

## Simposio

Simposio La Roche Posay

Congreso Mundial sobre Cáncer de la Piel. Madrid, 9 de abril de 2010

# Expresión génica de la fotoprotección

*Gene expression of photo-protection*

Françoise Bernard

Francia

Las consecuencias biológicas y clínicas de la exposición solar pueden ir desde efectos a corto plazo, como una quemadura solar, hasta consecuencias a largo plazo como el fotoenvejecimiento o la aparición de cánceres cutáneos.

Más allá de estas manifestaciones clínicas, hay lesiones biológicas localizadas tanto en la epidermis como en la dermis. La elastosis solar en el contexto del fotoenvejecimiento cutáneo es un buen ejemplo en este sentido, observándose una desestructuración completa de la matriz dérmica. Es bien conocido que tanto la radiación UVA como la UVB son capaces de provocar lesiones a nivel dermoepidérmico.

La radiación solar UV está principalmente compuesta por longitudes de onda del espectro UVA. En el peor de los casos, la radiación UVB puede llegar a representar tan solo un 5% del total de radiación ultravioleta solar en comparación con el 90-95% correspondiente a UVA. Debido a su longitud de onda, la radiación UVA tiene una elevada capacidad de penetración en la piel, con especial afinidad por el compartimento dérmico. Cabe destacar que, a diferencia de la radiación UVB, fácilmente bloqueada por las nubes o los cristales, la radiación UVA siempre está presente, independientemente de las condiciones climáticas.

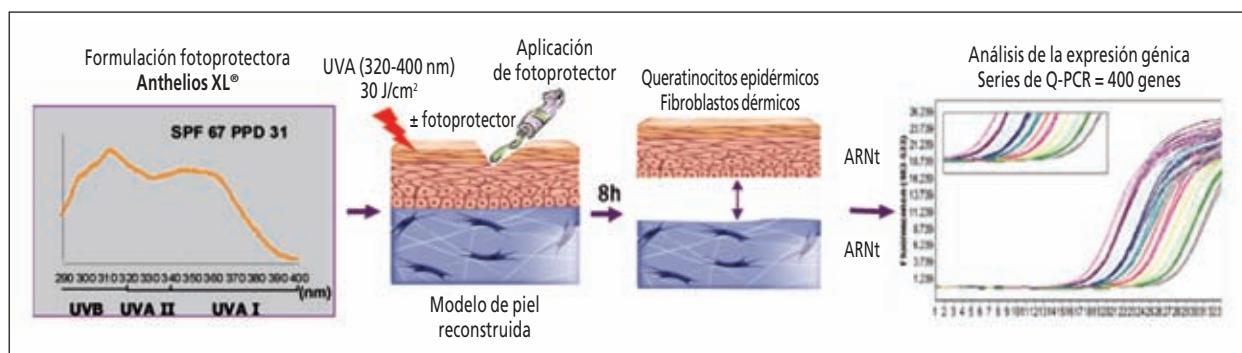
La radiación UVA tiene efectos negativos tanto a nivel biológico como clínico, incluso a dosis inferiores a las eritemágenas, lo que traduce la necesidad real de una fotoprotección eficiente frente a ella. Además, el valor de SPF, que se basa en la reacción eritematosa, no refleja el grado de protección frente a UVA. Para valorar los efectos biológicos de la radiación UVA y evaluar la eficiencia de la protección solar con fotoprotectores, hemos ideado un modelo *in vitro* de piel humana. Brevemente, este modelo reconstruido de piel reconstruida humana se basa en un equivalente dérmico (formado por fibroblastos humanos y colágeno) sobre el que se siembran queratinocitos y se cultivan en la interfase aire-líquido para hacer posible la diferenciación de estas células y la obtención de capas córneas. Este modelo permite valorar las propiedades de penetración de las dos principales longitudes de onda de la radiación solar UV y valorar sus efectos a nivel biológico sobre los dos tipos celulares representados: queratinocitos y fibroblastos. Hemos demostrado

que se trata de un modelo válido para valorar los efectos cutáneos de la exposición a radiación ultravioleta. Por ejemplo, hemos sido capaces de reproducir algunos efectos que se pueden observar *in vivo* asociados a quemaduras solares, como la formación de dímeros de pirimidina tipo ciclobutano, la aparición de *sunburn cells* en la epidermis o la acumulación de p53.

El mismo modelo también nos ha permitido visualizar las lesiones producidas por la radiación UVA a nivel dérmico, como la formación de radicales libres de oxígeno, fenómeno que tiene lugar tanto a nivel epidérmico como en los fibroblastos dérmicos, hecho que demuestra la capacidad de penetración de la radiación UVA. De hecho, los fibroblastos se mostraron muy sensibles al estrés oxidativo y, dos días después de ser expuestos a radiación UV, desaparecieron de la parte más superficial del equivalente dérmico de nuestro modelo. Otro marcador bien conocido del estrés oxidativo es la inducción de ARNm de hemo-oxigenasa-1 en los fibroblastos dérmicos, hecho que también se constató en nuestro modelo, así como la producción de MMP1, un marcador de daño actínico que también se ha relacionado con la aparición de cánceres cutáneos fotoinducidos.

Utilizando este sistema y los biomarcadores mencionados, pudimos evaluar la eficiencia de la aplicación tópica de fotoprotectores en el equivalente a la superficie cutánea en nuestro modelo *in vitro*. Para ilustrar este hecho y demostrar que el valor de SPF refleja inadecuadamente el grado de fotoprotección contra UVA, comparamos dos fotoprotectores distintos de idéntico SPF. Después de aplicar cada fotoprotector en cuestión a idénticas dosis en nuestros modelos, se irradiaron éstos con radiación solar simulada. El fotoprotector A demostró ser capaz de bloquear la penetración de la radiación UV tanto a nivel epidérmico como a nivel dérmico. A pesar de haber recibido la misma dosis de radiación, la muestra donde se aplicó el fotoprotector B mostró daño a nivel dérmico. Esto demuestra que el SPF por si solo es un mal indicador del grado de fotoprotección frente a UVA.

Para valorar los efectos de la radiación UV a nivel de la expresión génica, sometimos a nuestro modelo *in vitro* a radiación UVA previa aplicación, en algunos casos, de foto-



**Figura 1.** Diseño experimental para estudiar las modulaciones de la expresión génica tras la exposición a UVA y la protección conseguida con la aplicación previa de un fotoprotector de amplio espectro mediante el empleo del modelo de piel reconstruida.

protector en su superficie. El fotoprotector utilizado en este estudio fue *Anthelios XL®*, un producto equilibrado con un elevado valor tanto de SPF como de PPD, reflejando su capacidad de absorber tanto UVA como UVB. La aplicación de fotoprotector demostró ser capaz de evitar la desaparición de los fibroblastos dérmicos más superficiales dos días después de ser sometidos a radiación UVA. Para estudiar la modulación en la expresión génica, se utilizaron muestras control, muestras irradiadas sin fotoprotección y muestras irradiadas previa aplicación del fotoprotector mencionado. Se obtuvieron muestras tisulares 8 horas después de la exposición a la radiación UVA, de donde se obtuvo el ARNt de los queratinocitos epidérmicos como de los fibroblastos dérmicos. Se analizó comparativamente la expresión génica con series cuantitativas de PCR, estudiando 227 genes en los fibroblastos dérmicos y 244 en los queratinocitos epidérmicos. Los genes seleccionados estaban relacionados con la especificidad característica de cada tipo celular (como MMPs o matriz extracelular en el caso de los fibroblastos, o marcadores de diferenciación epidérmica en los queratinocitos), además de otros en relación con el estrés oxidativo y la inflamación. Cuando se analizaron los perfiles de expresión génica global mediante un método matemático de agrupación jerárquica, no existían diferencias significativas entre los fibroblastos dérmicos de las muestras control (no irradiadas) y los de las muestras irradiadas previa aplicación de fotoprotector, demostrando la gran eficiencia del fotoprotector testado frente a UVA (Figura 1).

El siguiente paso fue estudiar la ratio existente en la expresión génica, comparando primero las muestras irradiadas sin fotoprotector con las muestras control, y en segundo lugar las muestras expuestas a UVA previa aplicación de fotoprotector con las muestras control. La radiación UVA induce cambios en la expresión génica en ambos tipos celulares estudiados, especialmente en los fibroblastos dérmicos.

hecho que demuestra su elevada capacidad de penetración cutánea y la gran susceptibilidad de este subtipo celular. En las muestras irradiadas sin fotoprotección se observaron casos tanto de regulación al alza como a la baja de múltiples genes, en algunas ocasiones llegando a multiplicar por 25 los niveles de expresión génica normales, como en el caso de COX-2. En las muestras irradiadas previa fotoprotección, los cambios en la expresión génica fueron notablemente menores en ambos tipos celulares. La gran diferencia existente en el número de genes modulados en ambos casos demostró de nuevo la gran eficiencia del fotoprotector.

Posteriormente, los genes se agruparon según su funcionalidad en varias familias. En el caso de los fibroblastos dérmicos, se evaluaron numerosos genes responsables de la producción de matriz extracelular. En el caso de los numerosos genes que codifican para distintos tipos de colágeno estudiados, se constató su importante regulación a la baja en las muestras irradiadas sin fotoprotección, hecho que concuerda con estudios preexistentes realizados en modelos *in vivo*. La aplicación previa de fotoprotector demostró ser capaz de prevenir esta modulación a la baja. El mismo estudio objetivó que el aumento en la síntesis de MMP observado en las muestras irradiadas sin fotoprotector también podía prevenirse con la aplicación preexposición de protector solar.

En el caso de los queratinocitos, se estudiaron distintos marcadores de diferenciación epidérmica, cuya producción ampliamente modulada por la radiación UVA también podía ser prevenida con la aplicación adecuada de fotoprotectores. El mismo efecto preventivo se observó cuando se estudiaron otros genes relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación o la producción de citocinas, como es el caso de la hemo-oxigenasa 1 o la COX-2, cuya modulación al alza fue eficazmente evitada con la aplicación del fotoprotector.

El último paso en nuestro estudio fue correlacionar los resultados observados en los niveles de expresión génica con la producción de las proteínas correspondientes, que son las que finalmente llevan a cabo los efectos tangibles. Gracias a técnicas de ELISA, se pudo evaluar la producción de proteínas como GM-CSF, TNF- $\alpha$  o MMP1. En todos los casos, se demostró la correlación existente entre los niveles de ARNm y la cantidad de proteína finalmente secretada y se comprobó de nuevo la capacidad del fotoprotector de prevenir dicho efecto, tanto a nivel de producción de ARNm como de proteínas.

Para concluir, se ha presentado que es posible demostrar la eficiencia de la fotoprotección a nivel molecular, analizando la expresión génica. Este estudio aporta tanto una visión global de los efectos beneficiosos de la fotoprotección,

como también el análisis individual de algunos genes de especial interés. Se trata de un método cuantitativo de elevada sensibilidad que puede ser complementario a los análisis bioquímicos o histológicos habituales. Probablemente el resultado más interesante sea, como hemos señalado anteriormente, que las muestras que recibieron fotoprotector no mostraron diferencias significativas respecto de las muestras no irradiadas. Demostramos también que la aplicación de fotoprotector fue capaz de reducir drásticamente el número de genes modulados por la irradiación con UV y, posteriormente, este hecho se correlacionó razonablemente con una menor producción de las proteínas efectoras. La aplicación de un fotoprotector de amplio espectro demostró ser capaz de prevenir los efectos de la radiación UV más allá de lo que es externamente visible.