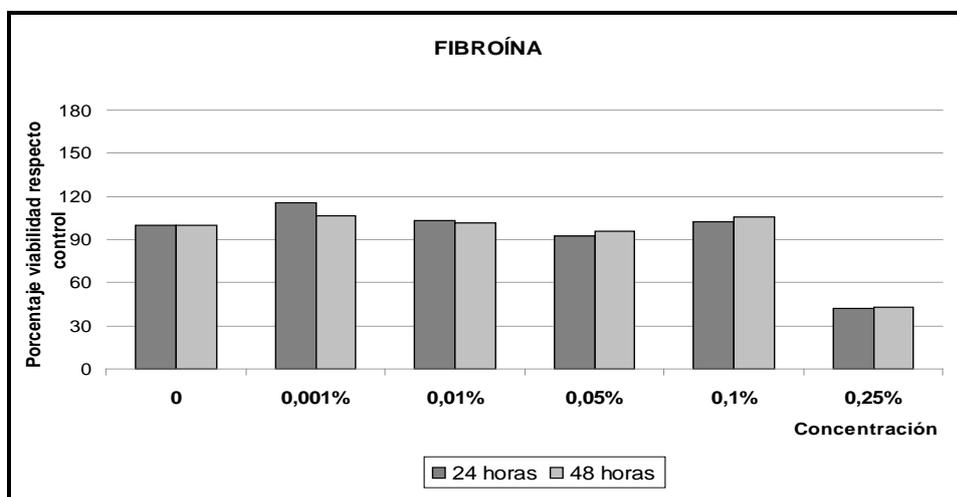
Efecto de la radiación UVB de $0,24 \text{ J / cm}^2$ de intensidad sobre la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con distintas concentraciones de hidrolizado de seda.



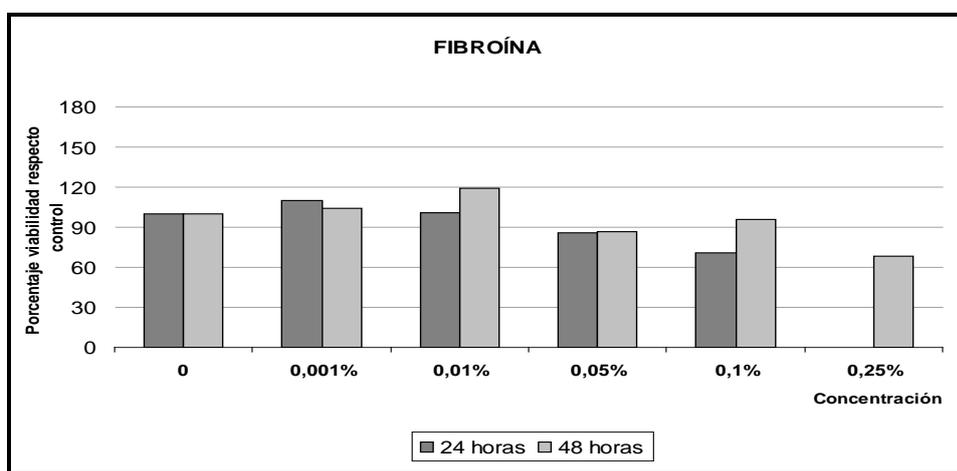
Efecto de la radiación UVB de $0,08 \text{ J / cm}^2$ de intensidad sobre la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con distintas concentraciones de sericina.



Efecto de la radiación UVB de $0,24 \text{ J / cm}^2$ de intensidad sobre la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con distintas concentraciones de sericina.



Efecto de la radiación UVB de $0,08 \text{ J / cm}^2$ de intensidad sobre la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con distintas concentraciones de fibroína.



Efecto de la radiación UVB de $0,24 \text{ J / cm}^2$ de intensidad sobre la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con distintas concentraciones de fibroína.

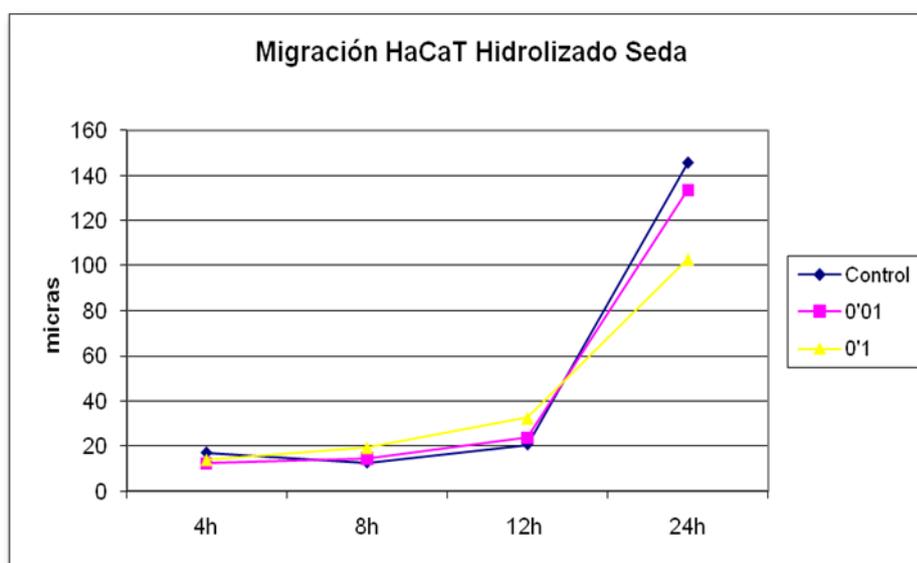
Las gráficas anteriores muestran el efecto de distintas concentraciones de extractos de la seda sobre la proliferación y viabilidad de las células HaCaT tras períodos de tiempo de 24 y 48 horas después de irradiarlas con 0,08 y 0,24 J/cm² de irradiación UVB.

El análisis estadístico de pares de medias indicó que las diferencias que mostraban los datos obtenidos eran significativas en todos los casos ($p < 0,001$), es decir, que las diferencias de la viabilidad con cada tiempo, concentración y dosis de radiación fueron estadísticamente significativas.

Así, el destacado incremento de viabilidad a 24 y 48 horas causado por el hidrolizado de seda a bajas concentraciones y mínima intensidad de radiación ultravioleta recibida fue significativo ($p < 0,001$). Del mismo modo, el moderado incremento de la viabilidad así como la estabilización de la viabilidad por la fibroína a concentraciones bajas-medias tras la mínima intensidad de radiación ultravioleta también fue significativo ($p < 0,001$).

V. MIGRACIÓN EN LA LÍNEA CÉLULAR HACAT

La comparación de medias con nivel de significación $p \leq 0,05$ mostró una clara ausencia de diferencias entre el control y los tratamientos con dos concentraciones de hidrolizado de seda ($p = 0,61$ para la concentración 0,01 % y $p = 0,45$ para la concentración 0,1 %). Es decir, que el porcentaje de área colonizada por las células en los tiempos estudiados, fue similar tanto en el caso de los pocillos tratados como en los controles, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las concentraciones estudiadas del hidrolizado de seda y el control.



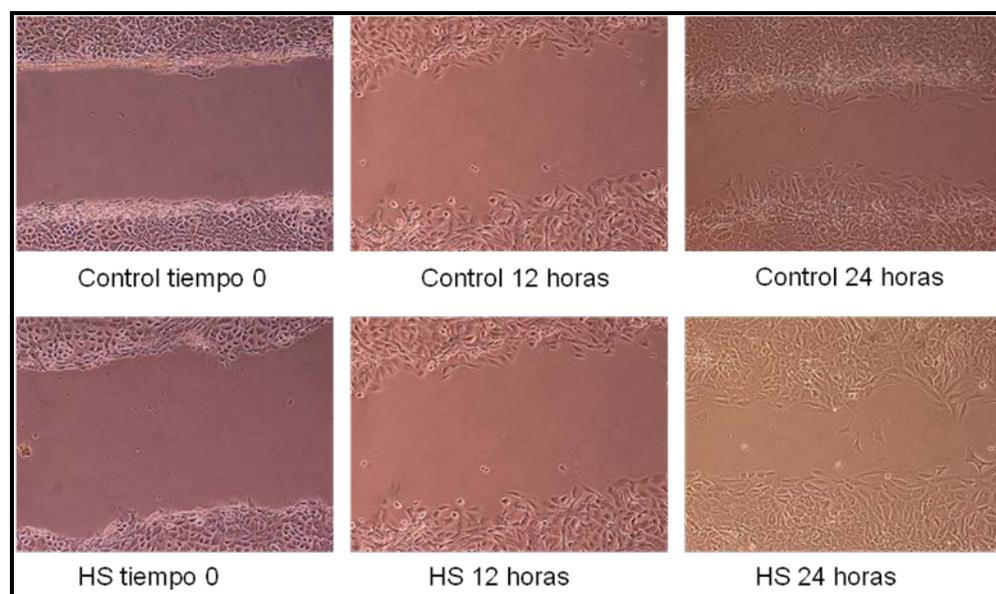
El gráfico representa cómo afecta la concentración de fibroína al crecimiento y proliferación celulares. Cada línea muestra cómo evoluciona la proliferación en cada uno de los tiempos estudiados. Otra característica es que el valor máximo de inhibición de crecimiento celular se dio en todos

los casos a la concentración 5 μM , aunque la significación de esta observación ha de confirmarse con los análisis estadísticos pertinentes.

El siguiente gráfico relaciona directamente las lecturas de absorbancia del espectrofotómetro con una escala creciente lineal de concentración de fibroína. Los puntos representan las concentraciones concretas empleadas en el estudio. A partir de estas representaciones, un programa estadístico elabora y ajusta una recta de regresión para la IC50 e IC 90.

En nuestro caso, los mejores ajustes a la curva no fueron suficientemente buenos como para considerar fiables los datos de IC obtenidos.

IC50 24 h.	162'50 μM	IC50 48 h	211'33 μM	IC50 72 h	62,02 μM
IC90 24 h.	315'83 μM	IC90 48 h	455 μM	IC90 72 h	148,77 μM



VI. DISCUSIÓN

Los cultivos celulares constituyen un método que permite simplificar los estudios hasta determinados niveles aceptables, a diferencia de los experimentos con organismos completos, al poder eliminar las interacciones y variaciones que se suelen presentar en estos últimos. Sus principales ventajas en el estudio de la actividad celular corresponden fundamentalmente al control del ambiente, la homogeneidad de la muestra y a la exposición directa de los agentes a ensayar a determinadas concentraciones. Por otra parte, los cultivos celulares constituyen el sistema más importante de los distintos métodos alternativos a la experimentación animal.

Estos hechos han supuesto un importante reto para la investigación científica, relacionado, por una parte con el desarrollo de diversos modelos experimentales “in vitro” de daño celular por irradiación ultravioleta (RUV), así como el posterior estudio de los efectos fotoprotectores de diversas sustancias, puesto que la normativa legal vigente en nuestro país impide la realización de modelos con animales para el ensayo de sustancias que, como ocurre con los extractos ensayados en este trabajo, puedan ser utilizados posteriormente en productos cosméticos fotoprotectores.

En este sentido, los cultivos celulares constituyen una alternativa para conocer los mecanismos celulares, así como los cambios implicados tras la exposición a radiación, tanto ionizante como ultravioleta así como de la geno y fotoprotección, que han sido objetivos de nuestro trabajo.

Asímismo, durante los últimos años ha ocurrido algo similar respecto a los productos o sistemas de fotoprotección, lo que ha llevado a un enorme

desarrollo de nuevos fotoprotectores de naturaleza química, así como a nuevas formulaciones de los de naturaleza física; aunque quizás lo mas novedoso corresponda al gran esfuerzo investigador en relación con los de naturaleza biológica y al ensayo de distintas sustancias de origen natural como los aceites esenciales. En nuestro trabajo hemos ensayado tres extractos correspondientes a este último grupo, derivados del capullo del gusano de la seda: fibroína, sericina y el hidrolizado.

La **seda** es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx mori L.*) que la utiliza para elaborar el capullo, una estructura cerrada de protección en la que realiza la metamorfosis de larva a adulto. Tal y como es segregado, el hilo de seda es continuo y puede medir hasta 1.500 metros, consta de dos proteínas: una de ellas es la **fibroína**, que es una proteína polimérica y lineal, que altera dominios amorfos y otros de lámina beta y constituye el 70% del peso del capullo. La otra proteína es la **sericina**, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína. La sericina es normalmente desechada en proceso textil aunque tiene diversas aplicaciones en cosmética (Cenis, 2008). Sin embargo, en el mundo occidental el aceite de crisálida fue descubierto de manera casual en Córcega. Fue en la primera mitad del S. XX, cuando un médico observó que las heridas que se hacían las mujeres que trabajaban en la fábrica de seda, al separar el gusano del capullo, sanaban con celeridad, cicatrizando totalmente sin dejar secuelas, lo que atribuyó a un líquido aceitoso contenido en el interior del gusano de la seda (conocido como aceite de gusano de seda o aceite de crisálida).

Uno de los campos de aplicación más importantes de los cultivos celulares corresponde al estudio del crecimiento, la viabilidad y la citotoxicidad en líneas celulares, mediante distintos métodos de evaluación directos e indirectos, entre los que destacan los ensayos de exclusión de colorante (Kaltenbach y cols., 1958; Borenfreund y cols., 1990), ensayos clonogénicos (Salmon y cols., 1978; Courtenay y Mills 1978), etc, y más recientemente los métodos de microtitulación, que suelen ser bastante más sensibles y reproducibles que los anteriores.

En los últimos años se han desarrollado algunos métodos colorimétricos que se pueden utilizar en placas de microtitulación, como es el que emplea la sal de tretrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazolio (MTT). Los ensayos con MTT son un método rápido, eficaz y fiable para cuantificar colorimétricamente la viabilidad celular en estudios de proliferación celular y citotoxicidad de cultivos “in vitro”, tanto en suspensión como en monocapa. En estudios previos de nuestro grupo (Rodríguez-Vicente y cols. 1998, Yáñez y col. 2004), hemos adaptado los métodos de Carmichael y cols. (1987 a y b) y Alley y cols. (1988) para su utilización sobre diversas líneas de melanoma, lo que hemos utilizado también en este trabajo.

La técnica, ampliamente utilizada, se basa en la reducción del MTT, soluble y de color amarillo, a un formazán insoluble de color azul. Esta reducción se realiza por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, activa solamente en las células vivas.

En relación con el **primer objetivo** planteado en nuestro trabajo, que consistía en evaluar los posibles efectos de los citados extractos sobre la viabilidad celular de las líneas: Vero, TRAMP-C1 y HaCaT, hemos utilizado el test del MTT descrito por Carmichael et al. (1987a; 1987b) y Alley et al. (1988). Esta técnica se basa en la capacidad de las células viables, mediante la acción de deshidrogenasas mitocondriales, de reducir el MTT, una sal de tetrazolio amarilla, a un producto de formazano de color azul (Carmichael, 1987a; Carmichael, 1987b; Alley, 1988; Talorete, 2006).

Esta técnica tiene además la ventaja de que puede realizarse de forma semiautomática, utilizando placas de 96 pocillos, ya que el producto de formazano se puede cuantificar mediante un espectrofotómetro de placas. Esta ventaja, junto a que sus resultados son similares a los de otros métodos utilizados para evaluar la viabilidad celular (Carmichael, 1987a y 1987b; Schroeterova, 2009), la convierten en una de las técnicas más empleadas para este tipo de ensayos.

En nuestro estudio, tras realizar diversos ensayos previos, los espectros de absorción para las condiciones experimentales y las líneas celulares consideradas, determinaron un máximo de absorbancia a 570 nm, lo que coincidía en general con los resultados de la mayoría de los métodos desarrollados hasta ahora para su utilización con MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolico) (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL, 1987a, 1987b y ALLEY 1988). No obstante, en este trabajo, hemos utilizado como longitud de onda de referencia 690 nm, puesto que no existía absorbancia del MTT, MTT formazán, ni otros componentes celulares a esa longitud de onda.

Por otra parte, para conseguir la solubilización de los cristales de MTT formazán que se forman en el interior celular, podemos comenzar utilizando el isopropancol (MOSMANN, 1983) y propanol o etanol (DENIZOT, 1986), aunque la solubilización no era total y facilitaba la interferencia del rojo fenol y del suero del medio con el espectro de absorción del MTT, por lo que posteriormente, y en un intento de mejorar la solubilización, se utilizó DMSO para los cultivos en monocapa y aceite mineral para los cultivos en suspensión (Carmichael, 1987a y 1987b).

En nuestro estudio, y de acuerdo con lo señalado por Alley (1988) hemos observado que el DMSO puede utilizarse con resultados óptimos tanto en los cultivos en monocapa cómo en suspensión. Además, antes de añadir el solubilizante hay que retirar el medio, y sea cual sea el método utilizado, siempre quedan unos 10-20 μ L en el fondo de los pocillos, que resultan más miccibles en DMSO que en aceite mineral (Alley, 1988).

El ensayo con MTT presentó una alta correlación entre la cantidad del MTT metabolizado y el número de células viables por pocillo, por lo que resulta un indicador adecuado para estimar el número de células vivas de un cultivo, a partir de la intensidad del color que muestra cada pocillo. Dicha correlación se mantenía, tanto con grandes densidades celulares como con un número bajo de células, por lo que consideramos que este método es adecuado para utilizarlo en ensayos en los que el control puede alcanzar gran número de células, mientras que los grupos tratados pueden contener escasas células viables.

En este sentido, otros autores han comparado el ensayo mediante MTT con el de formación de colonias en agar, contenido de proteína celular e incorporación de timidina tritiada (Carmichael, 1987; Alley, 1988 y Arnould, 1990a) obteniéndose en todos una fuerte correlación, por lo que permite utilizar el ensayo de MTT en sustitución de los demás.

En nuestro trabajo hemos adaptado el modo de utilización de los extractos ensayados a nuestro modelo “in vitro”. Para ello hemos ajustado las dosis utilizadas al volumen de medio de cultivo y a la capacidad del recipiente donde se cultivaban las células, entendiendo que con una mayor exposición directa de las células a los distintos extractos podríamos evaluar con mayor exactitud cualquier alteración en el crecimiento celular.

Asímismo, en este estudio hemos utilizado varios tiempos de incubación con los extractos a ensayar (24, 48 y 72 horas) para poder evaluar, tanto su efectos citotóxicos como antiproliferativos. Dado que diversos autores han establecido que en el tratamiento durante periodos cortos de tiempo, tales como 24 horas, los cambios en la viabilidad celular son debidos, fundamentalmente, a la muerte celular directa (Hansson, 1987; Rodríguez-Vicente, 1988; Yañez, 2004); sin embargo, otros autores proponen la incubación con concentraciones muy elevadas durante periodos de tiempo muy cortos (3 horas) para estudiar la citotoxicidad (Kuntz, 1999).

Por otra parte, los ensayos a tiempos más largos (72 horas), permiten evaluar el efecto antiproliferativo del compuesto estudiado, ya que ese periodo da lugar a que se produzcan fenómenos de apoptosis, de parada del ciclo celular, etc. (Hansson, 1987; Rodríguez-Vicente, 1988; Yañez, 2004).

La línea celular **Vero** (ECCC) fue establecida en 1962 por Yasumura y Kawakita en la Universidad de Chiba (Japón), y corresponde a células epiteliales de túbulo renales del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Consiste en una línea celular continua, no transformada y muy estable, libre de agentes contaminantes o infecciosos y altamente sensible a cualquier tóxico por lo que su utilización se ha extendido a laboratorios de todo el mundo para este tipo de ensayos.

Sobre esta línea, la fibroína mostró escasa pérdida de viabilidad celular, sobre todo a las 72 horas, no bajando en ningún caso del 60% respecto al control. Sin embargo, tanto la sericina como el hidrolizado de seda, afectaron a la viabilidad del cultivo, que era evidente en el caso en que administramos la máxima concentración de cultivo de sericina a las 72h (10%).

Con el hidrolizado de seda, los primeros ensayos realizados con diluciones porcentuales de entre 0,5 y 10% mostraron un freno de la viabilidad a las concentraciones 2,5, 5 y 10% que probablemente fue debida al elevado potencial osmótico del extracto a esas concentraciones.

La segunda línea celular utilizada en nuestro estudio correspondió a la línea celular **TRAMP-C1** que deriva de un tumor de próstata de un ratón TRAMP (Foster, 1997). Los ratones TRAMP son animales transgénicos diseñados para expresar un fragmento del material genético del virus SV40 específicamente en el epitelio de la próstata mediante el promotor del gen de la probasina de rata (Greenberg, 1994). Estos animales desarrollan todo el espectro tumoral de la próstata, desde la hiperplasia intraepitelial leve a la

neoplasia maligna, semejando estrechamente lo que ocurre en patología humana (Greenberg, 1995).

En este trabajo hemos elegido esta línea celular de cáncer de próstata para estudiar el posible efecto quimiopreventivo de los extractos ensayados, puesto que tradicionalmente se considera que las neoplasias de próstata son una excelente diana para el uso de compuestos quimiopreventivos, por su largo periodo de latencia además de su alta incidencia (Gupta, 2001; Patel, 2007), junto al hecho de que el cáncer, en general, es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y por tanto uno de los principales problemas sanitarios, sobre todo en los países desarrollados (Yabroff, 2007; Jemal, 2009). El cáncer de próstata, exceptuando a los cánceres cutáneos, es uno de los principales tumores humanos, tanto por su incidencia (25%) como por las muertes que provoca (9%) (Berkow, 2007; Assinder, 2009; Jemal 2013).

En nuestro estudio, pese al efecto citotóxico de la sericina y el hidrolizado de seda sobre células Vero, los extractos estudiados no afectaron a la viabilidad de la línea **TRAMP-C1** en ninguno de los tiempos estudiados y a las concentraciones ensayadas, lo que parece indicar que ninguna de las sustancias ensayadas mostró efecto anti-tumoral sobre dicha línea.

No obstante, aunque no ha sido probada anteriormente en el cáncer de próstata, la sericina ha demostrado efecto protector frente al cáncer de piel “in vivo” en ratones tratados con DMBA-TPA (Zhaorigetu, 2003), en los que disminuía el tamaño y la incidencia de los tumores de forma significativa. Además, la sericina suprimió de forma significativa la elevación en el nivel de

4-HNE y expresiones elevadas de c-fos, c-myc y la ciclooxigenasa-2 (COX - 2).

Por otra parte, también ha sido descrito que la sericina posee efecto protector frente a la promoción de tumores en la piel del ratón mediante la supresión del estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y TNF- α , según los estudios de Zhaorigetu, 2003 a, 2003b y 2007. Por lo que progresivamente, la sericina se ha convertido en un componente natural muy importante tanto en la industria cosmética como en la alimentaria (Voegli, 1993) por su importante actividad antioxidante (Kato, 1998).

La línea **HaCaT** (ATCC, EEUU) corresponde a queratinocitos cutáneos humanos de la piel de un individuo caucásico, norteamericano, voluntario de 27 años.

El objetivo del ensayo de citotoxicidad en esta línea celular, consistió fundamentalmente en ajustar bien la dosis de los extractos para poder utilizar la máxima concentración que admitiera el cultivo, sin que afectara a su viabilidad y poder llegar hasta ese punto con el ensayo de fotoprotección y migración.

La fibroina no presentó acción citotóxica para esta línea celular hasta una concentración de 0,1 %, a partir de la cual observamos cierto efecto citotóxico dependiente de la dosis estadísticamente significativo. Sin embargo, la sericina resultó más citotóxica que la fibroina, como también ocurría en la línea celular Vero. Este efecto comenzó a hacerse evidente ya con las concentraciones más bajas (0,05 y 0,1), alcanzando la IC50 de forma

temprana en 0,22% a las 24 horas y 0,16% a las 48 horas. El efecto negativo dosis-respuesta sobre el cultivo fue estadísticamente significativo a partir del 0,05%.

No obstante, el hidrolizado de seda fue el extracto que mostró un mejor comportamiento respecto a la viabilidad de las células HaCaT, con valores próximos e incluso superiores al 100% (control) en todas las concentraciones estudiadas, tanto a 24 como a 48 horas, por lo que se puede concluir que el hidrolizado de seda no afecta a la viabilidad celular de esta línea.

El **segundo objetivo** de nuestro trabajo consistió en estudiar los posibles efectos genotóxicos y genoprotectores de los tres extractos del gusano de la seda ensayados en este estudio, dado que la exposición accidental, o no, a la radiación ionizante (durante técnicas de diagnóstico médico o aplicaciones industriales, vuelos, accidentes, etc.) y los daños genéticos causados por ella pueden estar aumentando debido al incremento progresivo de su aplicación en la sociedad actual; sin embargo, todavía no se dispone de radioprotectores seguros, ya que los utilizados hasta ahora suelen presentar toxicidad a dosis radioprotectoras (Bogo, 1985; Nair, 2001; Hosseinimehr, 2003; Hosseinimehr, 2006; Song, 2006; Alcaraz, 2009). Por ello, y debido al reciente interés en la utilización de compuestos polifenólicos como radioprotectores, en nuestro trabajo nos planteamos el estudio de los posibles efectos de la fibroína, sericina y del hidrolizado de seda, para disminuir los daños causados por la radiación ionizante.

La radiación ionizante puede inducir la formación de fragmentos acéntricos de cromosomas y la segregación errónea de cromosomas; éstos, si

no interaccionan con el huso mitótico, quedan en el citoplasma formando un pequeño núcleo denominado micronúcleo aislado del principal (IAEA, 2001; Fenech, 2007). La técnica desarrollada por Fenech *et al.* (1985) para cuantificar la aparición de micronúcleos, conocida como ensayo de micronúcleos bloqueados durante la citoquinesis, se ha convertido en el método preferido para la cuantificación de este tipo de daños (IAEA, 2001; Fenech, 2007) y en una de las técnicas citogenéticas más utilizadas para estudiar los daños genotóxicos en mamíferos (Fenech, 2007).

El ensayo de micronúcleos es uno de los métodos más sensibles para medir el daño al DNA causado por distintos agentes genotóxicos, entre ellos la radiación ionizante, el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido o los neutrófilos activados (Fenech, 1985; Fenech, 1986; Fenech, 1991; Fenech, 1993; Odagiri, 1994; Fenech, 1997; Umegaki, 2000), siendo, incluso, más sensible que la detección de 8-oxo- dG por HPLC (Kobus, 1993).

Existen, además, otra serie de técnicas utilizadas para cuantificar el daño causado en el DNA, bien por la radiación ionizante, o bien por otros agentes genotóxicos. Otras técnicas citogenéticas analizan la presencia de cromosomas dicéntricos, anillos, exceso de fragmentos, o la condensación prematura de la cromatina (IAEA, 2001; Terzoudi, 2006); asimismo, el desarrollo de las técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) ha permitido estudiar daños más persistentes, como translocaciones (Terzoudi, 2006).

Además, también se utilizan técnicas bioquímicas, como el estudio del bloqueo en la fase G₂, que se produce cuando la célula ha sufrido daños cromosómicos, o la actividad de cdk 1 y de la ciclina B en la transición G₂-M

(Terzoudi, 2006). La técnica de Cometa, o la versión alcalina del ensayo de electroforesis en gel de una sola célula, es una técnica rápida para detectar daño en el DNA, y permite estimar la cinética de reparación de las lesiones (Kumaravel, 2006).

En nuestro estudio, los tres extractos ensayados no presentaron actividad genotóxica, ni a 20 ni a 40 μL , puesto que no aumentaron la frecuencia basal de presentación de micronúcleos en los linfocitos humanos bloqueados con citochalasina B, lo que demuestra, por tanto, la ausencia de capacidad mutagénica de estos compuestos.

De este modo, la frecuencia de MN de las muestras tratadas con fibroína fue de 9 y 10 MN/500 CB para las muestras tratadas con 20 μL y 40 μL respectivamente. En el caso de la sericina, la frecuencia de MN fue de 11 y 13 MN/500 CB (20 y 40 μL , respectivamente) y para el hidrolizado de seda, de 9 MN/500 CB tanto en las muestras tratadas con 20 μL como para las de 40.

En la revisión bibliográfica realizada hemos encontrado descritos numerosos extractos o compuestos vegetales con actividad antioxidante (extractos de cítricos, de té rojo o negro, de soja, crisina, genisteína, hesperidina, luteolina, naringina, orientina, polifenoles del vino, quercetina, vicenina) que disminuyen los daños inducidos por la radiación ionizante utilizando diferentes versiones del test de micronúcleos (in vitro e in vivo) y el test Cometa (Shimoi, 1994; Shimoi, 1996; Parshad, 1998; Uma Devi, 2000; Vrinda, 2001; Greenrod, 2003; Hosseinimehr, 2003; Zhou, 2005; Hosseinimehr, 2006; Song, 2006; Benkovic, 2009b; Benkovic, 2009a).

Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha demostrado asimismo, en varios estudios previos, la actividad radioprotectora de diversos extractos ricos en polifenoles y flavonoides, como extractos de olivo, de semilla de uva y de té verde (Castillo, 2000; Castillo, 2001; Benavente-García, 2002; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009; Castillo, 2010) y de polifenoles y flavonoides, como los ácidos carnósico, rosmarínico, gálico y elágico, el carnosol o el hidroxitirosol (Alcaraz, 2006; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009), la rutina y la diosmina (Castillo, 2000; Benavente-García, 2002).

Asimismo, muchos otros compuestos con actividad antioxidante, como son los compuestos con grupos sulfidriilo, tales como la cisteína o la amifostina, vitaminas antioxidantes, etc., han sido también utilizados como radioprotectores (Bogo, 1985; Nair, 2001; Song, 2006; Alcaraz, 2009).

No obstante, no hemos encontrado descritos en la bibliografía, estudios en los que se hayan utilizado los extractos del gusano de la seda ensayados en nuestro trabajo.

En cuanto al segundo apartado de este objetivo, consistente en estudiar el posible efecto protector de los tres extractos frente a la radiación ionizante, destaca que el control positivo (es decir las muestra de sangre irradiadas con 2 Gy de rayos X) presentaba una frecuencia de micronúcleos de 26 MN/500CB, lo que supone un incremento significativo de la frecuencia esperada, que presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la frecuencia presentada por las muestras control ($p < 0,001$) no irradiadas. Estos resultados expresan el efecto genotóxico y mutagénico inducido por la radiación ionizante administrada a las muestras control.

Por otra parte, la frecuencia de presentación de MN en las muestras tratadas con fibroína antes de ser irradiadas de la misma forma que el control, fue de 22 MN/500 CB, mientras que los compuestos de las muestras post-irradiación era de 24 MN/500/CB. Ambos resultados no presentaban diferencias significativas con el control, lo que indica la ausencia de efecto protector de la fibroína frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

Del mismo modo, la sericina tampoco demostró efecto protector frente a las radiaciones, siendo la frecuencia de MN en las muestras tratadas pre-irradiación de 26 MN/500 CB y en las muestras tratadas post-irradiación, de 27 MN/500/CB.

El hidrolizado de seda tampoco demostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control, con 22 y 25 MN/500 CB en las muestras tratadas pre-irradiación y post-irradiación respectivamente, por lo que concluimos que este agente también poseía efecto protector frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

El mecanismo patogénico de la radiación ionizante consiste en la formación masiva de ROS en las células afectadas (Benavente-García, 2002; Rithidech, 2005a; Alcaraz, 2009). Esta generación de grandes concentraciones de radicales libres sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula, por lo que el ataque oxidativo a distintas moléculas puede provocar daños cromosómicos y mutaciones, o, incluso, la muerte celular (Rithidech, 2005a). Dada la síntesis masiva de radicales libres inducida por la radiación ionizante y la actividad

radioprotectora de muchos compuestos antioxidantes, numerosos autores han considerado que su capacidad antigenotóxica se basa, fundamentalmente, en la eliminación de ROS por los antioxidantes (Devi, 1999; Castillo, 2000; Uma Devi, 2000; Castillo, 2001; Benavente-García, 2002; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009).

Por tanto, la actividad radioprotectora de los agentes a ensayar se justificaría por su capacidad de capturar radicales libres (Kim, 2004b; Nagai, 2005; Patel, 2007) e inhibir el estrés oxidativo (Jeyabal, 2005; Duarte-Almeida, 2006; Patel, 2007); y, quizás, por la protección de los sistemas antioxidantes endógenos (Khan, 2006).

Sin embargo, no hemos encontrado en la revisión bibliográfica realizada trabajos en los que se haya estudiado el efecto del gusano de seda, su crisálida o su capullo sobre la radiación ionizante.

En relación con el **tercer objetivo** de nuestro trabajo, nos planteamos estudiar los efectos de los tres extractos sobre la migración celular en la línea HaCaT.

En nuestro estudio, el ensayo de migración no presentó diferencias significativas entre el control y los tratamientos con dos concentraciones de hidrolizado de seda ($p = 0'61$ para la concentración 0'01 % y $p = 0'45$ para la concentración 0'1 %). Es decir, que el porcentaje de área colonizada por las células en los tiempos estudiados, fue similar tanto en el caso de los pocillos tratados como en los controles. Por lo que las concentraciones estudiadas del

hidrolizado de seda (0'01 y 0'1 %) no provocaron una colonización más rápida de la herida realizada a los pocillos de ensayo. Concluimos, por tanto, que el hidrolizado de seda no favorece la migración celular de las células HaCaT, al no existir diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las concentraciones estudiadas del hidrolizado de seda y el control.

No obstante, la línea celular HaCaT (queratinocitos humanos no transformados de un individuo caucásico) ha sido utilizada en numerosos estudios con el objetivo de cuantificar el estrés oxidativo o las lesiones en el material genético, provocadas por la radiación ultravioleta.

En cuanto al **cuarto objetivo**, consistente en estudiar los posibles efectos protectores de los extractos frente a las RUV B, estaban basados en el interés que presenta la fotoprotección cuya finalidad es prevenir los efectos adversos de la exposición solar crónica y retrasar el fotoenvejecimiento impidiendo la presentación del cáncer cutáneo. Existen diferentes fotoprotectores según el tipo de filtro y mecanismo de acción (Montero, 2008): los **orgánicos**, conocidos también como químicos, los **inorgánicos**, llamados físicos, y los **biológicos**, que corresponden a sustancias que penetran más y tienen actividad antioxidante (Yaar, 2007). Entre los que se encuentran vitaminas con actividad antioxidante directa, otras sustancias que ejercen la actividad antioxidante a través de capacidad quelante del hierro (diferentes flavonoides), y otras que aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes de la piel (algunos oligoelementos) (Tuchinda, 2006).

En este último grupo se ha incorporado más recientemente a los aceites esenciales, que suelen ser mezclas de varias sustancias químicas sintetizadas

por algunas plantas (dan el aroma característico de algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas) así como ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris, etc.). Son intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire.

Durante las últimas décadas, la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la de tipo recreativo o intermitente, por lo que la "**dermatoheliosis**" se produce también en personas jóvenes que se exponen a la radiación solar sin protección, o a fuentes de luz ultravioleta artificial para el bronceado rápido (Camacho, 2001), por lo que durante los últimos años se ha ido generando de forma paulatina un nuevo cambio social, gracias al cúmulo progresivo de conocimientos en el sentido de que la exposición solar y por tanto el bronceado pueden comportar un grave riesgo (Vicente, 1999).

El cáncer cutáneo constituye la neoplasia maligna humana más frecuente (Matsumara, 2002; Jemal, 2011; Siegel, 2012;). Su prevalencia en occidente ha aumentado exponencialmente en los últimos años. Actualmente, supone uno de los motivos de consulta médica más frecuentes. Aunque su pronóstico es excelente tras la cirugía, excepto el melanoma, su abordaje clínico y terapéutico precisa la dedicación de un alto porcentaje del presupuesto sanitario en el mundo occidental (Yaar, 2007; Jemal, 2011; AVCI, 2013;).

La absorción directa de la energía por cromóforos de la epidermis (ADN, ARN, melanina, el ácido urocánico, lípidos, proteínas) va a originar la

formación de fotoproductos, especialmente dímeros de pirimidina que absorben diferentes longitudes de onda específicas (Young, 1997). Éstas, al liberarse posteriormente, originarán reacciones fotoquímicas con daño genético directo, que lleva a la producción de mutaciones y trastornos del crecimiento neoplásico cutáneo o fotocarcinogénesis, generalmente como consecuencia de las longitudes de onda corta de la RUV B y A (Brash, 1997; Young, 1998).

También se produce daño oxidativo indirecto por efecto de reacciones de fotosensibilización endógena en relación con las longitudes de onda mayores de la RUV A (Burren, 1998). Este daño celular va a generar, a su vez, la liberación de diversos mediadores químicos de la inflamación con las acciones descritas en el apartado a), junto a la acción moduladora sobre otros tipos celulares como queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, etc.

Casi todas las mutaciones originadas experimentalmente por RUV B y A se localizan en las pirimidinas adyacentes, y alrededor de dos tercios son mutaciones distintivas (Brash, 1991). El tercio restante también son generadas por las radiaciones ultravioleta, pero probablemente surjan a partir de la producción de ROS (Wondrak, 2001). Dado que existen diversos carcinógenos que generan esta lesión oxidativa, es difícil conocer si la fuente de las mutaciones fue la RUV B, la A, o la fosforilación oxidativa intracelular. La RUV A, induce levemente la aparición de mutaciones distintivas por RUV B a través de la fotosensibilización, pero genera mutaciones similares a las oxidativas en intercambios T→G. Estos intercambios se observan raramente con las UVB u otros carcinógenos, por lo que se considera que sean consecuencia de la RUV A (Halliday, 2005).

Está demostrado que la RUV B induce la síntesis de la enzima ornitindecarboxilasa, que limita la tasa de síntesis de poliaminas que estimulan la proliferación celular. Ello facilita la formación de neoplasias, a lo que se suma a la síntesis de óxido nítrico, que a su vez, induce la producción de eritema, melanogénesis e inmunosupresión lo que favorece la carcinogénesis. Por último, también favorece la angiogénesis dérmica, al disminuir la expresión de los inhibidores de trombospondina-1 y además, la expresión de dos factores angiogénicos, como el VEGF y el factor de crecimiento endotelial dependiente de plaquetas (Afaq, 2006).

A nivel celular, el efecto combinado de la RUV A y RUV B conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que activan directamente las MMPs, desencadenando reacciones en cascada múltiple que llevan a la transcripción de genes proinflamatorios y proapoptóticos. Todo ello conduce a la inflamación, la apoptosis y, finalmente, a la fotocarcinogénesis (Gupta, 2014).

Además se ha descrito que la radiación UV daña el ADN y puede dar lugar a alteraciones genómicas, que varía desde mutaciones puntuales a dislocaciones cromosómicas. La radiación UVB (banda de longitud de onda de 280-315 nm) es más cancerígena que la radiación UVA (315-400 nm) en la inducción experimental de carcinoma de células escamosas (SCC). El impacto de la radiación UVB puede deducirse claramente de las mutaciones puntuales características de p53 se encuentran en SCC humano y BCC.

En contraste con la radiación UVB, la mayor parte de la acción mutagénica y carcinogénica de la radiación UVA parece estar mediada a través de especies reactivas de oxígeno (ROS) (De Grujil, 2002).

En nuestro trabajo, en el estudio de fotoprotección, hemos obtenido resultados positivos con el hidrolizado de seda y con la fibroína, que fueron estadísticamente significativos en todos los casos. Debemos resaltar el importante incremento de la viabilidad celular a las 24 y 48 horas causado por el hidrolizado de seda en las concentraciones 0,001; 0,01; 0,05 y 0,1, y la mínima intensidad de radiación ultravioleta recibida (0,08 J/cm²). Este incremento resultó ser estadísticamente significativo ($p < 0'001$) y fue muy evidente, sobre todo en las concentraciones más bajas (0,001 y 0,01). Del mismo modo, el moderado incremento de la viabilidad así como la estabilización de la viabilidad por la fibroína a concentraciones bajas-medias tras la mínima intensidad de radiación ultravioleta también es significativo ($p < 0'001$).

Consideramos que este hecho puede tener gran relevancia clínica, por la facilidad de incorporación de una dosis tan baja de hidrolizado de seda a un producto fotoprotector, teniendo en cuenta que la radiación ultravioleta B es la más lesiva para el organismo humano de las que llegan a la superficie terrestre (A y B).

En la revisión bibliográfica realizada, no hemos encontrado estudios que utilizaran los extractos usados en el nuestro, salvo el reciente de Kaur, 2013, en el que describen el papel protector de la sericina del capullo del gusano de la seda frente a las radiaciones ultravioleta A y B, como también ocurrió en

nuestro estudio, como acabamos de comentar, aunque en el nuestro el hidrolizado del capullo presentó incluso un mayor efecto protector que la sericina.

Hemos encontrado estudios de otros autores relacionados con el tema como el de Pongcharoen, 2013, consistente en el estudio “in vitro” sobre la posible acción fotoprotectora de la luteína que se extrae de la seda, sobre queratinocitos humanos irradiados con RUV B.

Asímismo, en otro experimento, Zhaorigetu, 2003, señala el efecto protector de la sericina respecto a la capacidad de reducción significativa en la incidencia de tumores y el número de tumores cutáneos, de modo que el tratamiento con sericina produjo, además, cambios morfológicos que reflejan la respuesta inflamatoria, incluyendo la infiltración de leucocitos, hiperplasia y la proliferación celular. Además, la sericina suprimió de forma significativa la elevación en el nivel de 4-HNE y expresiones elevadas de c-fos, c-myc y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Estos resultados sugieren que la sericina posee efecto protector contra la promoción de tumores en la piel del ratón mediante la supresión del estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria y la inducción de TNF- α . En otro estudio posterior Zhaorigetu, 2007, describe también el efecto inhibidor del estrés oxidativo cuando se aplica sericina tópicamente sobre la piel de ratones tratados previamente con dimetilbenzantraceno y exposición radiación ultravioleta, así como la inhibición de la carcinogénesis de colon en ratones tratados con DMH (1,2- dimetilhidracina).

VIII. CONCLUSIONES

Primera: Los tres extractos ensayados (**sericina, fibroina e hidrolizado de seda**) no mostraron efectos sobre la viabilidad (**citotoxicidad**) de las líneas: **TRAMP-C1** y **HaCaT**. La **sericina** originó una disminución dosis-respuesta significativa sobre la viabilidad celular de la línea **Vero**.

Segunda: Tampoco presentaron actividad **genotóxica** sobre sangre humana completa. En cuanto a la **genoprotección** solo ocurrió una disminución del número de micronúcleos (aunque no era significativa), cuando los extractos se administraban antes de la irradiación.

Tercera: Los tres extractos antes citados no mostraron efecto sobre la **migración** de las células de la línea **HaCaT**.

Cuarta: El **hidrolizado de seda** y la **fibroina** demostraron efectos **fotoprotectores**, estadísticamente significativos, frente a la **RUV B** sobre la línea **HaCaT**. El primero de ellos, incluso a las concentraciones más bajas (0,001 y 0,01) y a la mínima intensidad de RUV-B (0,08 J/cm²).

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad Martínez, L.: Discurso de contestación a la recepción pública del Ilmo. Sr. Dr. D. Vicente Vicente Ortega en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia. 1999. Editorial Nogué.
2. Afaq, F., & Mukhtar, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental dermatology*. 2006; 15(9), 678-684.
3. Afaq, F., Adhami, V. M., Mukhtar, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res*. 2005; 571(1-2): 153- 73.
4. Alcaraz, M., Acevedo, C., Vicente, V., Castillo, J., Benavente-García, O., Fernández, H., Armero, D., Serna, A. Protective effects of carnosic acid against chromosomal damage induced in human lymphocytes by radiation gamma. *Radioprotección*. 2006; XIII(49): 23-25.
5. Alcaraz, M., Acevedo, C., Castillo, J., Benavente-García, O., Armero, D., Vicente, V., Canteras, M. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol*. 2009; 82(979): 605-09.
6. Allemann, I. B., Baumann, L Educación Médica Continua. *Dermatología*, 8. Rev. Chilena Dermatol. 2009; 25(1):8-20
7. Allemann, I. B., Baumann, L. Botanicals in skin care products. *International journal of dermatology*. 2009; 48(9), 923-934.
8. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;48(3): 589-601.
9. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R. Feasibility of

- drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 1988; 48(3): 589-601.
10. Almasy Z y Koteles GJ. Use of micronucleus test in detection of radieffect. *Health Phys. Res.* 1984, 11: 97-102.
11. Almasy Z, Kanyar B y Koteles GJ. Use of micronucleus test in detection of radioeffects. *Healtg Phys. Res.* 1986a, 49, 719-725.
12. Almasy Z, Kanyar B y Koteles GJ. Dose assesement through micronucxlei in irradiated human lymphocytes. In *Proc. European Congress of IRPA.* 1986b.
13. Almássy, Z., Krepinsky, A., Bianco, A., Köteles, G. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Int J Rad Appl Instrum A.* 1987; 38(4): 241-9.
14. An, K. P., Athar, M., Tang, X., Katiyar, S. K., Russo, J., Beech, J., Aszterbaum, M., Kopelovich, L., Epstein, E. H., Jr., Mukhtar, H., Bickers, D. R. Cyclooxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *PhotochemPhotobiol.* 2002; 76(1): 73-80.
15. Arnould R, Dubois J. Comparison of two cytotoxicity assays: tetrazolium derivate reduction (MTT) and tritiatedthymidine uptake, on three malignant mouse cell lines using choemotherapeutic agents and investigational drugs. *Anticancer Res* 1990a; 10 (1): 145-154.
16. Arnould R, Dubois J, Abikhalil F, Libert A, Ghanem G, Atassi G, Hanocq M, LejeuneFJ. Compared cytotoxicity effects of five anticancer drugs on human (HBL) and mouse (B16) melanoma cells in vitro. *Anticancer Res* 1990b; 10 (3): 789-793.

17. Avci, P.; Sadasivam, M; Gupta, A.; De Melo, W.; Huang, Y.; Yin, R.; Rakkiyappan, C.; Kumar, R.; Otufowora, A; Nyame, T.; Hamblin, M.: Animal models of skin disease for drug discover. *Expert Opin. Drug Discovery*. 2013; 1746, 0441, 1-25.
18. Bachelor, M. A., Bowden, G. T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol*. 2004; 14(2): 131-8.
19. Bachelor, M. A., Cooper, S. J., Sikorski, E. T., Bowden, G. T. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3- kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model. *Mol Cancer Res*. 2005; 3(2): 90-9.
20. Bakkenist, C. J., Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003; 421(6922): 499-506.
21. Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Alcaraz, M. Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfur-containing compounds. *J Med Food*. 2002; 5(3): 125-35.
22. Benkovic, V., Knezevic, A. H., Orsolich, N., Basic, I., Ramic, S., Viculin, T., Knezevic, f., Kopjar, N. Evaluation of radioprotective effects of propolis and its flavonoid constituents: in vitro study on human white blood cells. *Phytother Res*. 2009a; 23(8): 1159-68.
23. Berkow, S. E., Barnard, N. D., Saxe, G. A., Ankerberg-Nobis, T. Diet and survival after prostate cancer diagnosis. *Nutr Rev*. 2007; 65(9): 391- 403.
24. Bogo, V., Jacobs, A., Weiss, J. Behavioral toxicity and efficacy of WR-2721 as a radioprotectant. *Radiat Res*. 1985; 104(2): 182-90.

25. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. Human Micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. 2001. *Environ Mol Mutagen.*; 37(1):31-45.
26. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; 26 (11): 1030-1034.
27. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Ponten, J. A. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88(22), 10124-10128.
28. Brash, D. E. Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends in genetics*. 1997; 13(10), 410-414.
29. Brzoska, K., Szumiel, I. Signalling loops and linear pathways: NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Mutagenesis*. 2009; 24(1): 1-8.
30. Burren, R., Scaletta, C., Frenk, E., Panizzon, R. G., Applegate, L. A. Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I+ II and solar simulating radiations. *International journal of cancer*. 1998; 76(2), 201-206.
31. Camacho, F. Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección. *Rev Int Dermatol Dermocosm Clin*. 2001; 4(7), 441-8.

32. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987 a; 47(4): 936-942.
33. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 1987 b; 47(4): 943-946.
34. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987a; 47(4): 936-42.
35. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 1987b; 47(4): 943-46.
36. Carrel, A., Montrose T Burrows. Cultivation of adult tissues and organs outside of the body *JAMA.* 1910;55(16):1379-1381.
37. Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuño A, Del RioJA. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeda (*VitisVinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J AgricFood Chem* 2000; 4: 1738-1745.
38. Castillo, J., Alcaraz, M., Benavente-García, O. (2010). Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract. *Olives and olive oil in health and disease prevention.* V. R. preedy,R. R. Watson. Oxford, Academic Press: 951-58.
39. Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M. J., Lorente, J., Alcaraz, M., Dato, M. J. Radioprotective Effects Against Chromosomal Damage Induced in Human lymphocytes by gamma-Rays as a Function of Polymerization Grade of Grape Seed extracts. *J Med Food.* 2001; 4(2): 117-23.

40. Cenis, J. L.: La seda como material en Medicina Regenerativa. Revista Eubacteria. http://www.um.es/eubacteria/seda_medicina.pdf
41. Cho, HS., Lee, MH., Lee, JW., NO, KO., Park, SK., Lee, HS., Hong, JT. Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *PhotodermatolPhotoimmunolPhotomed.* 2007; 23 (5): 155-162.
42. Countryman PI y Hedde JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research* 1976, 41, 321-332.
43. Countryman PI y Hedde JA. A true microculture technique for human lymphocytes. *Human Genetics* 1977, 35, 197-205.
44. Courtenay VD, Mills J. An in vitro colony assay for human tumors grown in immunosuppressed mice and treated in vivo with cytotoxic agents. *Br J Cancer* 1978; 37: 261- 268.
45. deGruijl, F. R. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB radiation. *Skin Pharmacology and Physiology.* 2002; 15(5), 316-320.
46. deGruijl, F. R., Rebel, H. Early events in UV carcinogenesis--DNA damage, target cells and mutant p53 foci. *PhotochemPhotobiol.* 2008; 84(2): 382-7.
47. Del Baño, M. J., Castillo, J., Benavente-García, O., Lorente, J., Martín-Gil, R., Acevedo, C., Alcaraz, M. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(6): 2064-68.
48. Dendy PO. Cell cultures and their use in drug sensitivity prediction. *Arch. Geschwulstforsch,* 1981, 51, 111-118.

49. Denizot F y Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*, 1986, 89, 271-277.
50. Devi, P. U., Ganasoundari, A. Modulation of glutathione and antioxidant enzymes by *Ocimum sanctum* and its role in protection against radiation injury. *Indian J Exp Biol*. 1999; 37(3): 262-268.
51. Dolphin GW, LLOYD DC y PURROT RJ. Chromosome aberrations analysis as a dosimetric technique in radiological protection. *Health Phys*, 1973, 25, 7-15.
52. Eagle H, Foley GE. The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. *Am J Med* 1956; 21: 739-745.
53. Earle GC, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E. Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast culture and changes seen in the living cells. *J Natl Cancer Inst* 1943; 4: 165-212.
54. Evans HJ y O'Riordan ML. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on viciafaba roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage. The production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*, 1959, 3, 216-225.
55. Evans HJ y O'Riordan ML. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutation Research*, 1975, 31, 135-138.
56. Fenech, M., Morley, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*. 1985; 147(1-2): 29-36.

57. Fenech, M., Morley, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X- irradiation. *Mutat Res.* 1986; 161(2): 193-8.
58. Fenech, M. F., Dunaiski, V., Osborne, Y., Morley, A. A. The cytokinesis- block micronucleus assay as a biological dosimeter in spleen and peripheral blood lymphocytes of the mouse following acute whole- body irradiation. *Mutat Res.* 1991; 263(2): 119-26.
59. Fenech, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993; 285(1): 35-44.
60. Fenech, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res.* 1997; 392(1-2): 11-8.
61. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. 1999. *Mutat Res.* Jul 16; 428(1-2):271-83.
62. Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2007; 2(5): 1084-104.
63. Filip, A., Clichici, S., Daicoviciu, D., Adriana, M., Postescu, I., Perde- Schrepler, M., Olteanu, D. Photochemoprevention of cutaneousneoplasia through natural products. *Exp Oncol.* 2009; 31(1): 9-15.
64. Floyd y Cassoni. Intrinsic Radiosensitivity of adult and cord blood lymphocytes as deeterminates by the micronucleus assay. 1994.

65. Foster, B., Gingrich, J., Kwon, E., Madias, C., Greenberg, N. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.* 1997; 57(16): 3325-30.
66. Garg, A. K., Buchholz, T. A., Aggarwal, B. B. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(11-12): 1630-47.
67. Gasparro FP. Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy. *Environ Health Perspect.* 2010, 108(1): 71-78.
68. Gey GO, Coffman WD, kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 1952; 12: 364-365.
69. González S., Fernández-Lorente, M., Gilaberte-Calzada, Y. The latest on skin photoprotection. *Clin*
70. Goswami PK, Samant M, Srivastava R. Natural sunscreen agents. A review. *Acad. J. Pharm.* 2013, 2(6): 458-463.
71. Greenberg, N., DeMayo, F., Sheppard, P., Barrios, R., Lebovitz, R., Finegold, M., Angelopoulou, R., Dodd, J., Duckworth, M., Rosen, J. The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. *Mol Endocrinol.* 1994; 8(2): 230-9.
72. Greenberg, N., DeMayo, F., Finegold, M., Medina, D., Tilley, W., Aspinall, J., Cunha, G., Donjacour, A., Matusik, R., Rosen, J. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(8): 3439-43.

73. Greenrod, W., Fenech, M. The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage in vitro. *Mutagenesis*. 2003; 18(2): 119-26.
74. Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *BiochemBiophys Res Commun*. 2001; 287(4): 914-20.
75. Gupta A, Kaur CD, Jandey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Res Rev*, 2014, 13, 65-74.
76. Halliday, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005; 571(1), 107-120.
77. Hanke CW, Buening J. Sunscreens and sun protection – Update 2000 and sun protection – Update 2000. *The Skin Cancer Foundation Journal*. 2000; 18:41-42,86
78. Hansson J, Lewensohn R, Ringborg U, Nilsson B. Formation and removal of DNA cross-links induced by melphalan and nitrogen mustard in relation to drug-induced cytotoxicity in human melanoma cells. *Cancer Res* 1987; 47 (10): 2631-2637.
79. Harris H & Watkins JF. Hybrid cells developed from mouse and man artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* 1965, 205:640-646.
80. Harris, R. E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer. *SubcellBiochem*2007b; 42: 93-126.
81. Harrison RG. Observations of the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med* 1907; 4: 140-143.

82. Hayashi M, Sofuni T y Ishidate M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research*, 1983, 120, 241-243.
83. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 1973, 18, 187-190.
84. Heddle JA y Carrano AV. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragment. *Mutation Research*, 1977, 44, 66-69.
85. Heddle JA, Blakey DH, Duncan AMV, Goldberg MT, Newmark H, Wargowich MJ y Bruce WR. Micronuclei and related nuclear abnormalities as a short-term assay for colon carcinogens. *Banbury Rep*, 1982, 13, 361-371.
86. Hogstedt B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Research*, 1984, 130, 63-72.
87. Hogstedt B y Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research*, 1985, 156, 229-232.
88. Honeyman, J. Efectos de las radiaciones ultravioletas en la piel. *Rev Per Dermatol*. 2002; 12: 54, 62.
89. Hosseinimehr, S. J., Tavakoli, H., Pourheidari, G., Sobhani, A., Shafiee, A. Radioprotective effects of citrus extract against gamma-irradiation in mouse bone marrow cells. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2003; 44(3): 237- 41.
90. Hosseinimehr, S. J., Nemati, A. Radioprotective effects of hesperidin against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *Br J Radiol*. 2006; 79(941): 415-8.
91. Huang, J., Huang, C., Fang, J., Yang, C., Chan, C., Wu, N., Kang, S., Hung, C. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. *Toxicol In Vitro*. 2009; 24(1): 21- 28.

92. Huber R, Streng S y Bauchinger M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. *Mutation Research* 1983, 111, 185-193.
93. R. Huber, M. Bauchinger. Development and Perspectives of the Human Lymphocyte Micronucleus Assay. 1990. *Advances in Mutagenesis Research* 1:89-104
94. IAEA, I. A. E. A.-. Ed. (2001). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Technical Report Series, n° 405. Viena, International Atomic Energy Agency (IAEA).
95. Iskander O. An improved method for the detection of micronuclei in human lymphocytes. *Stain Technol*, 1979, 54, 221-223.
96. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M. J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59(4): 225-49.
97. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011; 61(2), 69-90.
98. Jeyabal, P. V., Syed, M. B., Venkataraman, M., Sambandham, J. K., Sakthisekaran, D. Apigenin inhibits oxidative stress-induced macromolecular damage in N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats. *Mol Carcinog*. 2005; 44(1): 11-20.
99. Joksic G, Petrović S. Lack of adaptive response of human lymphocytes exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. 2004a. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.*; 23(3): 195-206.
100. Joksić G, Petrović S, Ilić Z. Age-related changes in radiation-induced micronuclei among healthy adults. 2004, *Braz J Med Biol Res*. Aug;37(8):1111-7.

101. Kaltenbach JP; Kaltenbach MH, Lyons WB. Nigrosine as a dye for differentiating liveanddeatascites cells. *Exp Cell Res* 1958; 15:112-117.
102. Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinasephosphatases. *Cell*. 2005; 120(5): 649-61.
103. Kaur J, Rajkhowa R, Tsuzuki T, Millington K, Zhang J, Wand X. Photoprotection by silk cocoons. *Biomacromoleculares* 2013. 14, 14 (10): 3660-7.
104. Khan, T. H., Jahangir, T., Prasad, L., Sultana, S. Inhibitory effect of apigenin on benzo (a) pyrene-mediated genotoxicity in Swiss albino mice. *J PharmPharmacol*. 2006; 58(12): 1655-60.
105. Kim, J. H., Cho, Y. H., Park, S. M., Lee, K. E., Lee, J. J., Lee, B. C., Pyo, H. B., Song, K. S., Park, H. D., Yun, Y. P. Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch Pharm Res*. 2004b; 27(2): 177-83.
106. Kim, A. L., Labasi, J. M., Zhu, Y., Tang, X., McClure, K., Gabel, C. A., Athar, M., Bickers, D. R. Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol*. 2005b; 124(6): 1318-25.
107. Kim, B. Y., Kim, K. A., Kwon, O., Kim, S. O., Kim, M. S., Kim, B. S., Oh, W. K., Kim, G. D., Jung, M., Ahn, J. S. NF-kappaB inhibition radiosensitizesKi-Ras-transformed cells to ionizing radiation. *Carcinogenesis*. 2005a; 26(8): 1395-403.
108. Kobus, K., Turner, J., Priestley, B., Dreosti, I. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine and micronucleus techniques for the assessment of X-ray and UV induced genotoxicity. *Res CommunChemPatholPharmacol*. 1993; 80(2): 249-52.

109. G. Köhler & C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *Nature* 256, 495 - 497; doi:10.1038/256495a0
110. Kumaravel, T. S., Jha, A. N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res.* 2006; 605(1-2): 7-16.
111. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999; 38(3): 133-142.
112. Lasne C, GU ZW, Venegas W y Chrouonlinkov I. The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens. Comparison with the in vitro sister-chromidexchange assay. *Mutation Research*, 1984, 130, 273-275.
113. Ledebur Von M. y Achmid W. The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutation Research*, 1973, 19, 107-117.
114. Macgregor JT, Wehr CM y Gould DH. Clastogeninduced micronuclei in peripheral blood erythrocytes. The bases of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagen*, 1980, 2, 509-511.
115. Mahns, A., Wolber, R., Stab, F., Klotz, L. O., Sies, H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *PhotochemPhotobiol Sci.* 2004; 3(3): 257-62.
116. Matsumura, Y; Ananthaswamy, H.N. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci.* 2002; 7: d765-83.
117. Matsumura, Y; Ananthaswamy, H.N. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2002; 1-22.

118. McDaniel, D. H., Neudecker, B. A., DiNardo, J. C., Lewis, J. A., Maibach, H. I. Idebenone: a new antioxidant—Part I. Relative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known antioxidants. *Journal of cosmetic dermatology*. 2005; 4(1), 10-17.
119. Mittal, A., Elmets, C. A., Katiyar, S. K. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis*. 2003; 24(8), 1379-1388.
120. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89 (2): 271-277.
121. Montero, J. Radiación Solar y Fotoprotección. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, editor. *Atención Farmacéutica en Dermofarmacia*. 2008.
122. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65 (1-2): 55-63.
123. Muller I.: Sun and Men: An Ambivalent Relationship. In Altmeyer P. Hioffmann K. Stücker M. (eds): *Skin Cancer and UV Radiation*. In Springer. Verlag. Berlin – Hidelberg. 1997; 3-12.
124. Nagai, S., Ohara, K., Mukai, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *J Phys Chem B*. 2005; 109(9): 4234-40.
125. Nair, C. K., Parida, D. K., Nomura, T. Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2001; 42(1): 21-37.

126. Nichols, J. A., Katiyar, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* 2010; 302(2): 71-83.
127. Nishigori, C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *PhotochemPhotobiol Sci.* 2006; 5(2): 208-14.
128. Nusse M y Kramer J. Flow cytometric analysis of micronuclei found in cells after irradiation. *Cytometry*, 1984, 5, 20-25.
129. Obe G, Beek B y Vaidya F. The human leucocyte test system. III. Premature chromosome condensation from chemically and X-rays induced micronuclei. *Mutation Research*, 1975, 27, 89-101.
130. Odagiri T. Reverse misreading of a GC doublet by the modified T7 DNA polymerase, Sequenase. *Virus Genes.* 1994 Jul; 8(3):271-4.
131. O'Dea, E. L., Kearns, J. D., Hoffmann, A. UV as an amplifier rather than inducer of NF-kappa B activity. *Mol Cell.* 2008; 30(5): 632-41.
132. Pacheco- Palencia LA, Noratto G, Hingorani L, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Protective effects of standardized pomegranate (*punicagranatum L*), polyphenilic extracts in ultraviolet-irradiated human skin fibroblast. *Agric. Food Chem.* 2008, 56 (18): 8434-8441.
133. Parshad, R., Sanford, K. K., Price, F. M., Steele, V. E., Tarone, R. E., Kelloff, G. J., Boone, C. W. Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res.* 1998; 18(5A): 3263-6.
134. Patel, D., Shukla, S., Gupta, S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007; 30(1): 233-45.

135. Pelevina II, Aleshchenko AV, Gotlib VIa, Kudriashova OV, Noskin LA, Semenova LP, Sotnikova EN, Serebrianyĭ AM. Increased radiosensitivity after irradiation of lymphocytes low adaptive doses]. 2000. *Radiats Biol Radioecol.*;40(5):544-8..
136. Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. 1974. *Nature*. Sep 13;251(5471):156-8
137. Petersen B, Wulf HC. Application of sunscreen –theory and reality- *Thot Dermatol Photoimmunol Photomed.* 2014, 30(2, 3): 96-101.
138. Pincu M, Bass D y Normal A. An improved micronucleus assay in lymphocytes. *Mutation Research*, 1984, 139, 61-65.
139. Pinnell, S. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 48(1): 1-19.
140. Pongcharoen S, Warnnissonrs P, Lertkajornsinn O, Limpeanchob N, Sutheerawattananonda M. Protective effect of sildlutein on ultraviolet B-irradiated human keratinocytes. *Biol Res* 2013; 46(1): 39-45.
141. Pons Gimier L, Parra Juez J.L. *Ciencia Cosmética. Bases fisiológicas y criterios prácticos.* 1995 ed. Madrid. 2004; 36.
142. Pons Gimier L. *Cosmética Antienvejecimiento.* En *Dermatología.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2004.
143. Pons Gimier L. *Cosmética antienvjecimiento.* En *Atención farmacológica en Dermatología.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2008.
144. Prieto, L. Romper el proceso del envejecimiento cutáneo: activos dermocosméticos. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2010; 38(2), 95-100.

145. Prosser JS, Moquet E, Lloyd DC y Edwards AA. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research*, 1988, 199, 37-45.
146. Ramos, G. I. C., Pérez, D. A. Antioxidantes en dermatología *Dermatología CMQ*. 2010; 8 (4):272-277.
147. Reelfs, O., Tyrrell, R. M., Pourzand, C. Ultraviolet A radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF- κ B in human skin fibroblasts. *Journal of investigative dermatology*. 2004; 122(6), 1440-1447.
148. Rhodes, L. E., Gledhill, K., Masoodi, M., Haylett, A. K., Brownrigg, M., Thody, A. J., Tobin, D. J., Nicolaou, A. The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB J*. 2009; 23(11): 3947-56.
149. Rithidech, K. N., Tungjai, M., Whorton, E. B. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutat Res*. 2005a; 585(1-2): 96-104.
150. Rithidech, K. N., Tungjai, M., Arbab, E., Simon, S. R. Activation of NF- κ B in bone marrow cells of BALB/cJ mice following exposure in vivo to low doses of (^{137}Cs) gamma-rays. *Radiat Environ Biophys*. 2005b; 44(2): 139-43.
151. Rodriguez-Vicente J, Vicente-Ortega V, Canteras-Jordana M. The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines. *Cancer* 1998; 82(3): 495-502.
152. Rundhaug, J. E., Fischer, S. M. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *PhotochemPhotobiol*. 2008; 84(2): 322-29.
153. Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, Durie BGM, Albers DS, Moon TE. Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. *New Engl J Med* 1978; 298: 1321-1327.

154. Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, Durie BGM, Alberts DS y Moon TE. Quantitation of differential sensitivity of human tumor cells to anticancer drugs. *New Engl. J. Med.* 1978, 298: 1321-1327.
155. Sánchez-Saldaña, L., Lanchipa, P., Pancorbo, J., Regis, A., Sánchez, E. Fotoprotectores tópicos. *Revista Peruana de Dermatología.* 2002; Vol, 12(2).
156. Sasaki MS y Norman S. Proliferation of human lymphocytes in cultures. *Nature*, 1966, 210, 913-914.
157. Scherschun L., Lim H.W. Photoprotection by Sunscreens. *Am J Clin Dermatol.* 2001; 2:131-134
158. Schmid W, Arakaki DRT, Breslau Na y Culbertson JC. Chemical mutagenesis. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo system. I. Cytogenetic results on basic aspects of methodology obtained with alkylating agents. *Humangenetik*, 1971, 11, 103-118.
159. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research*, 1975, 31, 9-15.
160. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En *Chemical Mutagens IV.* (ed. Hollanender A.). Plenum Press. New York, 1976, pp. 31-53.
161. Cho HS, Lee MH, Leed JW, No KO, Park SK, Lee HS, Hong JT. Antiwrinkling effects of the mixture of vitamin C, Vitamin E, Pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2007, 23(5): 155-162.
162. Schroeder TM. Investigation of bone marrow smears. En: *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man* (ed. Vogel F. Y Rohrborn G). Springer Verlag. Heidelberg. 1970. pp. 214-218.

163. Schroeterova, L., Kralova, V., Voracova, A., Haskova, P., Rudolf, E., Cervinka, M. Anti proliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(7): 1406-11.
164. Schulze R. Einigeversuche und bemerkungen zum problem der ahndelsublischelichtschutzmittel. *Parfüm und kosmet*, 1956, 37: 310-365.
165. Serebrianyĭ AM, Aleshchenko AV, GotlibVIa, Kudriashova OV, Semenova LP, Pelevina II. On the newmechanism of adaptive response. 2004. *RadiatsBiolRadioecol*. 44(6):653-6.
166. Sharma, S. D., Katiyar, S. K. 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*. 2010; doi: 10.1007/s11095-010-0050-9.
167. Sharp JA. An introduction to Animal Tissue Culture. Edwar Arnold, London, 1977 pp 1-6.
168. Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, Kinae N. Radioprotective effect of antioxidativeflavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis* 1994; 15(11): 2669-2672.
169. Shimoi, K., Masuda, S., Shen, B., Furugori, M., Kinae, N. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat Res*. 1996; 350(1): 153-61.
170. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. *Cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians. 2012; 62(1), 10-29.
171. Song, L. H., Yan, H. L., Cai, D. L. Protective effects of soybean isoflavone against gamma-irradiation induced damages in mice. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2006; 47(2): 157-65.

172. Starr TJ. Fluorescence microscopy and autoradiography of colchicines induced micronucleated cells. *Nature*, 1963, 200: 608-610.
173. Stich TJ y Rosin MP. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer. Beel quid chewers. *Cancer*, 1982, 17, 125.
174. Stich TJ y Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *International Journal Cancer*, 1983, 31, 305.
175. Stopper H, Hempel K, Reiners C, Vershenya S, Lorenz R, Vukicevic V, Heidland A, Grawe J. Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring. 2005. *ToxicolLett.* 28; 156(3):351-60
176. Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub.* 2006;150(1):25-38.
177. Talorete, T. P., Bouaziz, M., Sayadi, S., Isoda, H. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology.* 2006; 52(3): 189-98.
178. Terzoudi, G. I., Pantelias, G. E. Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation. *Radiat Prot Dosimetry.* 2006; 122(1-4): 513-20.
179. Tessner, T., Muhale, F., Schloemann, S., Cohn, S., Morrison, A., Stenson, W. Ionizing radiation up-regulates cyclooxygenase-2 in I407 cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis.* 2004; 25(1): 37

180. Thierens H, Vral A, Barbé M, Meijlaers M, Baeyens A, Ridder LD. Chromosomal radiosensitivity study of temporary nuclear workers and the support of the adaptive response induced by occupational exposure. 2002. *Int J Radiat Biol.* 78(12):1117-26.
181. Thoday JM. The effect of ionizing radiation on the broad bean root. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem. *British Journal of Radiology*, 195, 24: 572-578.
182. Thomas DR. Sun protection using sunscreens. *Skintherapyletter.com* 2013.
183. Torras, H. ¿El bronceado con radiación ultravioleta A es realmente perjudicial para la piel? *Piel.* 2004; 19 (7), 345-346.
184. Tripp, C. S., Blomme, E. A., Chinn, K. S., Hardy, M. M., LaCelle, P., Pentland, A. P. Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(4): 853-61.
185. Tuchinda, C., Lim, HW., Ostelwalder, U., Rougier, A., Novel emerging sunscreen technologies. *DermatolClin.* 2006; 24 (1):105-117.
186. Uma Devi, P., Ganasoundari, A., Vrinda, B., Srinivasan, K. K., Unnikrishnan, M. K. Radiation protection by the ocimum flavonoid orientin and vicenin: mechanisms of action. *Radiat Res.* 2000; 154(4): 455-60.
187. Umegaki, K., Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2- NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis.* 2000; 15(3): 261-9.
188. Valadaud-Barrieu D. Un test d'induction de micronoyan" sur allium salivum; differentiation de substances clastogenes et mitoclasiques: *Mutation Research*, 1983, 119, 55.

189. Valster, A., Tran, N. L., Nakada, M., Berens, M. E., Chan, A. Y., Symons, M. Cell migration and invasion assays. *Methods*. 2005; 37(2): 208- 15.
190. Vicente Ortega, V.: El peligroso encanto de la belleza (Una aproximación a la patología de la pigmentación cutánea). Discurso de recepción pública como académico de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia. 4 denoviembre de 1999. Editorial Nogué.
191. Vostálová J, Zdarilová A, Svobodová A. Prunellavulgaris e3xtract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HACaTKeratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302:171-181.
192. Vrinda, B., Uma Devi, P. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicenin. *Mutat Res*. 2001; 498(1-2): 39-46.
193. Wang, Z. Y., Agarwal, R., Bickers, D. R., Mukhtar, H. Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis*. 1991; 12(8), 1527-1530.
194. Wang, S.Q., Setlow, R., Berwick, M., Polsky, D., Marghoob, A.A., Kopf, A.W., Bart, R.S. Ultraviolet A and melanoma: A review. *J Am Acad Dermatol*. 2001; 44: 837-846.
195. Watanabe, N., Hirokazu Kanegane, Seigo Kinuya, Noriyuki Shuke, MD4, Kunihiko Yokoyama, Hiroshi Kato, Gakuto Tomizawa, Masashi Shimizu, Hisashi Funada, and Hikaru Seto, The Radiotoxicity of ¹³¹I Therapy of Thyroid Cancer: Assessment by Micronucleus Assay of B Lymphocytes *J Nucl Med* April 1, 2004 vol. 45 no. 4 608-611
196. Watanabe, N., Hirayama, R., Kubota, N. The chemopreventive flavonoid apigenin confers radiosensitizing effect in human tumor cells grown as monolayers and spheroids. *J Radiat Res*. 2007; 48(1): 45-50.

197. Whitmore, S.E., Morison, W.L., Potten, C.S., Chadwick, C. Tanning salon exposure and molecular alterations. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44:775-780
198. Wilgus, T. A., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Kusewitt, D. F., Rubal, P. A., Oberszyn, T. M. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Molecular carcinogenesis.* 2003; 38(2), 49-58.
199. Wilgus, T., Koki, A., Zweifel, B., Rubal, P., Oberszyn, T. Chemotherapeutic efficacy of topical celecoxib in a murine model of ultraviolet light B-induced skin cancer. *Mol Carcinog.* 2003a; 38(1): 33-9.
200. Wilson AP. Cytotoxicity and viability assays. In. *Animal Cell Culture. A Practical approach.* Freshney RI (ed.) IRL Press, Oxford 1986:193.
201. Wondrak, G T., Jacobson, M K., Jacobson, EL. Antimelanoma activity of apoptogenic carbonyl scavengers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316(2): 805-814.
202. Wu, Z. H., Mabb, A., Miyamoto, S. PIDD: a switch hitter. *Cell.* 2005; 123(6): 980-2.
203. Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S., Miyamoto, S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science.* 2006; 311(5764): 1141-6.
204. Wu, Z. H., Miyamoto, S. Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med.* 2007; 85(11): 1187-202.
205. Yaar, M., & Gilchrist, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology,* 2007; 157(5), 874-887.
206. Yabroff, K. R., Warren, J. L., Brown, M. L. Costs of cancer care in the USA: a descriptive review. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007; 4(11): 643-56.

207. Yamamoto KI y Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and spindle poisons. *Mutation Research*, 1980, 71: 127-131
208. Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Teruel, J. A. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr Cancer*. 2004; 49(2): 191-9.
209. Yasumura Y, Kawakita Y. Studies on SV40 in tissue culture – preliminary step for cancer research “in vitro.” *Nihon Rinsho*. 1963;21:1201–1215.
210. Young, A. R. Chromophores in human skin. *Physics in Medicine and Biology*, 1997; 42(5), 789.
211. Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. 2003. *J Photochem Photobiol B*. 15;71(1-3):11-7.
212. Zhaorigetu S¹, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF- α . *Oncol Rep*. 2003;10(3):537-43.
213. Zhaorigetu S, Sasaki M, Kato N. Consumption of sericin suppresses colon oxidative stress and aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by colon undigested sericin. 2007. *J NutrSci Vitaminol*. 53(3):297-300.