



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Estudio *in vitro* de las actividades fotoprotectoras,
antioxidantes y despigmentantes de nuevos
ingredientes cosméticos para la prevención y
tratamiento del cáncer de piel y el melasma**

Adriana Solange Maddaleno Jiménez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**Estudio *in vitro* de las actividades fotoprotectoras,
antioxidantes y despigmentantes de nuevos ingredientes
cosméticos para la prevención y tratamiento del cáncer de piel
y el melasma**

Adriana Solange Maddaleno Jiménez

2022

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Departamento de Bioquímica y Fisiología

Sección de Fisiología

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**Estudio *in vitro* de las actividades fotoprotectoras,
antioxidantes y despigmentantes de nuevos ingredientes
cosméticos para la prevención y tratamiento del cáncer de piel
y el melasma**

Memoria presentada por Adriana Solange Maddaleno Jiménez para optar al título de doctor por la universitat de Barcelona

Dra. Montserrat Mitjans Arnal
(Directora)

Adriana S. Maddaleno Jiménez
(Doctoranda)

Adriana Solange Maddaleno Jiménez

2022

Esta tesis ha estado subvencionada por el programa de Doctorados Industriales de la Generalitat de Catalunya (número de expediente 2019 DI 37) con un convenio entre la Universidad de Barcelona y la empresa Roka Furadada S.L.

Agradecimientos

En primer lugar, quería dar las gracias a mi directora de tesis Dra Montse Mijntans por su confianza, preocupación y enseñanza en todos estos años. A la Dra Pilar Vinardell, por ofrecer su sabiduría en el campo de las alternativas y su ayuda durante el proyecto. Admiro mucho vuestro trabajo y espero que os vaya bien en el campo de los métodos alternativos a la experimentación animal.

A la Dra. Roggia, mi primera compañera de laboratorio en el mundo de las técnicas *in vitro* y a la Dra. Scheeren por enseñarme en su día todos los aspectos relacionados con el cultivo celular. A mis compañeros del grupo CEREX Adrià y Abie por ayudarme cuando empecé. A Berta y Javier, agradezco mucho vuestra compañía y hacerme más amenas las horas tanto en el laboratorio como en la sala de cultivos celulares. A la Dra. Morán, gracias por tu amabilidad y por ofrecerme tu ayuda siempre que has podido. A toda la sección de Fisiología por ofrecerme ayuda siempre que la he necesitado.

A todos los servicios externos que han ayudado a completar esta tesis como a los servicios de UTOX y a la Dra Marta Taulés del PCB y al servicio de histología de la facultad de veterinaria de la UAB.

A Judit Camargo por ofrecerme la oportunidad de realizar el Doctorado Industrial con Roka Furadada. A Claudia por su ayuda y supervisión durante todo el proyecto y a todos los demás compañeros de Roka que me han ayudado siempre que lo he necesitado.

A Néstor, por tu amistad y tu confianza en mí, gracias por todas esas conversaciones y por mostrarme siempre tu apoyo. A Jose, me alegro de haberte conocido en este proyecto y agradezco profundamente nuestras charlas en los momentos más complicados. También querría agradecer todos mis amigos y compañeros que he conocido durante estos años por haber pasado grandes momentos juntos.

Gracias a mi abuela, por querernos y ayudarnos durante toda su vida y por confiar completamente en mí. A mis tías, primos y a los más peques Marc y Pol por permanecer siempre unidos y por pasar grandes momentos juntos. A Fran por ayudarnos y a toda la demás familia que nos han apoyado.

Por último, quería agradecer a dos personas muy importantes para mí. A Aitor, gracias por todo tu apoyo y confianza estos años, nunca has dudado de mí y en mis peores momentos siempre has estado presente para darme ánimos y mostrarme tu cariño. A mi madre, mi pilar fundamental en mi vida, sin tu amor y apoyo no habría sido capaz de confiar en mí misma y superar todos los retos que me he propuesto. Gracias por todos los valores que me has enseñado.

RESUMEN

La luz solar aporta diversos beneficios sobre el organismo ayudando al mantenimiento de la homeostasis, a la regulación de la temperatura corporal y a la síntesis de vitamina D. A pesar de que en la piel se producen diferentes eventos para proteger al organismo, la radiación ultravioleta que forma parte de la luz solar provoca ciertas alteraciones fisiopatológicas que pueden provocar cáncer, fotoenvejecimiento e hiperpigmentación de la piel. Las luces UVA y UVB son las principales causantes de estos trastornos ya que la luz UVC que queda retenida en la capa de ozono. Con el objetivo de prevenir o tratar estas alteraciones, son de uso común diferentes productos cosméticos. Entre ellos podemos encontrar productos de protección solar con filtros ultravioletas incorporados para prevenir el cáncer de piel y las quemaduras y productos en formato crema o suero para prevenir o tratar manchas y arrugas.

No obstante, diferentes estudios confirman los efectos secundarios de las moléculas utilizadas en estos productos. Los filtros ultravioletas se dividen en filtros orgánicos e inorgánicos dependiendo de su naturaleza química. Ambos se han relacionado con desencadenar efectos nocivos en el medio marino, como por ejemplo la acumulación de filtros inorgánicos en la cadena trófica o el blanqueamiento de coral causado por filtros orgánicos. Además, los filtros orgánicos han mostrado efectos tóxicos en la salud humana según diferentes estudios, aunque existe controversia al respecto. Los tratamientos disponibles para la hiperpigmentación o melasma implican efectos secundarios como irritaciones o dermatitis, por lo que existe una necesidad para encontrar o desarrollar nuevos tratamientos eficaces.

Esta tesis se centra en el estudio de nuevos ingredientes cosméticos para su uso en protección solar, fotoenvejecimiento e hiperpigmentación. Para ello, se utilizaron diferentes técnicas *in vitro* con modelos celulares en monocapa y modelos reconstituidos de piel. Los primeros productos estudiados fueron los filtros UV "A" y "B", unas moléculas desarrolladas por Roka Furadada S.L. con una toxicidad intrínseca debido a su estructura orgánica. Este hecho se demostró en los ensayos de citotoxicidad realizados en queratinocitos humanos. Por esta razón, el filtro "A" se encapsuló con el objetivo de reducir su toxicidad. Sin embargo, los extractos obtenidos del escalado R_20 causaron mortalidad en queratinocitos humanos HaCaT revelando su degradación o liberación del filtro. Posteriormente, se estudiaron las propiedades de fotoactivación de

una fórmula solar con cápsulas pertenecientes al escalado optimizado R_41. La fórmula se aplicó en modelos de piel reconstituidos que se irradiaron con una dosis de radiación solar simulada de 20 J/cm². Las cápsulas ofrecieron una mejora en UVA-PF y en la disminución de espongiosis, pero no mejoraron el SPF ni protegieron de la mortalidad celular. Además, no presentaron unas buenas propiedades cosméticas y galénicas, siendo necesario su optimización para mejorar la aplicación de la fórmula final y su fotoestabilidad. En paralelo se intentó mejorar las propiedades fotoactivas de la fórmula con la adición de lignina, un biopolímero capaz de incrementar el SPF en fórmulas con capacidades fotoprotectoras. Esta fórmula incrementó los valores de UVA-PF, de SPF y disminuyó la toxicidad por la luz UV demostrando los beneficios de la lignina en su incorporación.

También se evaluaron las propiedades antioxidantes y despigmentantes de la combinación 1 a 1 de Floretina (NF02) y Neohesperidina dihydrochalcona (NHDC). A pesar de que esta mezcla no presentó actividad despigmentante en las condiciones ensayadas, sí mostró una capacidad antioxidante superior a la que ofrecen los productos por sí solos. Además, destacamos que la utilización de melanocitos murinos B16F0 para evaluar productos despigmentantes, presenta diferentes aspectos críticos por lo que se refiere a su capacidad de síntesis de melanina, como la importancia de la elección del medio de cultivo o el número de pase celular.

Sunlight provides different benefits to the organism by helping to maintain homeostasis, regulate body temperature and synthesis of vitamin D. Although different events take place in the skin to protect the body, ultraviolet radiation that is part of sunlight causes certain pathophysiological alterations that can cause cancer, photoaging and hyperpigmentation of skin. With the aim to prevent or treat these disorders, different cosmetic products are available. Among them we can find sun protection products with built-in ultraviolet filters to prevent skin cancer and burns, and products in cream or serum format to prevent or treat spots and wrinkles. Nevertheless, different studies confirm the side effects of the molecules used in these products. For this reason, the discovery or development of novel effective treatments is necessary.

This thesis is focused on the study of new cosmetic ingredients for their use in solar protection, photoaging or hyperpigmentation using different *in vitro* techniques. The UV filters "A" and "B", new molecules developed by Roka Furadada S.L., present an intrinsic toxicity due to their organic structure. This fact was demonstrated by the cytotoxicity induced by these compounds when exposed to human keratinocytes. For this reason and to reduce its toxicity, the filter "A" was capsulated. However, the extracts obtained by the batch R_20 of "A" capsules caused cell mortality when exposed to the human keratinocyte cell line HaCaT and thus revealing capsule degradation or filter release. Subsequently, after optimization capsule scaling process, the photoactivation properties of a sunscreen formulation including the new capsule batch R_41 were studied. This sunscreen formulation improves the UVA-PF and reduces the spongiosis observed in human skin reconstructed models when exposed to a simulated solar irradiation of 20 J/cm² but it failed to increase the SPF and prevent cell mortality. However, all these parameters were improved when a lignin was included in the formulation.

Moreover, the antioxidant and depigmenting properties of a mix of Phloretin (NF02) and Neohesperidin dihydrochalcone (NHDC) in a ratio 1 to 1 were also evaluated. This mixture, despite of lacking depigmenting capacity in the tested concentrations, showed higher antioxidant activity than the products alone. In addition, we highlight that the use of B16F0 melanocytes cells for evaluate depigmenting products presents critical aspects regarding to their melanin synthesis capacity.

Índice

Índice.....	7
Abreviaturas	9
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Fisiología de la piel.....	3
1.1.1. Fototipos de piel	10
1.2. Radiación ultravioleta y alteraciones patológicas asociadas	11
1.2.1. Daño producido por la radiación UV.....	13
1.2.2. Respuesta celular de defensa y reparación.....	19
1.2.3. Fisiopatología provocada por la RUV	23
1.3. Tratamientos y prevención	29
1.3.1. Prevención del cáncer de piel.....	29
1.3.2. Prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento.....	38
1.3.3. Tratamientos para la hiperpigmentación y melasma	40
1.4. Regulación cosmética en la Unión Europea y métodos <i>in vitro</i>	44
1.4.1. Cultivo celular en monocapa	46
1.4.2. Cultivo celular con modelos reconstituidos	49
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
3.1. Productos químicos estudiados	59
3.2. Otros productos y reactivos	61
3.3. Cultivo celular: líneas celulares y mantenimiento.....	61
3.4. Modelos de piel reconstituida.....	65
3.5. Estudio de la seguridad y capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV libre y encapsulado.....	66
3.5.1. Ensayo de citotoxicidad celular del filtro SMART UV libre (“A”)	66
3.5.2. Ensayo de citotoxicidad para el filtro SMART UV encapsulado: extractos de las cápsulas.....	68
3.5.3. Estudio de la capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV encapsulado	69
3.6. Estudio de la capacidad antioxidante y despigmentante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona.....	78
3.6.1. Ensayo de citotoxicidad celular	78
3.6.2. Ensayos actividad despigmentante.....	79
3.6.3. Ensayos de inhibición de la producción de ROS inducida por radiación UVA	83
3.7. Análisis estadísticos	84
4. RESULTADOS.....	85

4.1. Estudio de la seguridad y capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV libre y encapsulado.....	87
4.1.1. Ensayo de citotoxicidad celular de los productos SMART UV	87
4.1.2. Resultados de citotoxicidad de los extractos de las cápsulas con “A” R_20	88
4.1.3. Resultados del estudio de la capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV encapsulado.....	90
4.2. Resultados de la capacidad antioxidante y despigmentante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona	110
4.2.1. Resultados de citotoxicidad de la mezcla de NF02 y NHDC (1:1)	110
4.2.2. Resultados sobre la actividad despigmentante	112
4.2.3. Resultados para el estudio de la capacidad antioxidante de NF02 y NHDC.....	115
5. DISCUSIÓN	119
6. CONCLUSIONES.....	133
7. REFERENCIAS	137
8. ANEXOS.....	161
ANEXO 1. Composición de las fórmulas solares	163
ANEXO 2. Absorbancia del filtro UV “A”	166
ANEXO 3. Estudio despigmentante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona	169
ANEXO 4. Publicaciones	170

Abreviaturas

6-4PP	6-4 pirimidina-pirimidona
8-oxoG	8-oxoguanina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADNmt	ADN mitocondrial
AK	Queratosis actínica
AP	Apurínico o apirimidínico
AP-1	Proteína activadora 1
BCC	Carcinoma de células basales
BER	Reparación por escisión de base
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
BSA	Albúmina de suero bovino
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CBA	Calebin-A
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
CO₂	Dióxido de carbono
CPD	Dímeros de ciclobutano pirimidina
CTAB	Cetiltrimetilamonio
DAG	Diacilglicerol
DCF-DA	2',7'-Diclorofluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPA	Dihidroxilfenilalanina
ECM	Matriz extracelular
EMT	Epitelial-mesenquimatoso
ET	Endotelina
FBS	Suero fetal bovino
Glu	L-glutamina
GSH	Glutación
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
H&E	Hematoxilina y eosina
IL	Interleucina
KA	Ácido kójico
LDH	Lactato deshidrogenasa
MC1-R	Receptor 1 de melanocortina
MED	Dosis mínima de eritema
MITF	Factor de transcripción asociado a la macroftalmia
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
MTT	2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide
NAC	N-acetil-L-cisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NF02	Floretina
NFG	Factor de crecimiento nervioso
NHDC	Neohesperidina dihidrochalcona
NRU	Rojo neutro
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos estéril
Pen-estrep	Penicilina-Estreptomina

PKC	Proteína quinasa C
POMC	Proopiomelanocortina
PTCH1	Homólogo 1 de la proteína parcheada
RACK	Receptor para la C-quinasa activada
RhE	Epidermis humana reconstituida
RhS	Piel humana reconstituida
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RUV	Radiación Ultravioleta
SCC	Carcinoma de células escamosas
SEM	Error estándar
SHH	Sonic Hedgehog
SOD	Superóxido dismutasa
SPF	Factor de protección solar
TBST	Tris-HCl 10 mM (pH 8) + NaCl 150 mM+ Tween 20 0,05%
TCT	Crema triple combinación
TIO₂	Dióxido de titanio
TNF	Factor de necrosis tumoral
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
UVA-PF	Factor de protección frente a la luz UVA
WST	Agua de tetrazolio
ZnO	Óxido de zinc

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Fisiología de la piel

La piel es la principal barrera de protección del organismo frente al medio externo, siendo el órgano más grande y protegiendo los órganos internos para su correcto funcionamiento. Además, la piel contiene pigmentos que actúan como filtro solar protegiendo contra la radiación ultravioleta (RUV), ayuda a mantener la homeostasis y la temperatura corporal y es donde se producen las primeras etapas de la síntesis de vitamina D. En la piel se distinguen diversas capas con diferente estructura celular según su función: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1.1). El grosor de estas capas varía según la región anatómica (Yadav et al., 2019).

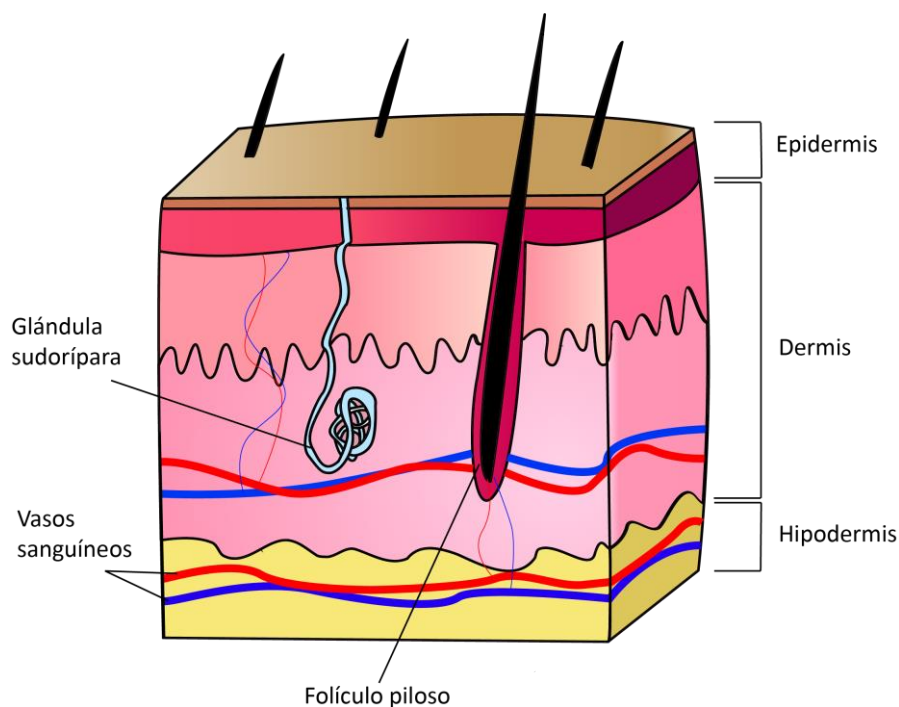


Figura 1.1. Anatomía de la piel humana.

Epidermis

La epidermis es una capa epitelial escamosa estratificada queratinizada. Es la parte externa de la piel y está formada por tres tipos básicos de células: los queratinocitos, los melanocitos y las células de Langerhans (Fodor & Dumitrascu, 2020). Su función principal es la de una barrera que se renueva a sí misma. La epidermis evita la entrada de patógenos y otros agentes extraños, protege el ADN del daño causado por la RUV y retiene agua (Dehdashtian et al., 2018). Se divide en cinco capas: el estrato córneo,

estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y el estrato basal (Ramadon et al., 2022) (Figura 1.2).

La capa externa de la epidermis se denomina **estrato córneo**. Ofrece protección mecánica y actúa contra la entrada de sustancias ajenas y contra la pérdida de agua (Joffe et al., 2020). Está formado por células cutáneas anucleadas terminalmente diferenciadas y conocidas como corneocitos (Dehdashtian et al., 2018). Estas células son grandes, planas y de forma poliédrica y han perdido su núcleo durante la diferenciación terminal por lo que técnicamente se consideran células muertas (Joffe et al., 2020). A medida que las células más externas envejecen, dañándose y volviéndose menos activas, se van desprendiendo diariamente para dar espacio a nuevas células. Este proceso se puede demorar entre 28 y 50 días, según la edad de la persona (Yadav et al., 2019). Los corneocitos están incrustados en una matriz extracelular compuesta de diferentes lípidos como el colesterol, ácidos grasos libres y glucosilceramidas. Estos lípidos están sintetizados por el estrato granuloso, una capa más profunda de la epidermis, y actúan como barrera de permeabilidad para la piel manteniendo así la humedad adecuada (Dehdashtian et al., 2018; Ribeiro et al., 2017).

Entre el estrato granuloso y el estrato córneo se encuentra el **estrato lúcido**. Está considerado una subdivisión del estrato córneo y sólo está presente en áreas de piel gruesa como en las palmas de las manos y las plantas de los pies (Arda et al., 2014; Yadav et al., 2019). Además, proporciona capacidad de estiramiento, impermeabilización y reducción de la fricción en la piel (Yadav et al., 2019). Su nombre se debe a que sus células aparecen translúcidas con membranas celulares engrosadas en el examen histológico (Dehdashtian et al., 2018).

El **estrato granuloso** es una capa de 3 a 5 células de espesor que constituye una barrera de la epidermis resistente al agua. Las células de este estrato son las responsables de una mayor síntesis y modificación de proteínas involucradas en la queratinización (Joffe et al., 2020). Es capaz de retener la humedad de la epidermis inferior al bloquear el paso del agua y otras sustancias hidrofílicas al interior (Yadav et al., 2019). Las células del estrato granuloso son aplanadas y de forma rectangular o poligonal y contienen gránulos asimétricos de dos tipos: los gránulos lamelares y la queratohialina basófila. Los gránulos lamelares secretan una sustancia rica en lípidos que se acumula en la matriz extracelular

para mantener las células bien cerradas entre sí y así evitar la pérdida de agua. Por su parte, la queratohialina basófila secreta tonofilamentos de proteínas de queratina y filagrina formando estructuras de prequeratina, las tonofibrillas, esenciales para la queratización (Yadav et al., 2019).

En el **estrato espinoso** los queratinocitos comienzan a producir proteínas fibrilares llamadas citoqueratinas. La citoqueratina se acumula formando tonofilamentos intermedios los cuales forman la base de las tonofibrillas, que a su vez forman desmosomas (Dehdashtian et al., 2018; Yadav et al., 2019). Los desmosomas promueven una conexión mecánica entre las células de la epidermis y brindan resistencia a las tensiones físicas (Joffe et al., 2020). Con la alineación de tonofilamentos y tonofibrillas, los queratinocitos de este estrato pasan de formas cúbicas y poliédricas a células aplanadas (Dehdashtian et al., 2018). El estrato espinoso se superpone a la capa de células basales y tiene un grosor de 5 a 10 células (Joffe et al., 2020). Los queratinocitos ubicados encima de la capa basal tienen forma poliédrica y un núcleo redondeado, mientras que los presentes en las capas más superiores del estrato tienen un tamaño generalmente mayor, se vuelven más planos a medida que son empujados hacia la superficie y contienen gránulos laminares (Joffe et al., 2020). Las células de Langerhans, que son células dendríticas que actúan como células presentadoras de antígeno a las células T iniciando el proceso de inmunidad adaptativa, se localizan principalmente en esta capa (Dehdashtian et al., 2018). La apariencia espinosa de los numerosos desmosomas de las conexiones intercelulares da nombre a este (Dehdashtian et al., 2018; Joffe et al., 2020).

El **estrato basal**, también conocido como estrato germinativo, se encuentra sobre la unión dermoepidérmica que separa la dermis de la epidermis. Es en esta capa donde se ubican las células mitóticamente activas que dan origen a las células de las capas más externas (Joffe et al., 2020). Es decir, contiene queratinocitos germinativos que son las células epidérmicas fundamentales para la renovación constante de la epidermis. El tiempo que tarda un queratinocito en migrar desde esta capa germinal hasta el estrato córneo oscila entre 15 y 30 días (Dehdashtian et al., 2018). A esta migración se le denomina queratización (Joffe et al., 2020). Además, este estrato también contiene células más especializadas como los melanocitos, que protegen el ADN de la luz

ultravioleta, las células de Langerhans y las células de Merkel, células neuroendocrinas que participan en la sensación del tacto. El estrato basal también proyecta pilares de tejido en la dermis subyacente, conocidos como crestas, ayudando a proteger la epidermis contra el traumatismo por cizallamiento (Dehdashtian et al., 2018).

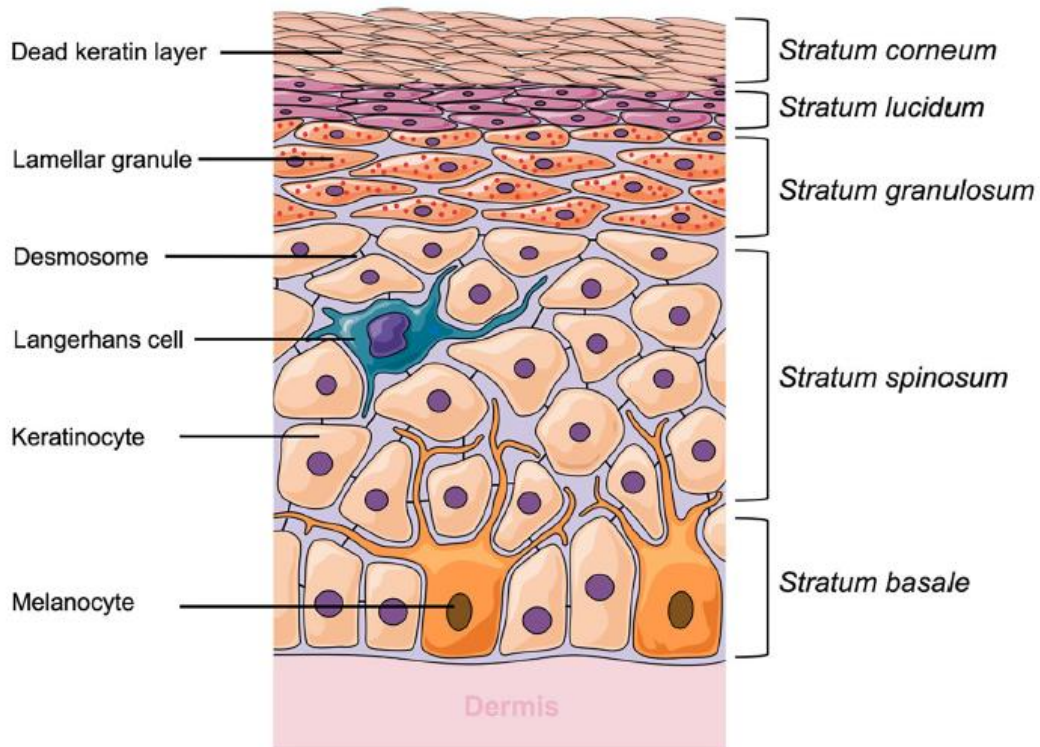


Figura 1.2. Imagen de los diferentes estratos y componentes que componen la epidermis (Ramadon et al., 2022).

Dermis

La dermis es un tejido conectivo compuesto principalmente por tres elementos: el celular, siendo los fibroblastos las células mayoritarias; las fibras fibrilares, colágenas y elásticas; y la sustancia intersticial amorfa, una especie de gel rico en glicosaminoglicanos en el que se encuentran embebidos los demás elementos (Issa & Tamura, 2017). En la dermis se encuentran las glándulas sudoríparas, los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas (Ribeiro et al., 2017). A parte de fibroblastos, contiene células dendríticas y mastocitos. Los fibroblastos sintetizan fibras colágenas, reticulares y elásticas que se entrelazan para aumentar la resistencia dérmica y optimizar su protección (Kanitakis, 2002). Gracias a la

presencia de tejido elástico y fibroso, la dermis proporciona protección y flexibilidad a la piel (Yadav et al., 2019). La dermis se subdivide en dos capas: la dermis papilar y la dermis reticular.

La **dermis papilar** se encuentra en la parte más externa de la dermis debajo de la unión epidérmica conteniendo una mayor densidad de fibroblastos que la dermis reticular. Es una capa delgada formada por tejido conectivo laxo facilitando la difusión de oxígeno y nutrientes desde los capilares hacia la epidermis. Además, contiene fibras de colágeno, fibras elásticas, fibras reticulares y capilares (Ribeiro et al., 2017; Yadav et al., 2019).

La capa más gruesa y profunda de la dermis es la **dermis reticular** que se encuentra justo encima de la capa subcutánea. Contiene una disposición compacta de tejido conectivo que incluye mastocitos, vasos sanguíneos, fibras de colágeno, fibroblastos, terminaciones nerviosas y linfáticas. Contiene paquetes de colágeno más gruesos y eosinofílicos que la dermis papilar separados por sustancia amorfa intersticial (Ribeiro et al., 2017; Yadav et al., 2019).

Hipodermis

La **hipodermis**, o tejido subcutáneo, no se considera parte de la piel, caracterizándose como parte del tejido blando del cuerpo. Está formada por lóbulos de adipocitos limitados por tabiques de colágeno que contienen los haces neurovasculares (Ribeiro et al., 2017). Estudios han indicado que los depósitos del tejido adiposo dérmico tienen perfiles genéticos y morfológicos distintos del tejido adiposo blanco subcutáneo (Driskell et al., 2014).

Queratinocitos

Aproximadamente el 85% de las células de la epidermis son queratinocitos derivados del ectodermo. Estas células producen queratina y su proceso de diferenciación que ocurre cuando las células migran desde la capa basal de la epidermis a la superficie de la piel se llama queratinización. Los queratinocitos pasan por una primera fase sintética y luego por una degradativa. En la primera fase de síntesis, la célula acumula queratina en el citoplasma, la cual es un filamento fibroso dispuesto en un patrón de espiral alfa-helicoidal que funciona como citoesqueleto celular. Haces de estos filamentos de queratina convergen y terminan en la membrana plasmática, formando placas de unión

intercelular conocidas como desmosomas. En la fase de degradación, los orgánulos celulares se pierden y el contenido de la célula se consolida en una mezcla de filamentos y envolturas celulares amorfas dando lugar a la célula corneal o corneocito. El proceso de maduración que acaba en muerte celular se conoce como diferenciación terminal (Dehdashtian et al., 2018).

Melanocitos

Los melanocitos son células dendríticas altamente especializadas que transfieren melanina a los queratinocitos circundantes en orgánulos subcelulares similares a lisosomas llamados melanosomas, donde se sintetiza y almacena la melanina. Fitzpatrick y Breathnach propusieron en 1963 la “unidad de melanina epidérmica”. Este concepto consistió en la interacción de 1 melanocito y aproximadamente 36 queratinocitos para producir pigmentación. Más recientemente se ha propuesto la unidad de queratinocitos-Langerhans-melanocitos, que no excluye la posibilidad de incluir otras células epidérmicas (Nordlund, 2007).

La melanina es un pigmento producido por los melanocitos de la capa basal de la epidermis como respuesta a la exposición a la luz UV (ultravioleta). Este polímero actúa como defensa para evitar las lesiones producidas por los rayos ultravioleta bloqueándolos y disipándolos en forma de calor. No obstante, cuando se produce una exposición excesiva a la RUV, este mecanismo de defensa es insuficiente y se producen alteraciones fisiológicas que conllevan a una pigmentación excesiva de la piel, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de fotoproductos de ADN.

El proceso de síntesis de melanina se conoce como melanogénesis, donde la enzima tirosinasa tiene un papel esencial, tal y como se muestra en la (Figura 1.3). Así, la tirosinasa participa en la hidroxilación de la tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA) y en la posterior oxidación de DOPA a DOPA quinona. Por otro lado, la melanogénesis da lugar a dos tipos de melanina: la eumelanina, un polímero insoluble caracterizado por un color negro pardusco; y feomelanina, un polímero soluble de color amarillo rojizo. Para la síntesis de eumelanina se requiere de las proteínas TRP1 y TRP2 una vez obtenida la DOPA como a partir de DOPA quinona (Figura 1.3). Mientras que la síntesis de feomelanina se realiza a partir de la DOPA quinona y requiere la presencia de derivados

del azufre (Montaudié et al., 2014). La eumelanina y la feomelanina se unen a cationes, aniones y fármacos, entre otras cosas, proporcionando protección a los melanocitos (Costin & Hearing, 2007).

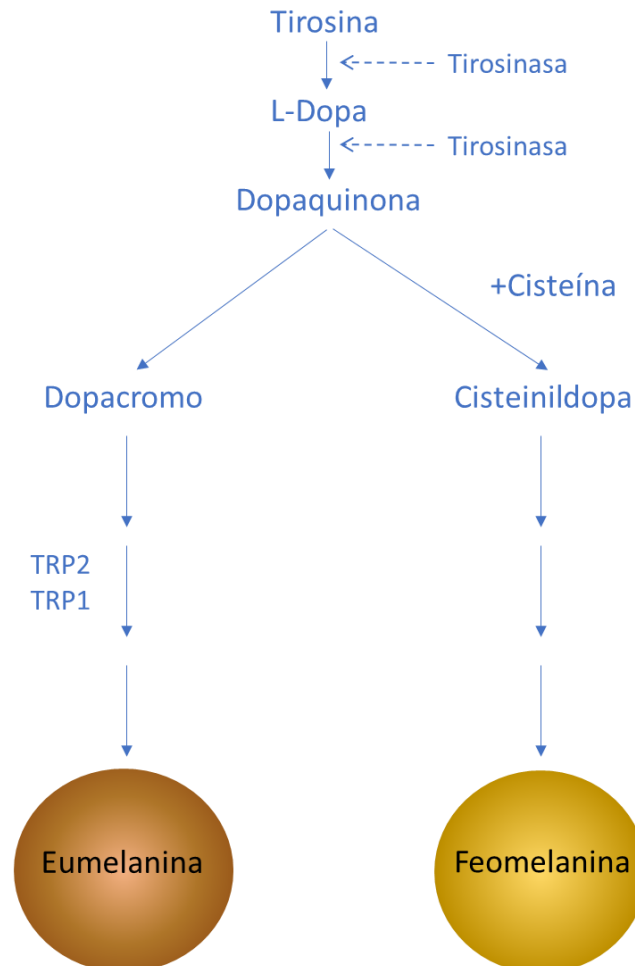


Figura 1.3. Esquema simplificado del proceso de melanogénesis.

Las diferencias de pigmentación en la piel se atribuyen a la proporción relativa de eumelanina y feomelanina y al número de melanosomas dentro de los melanocitos. La feomelanina es responsable de pigmentar las partes más claras de la piel como los labios o los pezones. En cambio, la eumelanina pigmenta la piel, los ojos y el pelo. Las poblaciones que viven más cerca del ecuador desarrollan una mayor proporción de eumelanina que absorbe luz UV, es antioxidante y elimina radicales libres. Por el contrario, las poblaciones que se encuentran más lejanas al ecuador producen más

feomelanina la cual induce radicales libres en respuesta a la exposición UV (Schlessinger et al., 2022).

La pigmentación de la piel en humanos muestra amplias variaciones entre individuos y se cree que se debe a la adaptación evolutiva al medio ambiente, concretamente a la exposición a la RUV (Jablonski & Chaplin, 2010). Las diferencias del color de piel varían por la cantidad y distribución del pigmento entre los queratinocitos. Los melanosomas grandes muy pigmentados que no están agregados se encuentran en pieles oscuras en toda la epidermis, incluido el estrato córneo. En cambio, los melanosomas pequeños, agregados y poco pigmentados se encuentran restringidos en la capa basal dando lugar a pieles más claras (del Bino et al., 2015). La densidad general de melanina se correlaciona con la oscuridad de la piel y con el tipo de piel de Fitzpatrick (Schlessinger et al., 2022).

1.1.1. Fototipos de piel

La coloración de la piel está relacionada con la sensibilidad a la RUV y la tendencia inherente a quemarse o broncearse después de la exposición a la RUV. Este hecho se ha utilizado para categorizar los fototipos de piel, conocidos también como tipos de piel de Fitzpatrick, tal y como se muestra en la Figura 1.4. Las personas con la piel clara tienen más riesgo de padecer cáncer de piel, así como de sufrir quemaduras solares. En cambio, las personas con la piel más oscura presentan menos riesgo de padecer cáncer de piel, se broncean con más facilidad y, su piel, contiene más melanina (Yadav & Banerjee, 2018).

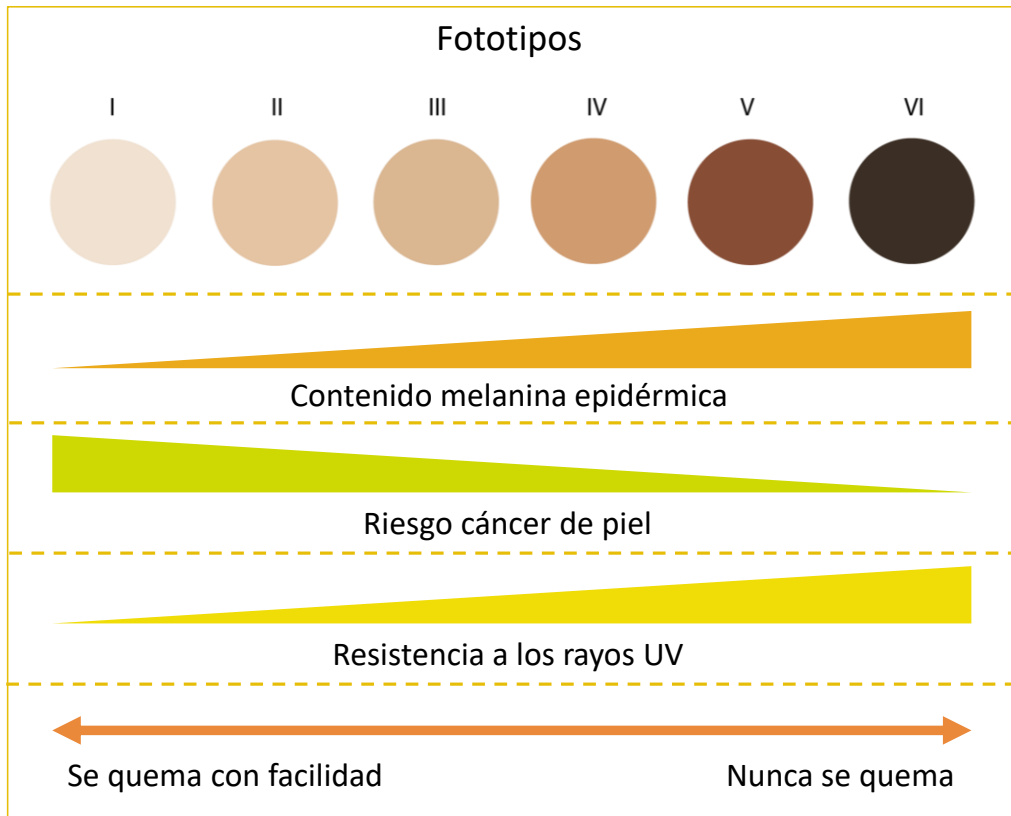


Figura 1.4. Fototipos de Fitzpatrick y características asociadas.

1.2. Radiación ultravioleta y alteraciones patológicas asociadas

La RUV de la luz solar se considera un carcinógeno completo porque actúa como mutágeno, así como agente lesivo no específico. Así, la RUV causa efectos nocivos para la salud humana mediante la iniciación de tumores y el desarrollo de cáncer de piel, pero también participa en otros trastornos dermatológicos cutáneos como eritema solar, hiperpigmentación, fotoenvejecimiento cutáneo y supresión del sistema inmunitario además de alterar la función visual por el desarrollo de cataratas (Serpone, 2021).

La RUV forma parte del espectro electromagnético con unas longitudes de onda entre la luz visible y la radiación gamma. A su vez, su espectro está dividido en las regiones UVA, UVB y UVC. Los fotones de la luz UVC comprenden las longitudes de onda más cortas entre 100 y 280 nm, mientras que los de la UVB comprenden el rango de 280-320 nm. La luz menos energética, la UVA, se encuentra entre 320 nm y 400 nm, y se puede dividir en UVA2 (320-340 nm) y UVA1 (340-400 nm) (Serpone, 2021). Cada tipo de luz UV ejerce unos efectos específicos en la piel, aunque la luz UVC es absorbida mayormente por la capa de ozono atmosférico (Sánchez-Quiles et al., 2020) (Figura 1.5). Por tanto, la luz solar UV que alcanza la superficie terrestre consiste en un 90-95% de UVA y un 5-10% de UVB. Además, los rayos con longitudes de onda más larga, pertenecientes a la región UVA1, comprenden hasta un 80% del total de la luz UV que alcanza la tierra (Bernerd et al., 2022). La luz UVA, la menos energética, penetra en la piel alcanzando la dermis y genera ROS que dañan el ADN indirectamente a través de reacciones fotosensibilizantes. Por su parte, la radiación UVB, que queda prácticamente retenida en la epidermis, es absorbida directamente por el ADN provocando un reordenamiento molecular que da lugar a fotoproductos, como los dímeros de ciclobutano, y causa mutaciones en el ADN y cánceres (D’Orazio et al., 2013).

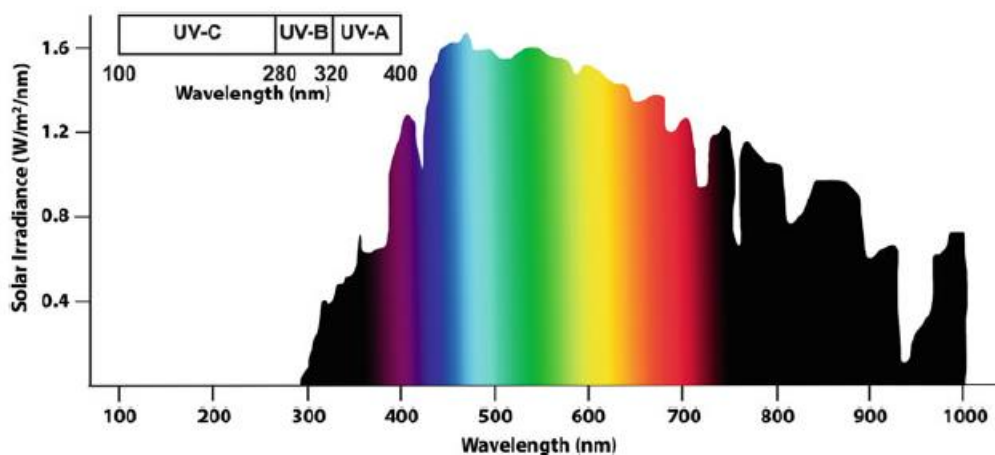


Figura 1.5. Espectro esquemático de la radiación solar sobre la superficie terrestre. Las longitudes de onda por debajo de 290 nm no alcanzan la tierra (Sánchez-Quiles et al., 2020).

1.2.1. Daño producido por la radiación UV

1.2.1.1. *Especies reactivas de oxígeno*

La RUV puede inducir a la producción de ROS ya sea a través de mecanismos de fotosensibilización o afectando directamente a componentes celulares. Las ROS son radicales libres que poseen un o más electrones desapareados y comprenden a todos los radicales libres derivados del oxígeno, así como no radicales como el peróxido de hidrógeno (de Jager et al., 2017). La RUV produce indirectamente una variedad de ROS que incluye el anión superóxido (O_2^-), el oxígeno singulete, radicales de hidroxilo y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de diferentes mecanismos (de Jager et al., 2017).

Las ROS pueden generar mutaciones a partir de la oxidación de las bases de nucleótidos. Una de las mutaciones más importantes es la transversión de guanina a timina ($G \rightarrow T$) formando la 8-hidroxi-2'-deoxiguanina que tiende a emparejarse con una adenina (A) en lugar de una citosina (C) y conduce de G/C a A/T en la segunda ronda de replicación (Mohania et al., 2017). La producción de radicales libres provoca un desequilibrio desencadenando un proceso de estrés oxidativo en las células induciendo la pérdida de la elasticidad en la piel (Langton et al., 2010; Naylor et al., 2011). Las ROS pueden dañar los lípidos (peroxidación), las proteínas y los ácidos nucleicos alterando así el citoesqueleto celular. Además, pueden afectar a la enzima catalasa y modifican la regulación al alza de la enzima óxido nítrico sintasa (Meyskens Jr. et al., 2001; Zastrow et al., 2009).

El lugar principal para la producción de ROS es la mitocondria dónde se han descrito, hasta el momento, 10 sitios para su formación. Estos sitios están vinculados a la cadena de transporte de electrones o al ciclo de Krebs. El complejo I tiene dos sitios para la formación de O_2^- , el sitio de oxidación de Flavina en NADPH y el sitio de reducción de la ubiquinona. El complejo III tiene un sitio para la producción de O_2^- que es el sitio de oxidación del quinol (Ganguly et al., 2022). Otras enzimas como la glicerol-3 fosfato deshidrogenasa, la 2-oxoglutarato-deshidrogenasa y la xantina oxidasa también participan en la generación de ROS (Quinlan et al., 2013).

Recientemente, se ha descrito que la RUV aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular desencadenando la generación de ROS al activar a la NADPH oxidasa. Además, este

aumento también activa la **proteína quinasa C (PKC)** que a través de la fosforilación de Rho GPI α , y diversos acontecimientos, finalmente facilita la estimulación de Nox1, uno de los homólogos de la subunidad citocromo de la NADH oxidasa de los fagocitos (Ganguly et al., 2022).

1.2.1.2. Formación de fotoproductos

El ADN es muy susceptible de ser dañado por la RUV, especialmente las bases pirimidínicas que son aproximadamente 10 veces más sensibles que las purinas (Oak et al., 2018). Así, los fotoproductos más importantes que se forman al interaccionar el ADN con la luz UVB son la 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP) y los dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) (Figura 1.6). Como consecuencia, se afecta la estructura del ADN interfiriendo en su replicación y el buen funcionamiento celular, siendo estos los principales responsables de la carcinogénesis inducida por la RUV.

Los CPDs son las lesiones de ADN más comunes y abundantes contribuyendo aproximadamente en un 85% de las lesiones de ADN causadas por la luz UVB. Por otro lado, los fotoproductos 6-4PP se forman por la unión covalente entre dos residuos de timina adyacentes en una sola cadena de ADN. También se pueden formar fotoproductos por interacción de residuos adyacentes de CT, TC y CC, aparte de TT. Aunque las lesiones producidas se pueden revertir mediante la reparación por escisión de base (BER), no ocurre lo mismo para el fotoproducto 6-4PP (J. Singh et al., 2018). Si no se consigue reparar la lesión, posteriores exposiciones a longitudes de onda superiores a 280-290 nm pueden dar lugar a isómeros de valencia de Dewar, que son más destructivos (Yadav & Banerjee, 2018) (Figura 1.6).

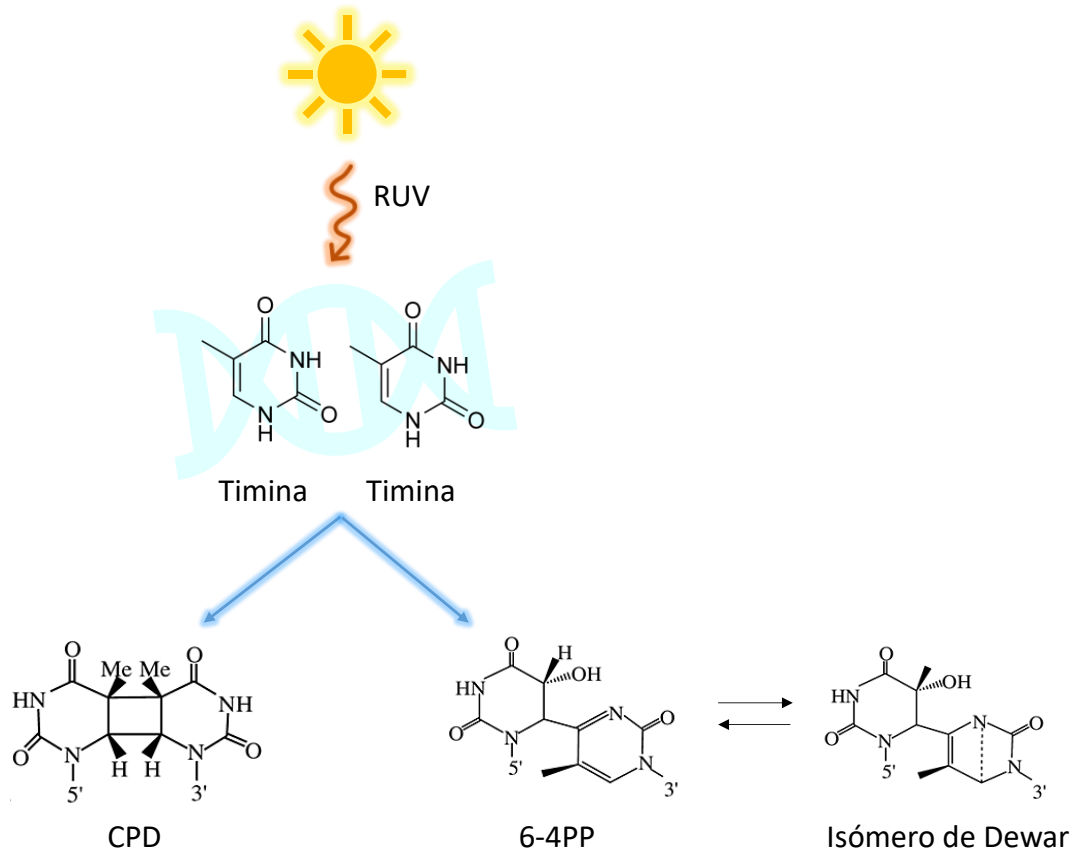


Figura 1.6. Estructuras químicas del dímero de ciclobutano Pirimidina, 6-4 Pirimidina-Pirimidona y del isómero de Dewar.

Como consecuencia, el ADN polimerasa no interpreta la hebra molde y se provocan mutaciones. En el caso de los CPD, las mutaciones ocurren de una manera homogénea e identificable, tal y como se encuentra con frecuencia en tumores de piel, por lo que se consideran marcadores de mutaciones por **huella UV**. Las mutaciones se forman instantáneamente y parecen estructuralmente indistinguibles como parte del ADN recién sintetizado para las enzimas de reparación del ADN. La iniciación es irreversible y puede ocurrir en cualquier momento de la vida de una persona (Oak et al., 2018).

Tradicionalmente, la formación de CPDs se ha atribuido principalmente a la luz UVB. En cambio, el daño provocado por la luz UVA se ha relacionado principalmente con el estrés oxidativo. Así, las ROS reaccionan con la guanina induciendo la oxidación de productos como aductos de 8-oxoguanina (8-oxoG) u 8-hidroxi-deoxiguanosina resultando en una transversión G→T o T→G (Agarwal, 2018). Por otro lado, Mouret y cols. demostraron una mayor producción de CPDs que de 8-oxoG en explantes de piel humana y células

irradiadas con luz UVA, concluyendo que la formación de CPD es una lesión predominante en la piel irradiada por UVA (Mouret et al., 2006). Estas observaciones fueron confirmadas por Tewari y cols. en voluntarios sanos (Tewari et al., 2012).

1.2.1.3. Reacciones bioquímicas

Existen tanto cromóforos endógenos como exógenos, es decir moléculas capaces de absorber la energía de longitudes de onda de luz concretas y transferirla a otras moléculas (Ainbinder & Touitou, 2010). Los cromóforos cutáneos incluyen el ADN, el ácido urocánico, aminoácidos aromáticos, retinoides, carotenoides, la bilirrubina, la hemoglobina, la melanina y el NAD(P)H (Rigel et al., 2004). Éstos pueden ser dañados directamente o actuar como fotosensibilizantes generando ROS en presencia de oxígeno molecular (Ainbinder & Touitou, 2010).

El estrés oxidativo asociado a la exposición a la luz UV se puede producir a través de la activación de la enzima oxidasa **NADPH** o promoviendo la **peroxidación lipídica**. Cuando el oxígeno molecular se reduce a O_2^- se produce la iniciación de ROS. Este proceso puede ser enzimático por reacciones catalizadas por oxidasa NADPH o xantina oxidasa o no enzimático (S. I. Ahmad, 2017).

La RUV causa estrés oxidativo en la piel induciendo la liberación de mediadores de inflamación. Los leucocitos producen el radical O_2^- catalizado por la enzima NADPH oxidasa el cual sufre dismutación a oxígeno y a peróxido de hidrógeno catalizado por la **superóxido dismutasa** (SOD). Finalmente, la mieloperoxidasa convierte el peróxido de hidrógeno en hipoclorito. Otra vía de estrés oxidativo por UV es por la eliminación de un protón y un electrón de las moléculas lipídicas produciendo radicales lipídicos. Estos radicales pueden interaccionar con oxígeno molecular dando lugar a la peroxidasa lipídica y a nuevas moléculas lipídicas (de Jager et al., 2017).

1.2.1.4. Daño al ADN

Los fotoproductos inducidos por la RUV pueden afectar a la replicación del ADN o causar mutaciones. Como consecuencia, la expresión de diferentes genes puede verse alterada por la RUV, sobre todo en el caso de la luz UVB, ya que es 1.000 veces más mutagénica que la UVA (Yadav & Banerjee, 2018). Entre las posibles mutaciones, se pueden ver afectados genes supresores de tumores o protooncogenes y, por lo tanto, la exposición

a luz UV es un factor de riesgo a padecer cáncer (Yadav & Banerjee, 2018). De manera breve se exponen los principales genes afectados por la luz UV.

El **gen supresor de tumores p53 (o TP53)** es esencial para evitar procesos carcinogénicos. En humanos el gen TP53 codifica proteínas p53 que verifican las mutaciones del ADN previniendo así el cáncer. Este gen está involucrado en el mantenimiento de la integridad del genoma, en la reparación del ADN, en la detención del ciclo celular y en la apoptosis (Perwez Hussain & Harris, 2006). La RUV hace que las proteínas p53 codificadas por el gen TP53 se acumulen en el núcleo y retrasen la progresión del ciclo celular. Este retraso proporciona un tiempo adicional para la reparación del ADN y la apoptosis de las células dañadas. En las células irradiadas con UV, la expresión del gen TP53 aumenta, produciendo una mayor síntesis de proteínas p53. No obstante, la RUV puede provocar una mutación en el gen TP53, donde las células pueden entrar en la fase S interrumpiéndose la apoptosis y provocando daño en el ADN. De esta manera, las células continúan replicándose con el ADN mutado iniciando así las lesiones precancerosas. La mayoría de las mutaciones de TP53 mediadas por UVB son el resultado de sustituciones de bases C a T y CC a TT. Estas mutaciones se originan en los cánceres de piel no melanoma: el carcinoma de células basales (BCC) y el carcinoma de células escamosas (SCC) (Yadav & Banerjee, 2018).

El **homólogo 1 de la proteína parcheada (PTCH1)** es un gen supresor de tumores asociado con BCC, BCC esporádicos y con carcinoma nevoide de células basales (Yadav & Banerjee, 2018). La inactivación del gen PTCH1 podría ser esencial para la formación de BCC. El producto del gen PTCH1 es un receptor de membrana para la vía de señalización *Sonic hedgehog (SHH)*. En ausencia de ligandos, PTCH1 inhibe la expresión del gen *smoothened*, que activa un factor transcripcional Gli1 y conduce a la formación de tumores (Boukamp, 2005; Deneff et al., 2000). Se ha encontrado que casi un 70% de casos de BCC tiene la vía de señalización *hedgehog* afectada (Boukamp, 2005). Se determinó que la mayoría de las mutaciones en PTCH llevaban la huella UV, transiciones C → T y CC → TT en sitios dipirimidina y que estaban asociadas con la dosis de irradiación (Liu-Smith et al., 2017).

La **familia de protooncogenes RAS** es otro grupo de genes afectados por la RUV, concretamente por la UVB. Estos genes codifican proteínas G que hidrolizan guanosina

5'-trifosfato (GTP) y facilitan las respuestas de señalización celular de varios receptores de factores de crecimiento. Las proteínas mutantes no pueden hidrolizar GTP por lo que el crecimiento celular ya no depende de los factores de crecimiento y continua incluso después de que no haya factores de crecimiento disponibles. Las mutaciones inducidas por UVB en los genes RAS son claras en algunos BCC y SCC humanos (Yadav & Banerjee, 2018).

Otros genes como el gen supresor de tumores p16, el gen CMM1, el gen CDK4 (quinasa dependiente de ciclina) y otros genes relacionados con las vías p53 también están implicados en el desarrollo del melanoma (Daya-Grosjean, 2008; Hussein et al., 2003).

La RUV también desencadena una **respuesta inmune** en la piel a través de diferentes moléculas de señalización, incluyendo el sistema Fas/FasL, el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas (IL) o la inducción de apoptosis en células T (Liu-Smith et al., 2017). Los rayos UV modulan la respuesta inmune inhibiendo la presentación de antígenos y alterando los niveles de citoquinas. Por otra parte, la RUV reduce el número de células madre mesenquimales y epidérmicas que tienen la capacidad de mantener la homeostasis en la piel, por lo que esta homeostasis se ve afectada contribuyendo así al envejecimiento de la piel y al cáncer (Panich et al., 2016). Además, dañan las células de Langerhans en la piel (Suman & Suman, 2019).

Los **genes proinflamatorios** también son inducidos por la RUV teniendo un rol vital en la fotocarcinogenesis y en el fotoenvejecimiento. Los mediadores inflamatorios se liberan de varios tipos de células como los queratinocitos, fibroblastos, células tumorales, leucocitos y el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos. Estos mediadores inflamatorios son los mediadores plasmáticos (bradicinina, plasmina, fibrina), los mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas) y las citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α). Las ROS también pueden activar los mediadores lipídicos, la COX-2 y la prostaglandina E2. Además, las respuestas inflamatorias desencadenan un incremento de ROS y especies reactivas de nitrógeno (Athar et al., 2001; Buckman, 1998; Hofseth et al., 2003).

1.2.2. Respuesta celular de defensa y reparación

1.2.2.1. Sistema antioxidante

Las células disponen de moléculas antioxidantes para neutralizar las ROS y así evitar el daño producido por los radicales libres en el ADN y otras moléculas.

El **glutati6n (GSH)** es un oligop6ptido compuesto por tres amino6cidos, ciste6na, glicina y glutamina, que representa una de las mol6culas antioxidantes celulares m6s importantes. El GSH funciona como agente reductor al neutralizar la reactividad de los radicales libres a partir de la donaci6n de electrones. A trav6s de este mecanismo, el GSH se oxida, pero el glutati6n reductasa puede reducirlo a su estado basal utilizando NADPH como donante de electrones. Por lo tanto, el GSH se puede encontrar en las c6lulas tanto en la forma oxidada como en la reducida, pero cuando hay anomal6as en la proporci6n de GSH reducido a oxidado indica estr6s oxidativo (D’Orazio et al., 2013).

La **catalasa** es una enzima oxidante que degrada el per6xido de hidr6geno en agua y ox6geno a trav6s de un proceso de actividad catal6tica. Adem6s, posee actividad peroxidasa cuando los niveles de per6xido son bajos (de Jager et al., 2017). La **SOD** inactiva el an6n super6xido (O_2^-) (Krol et al., 2000).

Adem6s, tambi6n **hay antioxidantes no enzim6ticos** como la vitamina E, la vitamina C, el 6cido 6rico, el ascorbato y el ubiquinol (J. Singh et al., 2018).

Finalmente, el **receptor 1 de melanocortina (MC1-R)**, que se encuentra en la superficie de los melanocitos, y la se6alizacion de monofosfato de adenosina c6clico (cAMP) tambi6n est6n implicados en la regulaci6n antioxidante (Suman & Suman, 2019).

1.2.2.2. Reparaci6n de ADN

Existen dos mecanismos principales para reparar el da6o del ADN producido por la RUV: la reparaci6n por escisi6n de base (**BER**) y la reparaci6n por escisi6n de nucle6tidos (**NER**) (Liu-Smith et al., 2017). Las peque6as lesiones se reparan espec6ficamente con BER, mientras que las dem6s lesiones se reparan con NER. En humanos, los fotoproductos CPDs y 6-4PP solo se pueden reparar con NER, mientras que las modificaciones oxidativas de ADN se reparan por BER, como la 8-oxoG. Con la exposici6n excesiva y cr6nica de la piel a los rayos UV, la reparaci6n de los fotoproductos no es tan

efectiva y el mecanismo de reparación se sobreactiva transmitiendo los fotoproductos a rondas posteriores de replicación (Yadav & Banerjee, 2018).

En el caso de BER, la ADN glicosilasa reconoce una única base defectuosa que escinde dejando un sitio apurínico o apirimidínico (AP). Seguidamente las endonucleasas AP y liasas AP cortan el ADN en el sitio 5' o 3' con respecto a los sitios AP y los eliminan. La fosfodiesterasa elimina el residuo de desoxirribosa fosfato. En un proceso de síntesis de ADN no programado, la ADN polimerasa β llena el espacio y a ADN ligasa sella el espacio alrededor de los oligonucleótidos recién sintetizados (Oak et al., 2018).

El mecanismo de NER repara los fotoproductos y elimina las lesiones masivas de ADN (Robertson et al., 2009). Este mecanismo tiene dos subvías, la GG-NER (reparación genómica global) y la TC-NER (reparación transcripción acoplada) que convergen después del reconocimiento del ADN dañado. Este mecanismo se divide en 5 pasos: reconocimiento del fotoproducto, escisión en ambos lados del fotoproducto, eliminación de la lesión, síntesis de una nueva cadena de ácido nucleico y ligadura en cadena. De esta manera NER altera la estructura tridimensional del ADN. Los factores de transcripción involucrados en el polimorfismo NER posiblemente estén influenciados por la RUV, lo que posiblemente aumenten los cánceres de piel (Krutmann & Merk, 2018; Ray et al., 2018)

Los CPD no reparados y los 6-4PP distorsionan la estructura hélice del ADN y dificultan tanto la replicación como la transcripción. Cuando los fotoproductos no se consiguen reparar existe un mecanismo de derivación (bypass). Cuando el ADN polimerasa encuentra un fotoproducto no reparado durante la replicación, se detiene y se separa. En este caso, se recluta una polimerasa de ADN capaz de eludir la lesión para continuar la replicación. A este proceso se le llama síntesis de translesión. La ADN polimerasa η se recluta en sitios que hay CPDs actuando como una “férula molecular” para estabilizar el sitio que contiene CPD para asegurar la inserción de los nucleótidos complementarios correctos y luego se separa (Oak et al., 2018; Yadav & Banerjee, 2018).

1.2.2.3. Mecanismo protector de los queratinocitos

Uno de los principales efectos agudos de la RUV es la inducción de inflamación. La luz UVB inicia una cascada de citoquinas y mediadores vasoactivos y neuroactivos en la piel

que resultan en una respuesta inflamatoria causando quemaduras solares. Si esta radiación es excesiva los queratinocitos activan vías apoptóticas y mueren. Esos queratinocitos apoptóticos se identifican por su núcleo picnótico y son conocidos como “*sunburn cells*” (D’Orazio et al., 2013). Cuando se inicia la apoptosis en los queratinocitos con ADN dañado, el citocromo C y otros factores proapoptóticos se liberan de la mitocondria y provocan la formación de apoptosoma mediante la activación de la caspasa-9 que activa secuencialmente las caspasas-3/7. En las quemaduras solares, los queratinocitos inducen apoptosis para prevenir una transformación maligna. Esta muerte celular libera autoantígenos que son detectados por las células de Langerhans desencadenando así una respuesta autoinmune. Los rayos UV inducen la reorganización de los autoantígenos nucleares en la superficie de los queratinocitos (Mohania et al., 2017). Las señales de daño como la activación de p53 alteran la fisiología de los queratinocitos, activando la reparación de ADN e induciendo apoptosis en respuesta a daño excesivo. Sin embargo, varias horas después del daño, las señales de respuesta disminuyen y los queratinocitos epidérmicos proliferan con fuerza (Coelho et al., 2009). El aumento de la división celular conduce a un incremento del grosor epidérmico con la acumulación de queratinocitos. Esta hiperplasia epidérmica protege mejor la piel contra la penetración de los rayos UV (Scott et al., 2012).

1.2.2.4. *Melanogénesis inducida por RUV*

El principal inductor de la melanogénesis es la radiación ultravioleta. En los queratinocitos y las células fotorreceptoras ubicadas en la capa externa de la epidermis, diferentes factores paracrinicos como el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento nervioso (NFG), endotelina (ET)-1 y péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC), como la hormona estimulante de melanocitos (MSH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y β -endorfina, son activados por la RUV, iniciando la principal vía de señalización de la melanogénesis (A. Y. Lee, 2014). Los derivados de POMC, inducidos por la activación de p53 en los queratinocitos, son cruciales para la activación de MC1-R en los melanocitos. Además, la activación mediada por RUV de p38, una proteína de respuesta al estrés, activa el factor de transcripción ***upstream stimulatory factor 1***, que induce la transcripción de tirosinasa (Galibert, 2001).

La melanogénesis puede ser estimulada por la unión de α -MSH a su receptor, MC1-R, promoviendo la síntesis de más eumelanina que feomelanina y aumentando la actividad de la tirosinasa (Hunt et al., 1995). Además, α -MSH induce la proliferación de melanocitos. Múltiples vías de señalización están implicadas en la melanogénesis, concretamente en la regulación del factor de transcripción asociado a la macroftalmia (MITF).

La principal vía de señalización en la pigmentación involucra al MC1-R, que es activado por α -MSH o ACTH. MC1-R aumenta la síntesis de cAMP mediante la activación del adenilato ciclasa. La PKA, activada por cAMP, fosforila CREB, que luego actúa como un factor de transcripción de MITF (Videira et al., 2013). MITF es un factor de transcripción con un dominio hélice-bucle-hélice básico de cremallera de leucina que regula la expresión de enzimas de la melanogénesis (tirosinasa, TYRP1 y TYRP2) y proteínas estructurales del melanosoma (MART-1 y PMEL17) (Ebanks et al., 2009). Estudios previos han informado que los melanocitos con un contenido de melanina más bajo sintetizan tirosinasa (TYR) más lentamente y la degradan más rápidamente que los melanocitos con un contenido de melanina más alto (Halaban et al., 1983).

La señalización dependiente de la PKC regula la melanogénesis mediante la activación de la isoforma PKC β a través del calcio y el diacilglicerol (DAG), su activador endógeno. La RUV induce la formación de DAG en las membranas de los melanocitos, provocando su translocación del citoplasma a la membrana, donde aumenta la PKC β , que luego fosforila y activa la tirosinasa. El receptor para la C-quinasa activada (RACK) controla la translocación de isoformas de PKC a compartimentos celulares específicos. La translocación del complejo PKA/RACK a la membrana del melanosoma conduce a la activación de la tirosinasa en los melanocitos humanos (Bae-Harboe & Park, 2012). Además, la isoforma MITF-M ha sido propuesta como un factor de transcripción clave para PKC β , vinculando la señalización dependiente de PKC y cAMP en la regulación de la melanogénesis (Park et al., 2006).

ETA y ETB son receptores de ET pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G. Los queratinocitos expuestos a la radiación UVB y los melanocitos secretan ET que tienen una alta afinidad por ETA y ETB. La señalización inducida por ET domina la activación de PKC a través de un receptor de ET específico. Este enlace activa la PKC y la

PKA y conduce al aumento de los niveles de AMPc, aumentando así la actividad de la tirosinasa (Imokawa et al., 1996). Además, la endotelina-1 (ET-1), liberada por las células endoteliales microvasculares, aumenta la melanogénesis a través de la fosforilación de MITF y el aumento de los niveles de tirosinasa y dopacromo tautomerasa. La activación de ETB y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) 1/2 y p38 MAP quinasas por la endotelina induce la melanogénesis (Regazzetti et al., 2015). La pigmentación se puede estimular o inhibir a través del receptor ET mediante productos químicos. La β -criptoxantina y la fucoxantina pueden inhibir la melanogénesis a través del receptor ET y otros receptores al reducir la fosforilación de CREB, mientras que la esfingosilfosforilcolina, la vitamina D3 y la kappa-elastina pueden estimular la melanogénesis a través del receptor ET y c-KIT (A.-Y. Lee & Noh, 2013).

La hiperpigmentación es común después de la inflamación, aunque los mecanismos involucrados no están claros. Los factores paracrinos derivados de queratinocitos como la IL-18, la IL-33, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la prostaglandina E2 y la prostaglandina F2 α estimulan la melanogénesis, mientras que el TNF, IL-6 e IL-1 α la pueden inhibir. Los fibroblastos también secretan factores paracrinos que pueden inducir la melanogénesis, como IL-33, prostaglandina E2 y prostaglandina F2 α , pero también inhibidores como TNF e IL-6 (C. Fu et al., 2020).

1.2.3. Fisiopatología provocada por la RUV

1.2.3.1. Fotocarcinogénesis

Tipos de cáncer de piel

Los principales cánceres de piel son el **carcinoma de células basales** (BCC), el **carcinoma de células escamosas** (SCC) y el **melanoma**. Tanto el BCC como el SCC están clasificados como cáncer de piel tipo no melanoma.

El BCC es el cáncer de piel más común en la población ya que 8 de cada 10 cánceres de piel son de este tipo. Su nombre se debe a que comienza en la capa de células basales de la epidermis. Normalmente se desarrolla en zonas expuestas al sol como la cara o el cuello. El SCC es un tipo de cáncer de piel que comienza en las células planas localizadas en la parte superior de la epidermis y, como en el caso del BCC, aparece en zonas expuestas al sol como cara, orejas, brazos, labios y en el dorso manos. A veces puede

empezar como queratosis actínica (AK). El melanoma es el tipo de cáncer de piel más grave pudiendo producir metástasis, aunque es el menos común. Este tipo de cáncer se desarrolla en los melanocitos localizados en la epidermis (cancer.org, 2019).

El cáncer comienza con una lesión precancerosa denominada displasia. Algunos cambios displásicos que ocurren en la piel son queratosis actínica, lunares y nevus displásicos (lunares anormales). Existen otros tipos de cáncer menos comunes como los tumores de células de Merkel y el dermatofibrosarcoma protuberante.

La gran parte de cánceres de piel son de tipo BCC y SCC que, a pesar de ser malignos, no son invasivos y hay poca probabilidad de que se propaguen a otras partes del cuerpo. Por otra parte, los melanomas son menos frecuentes, pero son altamente invasivos con tendencia a extenderse a otras partes del cuerpo (metástasis) (Agarwal, 2018; Yadav & Banerjee, 2018). Las fases en las que transcurren los BCC y los SCC son las etapas de iniciación, promoción y progresión. Los cambios se correlacionan extremadamente bien con la progresión de las características clínicas e histológicas del daño UV a los carcinomas invasivos (Subhadarshani et al., 2020). Por ejemplo, mientras que la exposición intermitente y recreativa a la luz solar en una etapa temprana de la vida es un factor de riesgo para los BCC, el daño solar crónico a largo plazo está más fuertemente asociado con el SCC (Armstrong & Kricger, 2001).

Etapas de la fotocarcinogénesis

1) Etapa de iniciación de la fotocarcinogénesis

Uno de los eventos más importantes en la iniciación de la fotocarcinogénesis son las mutaciones del ADN inducidas por la RUV (J. W. Lee et al., 2020). Las mutaciones de la huella UV C→T o CC→TT conllevan a los fotoproductos CPDs, 6-4PP e isómeros de Dewar. Los CPDs son los más abundantes comprendiendo el 80% de todas las mutaciones de fotoproductos ya que estos se reparan más lentamente que los 6-4PP. Los 6-4PP también pueden fotoisomerizarse a isómeros Dewar que son menos mutagénicos. Las mutaciones de la huella UV eluden las enzimas de reparación del ADN, ya que se asemejan al ADN recién sintetizado, lo que hace que la fase de iniciación sea irreversible (Subhadarshani et al., 2020).

El daño al ADN por parte de UVA es menos significativo que por parte de UVB, sin embargo, su abundancia en la luz solar y su uso con fines terapéuticos o recreativos incrementa su importancia a nivel perjudicial. El daño oxidativo por ROS causado por UVA hace que estas especies reaccionen con la guanina formando productos de oxidación (aductos de 8-hidroxi-deoxyguanosina) que provocan la transversión G→T o T→G. No obstante, estos son menos abundantes que los CPDs, que también pueden crearse por la luz UVA. Cuando el ADN se daña en los queratinocitos se intenta reparar con los mecanismos BER y NER aunque no siempre es totalmente efectivo. Además, la mutación en el gen p53 y la vía *SHH*, son las más relevantes en el proceso de la fotocarcinogénesis (Subhadarshani et al., 2020). Se requieren mutaciones en la vía *SHH* para BCC, pero no contribuyen a los SCC. La proteína p53 es fundamental para dirigir la reparación del daño en el ADN o, si el daño es demasiado grave, para guiar a la célula hacia la apoptosis. Se han identificado mutaciones en el gen p53 en el 50% de los BCC y en el 90% de los SCC (Ashton et al., 2001).

2) Etapa de promoción de la fotocarcinogénesis

Tras la exposición repetida a la RUV, los queratinocitos mutantes que aparecen en la etapa de iniciación de la fotocarcinogénesis tienen una ventaja proliferativa selectiva sobre los queratinocitos normales. En esta etapa de promoción también aparece inflamación. El resultado característico de promoción es la presencia de pequeños focos de queratosis actínicas premalignas. Además, la generación de intermedios reactivos de oxígeno está involucrados en este proceso. Por otra parte, la RUV activa la PKC, concretamente en fotocarcinogénesis a sus isoformas PKC α y PKC ϵ (Cataisson et al., 2003; Wheeler et al., 2004). Las PKC estimulan la respuesta inflamatoria y aumentan la proliferación celular, hecho evidente en los queratinocitos mutantes. En esta etapa aumenta la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa (N. Ahmad et al., 2001) que limita la velocidad en la vía biosintética de las poliaminas que a su vez aumentan la proliferación de los queratinocitos.

3) Etapa de progresión

En la etapa de progresión la RUV produce cambios genéticos y bioquímicos que permiten que las queratosis actínicas premalignas se conviertan en carcinomas de

células escamosas invasivas. Entre las actividades asociadas con la etapa de progresión se encuentran la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) (Tjiu et al., 2009) y la activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (An et al., 2007; Elmets et al., 2014; Tjiu et al., 2006). La EMT es el proceso por el cual las células en AK y carcinoma de queratinocitos premalignos pierden la expresión de E-cadherina, una molécula de superficie necesaria para la adhesión de célula a célula. En consecuencia, hay un aumento de la actividad migratoria e invasiva de queratinocitos mutantes (Bakshi et al., 2020). Por otra parte, las prostaglandinas también contribuyen en la fotocarcinogénesis con diferentes acciones, no solo en la progresión, sino que también en otras etapas. Las prostaglandinas promueven la EMT, aumentan la respuesta inflamatoria, inhiben la inmunidad a los antígenos tumorales y estimulan la angiogénesis (Dannenbergs & Subbaramaiah, 2003).

1.2.3.2. Fotoenvejecimiento

El fotoenvejecimiento se produce por la exposición a rayos UVA y UVB. Como consecuencia, se forman fibras elásticas anormales en la dermis y se produce una disminución de fibras de colágeno. La piel fotoenvejecida muestra una degradación mayor de colágeno y de las fibras elásticas en la dermis que es causada por un aumento en la activación proteolítica y una renovación anormal de la matriz extracelular (ECM). La ECM se compone de una red de moléculas para dar principalmente apoyo a las células. La exposición a la RUV puede afectar negativamente a la ECM ya que conlleva a la fragmentación de largas fibrillas de colágeno en cadenas cortas junto con la acumulación de material que contiene elastina no estructurada que termina en una disminución de la durabilidad de la piel (Fisher et al., 2000). El depósito de fibrillas de colágeno fragmentadas puede resultar en una disminución de la formación de procolágeno tipo I (Varani et al., 2000).

Además, los rayos UV generan ROS que estimulan el proceso inflamatorio en la piel. Este hecho reduce los mecanismos naturales de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de la piel fotoenvejecida y provoca un aumento de la infiltración de neutrófilos en la piel y un aumento de la inflamación (de Jager et al., 2017).

Tal y como se ha comentado anteriormente, los rayos UVA son los principales responsables de la producción de ROS. La luz UVA penetra hasta la capa dérmica profunda induciendo e impulsando el proceso y progresión del fotoenvejecimiento. Una vez que estos rayos penetran en la piel, son absorbidos por los cromóforos celulares que forman parte de moléculas como riboflavinas, melanina y bilirrubina. La absorción de fotones conlleva a la excitación de los cromóforos, lo que se conoce como estado de salida de singlete (Figura 1.7). La molécula energizada luego vuelve a su estado fundamental emitiendo calor o fluorescencia o, en segundo lugar, se da un cruce entre sistemas que conduce a un estado triple excitado. El estado triplete puede reaccionar tanto con el ADN como con el oxígeno molecular, lo que induce cambios en el ADN o producción de ROS. El fotoenvejecimiento puede provocar daño en el ADN, particularmente daño en el ADN mitocondrial (ADNmt). La producción de ROS en el ADNmt aumenta a medida que la RUV provoca una delección del ADNmt de 4.977 pares de bases bien reconocida (de Jager et al., 2017).

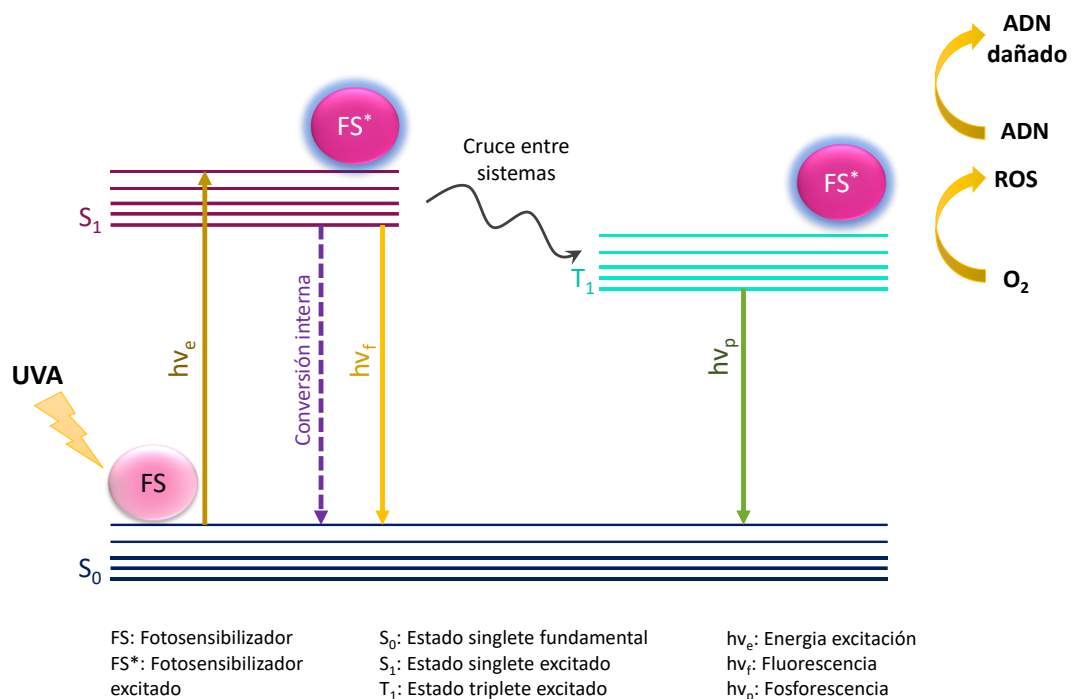


Figura 1.7. Proceso de excitación de un fotosensibilizador causado por la luz UVA. El fotosensibilizador en el estado triplete excitado puede inducir ROS a partir de oxígeno molecular y dañar el ADN.

Las ROS interfieren con el factor de transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1) al aumentar su respuesta, lo que conlleva a una mayor traducción de las metaloproteinasas de matriz (MMP), que son las responsables de la alteración del colágeno. Así, la producción y activación de MMP-9 (gelatinasa) junto con la MMP-2 en los queratinocitos puede digerir el colágeno tipo IV que se encuentra en la membrana basal y el colágeno tipo V y VII junto con la elastina (Pittayapruek et al., 2016). La MMP-1, o colagenasa intersticial, puede digerir el colágeno tipo I, lo que da como resultado la migración celular y la recuperación del daño. Por otra parte, la liberación de MMP-8 de los neutrófilos contribuye a la digestión del colágeno (Fisher et al., 2001). Finalmente, la elastasa de macrófagos humanos o MMP-12 actúa sobre las fibras de elastina. Los productos degradados se acumulan en la capa epidérmica resultando en elastosis solar y queratosis, que son características distintivas del fotoenvejecimiento (J. H. Chung et al., 2001; B. Singh et al., 2019). Además, el factor de transcripción AP-1 también bloquea la síntesis del colágeno en las células dérmicas al retardar el factor de crecimiento transformante β y, por lo tanto, la expresión del procolágeno tipo I y tipo III se regula a la baja (Sklar et al., 2013).

1.2.3.3. Hiperpigmentación

La melanina es un pigmento complejo que proporciona color y fotoprotección a la piel, al cabello y a los ojos de los mamíferos. La melanogénesis, el proceso mediante el cual los melanocitos sintetizan melanina, puede verse alterada, produciendo trastornos de la pigmentación de la piel como el melasma o hiperpigmentación.

La RUV puede causar diferentes tipos de pigmentación. La pigmentación inmediata, inducida por los rayos UVA, es un oscurecimiento transitorio de la piel que se produce por la oxidación de la melanina y la redistribución de los melanosomas a las capas epidérmicas superiores. Esta pigmentación se produce unos minutos después de la exposición, pero desaparece minutos o días después, por lo que no es fotoprotectora. Los rayos UVA también pueden inducir una pigmentación persistente que es más fácil de observar en personas con piel oscura en comparación con personas de piel clara. La pigmentación retardada, principalmente por UVA y UVB, ocurre de 3 a 4 días después de la exposición a la UVR y persiste durante semanas. Es causada por un aumento en los niveles de melanina epidérmica, particularmente eumelanina, que proporciona

fotoprotección contra el daño y las mutaciones del ADN (Maddodi et al., 2012; Miyamura et al., 2011; Videira et al., 2013).

El melasma es un trastorno de la piel que afecta principalmente a la cara y está causado por una hiperpigmentación resultante del aumento de la acumulación de melanina en la epidermis. Puede originarse a través de diferentes mecanismos, que son heterogéneos en diferentes individuos y grupos étnicos (A. Y. Lee, 2014). El melasma es más común en mujeres en edad reproductiva y en mujeres con tipos de piel III-IV de Fitzpatrick, fototipos que corresponden a poblaciones mediterráneas europeas y del norte de África (Rajanala et al., 2019).

1.3. Tratamientos y prevención

1.3.1. Prevención del cáncer de piel

La RUV en la luz solar promueve la formación de cánceres de piel, como el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y el melanoma maligno, además de quemaduras solares (eritema), cataratas, fotoenvejecimiento de la piel y supresión del sistema inmunológico. Debido a la exposición del ser humano a la RUV es necesario una fotoprotección que los filtros solares disponibles en el mercado ofrecen, ya sea en cremas, lociones u otros (Serpone, 2021).

1.3.1.1. Filtros UV

Actualmente, 29 filtros UV están aprobados en la unión europea (Tabla 1.1). Estos filtros están incluidos en el ANEXO VI del reglamento de productos cosméticos (Unión Europea, 2009).

Tabla 1.1. Filtros Ultravioleta autorizados en la Unión Europea según consta en el ANNEXO VI del Reglamento.

Nombre químico	Nombre común del ingrediente recogido en el glosario	Número CAS	Número CE	Concentración máxima en el producto preparado para el uso
Metilsulfato de <i>N,N,N</i>- trimetil-4-[(2-oxo-3 borniliden)-metil]-anilina	Camphor benzalkonium methosulfate	52793-97-2	258-190-8	6 %
Benzoato de 2-hidroxi-, 3,3,5-trimetilciclohexílico/homosalato	Homosalate	118-56-9	204-260-8	10 %
2-Hidroxi-4-metoxi-benzofenona/oxibenzona	Benzophenone-3	131-57-7	205-031-5	6, 2,2 o 0,5% conforme a las especificaciones del reglamento respecto al tipo de producto final
Ácido 2-fenil-5-bencimidazol sulfónico y sus sales de potasio, de sodio y de trietanolamina/ensulizol	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	27503-81-7	248-502-0	8 % (de ácido)
Ácido 3,3'-(1,4-fenilendimetilen) bis[7,7-dimetil- 2-oxobiciclo[2,2,1]hept-1-il-metano] sulfónico y sus sales/ Ecamsul	Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid	92761-26-7, 90457-82-2	410-960-6	10 % (de ácido)
1-(4-<i>tert</i>-Butil-fenil)-3- (4-metoxifenil) propano- 1,3-diona/avobenzona	Butyl nethoxydibenzoylmethane	70356-09-1	274-581-6	5 %
Ácido α-(2-Oxoborn-3- ilideno)-toluen-4-sulfónico y sus sales	Benzylidene camphor sulfonic acid	56039-58-8		6 % (de ácido)
Ester 2-etilhexílico del ácido 2-ciano-3,3-difenilacrílico/octocrileno	Octocrylene	6197-30-4	228-250-8	9 o 10% conforme a las especificaciones del reglamento respecto al tipo de producto final

Polímero de N-((2 y 4)- [(2-oxoborn-3-iliden)metil]bencil)acrilamida	Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	113783-61-2		6 %
Metoxicinamato de octilo/octinoxato	Ethylhexyl methoxycinnamate	5466-77-3	226-775-7	10 %
Etil-4-aminobenzoato etoxilado	PEG-25 PABA	116242-27-4		10 %
Isopentil-4-metoxicinamato/amiloxato	Isoamyl p-methoxycinnamate	71617-10-2	275-702-5	10 %
2,4,6-Trianiilino-p-carbo- 2'-etilhexil-1'oxi)-1,3,5- triazina	Ethylhexyl triazone	88122-99-0	402-070-1	5 %
2-(2H-Benzotriazol-2- il)-4-metil-6-(2-metil-3- (1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)-disiloxani)propilo) fenol	Drometrizole trisiloxane	155633-54-8		15 %
Benzoato Bis(2-etilhexil) bis(4,4'-[[6-[[4- [(1,1-dimetil-etil)amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino/Iscostrizol (USAN)	Diethylhexyl butamido triazone	154702-15-5		10 %
3-(4'-Metilbencilideno)- D,L-1 alcanfor/enzacameno	4-Methylbenzylidene camphor	38102-62-4/ 36861-47-9	-/253-242-6	4 %
Salicilato de 2-etilhexilo/octisalato	Ethylhexyl salicylate	118-60-5	204-263-4	5 %
Benzoato de 4-(dimetilamino)-2-etilhexilo/padimato O (USAN:BAN)	Ethylhexyl dimethyl PABA	21245-02-3	244-289-3	8 %
Ácido 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico y su sal de sodio (Sulisobenzona, Sulisobenzona sódica)	Benzophenone-4, benzophenone-5	4065-45-6/ 6628-37-1	223-772-2/-	5 % (de ácido)

2,2'-Metileno-bis-(6- (2H-benzotriazol-2-il)-4- (1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol/bisoctrizol	Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol	103597-45-1	403-800-1	10 %
2,2'-Metileno-bis-(6- (2H-benzotriazol-2-il)-4- (1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol/bisoctrizol	Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (nano)	103597-45-1	403-800-1	10 %
Sal sódica del ácido 2- 2'-bis-(1,4-fenilen)1H- bencimidazol,4,6-disulfónico/bisdisulizol disódico (USAN)	Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate	180898-37-7	429-750-0	10 % (de ácido)
2,2'-(6-(4-Metoxifenil)- 1,3,5-triazina-2,4- diil)bis(5-((2-etilhexil)oxi)fenol)/Bemotrizino	Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	187393-00-6		10 %
Benzalmalonato de dimeticodietilo	Polysilicone-15	207574-74-1	426-000-4	10 %
Dióxido de titanio	Titanium Dioxide	13463-67-7/ 1317-70-0/ 1317-80-2	236-675-5/ 215-280-1/ 215-282-2	25 %
Dióxido de titanio	Titanium Dioxide (nano)	13463-67-7/ 1317-70-0/ 1317-80-2	236-675-5/ 215-280-1/ 215-282-2	25 %
Hexiléster del ácido 2- [-4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil] benzoico	Diethylamino Hydroxy benzoyl Hexyl Benzoate	302776-68-7	443-860-6	10 %
1,3,5-Triacina, 2,4,6- tris[1,1'-bifenil]-4-il-, también como nanomaterial	Tris-biphenyl triazine Tris-biphenyl triazine (nano)	31274-51-8		10 %
Óxido de zinc	Zinc Oxide	1314-13-2	215-222-5	25 %
Óxido de zinc	Zinc Oxide (nano)	1314-13-2	215-222-5	25 %
3,3'- (1,4-Fenilen) bis(5,6-difenil-1,2,4- triazina)	Phenylene Bis-Diphenyltriazine	55514-22-2	700-823-1	5 %

(2Z)-2-ciano-2-[3-(3-metoxipropilamino)ciclohex-2-en-1-iliden] acetato de 2-etoxietilo	Methoxypropylamino cyclohexenylidene ethoxyethylcyanoacetate	1419401-88-9	700-860-3	3 %
---	--	--------------	-----------	-----

Los filtros solares pueden ser inorgánicos u orgánicos en función de su naturaleza química.

Los filtros inorgánicos presentan varias ventajas como una penetración limitada en la piel, no son sensibilizantes y presentan una elevada protección a la RUV (Antoniou et al., 2008). Generalmente, se combinan con filtros UV orgánicos en las cremas solares para lograr un alto factor de protección solar (SPF) (Diffey, 2017). Por otro lado, en determinadas ocasiones se les denomina bloqueadores físicos o solares, términos erróneos ya que cualquier tópico aplicado a la piel no puede ofrecer una protección completa de la RUV (Diffey, 2017).

Actualmente, el **dióxido de titanio (TiO₂)** y el **óxido de zinc (ZnO)** son los únicos **filtros inorgánicos** permitidos en todo el mundo. Ambos están disponibles también en sus formas micronizada y nanométrica (a veces denominados como nanopartículas) ofreciendo unas propiedades óptimas para la protección solar sin mostrar una opacidad al ser aplicada sobre la piel, lo que resulta poco estético en las formulaciones cosméticas (Diffey, 2017).

El TiO₂ absorbe principalmente los rayos UVB mientras que el ZnO absorbe principalmente los rayos UVA, por lo que la combinación de nanopartículas de ambos proporcionaría una amplia protección frente a los rayos UVB/UVA. Los pigmentos de óxido de metal con tamaño >100 nm tienden a dispersarse mal y reflejan y dispersan la luz en mayor medida que las nanopartículas (<100 nm). Además, las nanopartículas son más fáciles de aplicar y son transparentes sobre la piel, al contrario que las partículas >100 nm que dejan una película blanca visible después de su aplicación (Osmond & McCall, 2010). No obstante, estas nanopartículas pueden ser más biorreactivas y con mayor capacidad de penetrar en la piel y otros tejidos. Además, en medios acuosos absorben RUV y generan radicales libres en la superficie de la partícula. Por esto, las nanopartículas de TiO₂ y ZnO se han relacionado con citotoxicidad y genotoxicidad (Smijs & Pavel, 2011). Hay que considerar también que, debido al tamaño de las partículas, es posible su inhalación y afectación a la salud humana, por lo que se prohíbe su utilización en sprays.

Los filtros **orgánicos** se clasifican comúnmente como filtros UVA o UVB dependiendo de la radiación que absorban. Ejemplos de filtros UV son la oxibenzona, la avobenzona, el octocrileno y el octisalato.

La **oxibenzona** se puede encontrar ampliamente en formulaciones de protección solar y presenta absorción en las regiones UVB y UVA2 (*320-340 nm) (Sabzevari et al., 2021). Aunque esta molécula es fotoestable durante varias horas después de la exposición a la RUV, hay estudios que demuestran que se absorbe en la piel y da lugar a efectos dermatológicos indeseables y trastornos endocrinos (Ambrogi et al., 2013; Karsili et al., 2014; Lodén et al., 2011; Sambandan & Ratner, 2011; Serpone et al., 2002). Además, se ha detectado en leche materna y es un posible producto fotocarcinógeno (Sabzevari et al., 2021).

La **avobenzona** es un filtro UVA1(*340-400 nm) ampliamente conocido. Sin embargo, la avobenzona se fotodegrada en arilglioxales y bencilos que son citotóxicos y con efectos fotosensibles en la piel según ensayos realizados mediante el ensayo del nódulo linfático local. Por otro lado, existen evidencias de que estos arilglioxales pueden ser los responsables de alergias por fotocontacto experimentadas por algunas personas (Karlsson et al., 2009).

El **octocrileno** es un filtro UVA2(*320-340 nm)/UVB. A pesar de tener fotoestabilidad presenta penetración dérmica (Freitas et al., 2015; Potard et al., 2000). Recientemente también se ha detectado en leche materna y es fotosensibilizante incrementando los radicales libres en la piel (Sabzevari et al., 2021).

El **octisalato** también es un filtro UVA2(*320-340 nm)/UVB que muestra fotodegradación y es resistente al agua y soluble en aceite. Sin embargo, en diferentes estudios muestra absorción sistémica (Sabzevari et al., 2021).

1.3.1.2. Inconvenientes de los filtros UV actuales

Medio marino

Aunque los **filtros UV inorgánicos** se recubren generalmente con estabilizadores complejos, se liberan en partículas cuando las cremas solares entran en contacto con el agua. En el agua estos filtros tienden a dispersarse, agregarse, disuelven iones metálicos,

sedimentan, se absorben o se bioacumulan en organismos. Diferentes estudios muestran que los filtros UV inorgánicos interactúan con organismos acuáticos de diferentes maneras (Baker et al., 2014; Paredes et al., 2014). Así, estos filtros o sus agregados pueden absorberse o envolverse alrededor de la superficie del fitoplancton o de los microorganismos y pueden ser ingeridos por organismos. Por otra parte, los organismos marinos que se alimentan por filtración o los que devoran, pueden filtrar o deglutir estos filtros directamente. Además, los organismos de niveles tróficos superiores pueden consumir directamente agua o algas que contengan estos filtros UV inorgánicos, mientras que otros organismos de nivel trófico más bajo acumulan estos filtros a lo largo de la cadena alimentaria (Yuan et al., 2022).

La mayoría de los **filtros UV orgánicos** son lipofílicos lo que les da la capacidad de cruzar las membranas celulares fácilmente y son más propensos a ser biológicamente activos y capaces de alterar procesos fisiológicos (Emnet et al., 2015). Se ha descubierto que muchos filtros UV orgánicos se acumulan en la grasa de muchas especies marinas y de agua dulce, lo que teóricamente los hace capaces de bioacumularse en la cadena alimentaria (Fivenson et al., 2021).

Varios filtros solares, como la oxibenzona, el metoxicinamato de octilo (octinoxato) y el octocrileno, se han considerado amenazas para los arrecifes de coral de todo el mundo. Sin embargo, los efectos nocivos que provocan los filtros solares son menores que otros factores como el aumento de la temperatura del océano, la acidificación y la pérdida de metabolismo del CO₂ del plancton (S. L. Schneider & Lim, 2019a, 2019b).

El blanqueamiento de coral es la pérdida de las algas unicelulares simbióticas esenciales llamadas zooxantelas (*Symbiodinium* spp). Esto resulta en una pérdida de color en los márgenes exteriores y un efecto blanqueador. Los ecosistemas de arrecifes de coral albergan mucha biota marina, por lo que muchas otras especies pueden verse afectadas por episodios repetidos de blanqueamiento que provocan la muerte del coral (Fivenson et al., 2021). Numerosos estudios han demostrado que algunos filtros UV contribuyen y exacerban la decoloración generalizada de los corales en ecosistemas marinos, sobre todo en áreas costeras populares. Además, se sugiere que los filtros UV promueven la propagación de infecciones virales latentes en las zooxantelas las cuales entran en un ciclo lítico y son expulsadas del pólipo del coral. La mortalidad de las zooxantelas induce

un estado de estrés en los corales que puede acabar en su mortalidad. No obstante, la magnitud de la contaminación de los filtros UV no está clara debido a otros factores que afectan a los corales (Fivenson et al., 2021).

Además, los filtros solares UV pueden afectar al crecimiento y fotosíntesis del alga verde; inducir defectos en mejillones en crecimiento; causar alteraciones en el sistema inmune y reproductivo y deformidades en la población juvenil de los erizos de mar; afectar a la fertilidad de los peces; y acumularse en tejidos de delfines transfiriéndolos a la descendencia (Fivenson et al., 2021).

Salud humana y toxicidad

Las personas están expuestas a los filtros UV orgánicos a través de tres vías: exposición dérmica (filtros con elevada capacidad de permeación cutánea lo que conlleva a una distribución sistémica), ingestión (por comida o agua contaminada) e inhalación (Huang et al., 2021).

Algunos filtros orgánicos como por ejemplo la oxibenzona, el amiloxato y el octocrileno causan diversas formas de dermatitis irritativa, así como alergia por contacto o fotoalergia. En 2001 se empezó a sugerir que los filtros UV podían alterar las vías endocrinas, cuestión que generaba una preocupación tanto en la comunidad científica como en la población general. Los estudios realizados *in vivo* en diversas especies incluyendo humanos, así como los estudios *in vitro*, indicaban que muchos filtros UV orgánicos de uso común podían actuar como perturbadores endocrinos. Estos generan dudas y discusión ya que hay una gran variabilidad en las dosis empleadas y la exposición a filtros UV específicos (Carbone et al., 2010; Holbech et al., 2008; Janjua et al., 2004; Klammer et al., 2007; Schlumpf et al., 2004; S. Schneider et al., 2005; Szwarcfarb et al., 2008). Sin embargo, agencias de salud pública, incluida la Comisión de Salud Pública de la Unión europea (UE) y distintas instituciones de Estados Unidos como institutos nacionales de salud (NIH), la Agencia de Protección medioambiental (EPA) y la Administración de Alimentos y medicamentos (FDA) (Fivenson et al., 2021) han concluido que los filtros UV orgánicos actuales no presentan riesgos endocrinológicos para la salud humana a corto o largo plazo. Estos organismos reguladores no han podido abordar de manera efectiva los efectos de los filtros UV a largo plazo en los seres

humanos debido a la exposición sistémica sostenida a los mismos ya que se encuentran en el medio ambiente, por lo que las exposiciones de bajo nivel pueden continuar durante gran parte de la vida del ser humano (Fivenson et al., 2021).

Las nanopartículas, como TiO_2 y ZnO , pueden generar ROS y toxicidad cuando presentan áreas de superficie grandes. Sin embargo, basándonos en los datos disponibles, los filtros inorgánicos tienen pocos efectos en la salud humana. Además, estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demuestran que tanto TiO_2 como ZnO no penetran significativamente a través de la piel. No obstante, la fabricación de los productos cosméticos con estos filtros sí que ofrecen un problema toxicológico debido a su posible inhalación por las personas que los manipulan. Los pulmones no pueden eliminar las nanopartículas pudiendo aumentar la concentración en los alvéolos con su posible incorporación al torrente sanguíneo. Si esto ocurre, existe la posibilidad de daño en los órganos internos (S. L. Schneider & Lim, 2019b).

1.3.2. Prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento

1.3.2.1. Antioxidantes

Se cree que los antioxidantes naturales que se encuentran en las frutas y verduras pueden influenciar en la defensa antioxidante de la piel y brindar protección contra los rayos UV. Algunos nutrientes como las **vitaminas A, C y E**, **algunos ácidos grasos** y otros ingredientes derivados de plantas tienen la capacidad de mantener una piel sana (Tripathi et al., 2019).

La **vitamina C**, también denominada ácido ascórbico, induce la actividad procolágeno, decrece los problemas de pigmentación y las condiciones inflamatorias inducidas por los rayos UVA y UVB (Poljšak & Dahmane, 2012). La vitamina C neutraliza las ROS producidas por la RUV eliminando así radicales libres. Los humanos no sintetizan esta molécula por lo que se necesita una dieta adecuada para ingerirla. Esta molécula es soluble en agua y fotosensible (Antonίου et al., 2010). El nivel de vitamina C en la piel decrece con la edad, especialmente en la epidermis (Leveque et al., 2003, 2004). La mayor desventaja de la vitamina C es su poca penetración después de su uso tópico. Por esta razón, los productos con vitamina C normalmente se suplementan con otros antioxidantes incluyendo la vitamina E (Poon et al., 2015).

El término “**vitamina E**” se refiere al conjunto de 8 sustancias con actividad antioxidante que incluye dos tipos de moléculas: tocoferoles y tocotrienoles. Existen cuatro isómeros del tocoferol y cuatro del tocotrienol disponibles a través de la dieta. Además, existen evidencias que el uso tópico de vitamina E proporciona fotoprotección contra los rayos UV mediante la protección de formación de eritema, peroxidación lipídica, fotoenvejecimiento y fotocarcinogenesis. (Antoniou et al., 2010). Se encuentra en muchos productos de cuidados para la piel debido a sus propiedades de fotoprotección, hidratantes y preservantes (Graf, 2010).

Ciertos compuestos son necesarios para una buena actividad antioxidante en el organismo como por ejemplo el **selenio** y la **niacina**, ambos necesarios para la actividad del GSH.

Algunos productos de alimentación proporcionan ingredientes con propiedades antioxidantes. Un ejemplo es el uso del **té verde** o su extracto, rico en catequinas y polifenoles, y que muestra actividad fotoprotectora ya sea en forma tópica u oral. Los polifenoles tienen actividades antiinflamatorias, anticarcinogénicas y antienvjecimiento (Suman & Suman, 2019).

1.3.2.2. Retinoides tópicos

Entre los productos más utilizados en el tratamiento del fotoenvejecimiento se encuentran los retinoides. Estos compuestos son derivados de la vitamina A y pueden ser naturales y sintéticos (Antoniou et al., 2010). Su uso tópico además de tratar la piel fotoenvejecida, previene el fotoenvejecimiento (Serri & Iorizzo, 2008). Algunos productos tópicos disponibles contienen retinoides como el retinol, el retinaldehído (retinal) y el ácido retinoico (tretinoína) (Antoniou et al., 2010). Estas moléculas promueven la síntesis de colágeno I y III, la reorganización las fibras de colágeno empaquetadas, e incrementan el número de fibrillas de anclaje tipo VII (Rigel et al., 2004; Suman & Suman, 2019).

No obstante, el uso tópico con retinoides conlleva efectos no deseados como dermatitis, incluyendo eritema y descamación (Suman & Suman, 2019).

1.3.2.3. *Cremas solares*

Las cremas solares son un elemento básico en la prevención del fotoenvejecimiento. Gracias a los filtros UV que incorporan, reflejando (filtros UV inorgánicos) o absorbiendo (filtros UV orgánicos) los fotones de los rayos solares, ayudan a la prevención de formación de ROS que son unas de las responsables principales del fotoenvejecimiento.

1.3.3. Tratamientos para la hiperpigmentación y melasma

A pesar de que actualmente existen diferentes tratamientos para la hiperpigmentación o melasma, hay una necesidad por establecer o implementar nuevas terapias para reducir los efectos adversos de estas (Tabla 1.2).

1.3.3.1. *Compuestos fenólicos y no fenólicos*

Los productos que actúan como inhibidores de la tirosinasa son los más utilizados para la hiperpigmentación o melasma.

La **hidroquinona** es uno de los compuestos más reconocidos como inhibidor de la tirosinasa y de los más efectivos, sin embargo, su uso está prohibido en cosmética según la actual legislación debido a su actividad citotóxica y a los efectos secundarios que produce como irritación, eritema, dermatitis alérgica de contacto e irritante y amelanosis (Bandyopadhyay, 2009). No obstante, su empleo sigue siendo frecuente en el campo dermatológico debido a su elevada eficacia. La hidroquinona inhibe la oxidación enzimática de la tirosina a DOPA y suprime otros procesos melanocíticos (Baranska, et al., 2018; Pillaiyar et al., 2017). Además, induce generación de ROS causando daño oxidativo en las membranas de lípidos y proteínas (incluida la tirosinasa) (Jimbow et al., 1974).

La **arbutina**, un compuesto inhibidor natural de la tirosinasa y un derivado de la hidroquinona, se ha utilizado en tratamientos para el melasma en combinación con láseres o ácido elálgico, como en máscaras de hidrogel, todos sin efectos secundarios no deseados demostrando menos toxicidad que la hidroquinona (Ertam et al., 2008; Mazurek & Pierzchała, 2016). La arbutina se une de manera competitiva y reversible a la tirosinasa sin afectar la transcripción del ARNm de la tirosinasa. La desoxiarbutina, un derivado sintético de la arbutina, es un agente aclarador de la piel más seguro y eficaz,

con efectos inhibidores sobre la actividad de la tirosinasa similares a los de la hidroquinona y la arbutina (Grimes, 1995; K. Maeda & Fukuda, 1996; Parvez et al., 2006; Picardo & Carrera, 2007).

El **ácido kójico** es un metabolito fúngico hidrofílico que inhibe la actividad catecolasa de la tirosinasa y tiene actividad antioxidante (Deo et al., 2013; Kucuk, 2018). Su uso es común para el tratamiento del melasma, especialmente en Asia y Japón, a pesar de que en altas concentraciones puede causar dermatitis de contacto irritante (Monteiro et al., 2013).

La **vitamina C** puede quelar los iones de cobre, los cuales son cofactores de la melanogénesis. La vitamina C y sus derivados suprimen la actividad de la tirosinasa por acidificación citoplasmática (Miao et al., 2019). Sin embargo, es menos efectiva que la hidroquinona para reducir la melanogénesis (Espinal-Perez et al., 2004; Jiménez-Cervantes et al., 1994).

La **glabridina** es el componente principal de la fracción hidrofóbica del regaliz y puede potencialmente inhibir la actividad de la tirosinasa (B. Fu et al., 2005). Además, los otros componentes del regaliz, como la liquiritina y la isoliquiritina, pueden dispersar la melanina y eliminar la melanina epidérmica (Amer & Metwalli, 2000). Sin embargo, no hay evidencia clínica de su eficacia en el tratamiento del melasma a pesar de que se venden sin receta varias cremas despigmentantes que contienen extractos de regaliz (Kucuk, 2018).

El **Calebin-A (CBA)** es un análogo curcuminoide natural de la raíz de cúrcuma (*Curcuma longa*). Estudios recientes mostraron que el CBA (20 μ M) suprimía significativamente la melanogénesis estimulada por MSH en células de melanoma de ratón B16F10. El CBA no afectaba ni a la actividad de tirosinasa intracelular, ni a la actividad directa de la enzima tirosinasa ni a la actividad de α -glucosidasa intracelular. El CBA aumentaba la acidificación de los orgánulos celulares e inhibía la maduración de los melanosomas al reducir significativamente el número de melanosomas maduros (Goenka et al., 2019).

Los **retinoides** se dirigen a múltiples vías de señalización en la melanogénesis. Reducen la transcripción de tirosinasa y la síntesis de melanina, lo que provoca una rápida pérdida de pigmento a través de la epidermopoesis (Miao et al., 2019). Los retinoides se usan

en monoterapia o en combinación para tratar el melasma y la hiperpigmentación posinflamatoria (J. v Wang et al., 2019).

1.3.3.2. Otras terapias

La **crema triple combinación (TCT)** contiene un 4% de hidroquinona, un 0,05% de tretinoína (retinoide) y un 0,01% de acetónido de fluocinolona (corticosteroide fluorado) (Banavase Channakeshavaiah & Andanooru Chandrappa, 2020). Las terapias combinadas tienen diferentes efectos secundarios, como eritema, sensación de ardor, sensación de hormigueo e irritación, pero estos efectos secundarios son leves en la mayoría de los pacientes. La CTC puede causar irritación de la piel e hiperpigmentación posinflamatoria dependiendo del color de la piel (Pekmezci, 2019).

Los **peelings químicos** se utilizan para varios trastornos de la piel a pesar de causar irritación e hiperpigmentación post-inflamatoria. El **ácido glicólico** es el más utilizado para los peelings químicos, y el ácido salicílico representa una opción más segura para los fenotipos sensibles y oscuros (Sarkar et al., 2016).

Los recursos y terapias con **láser** y **luz** deben utilizarse en casos resistentes, aunque paradójicamente puede tener efectos adversos como hiperpigmentación, especialmente en fototipos altos. Por lo tanto, se requieren agentes despigmentantes antes y después del tratamiento (Kucuk, 2018; Sadick et al., 2019). En el tratamiento del melasma se utilizan luz pulsada intensa, láser fraccionado y de radiofrecuencia o de pigmento (McKeseey et al., 2020; Shah & Aurangabadkar, 2019).

Tabla 1.2. Tratamientos actuales para la hiperpigmentación o melasma.

Tratamientos actuales		Características	Referencias
Compuestos fenólicos	Hidroquinona	Inhibidor de la tirosinasa	Bandyopadhyay, 2009; Baranska et al., 2018; Jimbow et al., 1974; Mazurek & Pierzchała, 2016; Pillaiyar et al., 2017
	Glabridina	Inhibidor de la tirosinasa	C. Fu et al., 2020
Compuestos no fenólicos	Arbutina	Inhibidor de la tirosinasa	Ertam et al., 2008; Han et al., 2011; K. Maeda & Fukuda, 1996
	Deoxiarbutina		Grimes, 1995; Parvez et al., 2006; Picardo & Carrera, 2007
	Ácido kójico		Deo et al., 2013; Kucuk, 2018; Monteiro et al., 2013
	Ácido azelaico		Mazurek & Pierzchała, 2016; Schallreuter & Wood, 1990
	Vitamina C	Inhibidor de la tirosinasa	Y. K. Choi et al., 2010; Espinal-Perez et al., 2004; B. Fu et al., 2005; Huh et al., 2003; Jiménez-Cervantes et al., 1994; Miao et al., 2019
	Compuestos de regaliz	Dispersión de melanina y eliminación de melanina epidérmica	Amer & Metwalli, 2000; B. Fu et al., 2005; Toossi et al., 2013
	Curcumoides	Supresor de la melanogénesis estimulada por α -MSH e inhibición de la maduración de melanosomas	Goenka et al., 2019
	Retinoides	Múltiples actividades (ej. Reducción de la transcripción de TYR)	Romero et al., 1994; J. v Wang et al., 2019
Crema triple combinación		Múltiples actividades	Banavase Channakeshavaiah & Andanooru Chandrappa, 2020; Pekmezci, 2019
Peeling químico		Eliminación de melanina	Sarkar et al., 2016
Terapias de láser y luz		Eliminación de melanina	McKeseey et al., 2020; Picardo & Carrera, 2007; Sadick et al., 2019; Shah & Aurangabadkar, 2019

1.4.Regulación cosmética en la Unión Europea y métodos *in vitro*

En 2009, el Consejo y Parlamento de la UE adoptaron el reglamento sobre cosméticos de la UE (1223/2009/EU) (Unión Europea, 2009). En el artículo 18 se proporcionaba el marco reglamentario para la eliminación gradual de la experimentación animal con fines cosméticos (Figura 1.8).

Este reglamento establece la prohibición de ensayar en animales productos cosméticos acabados y sus ingredientes, así como la prohibición de comercializar en la Unión Europea productos cosméticos acabados e ingredientes que hayan sido ensayados en animales. De esta manera, se establece que:

- Desde el 11 de septiembre de 2004 se prohíbe probar en animales productos cosméticos acabados.
- Desde el 11 de marzo de 2009 se prohíbe ensayar ingredientes o combinaciones, con excepción de los ensayos de toxicidad de dosis repetidas como la toxicidad subcrónica, toxicidad para la reproducción, sensibilización dérmica...
- En el 11 de marzo de 2013 se termina esta excepción y se prohíbe la comercialización de productos que contengan ingredientes cosméticos ensayados en animales.

No obstante, está permitido el uso de los datos generados de ingredientes que han sido ensayados en animales siguiendo legislaciones distintas de la de cosméticos.

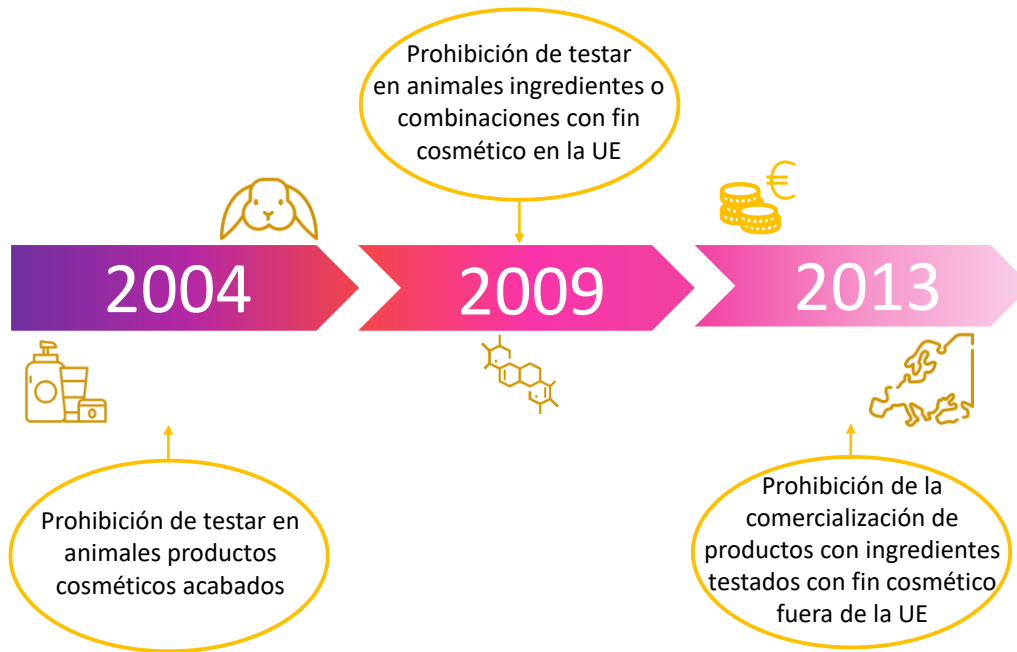


Figura 1.8. Cronología de prohibiciones en cosmética dentro de la Unión Europea.

Actualmente, 41 países han prohibido completamente la experimentación animal con fin cosmético, dónde están incluidos todos los países de la UE aparte de Australia, Colombia, Guatemala, Islandia, India, Israel, México, Nueva Zelanda, Noruega, Corea del Sur, Suiza, Taiwán, Turquía y el Reino Unido. Por otro lado, 154 países no han prohibido completamente su uso, entre ellos China, Rusia, Brasil y Estados Unidos, estos dos con restricciones parciales (Clarkson-Bennett, 2022) (Figura 1.9).



Figura 1.9. Tipos de prohibiciones en cosmética en diferentes países (Clarkson-Bennett, 2022).

1.4.1. Cultivo celular en monocapa

La investigación en cultivo de células en monocapa, además de resultar más económica, proporciona un alto rendimiento y fácil manipulación. Sin embargo, en estudios relacionados con un fin dermatológico, estos cultivos carecen de barrera protectora siendo no viable el ensayo de productos químicos puros. La principal limitación del cultivo celular es que ninguna condición *in vitro* es suficiente para imitar mecanismos complejos en el organismo.

Además, en cultivo celular se tiene que trabajar en unas condiciones específicas para evitar contaminación cruzada y contaminación biológica o química. La contaminación cruzada es la denominación de una línea celular de manera diferente con una definición incorrecta. Esto se debe a etiquetados incorrectos de botellas de cultivo, contaminación de una línea celular con la botella de medio de otra línea celular, etc. La contaminación es uno de los problemas más comunes en cultivo celular. Pueden ser debidas a contaminaciones biológicas (bacteria, hongos, micoplasma, parásitos, virus y contaminaciones cruzadas provenientes de otras líneas celulares) o contaminaciones químicas (contaminantes en agua y medio o residuos de detergente) (Uysal et al., 2018).

Es importante mantener un control sobre la densidad celular, así como el pH del medio para controlar la proliferación de las células en cultivo. Aunque las células sigan

proliferando, al cabo de un cierto tiempo, las células pierden la capacidad de proliferar y sobrevivir debido a cambios fisiológicos y patológicos a través de procesos similares a los que ocurren en los organismos como el envejecimiento celular y la apoptosis. Por tanto, en cultivo celular es importante conocer como determinar la apoptosis y la viabilidad celular (Uysal et al., 2018).

El objetivo de los sistemas de cultivo celular es mantener las células cultivadas y examinadas proporcionando las circunstancias apropiadas en condiciones *in vitro*. Estos sistemas son una herramienta importante en investigación ya que permiten la supervisión de las condiciones en las que se encuentran las células. Así, estos sistemas son de utilidad para campos como los estudios de toxicología, el desarrollo de nuevos medicamentos y métodos de tratamiento. Además, actualmente, en paralelo con las mejoras que se están experimentando en el campo de las células madre y la genética, los sistemas de cultivo celular han llegado a un lugar importante en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Las células empleadas para el sistema de cultivo celular se pueden dividir en líneas celulares primarias o líneas celulares continuas (Uysal et al., 2018).

El cultivo celular primario consiste en la extracción de muestras o biopsias de tejidos u órganos en condiciones asépticas y obtener las células a partir de métodos mecánicos, químicos o de digestión enzimática. A pesar de que las células obtenidas presentan heterogeneidad y una tasa de proliferación baja y las técnicas empleadas presentan dificultades, los cultivos primarios representan la forma más cercana de las células en los tejidos (Uysal et al., 2018).

Con condiciones específicas, se puede lograr la inmortalidad de una línea celular primaria a partir de mutaciones genéticas o modificaciones artificiales consiguiendo la habilidad de proliferar indefinidamente. Estas nuevas líneas se denominan líneas celulares continuas. También se pueden obtener de células cancerosas derivadas de humanos o animales. Estas líneas se dividen rápidamente con un tiempo de generación de 12 a 14 h y tienen el potencial de ser cultivadas indefinidamente. Además, estas líneas celulares muestran aneuploidía o heteroploidía debido a una alteración del número de cromosomas (Verma, 2014).

Las líneas celulares suelen ser clonales, lo que significa que toda la población se originó a partir de una única célula ancestral común. Las líneas celulares continuas proporcionan una serie de ventajas lo que las hace útiles como modelo *in vitro* (Z. Li, 2011).

1. Estas líneas celulares proporcionan una población homogénea de células.
2. Son relativamente fáciles de cultivar y se pueden cultivar continuamente a través de un número aceptable de pasajes para proporcionar un gran número de células en un corto período de tiempo.
3. Los estudios son más económicos.

Sin embargo, la principal desventaja es que sus niveles funcionales son con frecuencia diferentes de los que se encuentran en las células primarias y algunas funciones importantes se pierden debido a la transformación (Z. Li, 2011).

Existen líneas celulares adherentes para poder cultivar en monocapa y líneas celulares para cultivar en suspensión.

Los cultivos se mantienen en incubadores para controlar la temperatura, 37°C para la mayoría de los cultivos, y la humedad para minimizar la evaporación y el contenido de dióxido de carbono (CO₂) de la fase gaseosa (5%). El contenido de CO₂ es importante para estabilizar el pH de los cultivos mediante su interacción con los sistemas de amortiguación basados principalmente en carbonatos dentro del medio de cultivo celular. Los medios de cultivo contienen componentes como glucosa, sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas necesarios para las células. Estos medios de cultivo se complementan con suero fetal bovino que contiene una mezcla de hormonas, factores de crecimiento y factores de unión. Con motivo de reducir o reemplazar el uso de suero fetal bovino por razones éticas, investigadores están cambiando a alternativas como el lisado de plaquetas humanas, que provienen de desecho de concentrado de plaquetas caducado, o medio químicamente definido (Egger & Nebel, 2021).

En los tejidos hay gradientes de oxígeno y nutrientes cuya concentración depende de la distancia a los vasos sanguíneos y la permeabilidad de la ECM. No obstante, en los cultivos en monocapa las células tienen acceso prácticamente ilimitado a los nutrientes, moléculas de señalización y metabolitos disueltos en el medio de cultivo, además de estar expuestos a unos niveles de oxígeno mucho más altos que en cualquier parte del

cuerpo. Esta sobreexposición puede conllevar a la formación de ROS y daño celular. Esto se puede solucionar con la agregación o siembra en una ECM artificial porosa simulando a una esponja o hidrogeles. Estas matrices o andamios pueden estar formados por componentes naturales de la ECM, biomateriales, cerámicas o polímeros sintéticos (Egger & Nebel, 2021). De esta manera, se pueden obtener modelos tridimensionales donde el microambiente natural de la célula es más similar al que tendría *in vivo*.

1.4.2. Cultivo celular con modelos reconstituidos

Tradicionalmente los ensayos con células en monocapa (2D) eran los preferidos para realizar estudios *in vitro*. Sin embargo, cada vez hay más predilección por los modelos tridimensionales (3D) ya que ofrecen ventajas sobre los cultivos en monocapa.

El factor más importante de los modelos en 3D es que las células tienen la capacidad de formar sitios de adhesión en toda su superficie, ya sea con otras células o con el biomaterial semejándose así al microambiente natural de las células en un organismo vivo (Egger & Nebel, 2021) (Figura 1.10). Las propiedades del material utilizado para las matrices o andamios pueden dirigir el movimiento celular. Los pequeños tamaños de poro dentro de una esponja pueden restringir el movimiento celular, pero aun así permitir la difusión de nutrientes y desechos, mientras que los hidrogeles hechos de biomateriales no degradables pueden atrapar las células para la entrega segura y continua de factores secretores (Keshaw et al., 2005). Además, en el caso de cultivo en 3D el oxígeno, los nutrientes, las moléculas de señalización y los productos de desecho están restringidos por tasas de diferencia a diferencia de los cultivos en monocapa. Esto influye en los procesos fisiológicos y patológicos (Egger & Nebel, 2021).

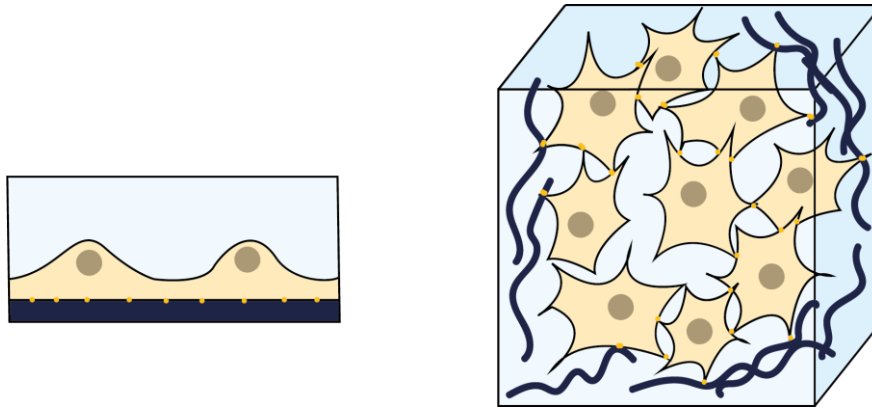


Figura 1.10. Cultivo en monocapa (izquierda) con puntos de unión (amarillo) con la superficie (azul oscuro) y cultivo en 3D (derecha) con puntos de unión con otras células y con la matriz extracelular sintética (azul oscuro).

La matriz más utilizada en cultivo 3D es la de colágeno tipo I debido a su facilidad para procesamiento, bajo coste y la flexibilidad para la manipulación de células vivas. Cambiando la concentración de colágeno se puede controlar el tamaño del poro, la densidad de ligando y la rigidez (Ravi et al., 2015).

A pesar de sus grandes ventajas, el cultivo en 3D presenta inconvenientes respecto al cultivo en monocapa: son más caros, tienen una mayor dificultad de manipulación y el modelo empleado depende del objetivo de estudio.

Modelos de piel reconstituida

Durante años se han utilizado modelos de ratón para realizar estudios de piel. Sin embargo, la piel de ratón tiene diferencias significativas respecto a la piel humana en cuanto a arquitectura celular y fisiología que hace difícil la extrapolación de los estudios en ratón a humanos. En la piel de ratón los melanocitos se encuentran mayormente localizados en los folículos de pelo con propiedades biológicas diferentes de los melanocitos humanos, los cuales se encuentran en la capa basal de la epidermis (L. Li et al., 2011).

Existen diferentes empresas que se dedican a desarrollar modelos reconstituidos, algunos de ellos validados e incorporados en las guías oficiales de la OCDE como por ejemplo la guía 439 de irritación de piel o la 428 para absorción dérmica *in vitro*.

Aparte de motivos éticos, uno de los incentivos para desarrollar modelos 3D ha sido a causa de la prohibición del uso de animales de experimentación para fines cosméticos.

El modelo de piel más simple es el modelo de **epidermis humana reconstituida (RhE)**. Este modelo se constituye sembrando queratinocitos en una membrana porosa donde, después de varios días de cultivo sumergido, el RhE se expone al aire por la zona superior y se mantiene el contacto con el medio de cultivo por la zona inferior. Esto estimula a los queratinocitos basales a diferenciarse y migrar apicalmente para formar una epidermis estratificada con estrato córneo. Este método se estandariza fácilmente por lo que hay varios RhE disponibles comercialmente como por ejemplo los modelos EpiSkin™, EpiDerm™, SKinEthic™RhE y EpiCs® RhE que ya han sido validados para pruebas de irritación y corrosión cutáneas de acuerdo con las directrices de ensayo 439 y 431 de la OCDE, respectivamente (Andres et al., 2017; Cottrez et al., 2015, 2016; Gibbs et al., 2013; Saito et al., 2013).

Los modelos de **piel humana reconstituida (RhS)** presentan dos capas y se construyen sembrando los queratinocitos en una matriz dérmica poblada de fibroblastos, como pueden ser un hidrogel de colágeno, una matriz de colágeno-elastina o dermis de donante (Gibbs et al., 2006; Spiekstra et al., 2005, 2007; van den Broek, 2012). De la misma manera que en RhE, después de varios días de cultivo sumergido, RhS se eleva a la interfaz aire-líquido para que los queratinocitos se diferencien para formar el estrato córneo. En estos modelos la interacción entre fibroblastos y queratinocitos da como resultado la formación de la membrana basal (el Ghalbzouri et al., 2005). Los fibroblastos son necesarios para la secreción de la ECM de la dermis y la localización óptima de los componentes de la unión dermoepidérmica, como el colágeno tipo VII y la laminina V (Marionnet et al., 2006). De esta manera se consigue la interacción queratinocito-fibroblasto donde, por ejemplo, el contacto de los queratinocitos con una sustancia química que estimule la secreción de IL-1 α , desencadenaría en los fibroblastos dérmicos la producción de una cascada de citoquinas y quimioquinas (Rodrigues Neves & Gibbs, 2018).

2.OBJETIVOS

Esta tesis forma parte de un proyecto cuyo objetivo global es la investigación de nuevos ingredientes cosméticos para un uso final en la protección solar, el tratamiento del fotoenvejecimiento o la hiperpigmentación. El valor diferencial del proyecto es la posibilidad de una aplicación real de los ingredientes estudiados sin centrarse solo en la investigación básica. La necesidad de nuevos filtros UV que proporcionen una alta protección y sean respetuosos con el medio ambiente, así como poco tóxicos para la salud, es cada vez más importante en la sociedad actual. Por otra parte, los productos cosméticos se relacionan cada vez más con el cuidado de la piel, dejando a un lado la parte estética y mostrando más importancia en la prevención. Actualmente encontramos en el mercado una gran variedad de filtros UV y productos antioxidantes o despigmentantes, sin embargo, la gran mayoría demuestran tener efectos secundarios para la salud.

Por estos motivos y para minimizar los problemas asociados con este tipo de productos, en esta tesis se plantea como objetivo general estudiar la toxicidad y la fotoprotección de filtros UV encapsulados, así como la actividad antitirosinasa e inhibidora de ROS inducidas por luz UVA de una mezcla de Floretina y Neohesperidina Dihidrochalcona (1:1), mediante métodos *in vitro*.

Los objetivos específicos que se plantean son los siguientes:

1. Estudiar la citotoxicidad del filtro UV "A", así como del filtro UV "B", en una línea continua de queratinocitos humanos (HaCaT). Ambos productos son filtros denominados SMART UV desarrollados por Roka Furadada S. L.
2. Evaluar la posible degradación o liberación del filtro "A" encapsulado.
3. Determinar la capacidad fotoprotectora de diferentes formulaciones de las cápsulas de "A" en modelos de piel reconstituida.
4. Estudiar la citotoxicidad de la mezcla de Floretina y Neohesperidina Dihidrochalcona (1:1) en líneas continuas de fibroblastos (3T3) y melanocitos murinos (B16F0) y queratinocitos humanos (HaCaT).
5. Poner a punto un método para evaluar la capacidad despigmentante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina Dihidrochalcona (1:1) en melanocitos murinos (B16F0).

6. Estudiar la actividad antioxidante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina Dihidrochalcona (1:1) frente a la generación de ROS inducida por la luz UVA en un modelo de queratinocitos humanos (HaCaT).

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Productos químicos estudiados

Filtros Solares Smart UV

El filtro "A" (XXXXXXXXXXXXXXXX) es un compuesto químico fotoactivo perteneciente a la familia de los fenoles benzoatos (Figura 3.1). Su investigación comenzó hace más de 10 años en los Laboratorios Ferrer siendo finalmente desarrollado por Roka Furadada S.L. (ROKA). Se le considera un filtro solar inteligente, también llamado SMART UV, siendo un precursor fotoquímico capaz de absorber la luz UV.

X

Estructura de "A"

X

Estructura de "A" fotoconvertido

Figura 3.1. Estructura química del precursor "A" y del producto fototransformado.

Otro filtro solar Smart UV desarrollado por ROKA es el "B" (XXXXXXXXXXXXXXXX). Este compuesto presenta una estructura muy similar al filtro "A" (Figura 3.2).

X

Estructura de "B"

X

Estructura de "B" fotoconvertido

Figura 3.2. Estructura química del precursor "B" y del producto fototransformado.

Productos con potencial antioxidante y despigmentante

En este proyecto se evaluó la mezcla de dos productos antioxidantes conocidos: la Floretina (NF02) y la Neohesperidina dihidrochalcona (NHDC) proporcionados por XXXXXXXXXXXXX (Figura 3.3).

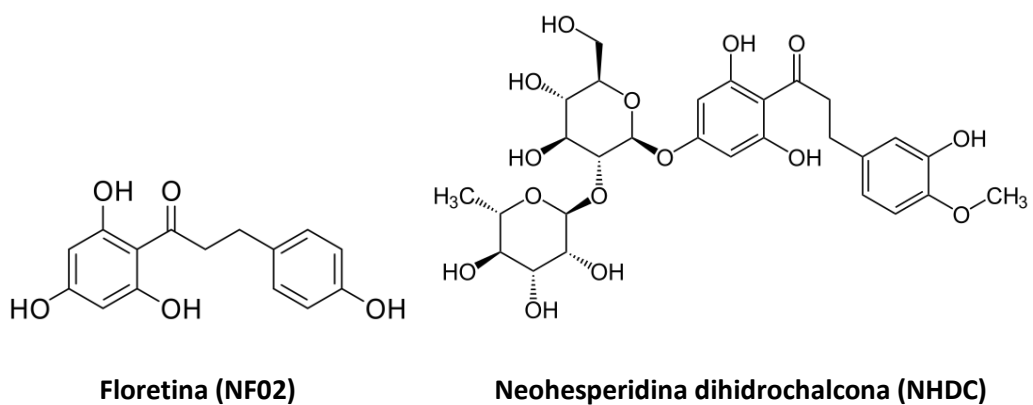


Figura 3.3. Estructura química de los productos Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona.

3.2. Otros productos y reactivos

El ácido clorhídrico 37% (v/v), el hidróxido de sodio, el metanol y el etanol fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España). El xileno y el medio de montaje DPX, mounting medium fast (base tolueno) fueron proporcionados por PanReac Applichem ITW reagents (Barcelona, España). El Tween 20, el paraformaldehído 10 %, el Tritón X-100, la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH), el ácido kójico (KA), la L-DOPA, la N-acetil-L-cisteína (NAC), la sonda 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), 2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide (MTT) y la solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) fueron suministrados por Merck life Science SLU (Barcelona, España). El medio de cultivo GDA3F+ fue suministrado por Episkin™ (Lyon, Francia). El kit de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa y el de cuantificación de interleucina-1 α fueron proporcionados por Tebu-Bio (Barcelona, España). El suero de cabra y los anticuerpos anti-dímero de timina de ratón y anti-ratón de cabra Alexa Fluor® 488 fueron suministrados por Abcam (Cambridge, Reino Unido). La albúmina de suero bovino y el lactato deshidrogenasa de corazón porcino fueron suministrados por Merck life Science SLU (Barcelona, España). El medio de montaje fluoroshield® y el marcador fluorescente DAPI fueron suministrados por VWR (Barcelona, España).

3.3. Cultivo celular: líneas celulares y mantenimiento

Para evaluar la citotoxicidad y otras actividades biológicas de los productos de interés, se utilizaron tres líneas celulares comerciales representativas de la piel. Específicamente fueron los fibroblastos murinos NIH 3T3 (Sigma, EACCAC 93061524), los melanocitos de origen murino B16F0 (ATCC® CRL6475™) y los queratinocitos humanos HaCaT (Eucellbank, Celltec-Universitat de Barcelona).

Condiciones de trabajo

Todos los ensayos se realizaron en condiciones estériles en cabina de flujo laminar. Antes de realizar cada procedimiento, la cabina se limpió con etanol de 70° y se irradió con UV durante al menos 15 minutos antes de introducir el material necesario para cada procedimiento.

Medios de cultivo y otros reactivos

El medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), la L-glutamina (200 mM, Glu), la mezcla penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL penicilina y 10 mg/mL estreptomicina, pen-estrep), la solución amortiguadora de fosatos estéril (PBS), la solución de tripsina-EDTA (70,000 U/L tripsina y 0.2 g/L EDTA) fueron suministrados por la casa comercial Lonza (Verviers, Bélgica). El suero fetal bovino Hyclone (FBS) se adquirió en la casa comercial Thermo Scientific (Northumberland, Reino Unido). El colorante azul de tripano y el dimetilsulfóxido (DMSO) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los frascos de cultivo de 75 cm², las placas de 6, 24 y 96 pocillos fueron suministrados por TPP (Trasadingen, Suiza). El resto de material estéril para cultivo celular fue suministrado por Sudelab (Barcelona, España) y las cámaras de recuento celular Neubauer por Merck life (Madrid, España).

Descongelación

Las alícuotas de líneas celulares son almacenadas a -80°C o en nitrógeno líquido. Para mantener una buena viabilidad, es de vital importancia descongelar las células de la manera correcta. Las muestras disponibles contenían 10 % de DMSO como criopreservante, el cual es tóxico a menos de 4°C, por lo que es esencial descongelar las células rápidamente y diluir la alícuota en medio de cultivo para minimizar los efectos tóxicos.

Procedimiento: La alícuota de la línea celular se descongela rápidamente en un baño de agua a 37°C y a continuación, se diluye en 5 mL de medio de cultivo DMEM (10% FBS, 1% Glu, 1 % pen-estrep) y se centrifuga a una baja velocidad de 300 g (Heraeus, Megafuge 2.0 R) durante 6-8 min a temperatura ambiente. Finalmente, se aspira el sobrenadante, se resuspenden las células y se traspasa la alícuota a un frasco de 75 cm². Las células se incuban en las condiciones apropiadas con 5% de CO₂ a 37°C para su correcto mantenimiento y crecimiento.

Siembra y subcultivo

Cuando las células llegaban al 80% de confluencia, se realizaba un subcultivo para proceder a una resiembra de las células, ya fuera en frascos de 75 cm² o bien en placas

de ensayos. Las líneas celulares utilizadas en el proyecto son células adherentes, las cuales se adhieren mediante fuerzas electrostáticas a la superficie de poliestireno de los frascos o de las placas, ambos tratados específicamente para que esto ocurra. Después de la adhesión, las células crecen y proliferan gracias a los nutrientes aportados por el medio de cultivo y por la temperatura y humedad aportadas en la estufa incubadora de CO₂.

Procedimiento: El medio celular es descartado y las células se lavan con PBS durante 10 segundos (x2). A continuación, se añade el volumen suficiente de la solución que contiene la proteasa tripsina (Tripsina-EDTA) para la disgregación enzimática de la unión de las células con la superficie y de las uniones intercelulares obteniendo así una suspensión de células. Dependiendo de la línea celular, el tiempo de contacto con la tripsina se ajustó de 2 a 6 minutos y nunca se superó los 10 minutos. El ajuste se realizó previamente mediante la observación en el microscopio invertido. Para inactivar la tripsina se añade el triple de volumen de medio completo con una pipeta serológica y se homogeniza bien la suspensión para realizar el recuento de células viables. Finalmente, una alícuota con el volumen apropiado se añade a un frasco con un volumen final de 20 mL para su crecimiento posterior o bien se prepara un volumen final con una densidad celular concreta para proceder a la siembra de placas.

Recuento celular

La cuantificación de las células viables se realizó mediante el método de exclusión con azul de tripano, en el cual las células vivas, con membrana citoplasmática íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen, en cambio penetra en las células muertas que se ven de color azul. Para realizar el recuento se introdujo una alícuota de 10 µL de la suspensión celular en una cámara de Neubauer, previamente diluida (1:10) y teñida con azul de tripano. El recuento de las células vivas se realizó en los cuadrantes indicados en la Figura 3.4 y se calculó la concentración celular a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular } \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Total células contadas}}{\text{Número de cuadrantes}} \times 10000$$

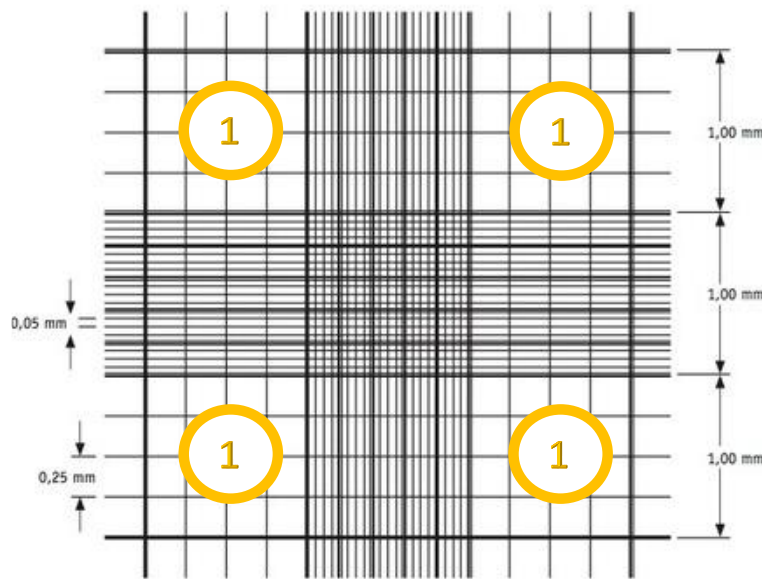


Figura 3.4. Retículo de la cámara Neubauer con los 9 cuadrantes resultantes. Con el número 1 se señalan los cuadrantes utilizados para el recuento celular.

Congelación

La criopreservación es esencial para conservar las líneas celulares durante un largo periodo de tiempo. El objetivo es mantener la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas (-80°C , $-195,8^{\circ}\text{C}$) para así enlentecer las reacciones bioquímicas producidas en las células. Debido a estas bajas temperaturas, el agua intracelular cristaliza pudiendo romper así las membranas. Para evitar estos cristales de hielo y su consecuente deshidratación, se utilizan agentes crioprotectores como el DMSO.

Cuando la confluencia celular llega a un 90% aproximadamente, se pueden obtener alícuotas para congelar. Así, de manera similar al procedimiento de subcultivo, se lavan las células con PBS (x2), y se tripsinizan con tripsina-EDTA. Después de neutralizar la tripsina, la densidad de la suspensión celular se ha de ajustar a unos $1-2 \times 10^6$ células/mL. Para ello se recoge la suspensión celular en un tubo de 15 mL tipo Falcon y se determina la densidad celular inicial. Posteriormente, la suspensión se centrifuga (300 g , 8 min a 25°C), se descarta el medio y el pellet celular resultante se resuspende en un volumen adecuado de DMEM (1% Glu, 1% pen-estrep) y FBS (1:1). Finalmente se añade DMSO lentamente y en agitación constante, de manera que no supere el 10% del volumen

total. La suspensión celular introducida en crioviales, se mantiene durante 3 h a -20°C y finalmente se almacena a -80°C en un ultracongelador o en un tanque de N_2 líquido. En caso de almacenar las células a -80°C , se realiza una reactivación cada 2 meses para preservar su integridad.

3.4. Modelos de piel reconstituida

Los modelos de piel reconstituida son de gran utilidad para reemplazar animales en experimentación, teniendo resultados con más ventajas respecto a los métodos tradicionales *in vitro* de cultivo celular en monocapa.

En esta tesis se ha utilizado el modelo de piel reconstituida T-Skin™ (Full Thickness Skin Model, Episkin, Lyon, Francia). Los tejidos son proporcionados en placas de pocillos de gran tamaño con agar y principalmente se trabaja con ellos en cabinas de flujo laminar, igual que con los cultivos en monocapa, para evitar así cualquier contaminación.

El sistema empleado para este estudio fue un tejido *in vitro* de piel humana reconstituida proporcionada por la casa comercial Episkin™. Este modelo de piel consiste en una capa dérmica con fibroblastos humanos superpuestos por una epidermis estratificada, bien diferenciada y derivada de queratinocitos humanos normales cultivados en un filtro de policarbonato inerte (Figura 3.5). Estos tejidos se pueden adquirir con diferentes estados de madurez (11 o 18 días) siendo el de 18 días elegido por recomendación de la casa comercial para el tipo de ensayo experimental requerido.

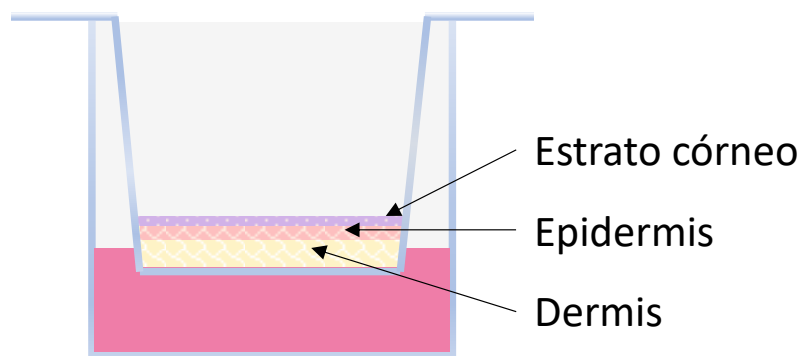


Figura 3.5. Tejido T-skin constituido por estrato córneo estratificado, epidermis y dermis proporcionado en su soporte apto para cultivo celular.

Tras la recepción, los tejidos son extraídos del agar y se traspasan a placas nuevas con medio fresco. Los medios requeridos habitualmente son proporcionados por la propia casa comercial que distribuye los modelos. Al finalizar los tratamientos y condiciones a los cuales están sometidos estos modelos depende del objetivo del estudio, los medios de cultivo pueden ser de objeto para estudios posteriores y los tejidos pueden ser extraídos de sus soportes para su procesamiento posterior. Para extraer los tejidos, estos se recortan por los bordes con la ayuda de un bisturí, previamente desinfectado con etanol, y se incluyen ya sea en parafina o en OCT (Optimal Cutting Temperature) para proceder a realizar el estudio histológico.

3.5. Estudio de la seguridad y capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV libre y encapsulado

3.5.1. Ensayo de citotoxicidad celular del filtro SMART UV libre (“A”)

Introducción

La viabilidad celular se puede ver afectada por los productos de interés dependiendo de la concentración de uso o del tipo de formulación. Los ensayos de citotoxicidad celular pueden determinar si un producto es tóxico para las células a partir de la cuantificación de la viabilidad celular. Para ello, existen diferentes métodos para estudiar la citotoxicidad basados en diferentes variables. Por esto, se realizó el ensayo de citotoxicidad celular en queratinocitos HaCaT para el filtro solar “A” y también para otro producto con potencial de filtro solar desarrollado por ROKA llamado “B”.

En este ensayo de citotoxicidad celular se utilizó el método del MTT. Este ensayo se basa en la reducción de una sal de tetrazolio llamada MTT a formazano a partir, principalmente, de la actividad metabólica de las deshidrogenasas mitocondriales celulares. El MTT es un compuesto soluble en agua de color amarillo y cuando se reduce, se convierte en formazano, un compuesto insoluble en agua y de color violeta. Por consiguiente, la formación de formazano disuelto en DMSO, es proporcional a la viabilidad celular.

Protocolo experimental

Siembra: Se sembraron las células HaCaT a 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos en DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% Glu, 1% pen-estrep. La placa con las células se mantuvo durante 24 h aproximadamente, en condiciones de humedad atmosférica con 5% CO₂ a 37°C, para obtener una monocapa.

Tratamientos: Transcurrido el tiempo de incubación, las células se expusieron a diferentes concentraciones de "A" o de "B". Así, de una solución concentrada de "A" o "B" en DMSO se obtuvo una solución de partida al 0,01% y un 1% DMSO en DMEM al 5% de FBS, 1% Glu, 1% pen-estrep, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:2. De esta forma, se obtuvieron las 10 concentraciones del producto a evaluar. Se incubó de nuevo la placa con las células otras 24 h aproximadamente, en condiciones de humedad atmosférica con 5% CO₂ a 37°C.

Aplicación MTT: Después del tiempo de incubación, se utilizó el método de reducción del MTT (Liu y cols., 2002). Así, se descartó el sobrenadante y las células se expusieron a una solución de MTT al 0,5 mg/mL durante 3 horas. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el formazano formado se disolvió con 100 µL de DMSO. Finalmente, se agitaron las placas durante 5 minutos para terminar de solubilizar y se determinó la absorbancia con un lector de placas (Tecan Sunrise, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de 550 nm.

Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀): Partiendo de las absorbancias obtenidas para cada concentración, se calcula la viabilidad según la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{AM}/\text{AC}) \times 100,$$

donde AM es la absorbancia obtenida para el producto ensayado a diferentes concentraciones y AC es la absorbancia de las células no tratadas o control. Se asume que la viabilidad de las células no tratadas es el 100%.

Finalmente, a partir del mejor ajuste de los datos, se calcularon los índices de citotoxicidad o concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), que es la concentración en el que el producto provocó el 50 % de mortalidad en las células.

3.5.2. Ensayo de citotoxicidad para el filtro SMART UV encapsulado: extractos de las cápsulas

Introducción

Para mejorar la seguridad de “A” así como para mejorar su fotoactivación, se encapsuló este producto mediante diferentes métodos de síntesis llevados a cabo por LEITAT. En esta tesis se estudiaron los escalados R_20 y R_41 de estas cápsulas. Para ello, se realizó un estudio de citotoxicidad de extractos de cápsulas en células HaCaT tomando como referencia la ISO 10993-5:2009 y el protocolo descrito por Garcia y cols. (2013) (Garcia et al., 2013). De esta manera se puede determinar si las capsulas se degradan en productos tóxicos o si liberan “A”.

Estudios previos de las cápsulas R 20

Se realizó la encapsulación de “A” en cápsulas inorgánicas de base sílice. Para la síntesis se utilizaron los siguientes reactivos: ortosilicato de tetraetilo (TEOS) como precursor de sílice en la fase oleosa, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como tensioactivo estabilizante y una mezcla etanol/agua en la fase acuosa. La estructura de las cápsulas era un *core-shell*, donde “A” se encuentra en el interior de estas cápsulas formando el *core* y se rodeó de una carcasa formada principalmente por sílice y una pequeña porción de organosílice proveniente del filtro “A”. El proceso de síntesis, así como las propiedades de las cápsulas están bajo secreto debido a cuestiones de propiedad intelectual. Asimismo, se realizaron estudios de fotoactivación y caracterización de dichas cápsulas.

Protocolo experimental para las cápsulas R 20

Preparación muestras: Se prepararon los extractos en condiciones hidrofílicas y lipófilas. Para ambas condiciones se prepararon 0,2 g/mL de cápsulas en su medio correspondiente tal y como se muestra en la Tabla 3.1. En el caso del medio hidrofílico, las cápsulas se incubaron durante 72 h antes de tratar las células, mientras que en el caso del medio lipófilo solamente 24 h. Además, a efectos comparativos, también se prepararon extractos de cápsulas sin “A” (cápsulas blancas), un control negativo de cápsulas de sílice y un control positivo de “A” (0,01% para la condición hidrofílica y 0,005% para la condición lipófila).

Siembra: Las condiciones de siembra de las células HaCaT fueron las mismas que en el apartado anterior para el filtro libre.

Aplicación extractos: Para obtener los extractos, todas las muestras se filtraron con un filtro con poros 0,2 μm (Sringe Filter, TTP, Trasadingen, Suiza) y las muestras en condiciones hidrofílicas se diluyeron a la mitad en DMEM suplementado con 10% FBS, 1% glutamina y 1% antibiótico con tal de aplicar un medio apropiado para las células (Tabla 3.1). Finalmente, los queratinocitos HaCaT se expusieron a los extractos y se incubaron durante 24 horas en condiciones de humedad atmosférica con 5% de CO_2 y a 37°C.

Tabla 3.1. Condiciones de incubación de las cápsulas y de aplicación a las células de los extractos en condiciones hidrofílicas y lipófilas usadas en el ensayo de citotoxicidad de las cápsulas.

	Condición hidrofílica		Condición lipófila	
	Medio de incubación	Medio de aplicación	Medio de incubación	Medio de aplicación
Medio	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
FBS (%)	-	5%	5%	5%
DMSO (%)	-	-	0,5%	0,5%
Tiempo de incubación (h)	72	24	24	24
Control "A" (%)	0,01	0,005	0,005	0,005

Ensayo del MTT: Para determinar si estos tratamientos afectaban a la viabilidad celular, se empleó el método de reducción de MTT explicado en el apartado 3.5.

3.5.3. Estudio de la capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV encapsulado

3.5.3.1. Espectros UV-VIS

Introducción

Para obtener el espectro UV-VIS del filtro solar "A" se siguió la guía OCDE 101 (1981). Además, también se obtuvieron los espectros otro filtro SMART UV desarrollado por ROKA llamado "B".

Protocolo experimental

Calibración del espectrofotómetro UV-Visible: Para la calibración del instrumento, se empleó una disolución de dicromato de potasio a 0,005 mol/L en H₂SO₄.

Preparación de las muestras: Siguiendo la guía para productos orgánicos OCDE 101 (1981) las soluciones stock de "A" y de "B" fueron preparadas al 0,05 % (v/v) en metanol. Posteriormente, las soluciones se diluyeron a las concentraciones apropiadas para que el pico máximo del espectro de absorción se ajustara a los valores entre 0,5 y 1,5, y se determinó el pico de absorbancia en las tres condiciones de pH: ácido, neutro y básico. Para obtener las soluciones ácidas y básicas, se añadió o bien un 10% de volumen de HCl o bien NaOH 1 mol/L, respectivamente. Además, para cada condición experimental se prepararon los blancos respectivos.

Determinación del espectro UV-VIS: Los espectros se determinaron en un rango de 210 a 700 nm en un Espectrofotómetro UV-VIS, Specord 205, Analytik Jena (Alemania) y, a partir del pico máximo, se calculó el coeficiente de extinción molar a partir de la fórmula de Lambert-Beer:

$$\mathcal{E} = \frac{A}{c \times d}$$

donde \mathcal{E} corresponde al coeficiente de extinción molar, c a la concentración del producto, A a su máxima absorbancia y d a la longitud de trayectoria correspondiente a la cubeta de medida.

3.5.3.2. *Ensayo de fotoprotección con una formulación con cápsulas de "A" incorporadas*

Introducción

La capacidad fotoprotectora de la fórmula solar con cápsulas de "A" R_41 se estudió sobre el modelo de piel reconstituida T-Skin de la compañía Episkin™. Las cápsulas R_41 provienen del primer escalado optimizado de las cápsulas con "A", después de haber comprobado su potencial citotóxico en los ensayos con las R_20 (mismas cápsulas antes del escalado optimizado).

A partir de aquí, la empresa realizó diferentes formulaciones: la CAP-006-002 con las cápsulas de “A” incorporadas y la CAP-006-008 con cápsulas de “A” más una lignina tipo XXXX obtenida de madera blanda llamada XXXXXXXXXXXXXXXX (XXXXXXXXXXXXXXXX, XXXX, XXXXXXXXXXXX), para estudiar un posible efecto sinérgico. La composición de las diferentes fórmulas se describe en el ANEXO 1.

Dado que el filtro “A” tiene una absorbancia máxima de 328 nm tras fototransformarse (cuya λ corresponde a la franja UVA-PF II), se optó por incorporar en el diseño de la fórmula unos filtros con las mismas características, de forma que fuera más sencillo observar la activación y el efecto de “A”. Asimismo, se formuló una crema base con solo los filtros solares comerciales como control positivo de fotoprotección identificada como CAP-006-001.

El estudio de fotoactivación de las formulaciones para obtener los valores de Factor de protección solar (SPF), el factor de protección frente a la luz UVA (UVA-PF) y las absorbancias a una longitud de onda de 328 nm, donde el filtro “A” presenta su pico de máxima absorción una vez ha alcanzado la fototransformación, se llevó a cabo por parte de ROKA. Para ello, se irradiaron las fórmulas solares con una fuente de luz de ancho espectro mediante el simulador solar Atlas Suntest CPS+ (Estados Unidos de América). Se utilizó una potencia de 55 W/cm² (correspondiente a la región UVA/UVB del simulador solar) y diferentes tiempos. Finalmente, se analizó la transmitancia difusa antes y después de irradiar las muestras (Labsphere UV-2000s, Pro-Lite Technology, Reino Unido). Las fórmulas para realizar el cálculo de SPF y UVA-PF son las siguientes:

$$SPF = \frac{\int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} E(\lambda) \cdot S(\lambda) \cdot d(\lambda) \cdot}{\int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} E(\lambda) \cdot S(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot d(\lambda)}$$

$$UVA - PF = \frac{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} P(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot d(\lambda) \cdot}{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} P(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot d(\lambda)}$$

donde S corresponde a la función de eficacia de eritema, E a la irradiación espectral solar y T a la transmitancia espectral del producto bajo prueba. En el caso de UVA-PF, P hace referencia al espectro de acción del método de oscurecimiento de pigmento persistente (PPD), e I a la irradiación espectral de la fuente UVA para pruebas de PPD.

Finalmente, la capacidad fotoprotectora de una fórmula solar con y sin cápsulas de "A" R_41, y de la fórmula con la lignina añadida a la formulación con cápsulas, se estudió sobre el modelo de piel reconstituida T-Skin™ (Episkin, Lyon, Francia) siguiendo el protocolo experimental descrito a continuación (Figura 3.6) para obtener diferentes muestras de tejido o sobrenadantes para el análisis de diferentes biomarcadores.

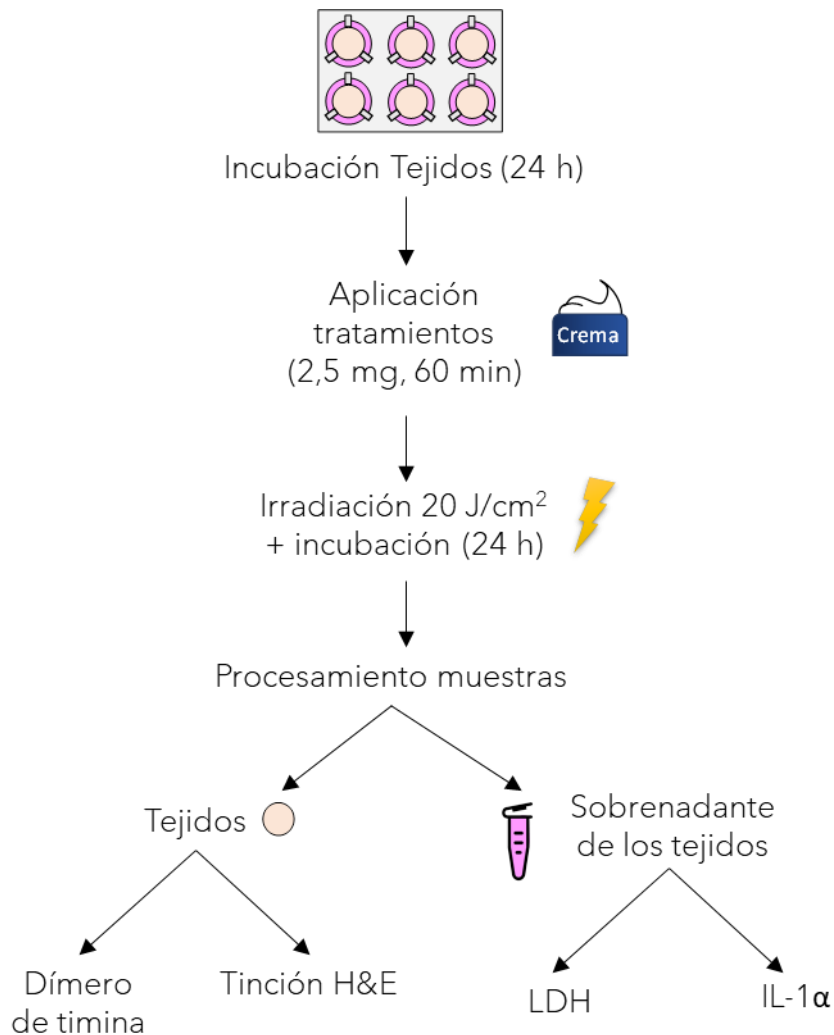


Figura 3.6. Esquema de la metodología experimental seguida para la evaluación de la capacidad fotoprotectora a través de diferentes biomarcadores.

Protocolo experimental

Condiciones experimentales: A continuación, se muestran las diferentes condiciones aplicadas en los tejidos:

Tabla 3.2. Condiciones experimentales del estudio *

Condición	Nombre abreviado	Producto aplicado	Cantidad aplicada (mg)	Dosis irradiada (J/cm ²)
Control	CTR	-	-	-
Cápsulas "A"	CAPS	CAP-006-002	2,5 ± 0,2	-
Control irradiado	CTR+UV	-	-	-
Comercial irradiado	COM+UV	CAP-006-001	2,5 ± 0,2	20
Cápsulas "A" irradiado	CAPS+UV	CAP-006-002	2,5 ± 0,2	
Lignina irradiada	LIG+UV	CAP-006-008	2,5 ± 0,2	

*Se utilizaron 3 réplicas para cada condición

Aplicación de los productos e irradiación (Figura 3.6): Tras la recepción, los tejidos se extrajeron del agar en el que son proporcionados y se incubaron en medio de cultivo GDA3F+ (Episkin, Francia) durante 24 h en humedad atmosférica con 5% de CO₂ y a 37°C. Transcurrido este tiempo, se aplicaron uniformemente las diferentes formulaciones y los tejidos se incubaron durante 60 minutos en condiciones de humedad atmosférica con 5% de CO₂ y a 37°C. Durante este tiempo, se desinfectó el simulador solar (Suntest CPS+, Atlas) con etanol de 70° y se inició el baño refrigerante (Termostato eco RE630, Lauda) conectado al simulador solar, para evitar el aumento de temperatura debido a la radiación.

Después de la aplicación de los tratamientos, se retiró el medio en el cual estaban los tejidos, se hicieron dos lavados con HBSS y se dejaron en esta solución amortiguadora para así evitar posibles interferencias debidas a la absorción de la radiación por parte de los componentes del medio. Las placas con los tejidos se introdujeron en el simulador solar, constituyendo las muestras en condiciones irradiadas (CTR+UV, COM+UV, CAPS+UV y LIG+UV). Se estableció una potencia de 55 W/m² en el espectro de radiación

UVB-UVA durante 60 min para obtener una dosis de irradiación de 20 J/cm² según la siguiente fórmula:

$$\text{Potencia} \left(\frac{W}{m^2} \right) \cdot \text{tiempo}(s) = \text{Dosis} \left(\frac{J}{m^2} \right)$$

La placa con los tejidos con las condiciones CTR y CAPS se recubrió con papel de aluminio para evitar cualquier interferencia de luz y se dejó a temperatura ambiente. Al finalizar la irradiación, todos los tejidos (irradiados y no irradiados) se trasladaron a placas nuevas con medio fresco GDA3F+ y se incubaron durante 24 h en condiciones de humedad atmosférica con 5% de CO₂ y a 37°C.

Recogida de muestras: Cada tejido se extrajo de su soporte con un bisturí, recortando por los bordes, y se dividió en dos porciones. Una de las dos partes de cada tejido se envolvió con papel de filtro, se colocó en un casete de histología, y se fijó en paraformaldehído 4% durante 24 h a 4°C. La otra parte de cada tejido se incluyó en OCT (Cellpath, Newtown, Reino Unido) y se almacenó a -80°C para posibles estudios posteriores. Posteriormente, los tejidos fijados con paraformaldehído 4% se deshidrataron empezando con agua corriente durante 3-6 minutos, después con etanol en graduaciones crecientes (50°, 70°, 96°), seguido de una mezcla de xileno y etanol 96° (1:1) y finalmente se mantuvieron entre 3-6 minutos en xileno. Los tejidos se incluyeron en parafina, se montaron bloques y se realizaron cortes histológicos de un grosor de 3 µm gracias a un micrótopo (LEICA RM 2145, Leica Microsystems, Alemania). Los tejidos se tiñeron posteriormente.

Además de los tejidos (Figura 3.6), se recogieron los medios de cultivo para determinaciones posteriores, específicamente la viabilidad celular y la cuantificación de IL-1α. En este último caso, se recogieron alícuotas del medio que se centrifugaron durante 10 minutos a 9.000 g (Nahita Blue 2624/2, Sudelab S.L), se transfirieron a microtubos y se congelaron a -80°C hasta su posterior determinación.

Viabilidad celular: La viabilidad celular, en este caso, se determinó mediante la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) presente en el medio de cultivo de los tejidos. Esta enzima se encuentra en el citoplasma de las células, y se libera al exterior cuando se produce un daño en la membrana plasmática.

El ensayo se basa en la reducción de una sal soluble en agua de tetrazolio (WST) a formazano a partir de la transferencia de hidrógeno por la nicotinamida adenina dinucleótida reducida (NADH). La NAD⁺ se reduce a NADH por el LDH, el cual cataliza la deshidrogenación de lactato a piruvato (Figura 3.7). De esta manera el formazano formado es proporcional a la viabilidad celular.

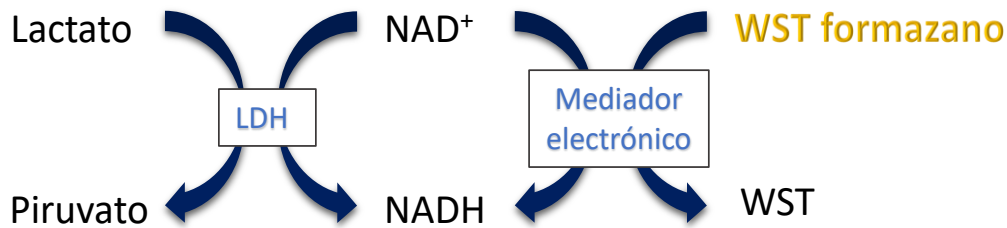


Figura 3.7. Reacción de la conversión de la sal de tetrazolio a formazano.

El medio de cultivo de cada condición del ensayo se diluyó según la Tabla 3.3, para que los valores estuvieran dentro de la recta de calibración, y se cuantificó la cantidad de LDH en cada muestra a partir un kit comercial de Dojindo Molecular Technologies (Rockville, EE. UU.). Así, en una placa de 96 pocillos se mezclaron 100 μ L de solución de trabajo con 100 μ L de medio de cultivo y se incubaron 30 min a temperatura ambiente y protegiéndola de la luz. Se paró la reacción y se procedió a la lectura de la absorbancia a la longitud de onda de 490 nm. La recta de calibración se realizó con LDH de corazón bovino diluido en PBS en un rango de 1.600-50 mU/mL.

Tabla 3.3. Factor de dilución por condición para la cuantificación de LDH.

Condición	CTR	CAPS	CTR+UV	COM+UV	CAPS+UV
Factor de dilución	10	10	200	100	100

Cuantificación de la citoquina proinflamatoria IL-1 α : La interleucina-1 α (IL-1 α) es una citoquina inflamatoria involucrada en procesos de inmunidad innata cuya señalización desregulada provoca enfermedades graves que se manifiestan por una inflamación aguda o crónica. La radiación UV incrementa la producción de esta citoquina, por lo que

se realizó una cuantificación de IL-1 α con la técnica ELISA tipo sándwich (Figura 3.8) con el objetivo de estudiar el posible efecto protector de la formulación con las cápsulas incorporadas frente a una dosis de irradiación solar de 20 J/cm².

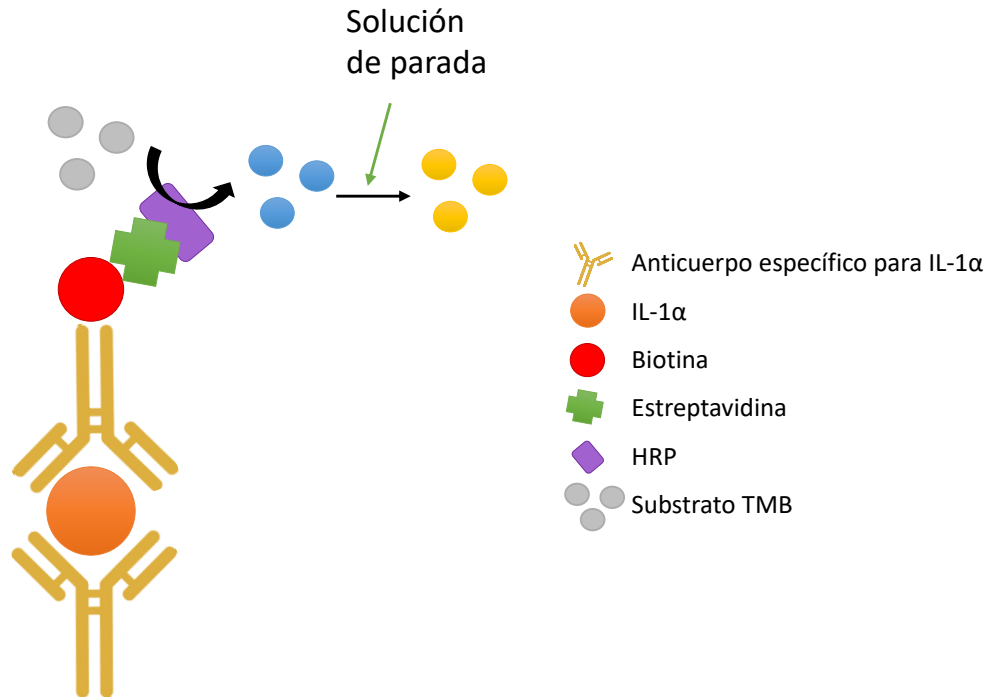


Figura 3.8. Esquema de un ELISA tipo sándwich.

Esta cuantificación se realizó mediante el kit de Abbkine (Wuhan, China), con un límite de detección de 7,8 pg/mL. Las diluciones de las muestras se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Factor de dilución por condición para la cuantificación de IL- α .

Condición	CTR	CAPS	CTR+UV	COM+UV	CAPS+UV
Factor de dilución	1	1	5	5	5

La cuantificación de la interleucina se realizó mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en el lector de placas Victor3 1420 Multilabel Counter Plate Reader (Perkin Elmer, Reino Unido) y la recta de calibración proporcionada por el kit.

Tinción de los tejidos en hematoxilina y eosina (H&E): Se realizó la tinción de hematoxilina y eosina sobre los cortes de tejido con el fin de diferenciar cambios estructurales entre las diferentes condiciones experimentales empleadas. Tal y como se

explica a continuación, los cortes en parafina se trataron para posteriormente teñirlos con Hematoxilina de Mayers y eosina.

Los cortes se desparafinaron manteniéndolos entre 3-6 minutos en xileno, seguido de una mezcla de xileno etanol 96° (1:1) y etanol en graduaciones decrecientes (96°, 70°, 50°), hasta sumergirlos en agua fría corriente. A continuación, se procedió a la tinción comenzando con la inmersión de los tejidos en Hematoxilina Gil II durante 5 minutos, después en agua corriente por 15 minutos, seguido de etanol 70° por 5 minutos, eosina 0,2% en agua por 1,5 minutos y se deshidrataron de la misma manera comentada anteriormente. Finalmente, se montaron los portaobjetos con el medio de montaje DPX, mounting medium fast (base tolueno) (PanReac Applichem ITW reagents, Barcelona España).

Tinción y análisis inmunohistoquímico: Para evaluar el efecto fotoprotector por las diferentes condiciones ensayadas, la formación del dímero de timina inducida por la radiación UV de la luz solar, fue estudiada a partir de una tinción por inmunofluorescencia.

La tinción de inmunofluorescencia se realizó sobre los cortes obtenidos de las pieles fijadas en parafina con dos réplicas por condición experimental. En primer lugar, se desparafinaron las muestras tal y como se ha descrito para la tinción en H&E.

A continuación, se realizó un desenmascaramiento de antígenos con una solución de citrato sódico 10 mM + Tween 20 0,05% a pH 6 al baño maría a 60°C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras se lavaron con TBST (Tris-HCl 10 mM (pH 8) + NaCl 150 mM + Tween 20 0,05%) y se les aplicó una solución bloqueo de 10% de suero de cabra en PBS durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear sitios de unión inespecíficos. Después de la incubación se retiró la solución de bloqueo y se aplicó el anticuerpo primario anti-dímero de Timina a una dilución 1/2.000 en 1% de albúmina de suero bovino (BSA) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda.

Transcurrido este tiempo, se descartó completamente la solución del anticuerpo primario, se realizaron lavados con TBST (x3, 10 min) y se trataron las muestras con una dilución 1/500 del anticuerpo secundario de cabra anti-ratón con el fluoróforo Alexa Fluor® 488 en 1 % de BSA durante 1 h y a temperatura ambiente en la cámara húmeda.

A continuación, se aplicó DAPI a 1 µg/mL en TBST durante 5 minutos para teñir el núcleo de las células. Finalmente, se realizaron tres nuevos lavados de 10 minutos con TBST y se prepararon los portaobjetos con los cubres con un medio de montaje específico para conservar la fluorescencia producida. Se obtuvieron imágenes en el microscopio de fluorescencia Olympus BX41 con aumento x100.

3.6. Estudio de la capacidad antioxidante y despigmentante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona

3.6.1. Ensayo de citotoxicidad celular

Introducción

La viabilidad celular de NF02 y NHDC (1:1) se determinó a partir del ensayo del MTT, tal y como se ha explicado en el apartado 3.5, y con el ensayo de captación del rojo neutro (NRU). Este último ensayo se basa en la capacidad de las células de incorporar el colorante rojo neutro en los lisosomas. De esta manera, el colorante residual en las células es proporcional a la viabilidad celular.

Protocolo experimental

Siembra: La siembra de las células 3T3, HaCaT y B16F0 se realizó a una densidad de 10⁴ células/pocillo tal y como se explica en el apartado 3.5.

Tratamientos: Transcurrido el tiempo de incubación, las células se expusieron a diferentes concentraciones de los productos disueltos en DMEM con 5% de FBS, 1% Glu, 1% pen-estrep. Las concentraciones testadas de la mezcla de NF02 y NHDC (1:1) fueron de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 20, 10 µg/mL con una concentración máxima de DMSO al 0,4%, que se comprobó que no afectaba a la viabilidad celular. Se incubó de nuevo la placa con las células durante 24 h aproximadamente en condiciones de humedad atmosférica con 5% CO₂ a 37°C.

Viabilidad celular: Tras el tiempo de incubación, las células se expusieron a las soluciones de MTT o NRU durante 3 horas a unas concentraciones de 0,5 mg/mL y 0,05 mg/mL respectivamente. Posteriormente, las soluciones fueron descartadas y el formazano producido se disolvió con 100 µL de DMSO y el colorante rojo neutro captado con 100 µL de una solución compuesta de agua, etanol y ácido acético glacial (50:49:1).

Finalmente, se agitaron las placas durante 5 min para terminar de solubilizar el formazano y homogeneizar también el colorante residual y se determinó la absorbancia con un lector de placas (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 550 nm.

Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀): Este cálculo se realizó de la misma manera que está explicado en el apartado 3.5. En el caso del ensayo de captación del colorante rojo neutro, la viabilidad se expresó como el porcentaje de captación de colorante por los lisosomas en las células tratadas respecto a las células control.

3.6.2. Ensayos actividad despigmentante

3.6.2.1. *Ensayo de inhibición de la actividad tirosinasa de champiñón*

Introducción

La posible actividad despigmentante de NF02 y NHDC (1:1) se estudió mediante un ensayo *in chemico* donde se determina la inhibición de la tirosinasa de champiñón. Para confirmar la eficacia del ensayo, se empleó el ácido kójico, un conocido producto despigmentante, como control positivo de inhibición de la enzima tirosinasa. Este método se basa en la conversión del sustrato L-DOPA a DOPA quinona, un producto de coloración amarillada característica, y que forma parte de las reacciones de síntesis. Así pues, la posible actividad de la enzima tirosinasa se ve reflejada en la formación de la DOPA quinona.

En este estudio también se incluyó el estudio de la mezcla de los dos productos (NHDC y NF02), con una relación en base a la concentración 1:1 y 2:3. El caso del estudio de la relación 2:3 es para una comparativa, ya que existe una petición de patente por parte de otra empresa.

Protocolo experimental

Preparación muestras: El ensayo se basó en el protocolo establecido por (Ashooriha et al., 2019) con ligeras modificaciones. El control de ácido kójico así como las mezclas 1:1 y 2:3 de NHDC y NF02 se prepararon a diferentes concentraciones de 2, 1,5, 1, 0,5 y 0,1 mg/mL en DMSO. La tirosinasa de champiñón se preparó a 0,5 mg/mL en PBS 50 mM a un pH de 6,8.

Reacción: Primero se incubaron 40 µl de las diferentes muestras con 10 uL de tirosinasa de champiñón a 0,5 mg/mL y 130 uL de PBS 50 mM a pH 6.8. Después de 20 minutos de incubación, se añadió 20 µL de L-DOPA 10 mM y se incubó 10 minutos a 37°C. Finalmente, se determinó la absorbancia de la reacción producida a una densidad óptica de 475 nm.

Cálculo de la inhibición de la actividad tirosinasa: La actividad inhibitoria se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria tirosinasa (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs } C - \text{Abs } M}{\text{Abs } C} \times 100$$

donde *Abs C* se refiere a la absorbancia del control sin producto y *Abs M* a la absorbancia de la reacción con los productos de estudio.

3.6.2.2. *Ensayo de inhibición de la actividad tirosinasa y producción de melanina en melanocitos de ratón*

Introducción

Con el objetivo de estudiar el efecto despigmentante de un producto, se puede evaluar esta actividad mediante la inhibición de la actividad de la enzima tirosinasa, así como la reducción de producción de melanina en melanocitos. Con el objetivo de tener un modelo celular consistente y reproducible, en este proyecto se empezó a optimizar los ensayos descritos con células B16F0, melanocitos de melanoma de ratón con la propiedad de sintetizar melanina.

Protocolo experimental

Se probaron diferentes protocolos para establecer el método final de estudio, tal y como se muestra en la Tabla 3.5 y la Tabla 3.6. La base del protocolo consistió en la siembra de las células en placas de 6 pocillos, aplicar el tratamiento de los productos juntamente con α -MSH, dejar un tiempo de incubación determinado para la producción de melanina y finalmente, la cuantificación de la inhibición de la enzima tirosinasa o de la producción de melanina. El ácido kójico también fue utilizado como control positivo de inhibición de la actividad tirosinasa y de la reducción de producción de melanina.

Cuantificación actividad tirosinasa: Al acabar el periodo de incubación con los productos, las células se recogieron y se lisaron con una solución tampón de Tritón X-100 al 0,05% en PBS 50mM pH 6,8 seguido de una incubación de 15 min a -80°C. El lisado se centrifugó a 1.200 *g*, 15 min a 4°C (Heraeus Fresco 21, Thermo scientific) y se cuantificó la proteína de las muestras a partir del método de Bradford (Bradford, 1976), mediante una recta de calibración con albúmina de suero bovino de 37,5 a 750 µg/mL. Así, se mezclaron 50 µL de muestra (o de la recta patrón) con 50 µL de ácido fórmico y 1,5 mL de colorante Biorad y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para posteriormente determinar la absorbancia a 595 nm. Finalmente, una alícuota del lisado se incubó con L-DOPA en PBS 48 mM pH 7,1 durante un tiempo determinado a 37°C, para que se produjera la conversión de L-DOPA a DOPA quinona por la acción de la tirosinasa y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 475 nm.

Cuantificación melanina: Tras el periodo de incubación, se tripsinizaron las células con 0,3 mL de tripsina-EDTA durante 6 min, se neutralizó con 0,9 ml de medio y se realizó un recuento de las células viables con el colorante azul de tripano. Se obtuvo el pellet celular tras una centrifugación a 300 *g*, 6 minutos a 25°C (Nahita Blue 2624/2, Sudelab S.L) el cual se trató con una solución de hidróxido de sodio 1 M a más de 80°C en un baño de agua con el objetivo de solubilizar la melanina.

Tabla 3.5. Condiciones experimentales para el ensayo de evaluación actividad tirosinasa en melanocitos B16F0*.

Densidad celular	α -MSH (nM)	KA ($\mu\text{g/mL}$)	P ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo (h)	V (μL)	L-Dopa (mM)
2×10^5 ; 1×10^5	100	100, 70, 50	-	24	90	1,5
2×10^5	50; 100	100, 70	-	24	90; 45	1,5; 0,75
2×10^5	50	150, 125	100, 70	24	90	0,75
2×10^5	50	-	50, 35, 20	24	90	0,75
$1,7 \times 10^5$	50	100, 50	35, 20, 10	48	90	0,75
1×10^5	50	100, 50	35, 20, 10	72	90	0,75
$1,7 \times 10^5$; 1×10^5	50	100, 50	35, 20, 10	48	Diferentes condiciones	
1×10^5	50	100, 50	35, 20, 10	48	90	0,75
1×10^5	50	Curva calibración		48	Curva calibración	

*El volumen final se ajustó a 100 μL . Densidad celular: células/ml en cada pocillo; P: producto en estudio; V: Volumen del lisado celular

Tabla 3.6. Condiciones experimentales para el ensayo de determinación de producción de melanina en melanocitos B16F0.

Densidad celular	α -MSH (nM)	KA ($\mu\text{g/mL}$)	P ($\mu\text{g/mL}$)	NaOH 1 M (μL)
1×10^5	50	100, 35	NHDC NF02 (1:1) = 35, 30, 25 NHDC = 17,5 NF02 = 17,5	100
5×10^4	50	100, 35	NHDC NF02 (1:1) = 35, 30, 25 NHDC = 17,5 NF02 = 17,5	100
1×10^5	50	100, 30	NHDC NF02 (1:1) (2:3) = 30 NHDC = 15 NF02 = 15	100
1×10^5	50	100, 25	NHDC NF02 (1:1) (2:3) = 25 NHDC = 12,5 NF02 = 12,5	250 (20 % DMSO)

Densidad celular: células/ml en cada pocillo; P: producto en estudio.

En todas las condiciones el tiempo de incubación fue 72 h.

3.6.3. Ensayos de inhibición de la producción de ROS inducida por radiación UVA

3.6.3.1. Espectros UV-VIS

Los espectros UV-VIS de la NF02 y de la NHDC se obtuvieron de la misma manera que está descrita en el apartado 3.5.3.1.

3.6.3.2. Ensayo de la inhibición de ROS

Introducción

La radiación UVA, que comprende entre 320-400 nm del espectro UV, es la principal forma de irradiación UV en la luz natural solar. La luz UVA es un fuerte agente oxidante que puede dañar componentes celulares a partir de la liberación de ROS (Narayanapillai et al., 2012).

Los productos NHDC y NF02 son conocidos antioxidantes de origen natural, y en el siguiente estudio el objetivo era evaluar si era posible una actividad antioxidante sinérgica entre ambos o si podían tener una actividad mayor que un antioxidante conocido, en este caso la N-acetil-L-cisteína (NAC), la cual fue utilizada como control positivo de inhibición de ROS inducido por la irradiación UVA.

Protocolo experimental

Siembra: Las células epiteliales HaCaT se sembraron a una densidad de 8×10^4 células/pocillo en una placa de 24 pocillos con DMEM 10% FBS, 1% Glu y 1% pen-estrep. y una posterior incubación de 24 h con 5% de CO₂ a 37°C.

Tratamientos: Tras 24 h de incubación, las células se trataron durante 24 h con los siguientes productos: NAC 5 mM, NHDC y NF02 (1:1) 20 µg/ml, NHDC 10 µg/ml y NF02 10 µg/ml con DMEM 5% FBS, 1% Glu y 1% pen-estrep en condiciones de humedad atmosférica con 5% de CO₂ a 37°C.

Internalización sonda e irradiación UVA: Las células HaCaT se trataron con una solución de DCF-DA 10 mM en PBS durante 40 minutos en condiciones de humedad atmosférica con 5% de CO₂ a 37°C para su permeabilización a través de la membrana celular hacia el citoplasma. Una vez internalizada, la sonda se desacetila a 2',7'-Diclorofluoresceína (DCF) por la acción de las esterasas intracelulares. Pasado el tiempo de incubación, el

exceso de sonda se descartó y se lavaron las células con PBS (x2). Se aplicó 0,5 mL de PBS a todos los pocillos y se realizó una lectura de fluorescencia a unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 480 y 530 nm respectivamente para conocer la señal basal de la sonda. Seguidamente, se descartó el PBS y se aplicó de nuevo los tratamientos disueltos en PBS a las células, se irradiaron a una dosis de 10 J/cm² con UVA y se volvió hacer una lectura inmediata de la fluorescencia.

Cuantificación proteínas: Para poder normalizar los resultados de fluorescencia, se cuantificó la cantidad de proteína resultante de cada pocillo con el método de Bradford adaptado para placa de 96 pocillos. Para ello, 250 µl de solución de lisis fueron aplicados a cada pocillo con una posterior congelación a -80°C de 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 1.200 g durante 15 minutos a 4°C (Nahita Blue, high speed centrifuge) y 10 µl del sobrenadante fueron mezclados con 10 µl de ácido fórmico y 200 µl de reactivo Biorad con una lectura final de absorbancia a 595 nm después de un periodo de incubación de 10 minutos. Se realizó una recta de calibración con BSA de 37,5-750 µg/mL.

Cálculo de fluorescencia: Los resultados se expresaron conforme a la fluorescencia relativa producida entre la cantidad de proteína.

$$\begin{aligned} & \text{Fluorescencia relativa (\%)} \\ & = \frac{\text{Valor fluorescencia muestra} - \text{Valor fluorescencia control}}{\text{Valor fluorescencia control}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\text{Fluorescencia (U.A.)} = \frac{\text{Fluorescencia relativa (\%)}}{\text{Concentración proteína } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

3.7. Análisis estadísticos

Los resultados de los diferentes ensayos se expresan como el promedio y el error estándar (SEM). Los datos se han comparado utilizando el análisis ANOVA de uno o dos factores seguidos de diferentes análisis *post hoc* para comparación entre grupos, tal y como se indicará específicamente para cada caso. Se han considerado la existencia de diferencias estadísticamente significativas a un valor de p<0,05, aunque en algunos casos también se ha indicado el valor de p<0,01; p<0,005 y p<0,0001. Todos los análisis se han realizado con el software GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, Inc., California, EE. UU.).

4.RESULTADOS

4.1. Estudio de la seguridad y capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV libre y encapsulado

4.1.1. Ensayo de citotoxicidad celular de los productos SMART UV

La citotoxicidad de los filtros UV "A" y "B" se evaluaron sobre la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Debido a su baja solubilidad en medio acuoso, los productos se vehiculizaron en DMSO diluyendo posteriormente hasta obtener una concentración máxima del 0,01 % de cada uno de los filtros y del 1% una máxima de DMSO. Todas las diluciones obtenidas se aplicaron a los queratinocitos durante 24h y finalmente se determinó la citotoxicidad del producto mediante el método del MTT. Los resultados de la citotoxicidad provocada por las diferentes concentraciones de "A" y "B" en las células HaCaT se muestran en la Figura 4.1.

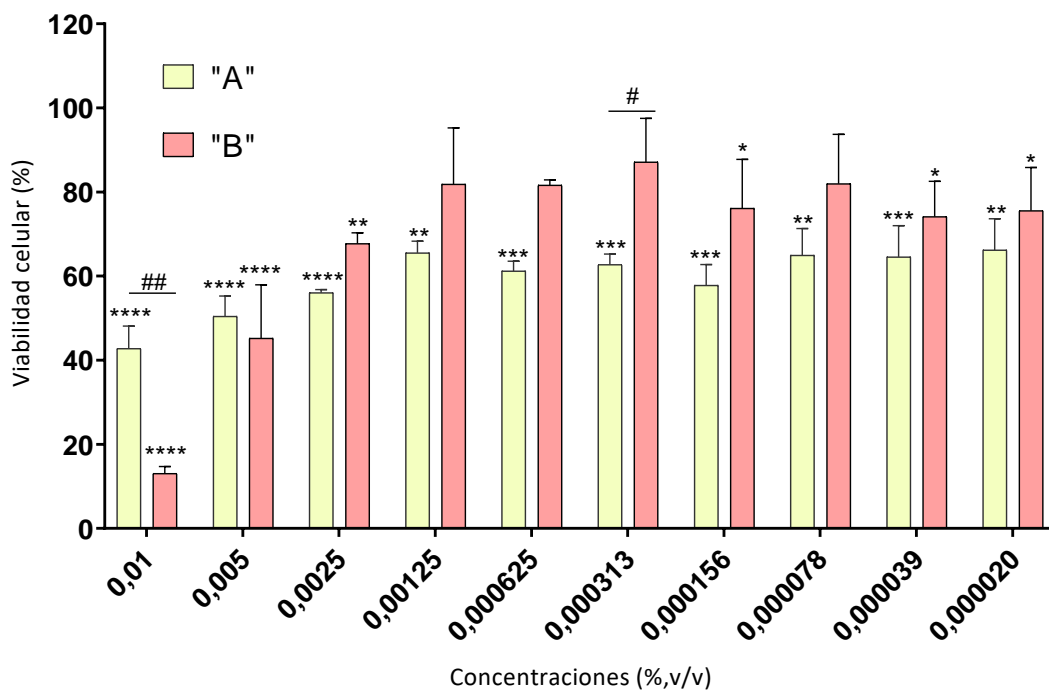


Figura 4.1. Actividad citotóxica de "A" y "B" en células HaCaT obtenida mediante el ensayo de MTT y representada como el porcentaje de viabilidad celular respecto las células no tratadas. Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar (N= 3 ensayos independientes, con 3 réplicas). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de dos factores seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p<0,005 y ****p<0,0001 denotan diferencias significativas con el control negativo de citotoxicidad. #p<0,05 y ##p<0,01 denotan diferencias significativas entre los filtros.

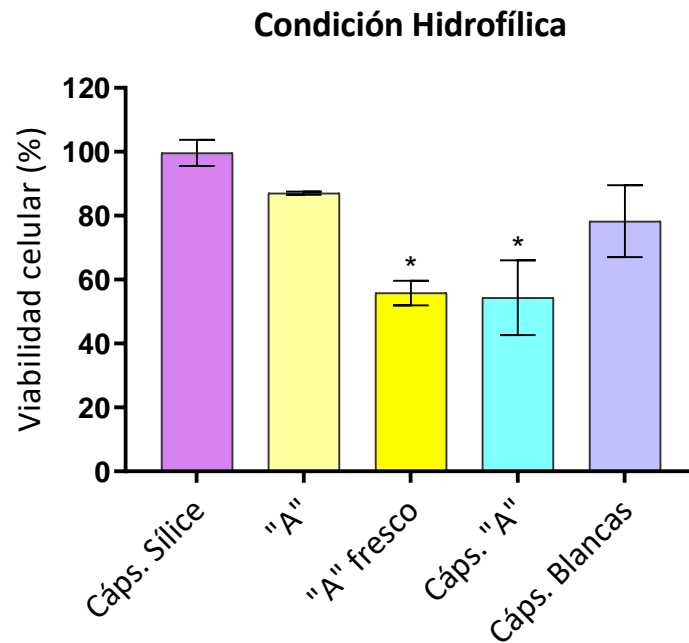
Todas las concentraciones testadas de "A" resultaron ser citotóxicas para los queratinocitos (viabilidad celular < 80%), siendo más notable en las dos concentraciones más altas de 0,01 % y 0,005 % (v/v). Por su parte, las concentraciones más bajas de "B" a partir de 0,00125 % presentaron poca citotoxicidad celular (viabilidad celular > 80%). En cambio, las concentraciones más altas de "B" presentaron más citotoxicidad que "A". Las CI_{50} calculadas a partir del mejor ajuste de los datos (función exponencial) fueron de 0,006% (v/v) para el filtro "A" y de 0,003 % (v/v) para el filtro "B".

4.1.2. Resultados de citotoxicidad de los extractos de las cápsulas con "A" R_20

En el ensayo de citotoxicidad de los extractos de las cápsulas, éstas se sometieron a una incubación en dos condiciones de polaridad diferentes con el fin de conocer o bien una posible degradación de compuestos citotóxicos, o bien una liberación del filtro solar. Después de la obtención y del procesamiento de los extractos, las células se expusieron a estos durante 24h y finalmente se evaluó la viabilidad celular mediante el MTT. Los dos tipos de extractos no son comparativos, ya que para el hidrófilo se realizó una dilución 1:2 antes de ser aplicados sobre las células para introducir FBS en el medio de cultivo. En la Figura 4.2 se muestran los resultados de citotoxicidad tanto para las condiciones hidrofílicas como para las lipófilas.

Las cápsulas blancas muestran una clara citotoxicidad en condiciones lipófilas (52 ± 15), lo que indica una toxicidad inherente de las cápsulas debido a algún componente con carácter apolar. En cuanto a las cápsulas de "A" R_20, se observa que los extractos son citotóxicos en ambos medios, lipófilo (22 ± 4) e hidrofílico (54 ± 12). No obstante, la toxicidad es mayor en el caso de los extractos de las cápsulas de "A" R_20 incubadas en la condición lipófila debido, probablemente, a la liberación de "A" al exterior de las cápsulas. Los controles de "A" incubados en ambas condiciones no muestran citotoxicidad aparente en los queratinocitos (viabilidad celular > 80%), a diferencia del filtro "A" aplicado sin una incubación previa, sugiriendo algún posible cambio fisicoquímico del producto durante la incubación.

A



B

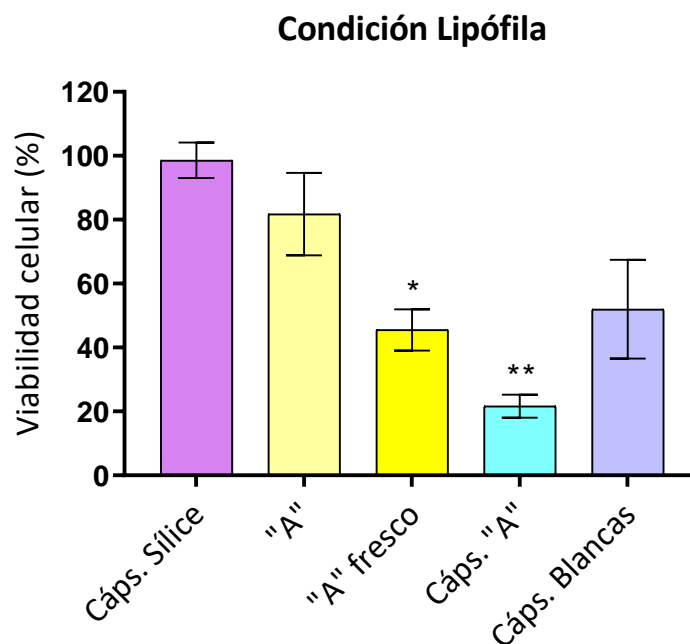


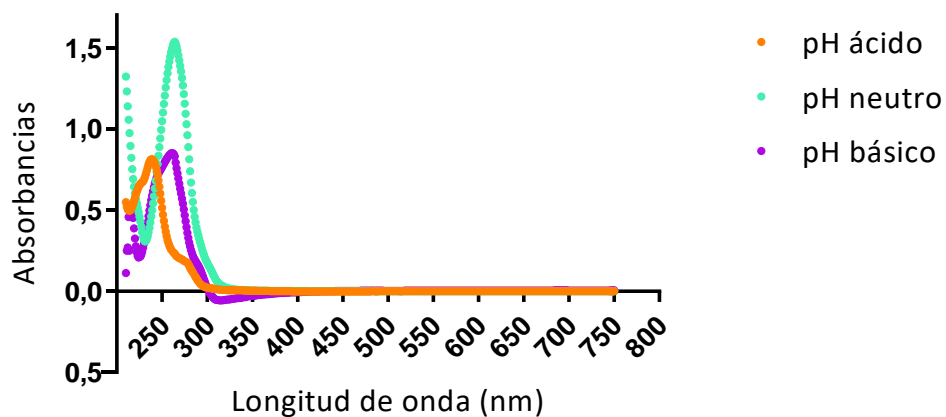
Figura 4.2. Citotoxicidad provocada por los extractos de las cápsulas de "A" R₂₀ y las cápsulas blancas en condiciones hidrofílicas (A) y lipófilas (B). Se representa el promedio \pm el error estándar (N=2 ensayos independientes, con 4 réplicas cada uno). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ denotan diferencias significativas con la condición con cápsulas de sílice.

4.1.3. Resultados del estudio de la capacidad fotoprotectora del filtro SMART UV encapsulado

4.1.3.1. Espectros UV-Visible

En la Figura 4.3 se muestran los espectros UV-Visible de los filtros solares “A” y “B” que se obtuvieron a pH ácido, neutro y básico con metanol como solvente según indica la guía OCDE 101 (1981). Tal y como se observa, los productos presentan el pico de máxima absorción en la región UVC (200-280 nm) en las tres condiciones ensayadas. Por otro lado, se observa una mayor absorbancia en los espectros UV-VIS de “A” y de “B” en condición de pH neutro, lo que indica estabilidad en este pH y una degradación del producto en condiciones ácidas y básicas.

A



B

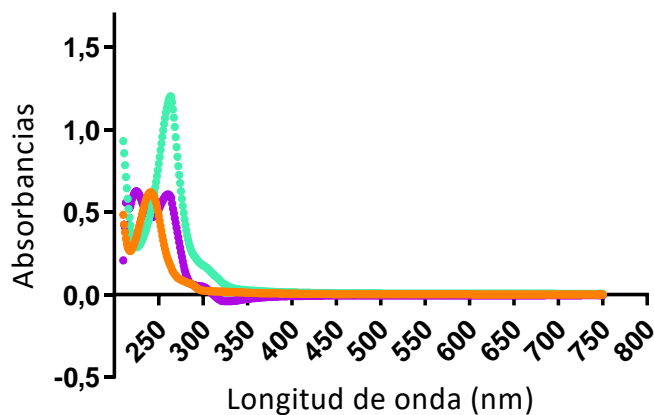


Figura 4.3. Espectros de absorción en las regiones UV y visible de “A” (A) y de “B” (B) en diferentes condiciones de pH.

Los coeficientes de extinción molar de “A” y de “B” se calcularon a partir de la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon dC$). En la Tabla 4.1 se muestran los valores calculados a partir del pico máximo de absorción obtenido, mostrando un mayor valor en el espectro UV-Visible en la condición de pH neutro.

Tabla 4.1. Coeficientes de extinción molar (ϵ) de “A” y de “B”.

Producto	pH	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)*	Máxima absorción**	ϵ (L/mol-cm)**
“A”	Ácido	239	0,812 \pm 0,002	16.967.015 \pm 34.251
	Neutro	264	1,540 \pm 0,010	32.077.968 \pm 221.500
	Básico	261	0,851 \pm 0,009	17.769.912 \pm 135.909
“B”	Ácido	240	0,619 \pm 0,007	17.615.579 \pm 192.727
	Neutro	263	1,202 \pm 0,001	341.629.608 \pm 20.212
	Básico	225	0,627 \pm 0,013	17.832.743 \pm 365.511

*Longitud de onda a la que se presenta la máxima absorción. **Los valores se muestran como el promedio \pm el error estándar (N = 2 réplicas).

4.1.3.2. Resultados del ensayo de fotoprotección con la formulación con las cápsulas R_41 incorporadas

4.1.3.2.1. Resultados de fotoactivación de las fórmulas solares

La proporción de la dispersión acuosa de las cápsulas añadida a la formulación fue de un 40% (p/p), equivalente a un 4,8% (p/p) de cápsulas de “A”. En un estudio externo encargado por ROKA, se estimó un 40% de contenido de “A” en estas cápsulas. Sin embargo, el error asociado al estudio fue bastante grande. Además, al no disponer de cantidad suficiente de cápsulas para volver a elaborar una nueva fórmula e incorporar lignina sobre esta, se decidió incorporar la lignina directamente sobre la crema ya formulada con cápsulas de “A”. Se añadió un 3% de lignina resultando una mezcla final al 103% (por encima del 100%).

Los valores de SPF, UVA-PF y la absorbancia a 328 nm se obtuvieron, por parte de la empresa, a partir de los datos de absorbancia o transmitancia de las fórmulas solares CAP-006-001 y CAP-006-002 por el software del equipo Labsphere UV-2000s.

En la gráfica de absorbancia respecto al tiempo, mostrada en la Figura 4.4, se observa una ligera fotoactivación de las cápsulas dentro de la fórmula solar (CAP-006-002) a los 15 minutos, que se mantiene hasta los 30 minutos y que no presenta en la fórmula

control (CAP-006-001). Pasado este tiempo, los valores de absorbancia, SPF y UVA-PF de CAP-006-002 empiezan a disminuir lentamente, observándose una diferencia entre el valor máximo y el mínimo del 14,5% en UVA-PF y del 13,4% en los valores de absorbancia. El valor máximo de SPF fue de 30 y de UVA-PF de aproximadamente 7 (Figura 4.5).

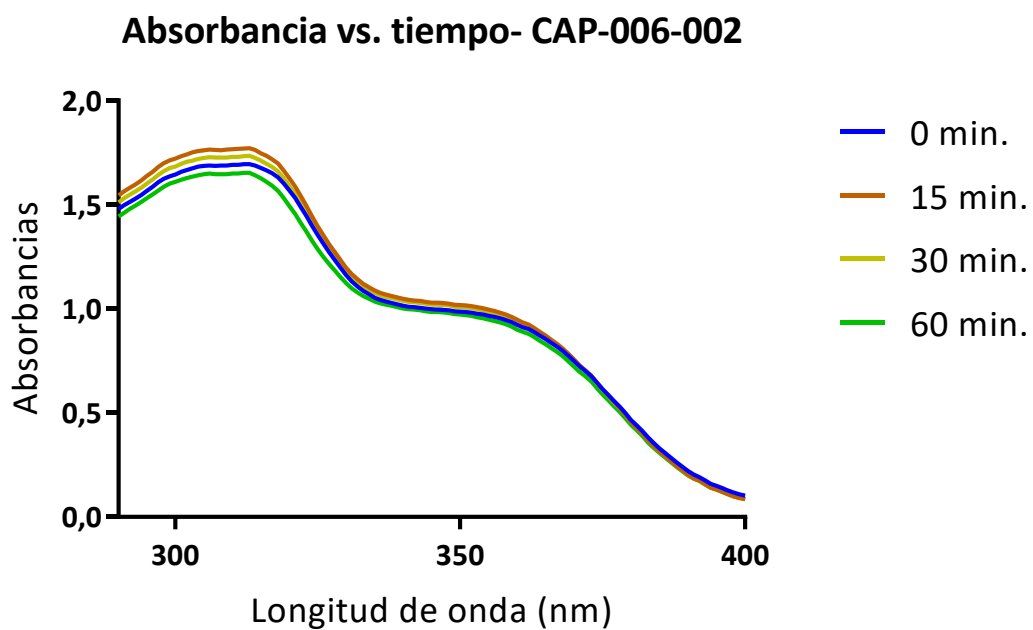
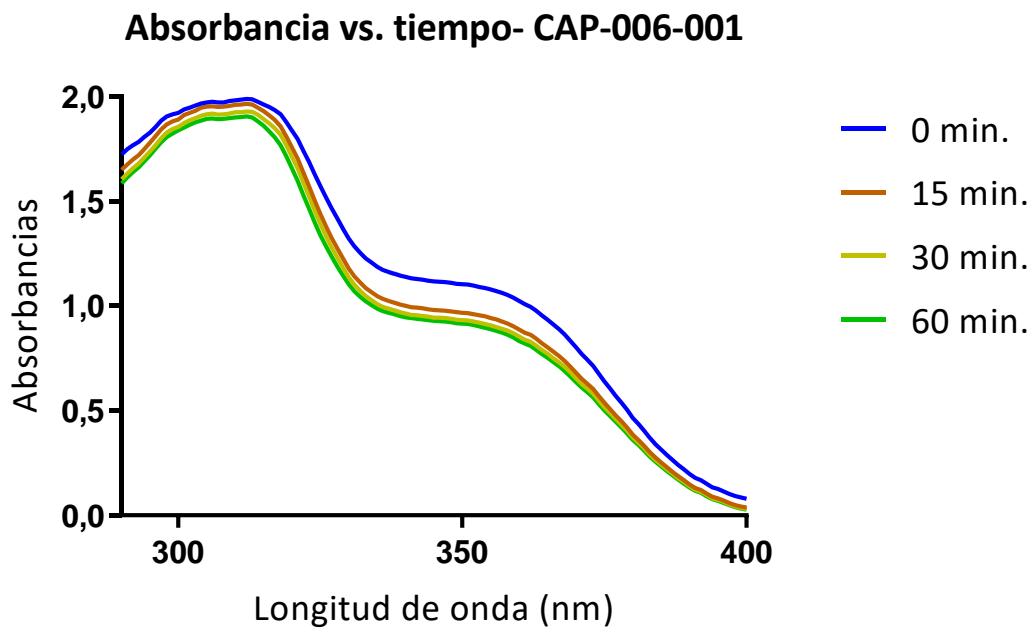


Figura 4.4. Comparativa de las absorbancias (290-400 nm) a diferentes tiempos de las fórmulas CAP-006-001 y CAP-006-002.

Al comparar la capacidad de fotoprotección de la fórmula con filtros comerciales y la misma fórmula con cápsulas de “A”, se observa que la presencia de las cápsulas en la fórmula permite estabilizar los valores de UVA-PF (Figura 4.5).

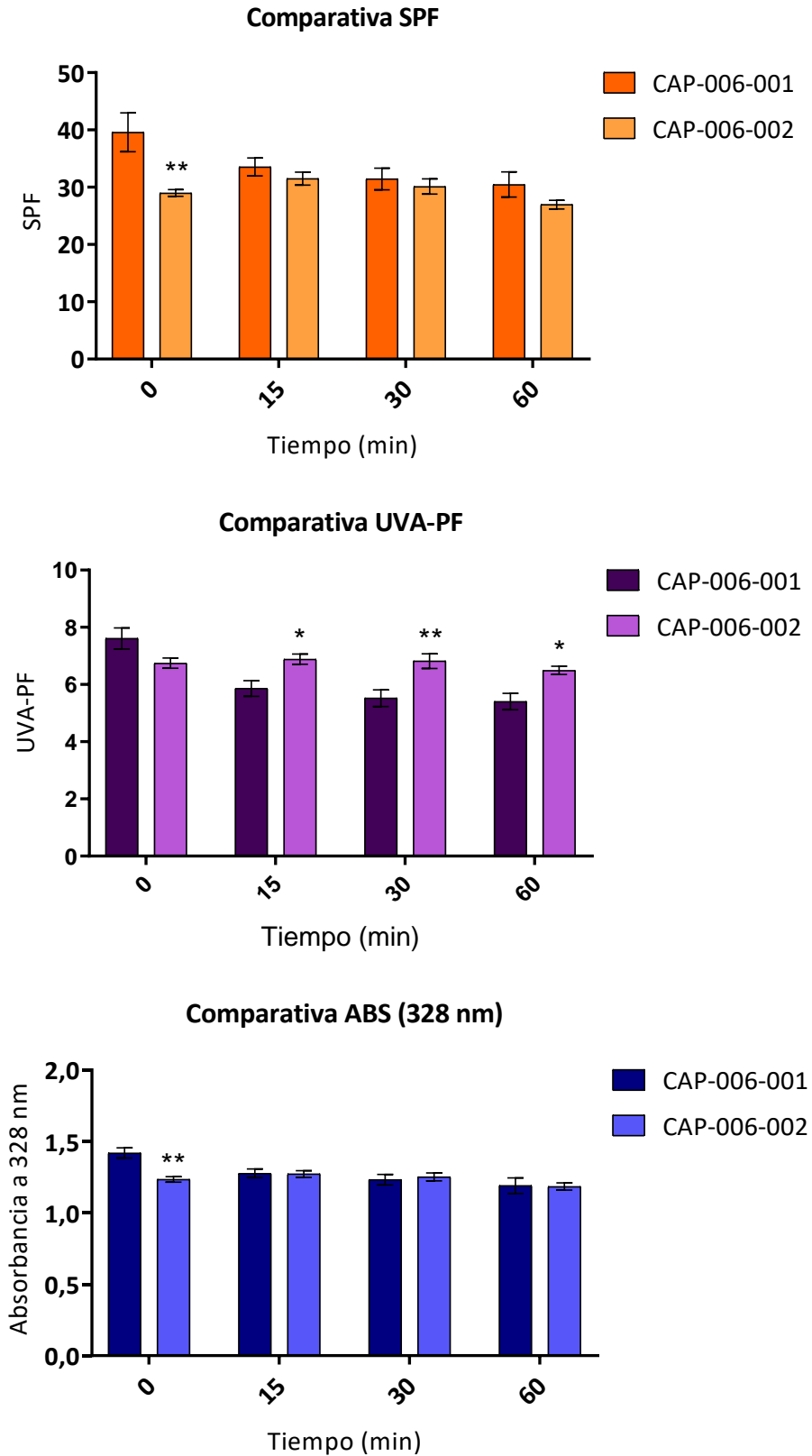


Figura 4.5. Comparativa de los valores de SPF, UVA-PF y de Absorbancia a 328 nm de las fórmulas CAP-006-001 y CAP-006-002. Se representa el promedio \pm el error estándar (N=3, muestras independientes en un mismo ensayo). Los análisis estadísticos se realizaron usando ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparación múltiple de Sidak. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ denotan diferencias significativas entre las formulaciones.

Además, se calcularon los incrementos de SPF, UVA-PF y de la absorbancia a 328 nm de la fórmula CAP-006-002 respecto a la fórmula control CAP-006-001 mostrando como la fórmula con las cápsulas ofrece un incremento de alrededor del 20% en la capacidad protectora en la franja del UVA-PF (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Incremento de los valores de SPF, UVA-PF y de la Absorbancia a 328 nm de la fórmula CAP-006-002 respecto a la fórmula CAP-006-001.

Incremento	Tiempo (min)			
	0	15	30	60
SPF	-26,8	-6,1	-4,2	-11,5
UVA-PF	-11,4	17,5	23,4	20,2
Absorbancia 328 nm	-13,0	-0,4	1,6	-0,5

Uno de los objetivos era determinar el efecto sinérgico de las cápsulas con otros activos naturales, en este estudio concretamente con una lignina tipo XXXXXX obtenida de madera blanda. Se añadió lignina a la fórmula CAP-002-006 resultando en la fórmula CAP-006-008 y se realizó el estudio comparativo del comportamiento fotoquímico determinando los valores de SPF, UVA-PF y absorbancia a 328 nm tal y como se ha descrito anteriormente.

En los espectros de absorbancia a diferentes tiempos (Figura 4.6), se muestra un incremento en el valor de absorbancia alrededor de 330 nm, lo que confirma que la adición de lignina sobre una fórmula con cápsulas de "A" produce un efecto beneficioso para éstas, incrementando la protección que ofrece "A" en su rango de absorbancia.

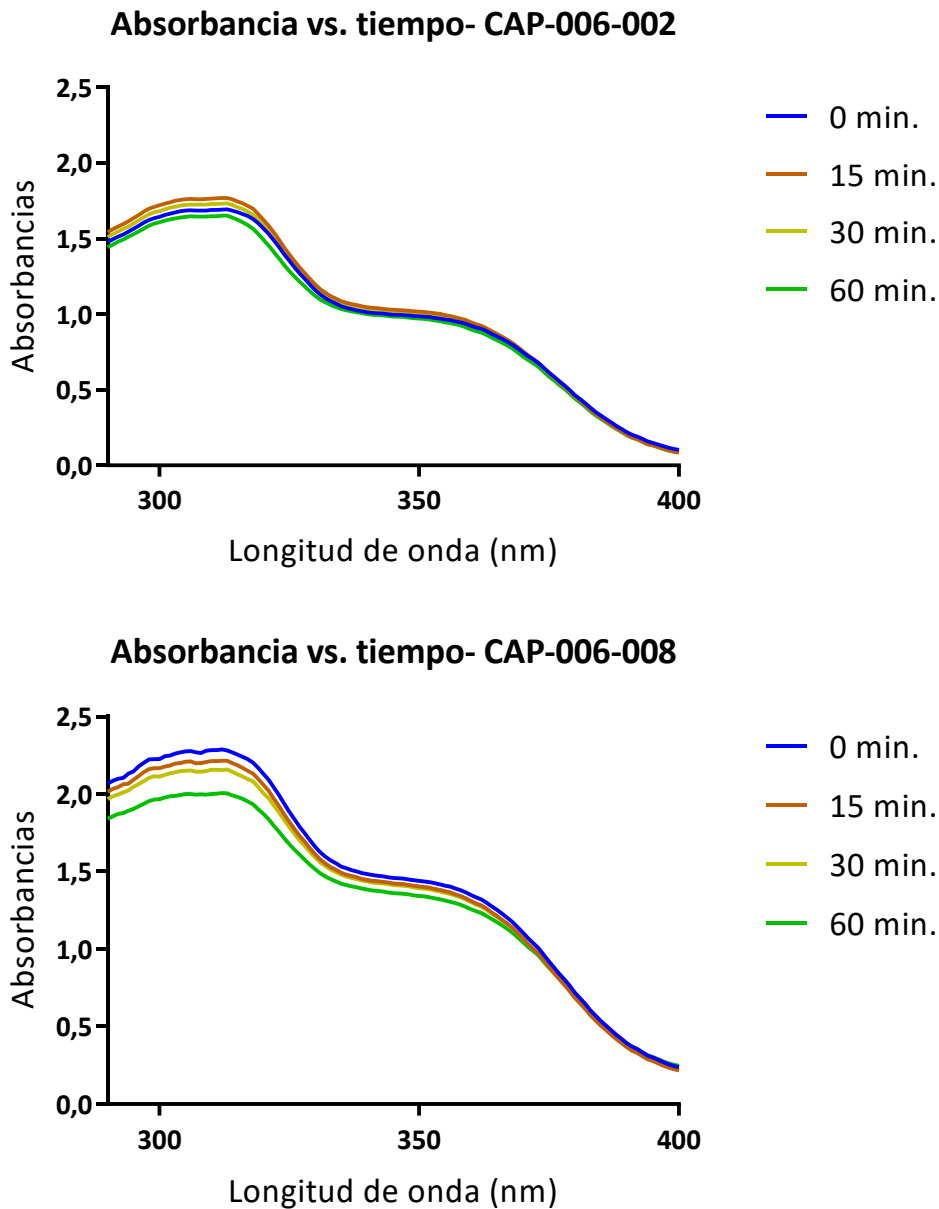


Figura 4.6. Comparativa de las absorbancias (290-400 nm) a diferentes tiempos de las fórmulas CAP-006-002 y CAP-006-008.

Además, en la Figura 4.7 se muestra como la incorporación de la lignina a la fórmula provoca un importante incremento en los valores de SPF, UVA-PF y absorbancia.

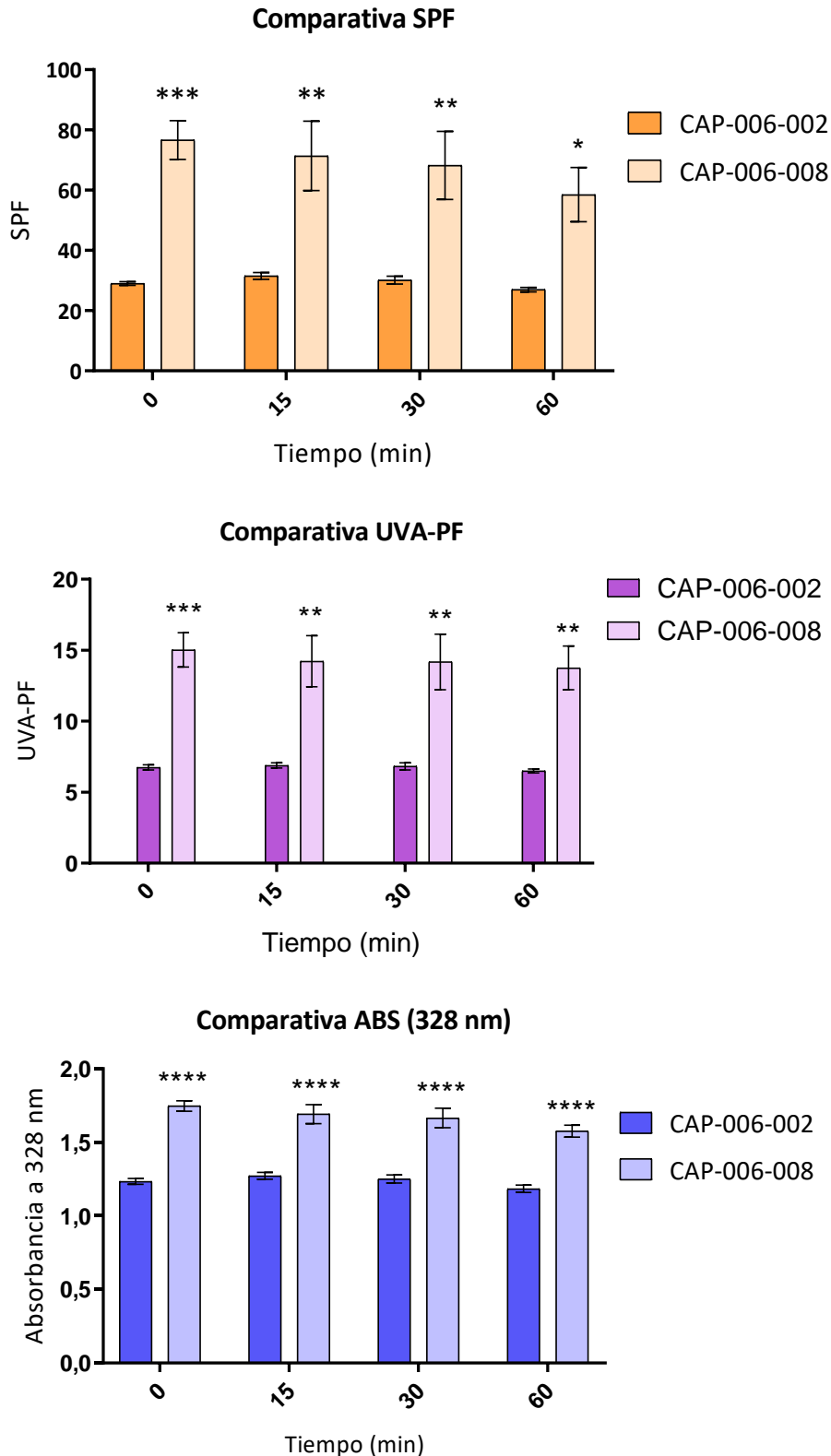


Figura 4.7. Comparativa de los valores de SPF, UVA-PF y de Absorbancia a 328 nm de las fórmulas CAP-006-002 y CAP-006-008. Se representa el promedio \pm el error estándar (N=3, muestras independientes en un mismo ensayo). Los análisis estadísticos se realizaron usando ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparación múltiple de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ y **** $p < 0,0001$ denotan diferencias significativas entre las formulaciones.

Respecto al aspecto de las fórmulas, la incorporación de las cápsulas de "A" a la fórmula solar base no alteró su estabilidad, sin embargo, si muestran una tendencia a la agregación. Por su parte, la inclusión de lignina no altero tampoco la estabilidad de la fórmula ya que no se observó exudado ni precipitación de la lignina al fondo del recipiente. El aspecto de las fórmulas se muestra en la Figura 4.8.



Figura 4.8. De izquierda a derecha: Fórmula sin cápsulas CAP-006-001, fórmula con cápsulas de "A" CAP-006-002 y fórmula con cápsulas de "A" y lignina CAP-006-008.

4.1.3.2.2. Viabilidad celular por LDH

La capacidad fotoprotectora de las formulaciones se ensayó en modelos de piel reconstituida y se determinó la posible citotoxicidad mediante el ensayo de la LDH. Así, se evaluó la cantidad de LDH liberada al medio con un kit específico y frente a una curva patrón, de manera que a más concentración de LDH, mayor toxicidad ha sufrido el tejido.

En la Figura 4.9 se observa que los sobrenadantes de tejidos no irradiados tanto no tratados (CTRL) como tratados con la formulación de cápsulas de "A" R_41 (CAPS), muestran una baja concentración de LDH sugiriendo una escasa mortalidad de los queratinocitos y fibroblastos presentes en la epidermis y dermis del tejido. En cambio, se determinó una elevada concentración de LDH liberada por las células de los tejidos irradiados. Estos datos indican que tanto en el control (CTR+UV) como en las condiciones con las formulaciones (COM+UV; CAPS+UV; LIG+UV) irradiadas hay una elevada citotoxicidad. Sin embargo, en el caso de la formulación de las cápsulas de "A" R_41 con lignina incorporada (LIG+UV) se observa una concentración menor de LDH,

estadísticamente significativa respecto a la condición irradiada sin tratamiento (CTR+UV), sugiriendo una posible protección a una dosis de irradiación de 20 J/cm².

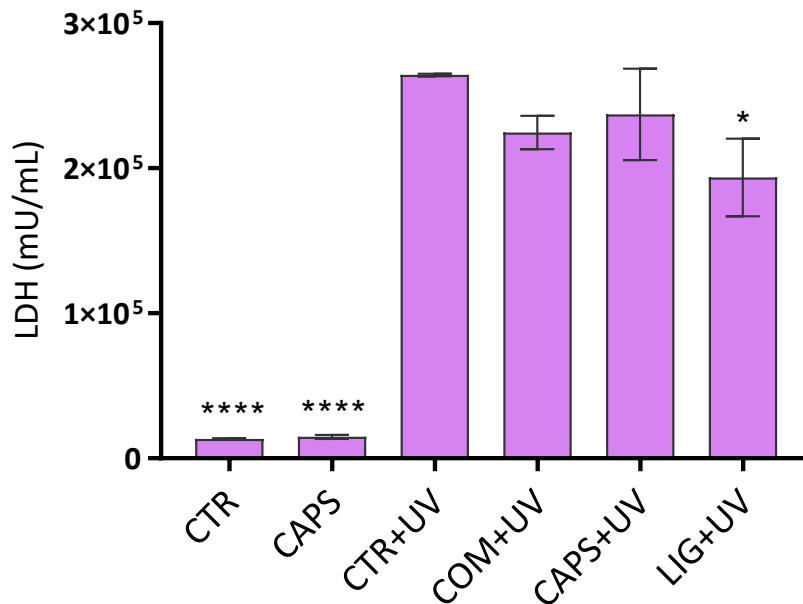


Figura 4.9. Concentración de LDH liberada al medio de cultivo para cada condición. Se representa el promedio \pm el error estándar (N=3, réplicas). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$ denota diferencias significativas con el control irradiado. CTR: control no irradiado ni tratado; CAPS: tejido no irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas "A" R_41; CTR+UV: control irradiado y no tratado; COM+UV: tejido irradiado y tratado con una formulación de filtros comerciales; CAPS+UV: tejido irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas "A" R_41; LIG+UV: tejido irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas "A" R_41 y lignina.

Además, se recogieron los medios después de las 24 de incubación post-irradiación para observar si existía cambio de color y así conocer si se produjo un cambio de pH (Figura 4.10). El color del control irradiado presentaba un tono amarillo indicando un cambio a pH ácido lo que puede causar citotoxicidad. A pesar de que las condiciones COM+UV, CAPS+UV y LIG+UV presentan un tono ligeramente diferente al control sin irradiar, la tonalidad es solamente ligeramente amarilla, y por consecuencia no tan ácido, como el control irradiado.



Figura 4.10. Coloración de los medios de cultivo de cada condición después de la incubación de 24 horas post-irradiación.

4.1.3.2.3. Cuantificación de la interleucina-1 α

La cantidad de IL-1 α liberada en el medio de cultivo es un reflejo del estrés al cual han estado sometidos los tejidos durante el proceso de irradiación. A pesar de que los tejidos no expuestos a la radiación no presentan una gran cantidad de producción de IL-1 α , no se aprecian diferencias entre las condiciones con las formulaciones más irradiación con el control de irradiación, indicando una nula protección frente al posible proceso inflamatorio desencadenado por la liberación de la IL-1 α (Figura 4.11).

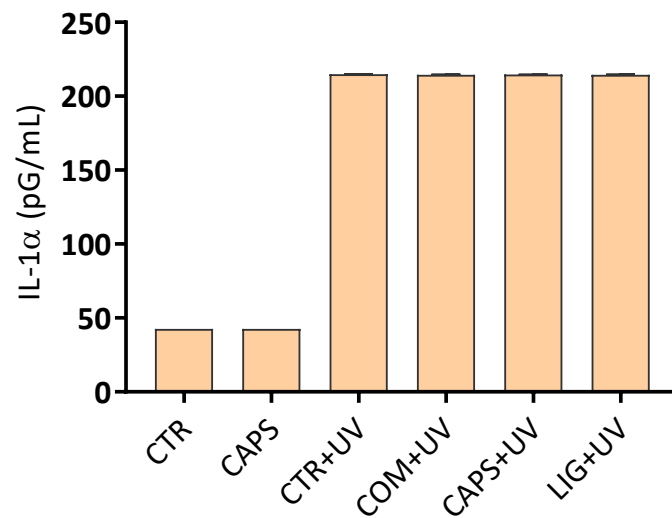


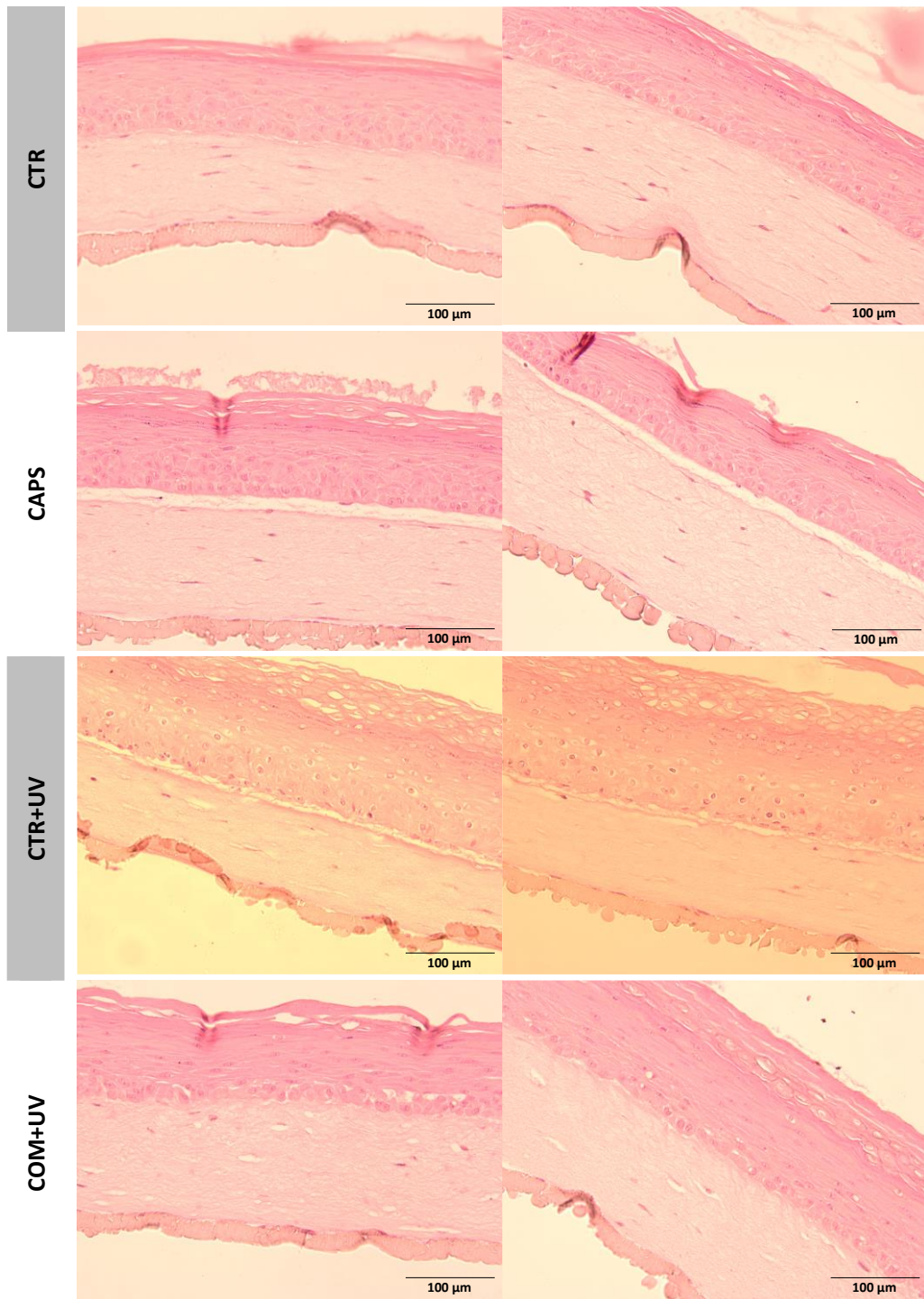
Figura 4.11. Concentración de IL-1 α determinada en el medio de cultivo por condición. Se representa el promedio \pm el error estándar (N=3, réplicas). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. CTR: control no irradiado ni tratado; CAPS: tejido no irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas "A" R_41; CTR+UV: control irradiado y no tratado; COM+UV: tejido irradiado y tratado con una formulación de filtros comerciales; CAPS+UV: tejido irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas "A" R_41; LIG+UV: tejido irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas "A" R_41 y lignina.

4.1.3.2.4. Cambios estructurales observados mediante tinción de los modelos en Hematoxilina y Eosina

Para observar los cambios estructurales inducidos en los tejidos debido a los tratamientos o la irradiación, las muestras incluidas en parafina se tiñeron con hematoxilina y eosina. La hematoxilina, concretamente la hemateína que es su derivado oxidado, es un colorante catiónico/básico que tiñe de color violeta azulado estructuras basófilas como los ácidos nucleicos y los ribosomas. Por su parte, la eosina es un colorante aniónico/ácido que tiñe de color rosado estructuras acidófilas como el citoplasma, la matriz extracelular, el colágeno y otras estructuras que rodean y soportan la célula.

En las tinciones con hematoxilina y eosina mostradas en la Figura 4.12 se observa cómo los tejidos expuestos a una dosis de radiación de 20 J/cm² y no tratados, muestran una morfología diferente a los tejidos tratados e irradiados, tanto con la formulación con cápsulas de "A" R_41 (con y sin lignina) como con la formulación con filtros comerciales.

Los tejidos más afectados, los irradiados sin tratamiento (CTR+UV), presentan una especie de vesículas en la zona epidérmica del tejido, así como una separación entre células. Además, los tejidos irradiados resultaron difíciles de manipular ya que tenían tendencia a separarse las capas de la epidermis y dermis como se muestra en la Figura 4.13. No obstante, los tejidos en las condiciones CAPS+UV y LIG+UV, presentan también estas vesículas en menor medida, sugiriendo una cierta protección por parte de las fórmulas CAP-006-002 y CAP-006-008.



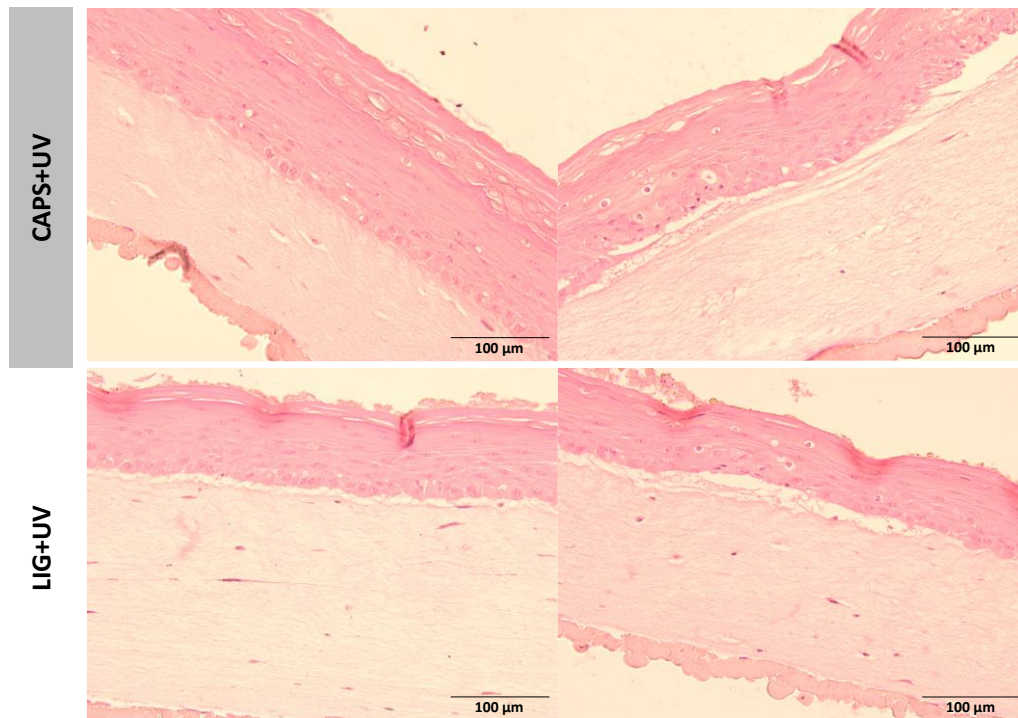


Figura 4.12. Imágenes de los tejidos teñidos con hematoxilina y eosina no irradiados e irradiados. Las imágenes se obtuvieron a través de una cámara fotográfica acoplada a un microscopio Olympus modelo BX41 a un aumento de x200.

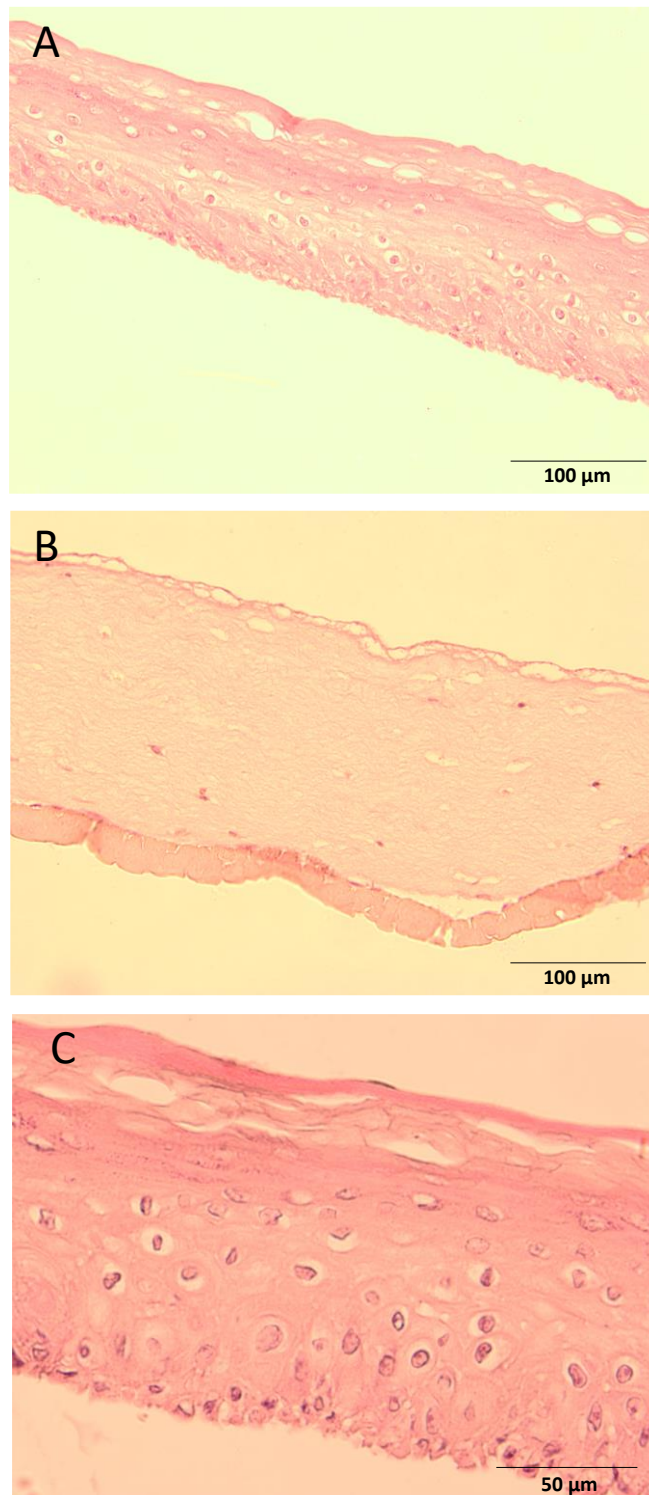
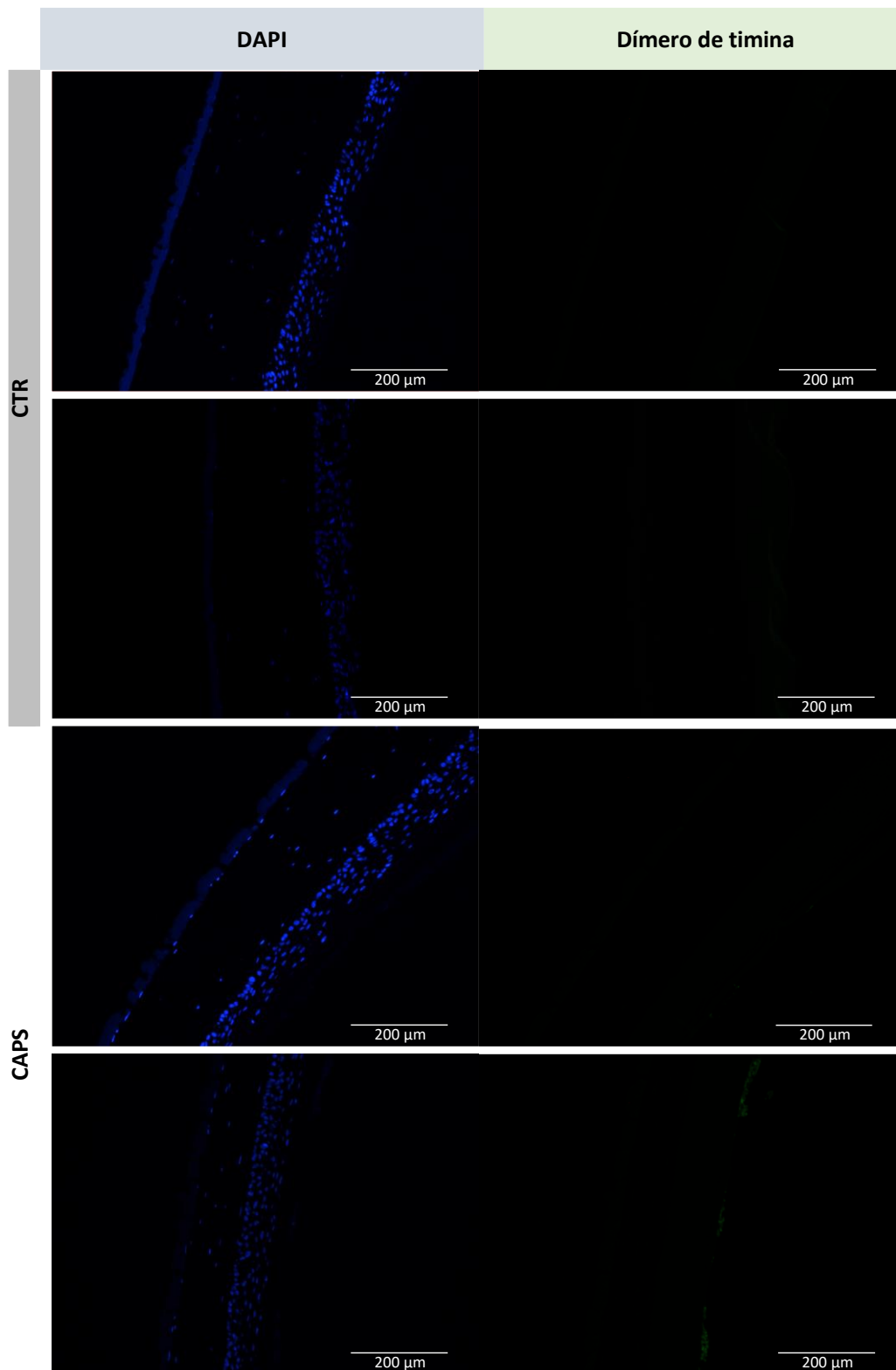


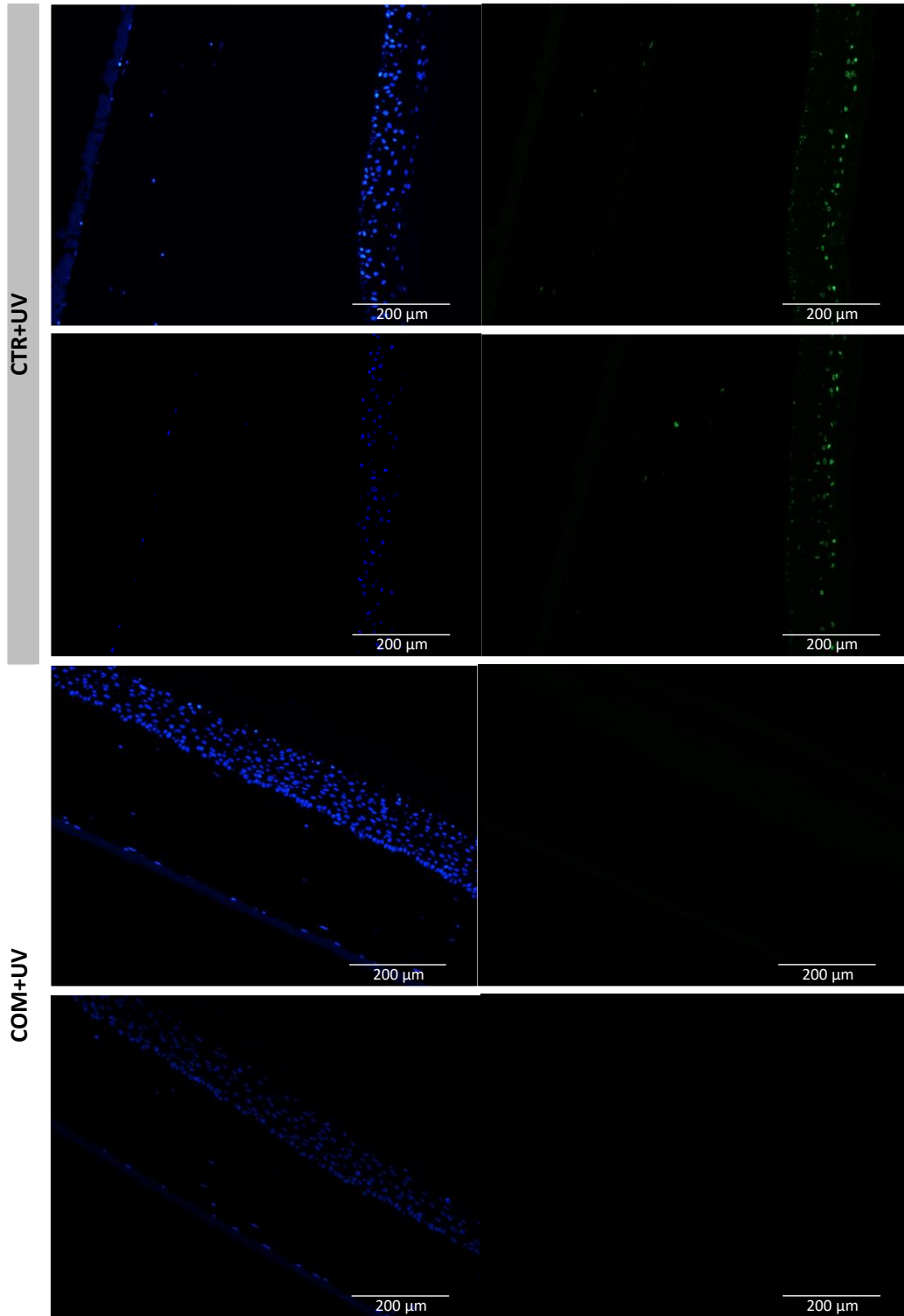
Figura 4.13. Imágenes del tejido con hematoxilina y eosina irradiado donde se muestran la epidermis(A) y la dermis (B) y las vesículas formadas(C). Las imágenes se obtuvieron a través de una cámara fotográfica acoplada a un microscopio Olympus modelo BX41 a un aumento de x200 (A y B) y de x400 (C).

4.1.3.2.5. Resultados del ensayo de inmunofluorescencia para la detección de dímeros de timina

El efecto fotoprotector de las fórmulas solares se estudió mediante la formación del dímero de timina. Los dímeros de timina son una lesión producida por la radiación UV formada a partir de la unión covalente entre dos timinas adyacentes en una sola cadena de ADN (Pinak, 2006). Esta fotolesión se produce mayormente a partir de longitudes de onda cortas de la radiación UV, aunque hay estudios que muestran la contribución de la radiación UVA en la formación de dímeros de timina como tipo primario de daño de ADN en piel humana *in vivo* (Douki et al., 2003; Mouret et al., 2006).

En la Figura 4.14 se muestra las imágenes de inmunofluorescencia de los dímeros de timina obtenidas en los tejidos con las diferentes condiciones experimentales. La formación del dímero de timina es clara en la epidermis del tejido irradiado a la dosis de 20 J/cm² sin producto (CTR+UV), no obstante, no es posible la identificación en la dermis. Respecto a los tratamientos con los productos, podemos observar que todos ofrecen una alta protección frente a la formación del dímero de timina por lo que no podemos diferenciar la actividad protectora ofrecida por las formulaciones ensayadas. Asimismo, en las condiciones de CAPS, CAPS+UV y LIG+UV, se detecta en ciertas partes del tejido señal inmunofluorescente correspondiente a las fórmulas. Esta observación indica que en las zonas dónde hay acumulación de las cápsulas se detectan debido a su autofluorescencia.





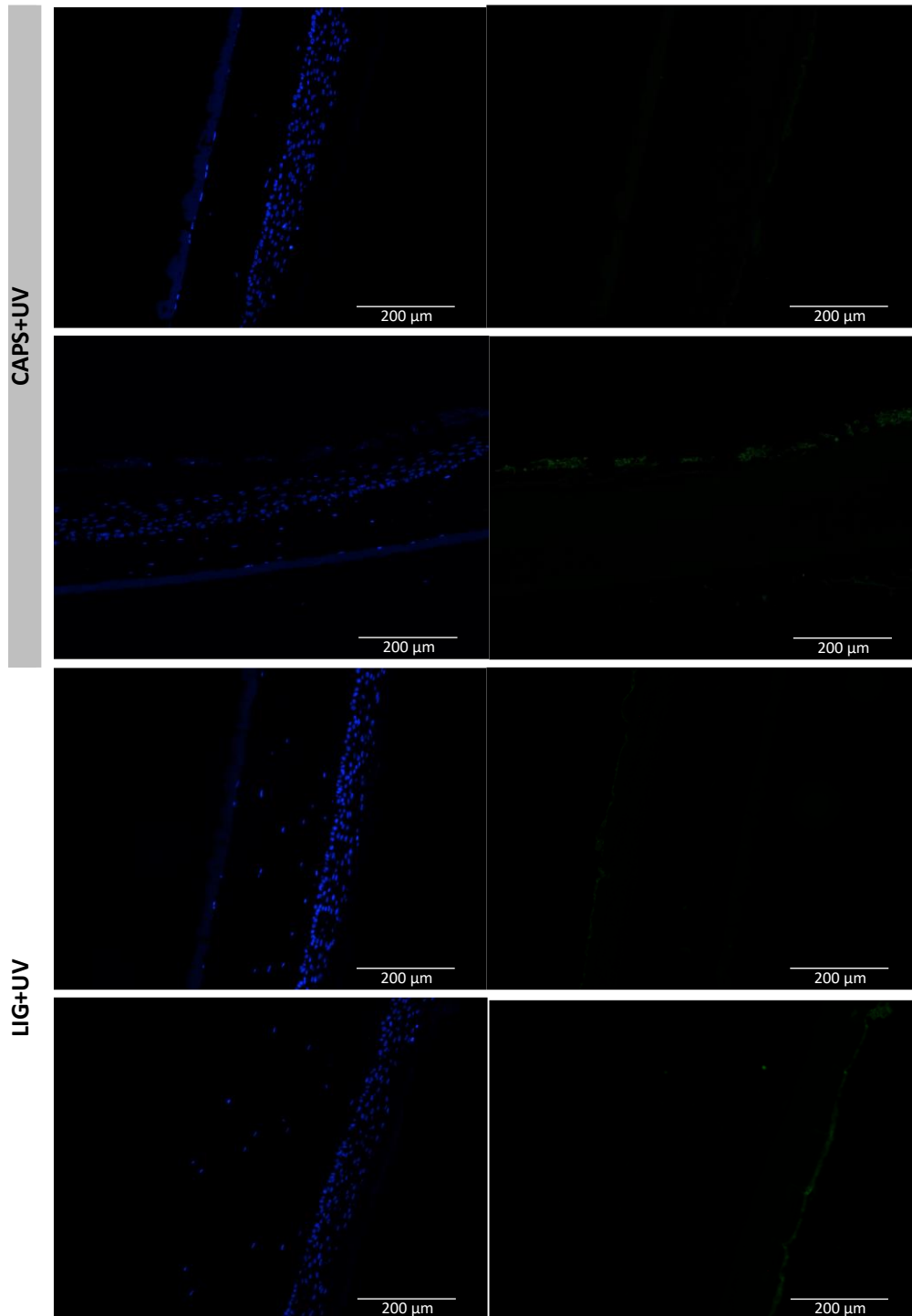


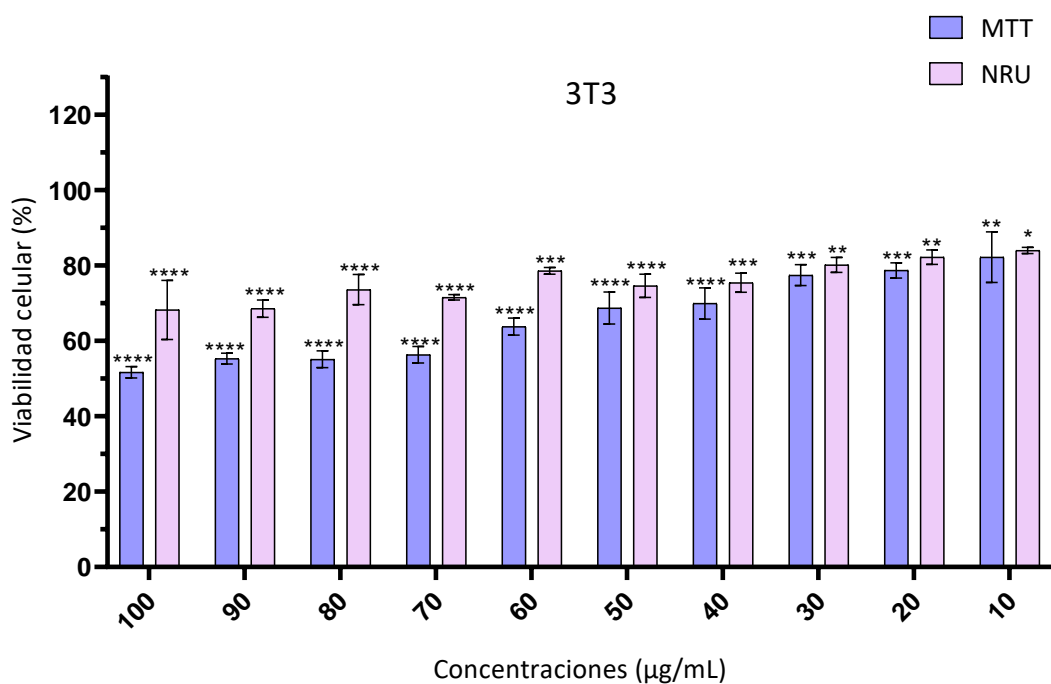
Figura 4.14. Detección de dímeros de timina mediante la tinción inmunofluorescente en los tejidos no irradiados e irradiados. Se muestran dos zonas de los tejidos teñidas. Se aplicó un anticuerpo primario anti-dímero de Timina que posteriormente fue revelado con un anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa Fluor® 488 obteniendo una fluorescencia en verde (derecha). Los núcleos fueron teñidos en azul con DAPI (izquierda). CTR: control no irradiado ni tratado; CAPS: tejido no irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas de "A" R_41; CTR+UV: control irradiado y no tratado; COM+UV: tejido irradiado y tratado con una formulación de filtros comerciales; CAPS+UV: tejido irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas de "A" R_41; LIG+UV: tejido irradiado y tratado con la formulación de las cápsulas "A" R_41 y lignina.

4.2. Resultados de la capacidad antioxidante y despigmentante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona

4.2.1. Resultados de citotoxicidad de la mezcla de NF02 y NHDC (1:1)

En la Figura 4.15 se muestran los resultados de viabilidad celular obtenidos a partir de los métodos de MTT y NRU y para las tres líneas celulares estudiadas. La viabilidad celular en el caso de los fibroblastos 3T3 y los queratinocitos HaCaT presenta un perfil similar, de manera que se mantiene cerca del 50%-70% a las concentraciones más altas y es superior al 80% a las concentraciones más bajas (10-20 µg/mL). En el caso de los melanocitos B16F0 la curva de citotoxicidad es más pronunciada, ya que a las concentraciones más bajas la viabilidad no se ve afectada y a la máxima concentración es aproximadamente del 40%.

Sin embargo, este perfil citotóxico de los productos no permite el cálculo de la CI_{50} con los resultados obtenidos mediante NRU para 3T3 y HaCaT. En el resto de las situaciones, la CI_{50} se muestra en la Tabla 4.3, dónde se observa que para las células 3T3 y HaCaT este valor es muy próximo a la máxima concentración ensayada y para B16F0 es algo inferior. Así, estos productos muestran mayor toxicidad para los melanocitos que para los fibroblastos y queratinocitos.



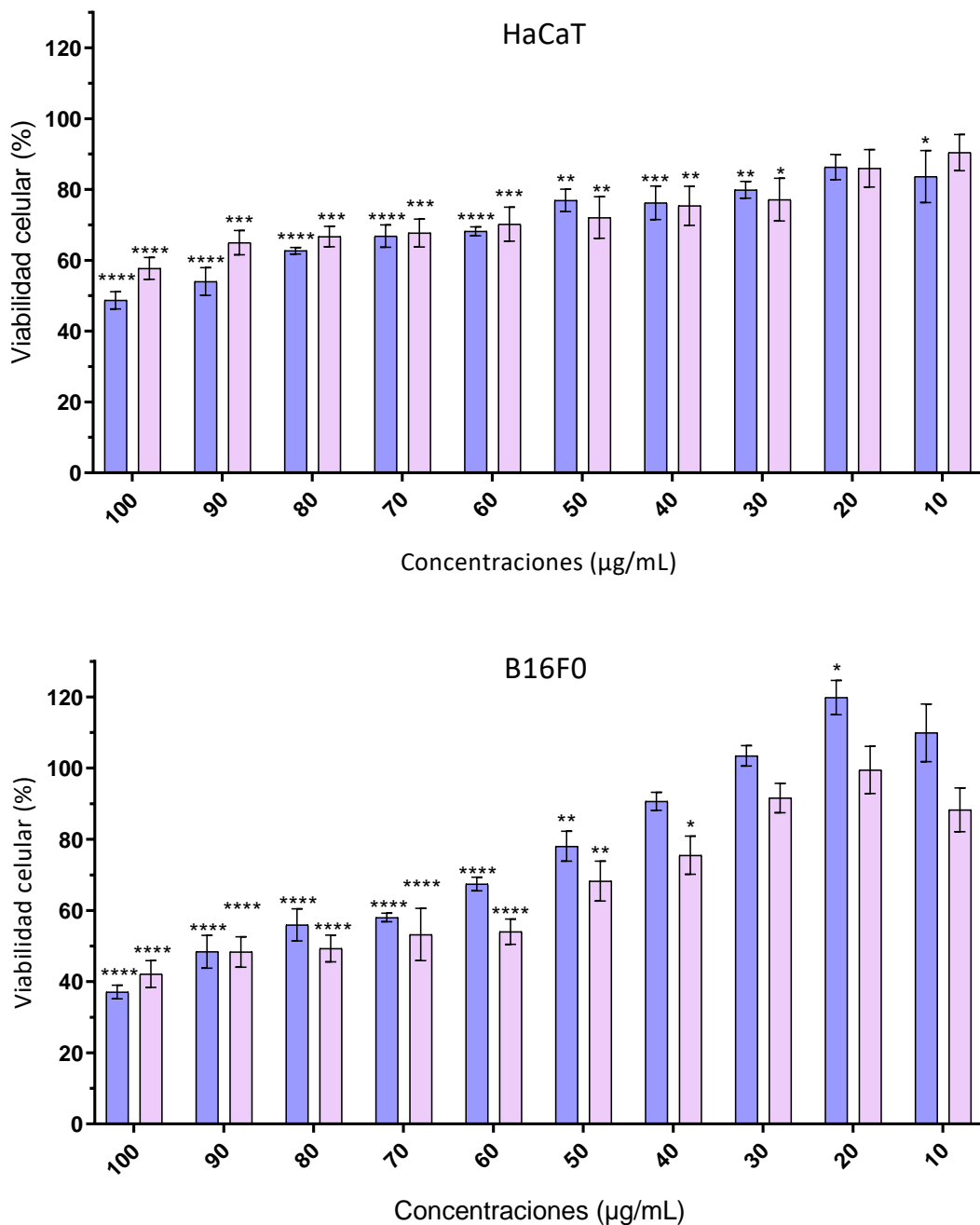


Figura 4.15. Actividad citotóxica de la mezcla de NF02 y NHDC obtenida mediante los métodos de MTT y NRU para las líneas celulares 3T3, HaCaT y B16F0. Se representa el promedio \pm el error estándar de la viabilidad celular expresada como porcentaje respecto a las células no tratadas (N = 3, ensayos independientes con 3 réplicas cada uno). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ y **** $p < 0,0001$ denotan diferencias significativas con el control negativo de citotoxicidad.

Tabla 4.3. Valores de Cl_{50} representados como la media \pm el error estándar.

	Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	B16F10	3T3	HaCaT
MTT	81 \pm 3	100 \pm 8	110 \pm 5
NRU	83 \pm 11	> 100	> 100

4.2.2. Resultados sobre la actividad despigmentante

La actividad de inhibición de la actividad tirosinasa se determinó mediante un método *in chemico* utilizando el ácido kójico como control positivo de despigmentación (Figura 4.16). Además, a efectos comparativos, se introdujo la mezcla de NHDC y NF02 (2:3) perteneciente a una solicitud de patente china. El ensayo consistió en mezclar los tratamientos con la tirosinasa de champiñón y, después de un periodo de incubación, añadir el sustrato L-Dopa para efectuar su conversión a L-Dopa quinona gracias a la actividad de la tirosinasa. A partir de esta reacción se pudo evaluar si la actividad de la tirosinasa se vio afectada por los diferentes tratamientos utilizados.

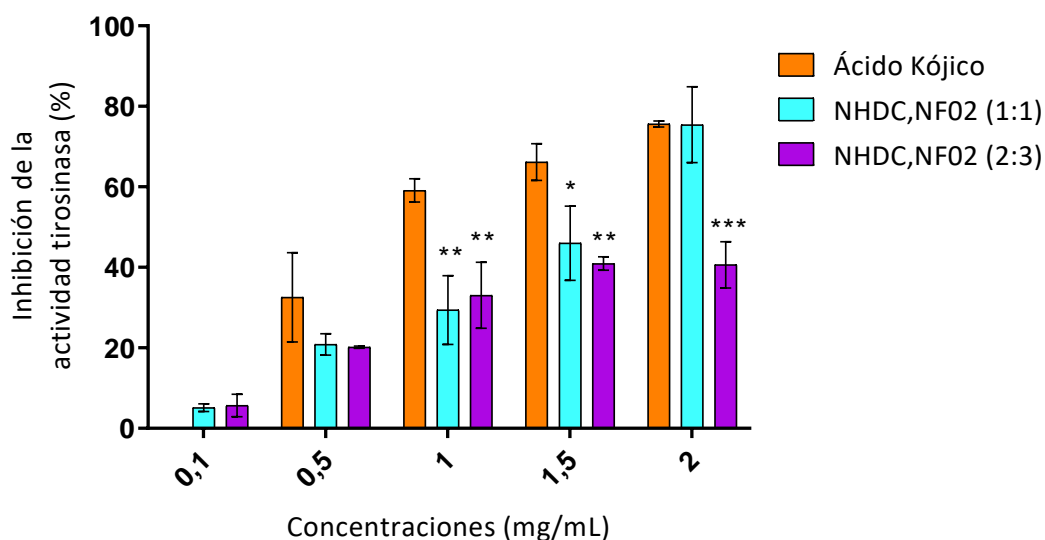


Figura 4.16. Porcentaje de inhibición de la actividad tirosinasa. Se representa el promedio \pm el error estándar ($N=3$, ensayos independientes con 3 réplicas cada uno). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de dos factores seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,005$ denotan diferencias significativas con el ácido kójico.

Tanto en la proporción 1 a 1 como en la 2 a 3 de NHDC y NF02, las mezclas de los productos son capaces de inhibir la actividad tirosinasa en todas las concentraciones estudiadas. No obstante, solo la concentración de 2 mg/mL de la proporción 1 a 1 muestra una alta actividad inhibidora (75 ± 9), llegando incluso a obtener un potencial similar al del control positivo de inhibición, el ácido kójico (76 ± 1).

Respecto al ensayo de inhibición de la actividad tirosinasa en melanocitos y producción de melanina en las células B16F0, no se pudieron obtener resultados debido a los inconvenientes surgidos durante la optimización. Las actividades inhibidoras de la actividad tirosinasa y de la producción de melanina no se pudieron cuantificar en los diferentes experimentos realizados. Por esta razón, se adquirió una nueva línea celular de melanocitos, la B16F10, muy referenciada en la literatura y obtenida a partir de la parental B16F0.

Se compararon las morfologías de ambas líneas celulares, observándose en la nueva línea celular una estructura más dendrítica propia de los melanocitos (Figura 4.17). Además, el medio de cultivo celular en esta línea se tornaba de color marrón a partir del tercer día en cultivo, característica que la anterior línea celular había perdido (Figura 4.18). También se recogieron muestras celulares y se compararon con pellets de otros ensayos de la línea celular antigua B16F0 (Figura 4.19).

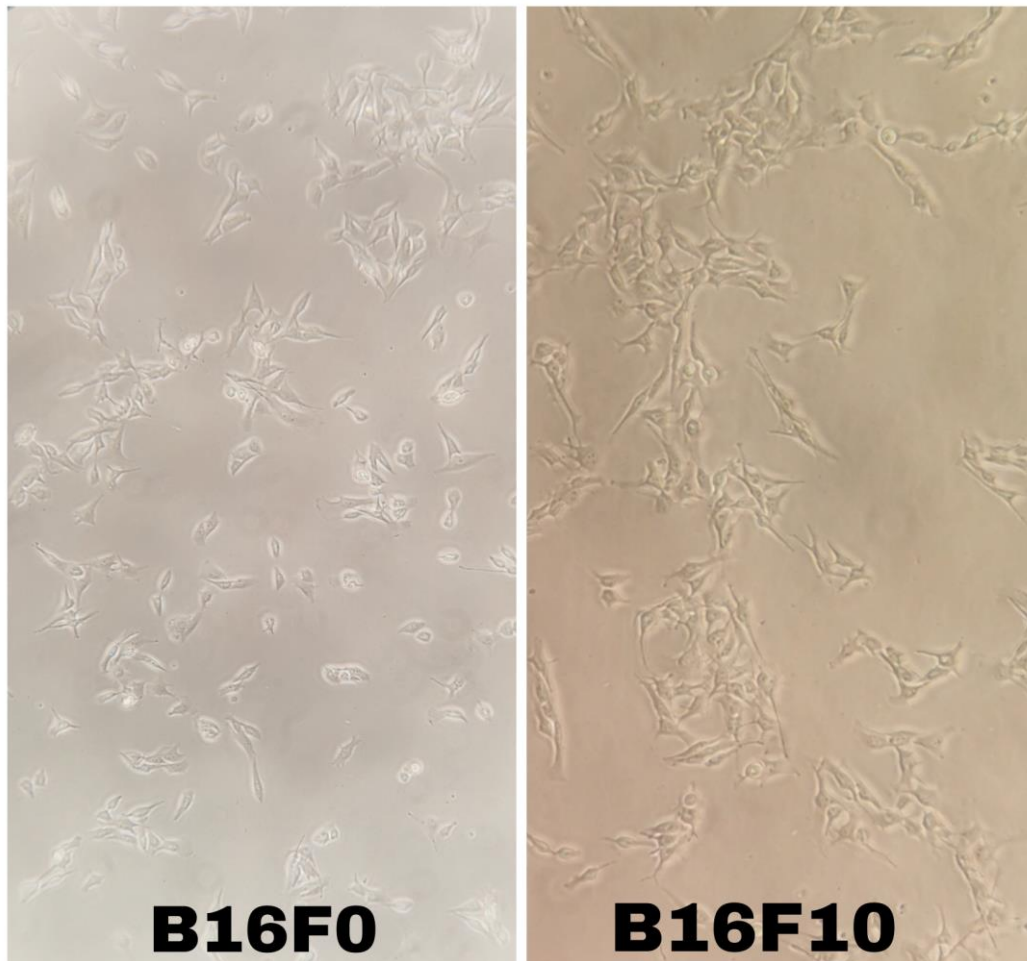


Figura 4.17. Comparación de la morfología celular de las líneas B16F0 (izquierda) y B16F10 (derecha).

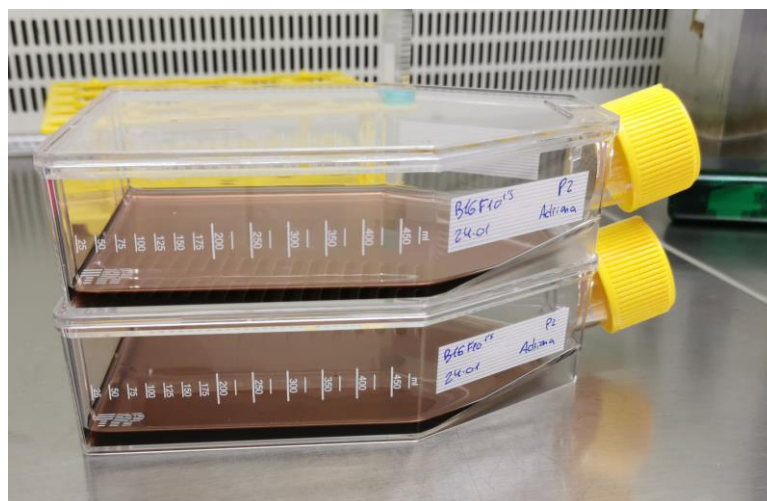


Figura 4.18. Medio de las células B16F10 en el pase 2 tras 3 días en cultivos.

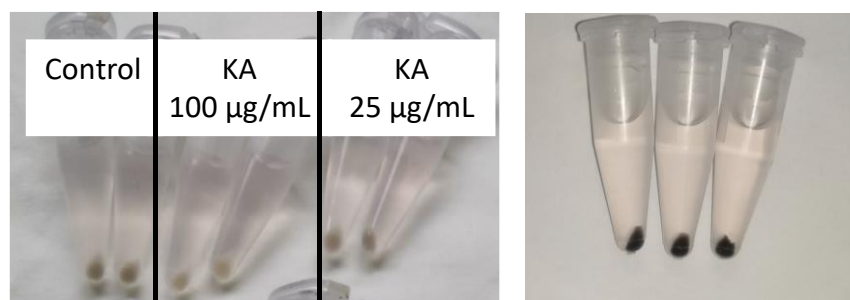


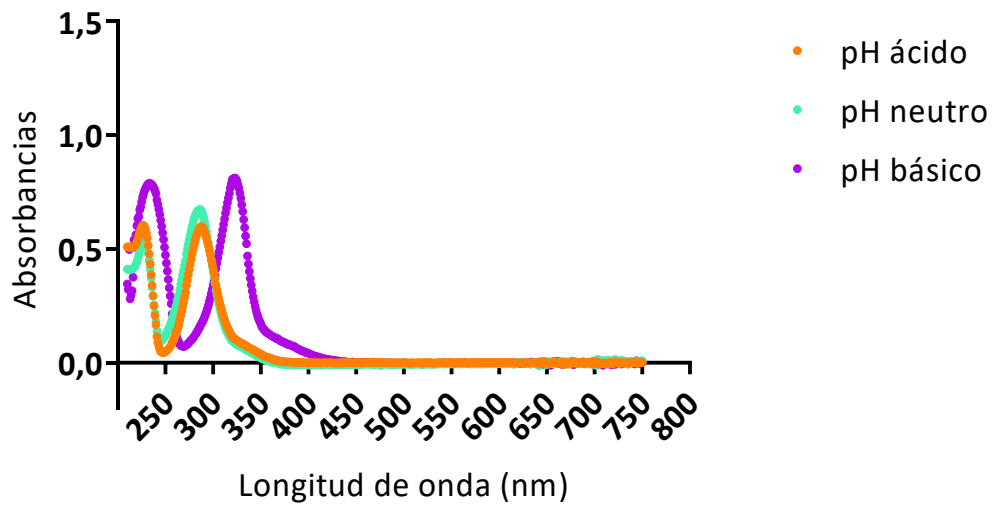
Figura 4.19. Aspecto de los pellets celulares tras 3 días de incubación. Izquierda: línea celular B16F0 sin y con tratamiento. Derecha: línea celular B16F10 sin tratamiento(derecha).

4.2.3. Resultados para el estudio de la capacidad antioxidante de NF02 y NHDC

4.2.3.1. Espectros UV-Visible de los productos NF02 y NHDC

Para conocer en que rango del espectro ultravioleta absorbían los productos NF02 y NHDC se obtuvieron los espectros UV-Visible siguiendo las especificaciones de la guía de la OCDE 101 (1981). Tal y como se muestra en la Figura 4.20, tanto NF02 como NHDC absorben luz UVB en las condiciones de pH ácido y neutro. No obstante, en pH básico NF02 absorbe luz de las regiones UVA y UVC mientras que NHDC solo absorbe energía en la región UVB.

A



B

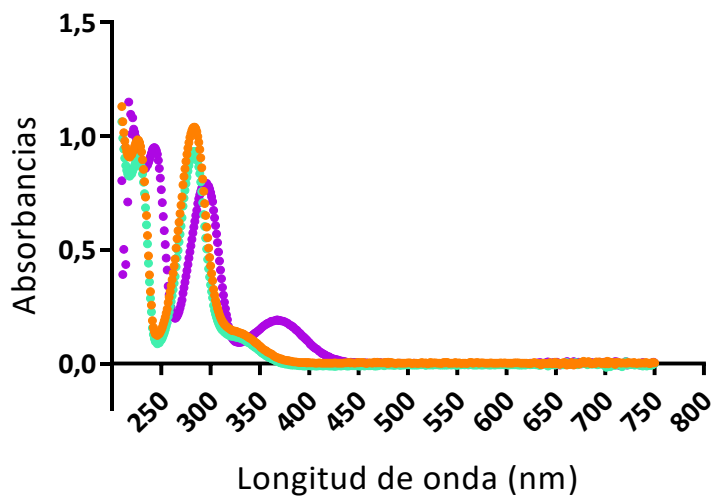


Figura 4.20. Espectros UV-de NF02 (A) y de NHDC (B).

Por otra parte, también se calcularon los coeficientes de extinción molar para cada condición (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Coeficientes de extinción molar de NF02 y de NHDC. Los valores se muestran como la media \pm el error estándar.

Producto	pH	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)*	Máxima absorción**	\mathcal{E} (L/mol·cm)**
NF02	Ácido	239	0,599 \pm 0,001	20.526 \pm 39
	Neutro	264	0,680 \pm 0,190	23.295 \pm 6.521
	Básico	261	0,814 \pm 0,020	27.861 \pm 677
NHDC	Ácido	240	1,043 \pm 0,132	21.279 \pm 2.701
	Neutro	263	0,9361 0,001	19.105 \pm 20
	Básico	225	0,794 \pm 0,028	16.204 \pm 572

*Longitud de onda a la que se presenta la máxima absorción. **Los valores se muestran como el promedio \pm el error estándar de N=2 réplicas.

4.2.3.2. Resultados de la producción de ROS

La actividad antioxidante de la mezcla de NF02 y NHDC se evaluó en células HaCaT a partir de la inhibición de producción de ROS inducida por luz UVA. Tras la exposición de los productos de interés durante 24 h en las células HaCaT, la sonda DCF-DA se internalizó con una posterior lectura de fluorescencia basal e irradiación de las células juntamente con los tratamientos a una dosis de 10 J/cm². Tras la lectura inmediata de fluorescencia, se cuantificó la proteína total de cada muestra de células a partir del método de Bradford, con el objetivo de normalizar los resultados finales.

Los resultados de inhibición de ROS obtenidos a partir de la fluorescencia relativa normalizada por la cantidad de proteína final se muestran en la Figura 4.21. Tanto la mezcla como los productos por separado muestran actividad antioxidante a partir de la reducción de la producción de ROS (NF02 + NHDC 4,7 \pm 1,1; NF02 6,6 \pm 1,7; NHDC 7,5 \pm 0,8), siendo incluso mayor que el producto empleado como control antioxidante, la N-acetil-L-cisteína (8,2 \pm 0,9). Todos los tratamientos aplicados reducen de manera estadísticamente significativa la producción de ROS respecto al control irradiado, siendo esta reducción mayor en el caso del tratamiento con NF02+NHDC ($p < 0,005$) que para

los demás tratamientos ($p < 0,01$). Así pues, se demuestra una mejora de la mezcla de NF02 y NHDC para su actividad antioxidante respecto a los productos por separado.

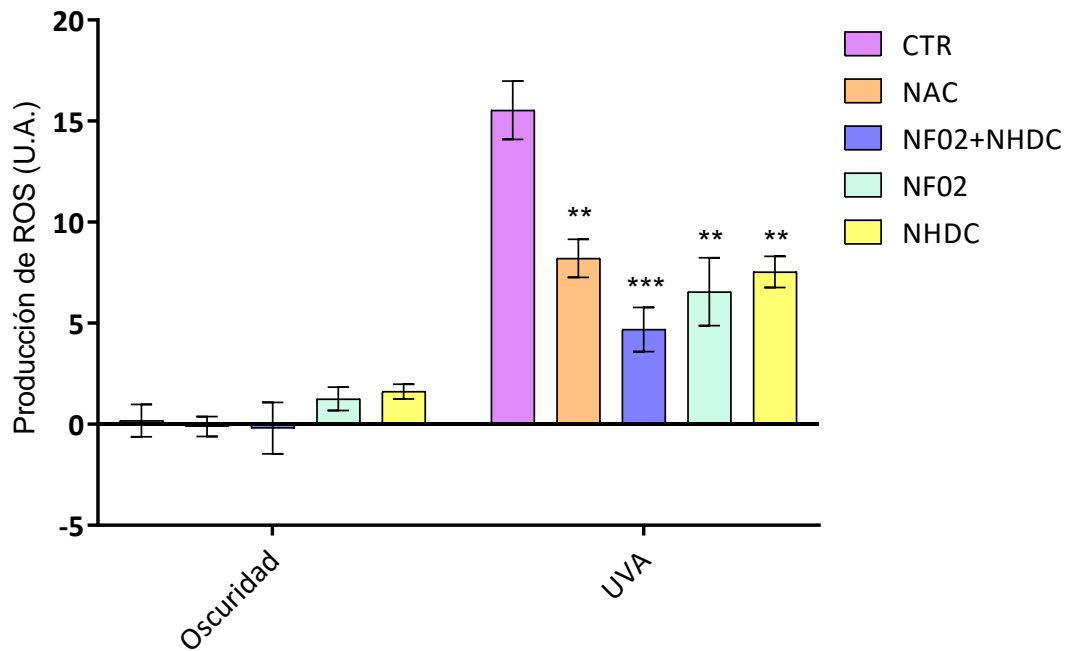


Figura 4.21. Producción de ROS después de la irradiación UVA a 20 J/cm². Se representa el promedio \pm el error estándar ($N=3$, ensayos independientes con 4 réplicas cada uno). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una ANOVA de un factor seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$ denotan diferencias significativas con el control.

5. DISCUSIÓN

Capacidad de fotoprotección de “A” encapsulado en fórmula solar

La molécula “A” fue desarrollada por ROKA para ser utilizada como filtro solar UV. Debido a su estructura, es capaz de fototransformarse a una nueva molécula a partir del reordenamiento inducido por un fotón a través de la reacción de “photo-fries”(H. Maeda et al., 2017). De esta manera, la protección que ofrece el filtro “A” se incrementa con el tiempo conforme está expuesto a la luz solar, característica que permite clasificarlo como un SMART UV (ANEXO 2). El filtro “A” utiliza la luz solar para transformarse en un compuesto fotoprotector con mayor capacidad para absorber los rayos UV manteniendo la protección hasta 6 veces más tiempo que los filtros solares actuales. Sin embargo, debido a su naturaleza de carácter orgánico, este filtro podría dar lugar a posibles efectos tóxicos en el organismo, así como un impacto negativo en los ecosistemas marinos. Para solventar este problema, ROKA participó en un proyecto junto con el centro tecnológico LEITAT para realizar la encapsulación efectiva del filtro “A” impidiendo su liberación al exterior, pero manteniendo sus propiedades químico-físicas intactas.

Así, en primer lugar, se estudió la citotoxicidad del filtro libre en células HaCaT para obtener una concentración tóxica con el fin de utilizarla de control positivo en el siguiente ensayo. El ensayo, realizado por el método del MTT, indicó que “A” presentaba una CI_{50} de 0,006% (v/v) corroborando la alta toxicidad de la molécula en las concentraciones ensayadas. A pesar de que el método del MTT solo nos indica la disfuncionalidad de las deshidrogenasas mitocondriales a partir de su actividad reductora, nos puede dar una idea de la citotoxicidad producida por los productos en estudio. Además, se ha descrito que la reducción de MTT a formazano también puede ocurrir en otros compartimentos celulares (Y. Liu et al., 2002). En esta etapa, también se estudió “B”, otra molécula desarrollada por ROKA similar a “A” tipo SMART UV, que presentó una CI_{50} de 0,003%, mostrando un poder más citotóxico que el propio “A”.

Por otro lado, los espectros UV-Visible de “A” y de “B” corroboraron que estas moléculas absorben en la región del espectro solar UVC y que, además, se degradan en condiciones de pH ácido y básico. En otros estudios de ROKA, se observó que el filtro “A” se degrada en contacto con el agua, sufriendo hidrólisis en el grupo imina y dando lugar a un aldehído llamado XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX (“C”). Dado a que las condiciones de

pH ácido y básico contienen mayor cantidad de agua, la degradación observada podría relacionarse con la ruptura de la molécula y la consecuente formación de "C". En estos estudios también se determinó que los coeficientes de extinción molar eran superiores a 1.000 L/mol-cm, indicando un potencial fototóxico y, por lo tanto, la necesidad de realizar estudios de fotoseguridad (Bauer et al., 2014). Sin embargo, se descartaron los efectos fototóxicos mediante estudios externos realizados por ROKA.

Mediante la tecnología Sol-Gel, se realizaron diversos escalados para optimizar la encapsulación de "A". Por otro lado, para conocer si las cápsulas producían un lixiviado tóxico, ya fuera por la degradación de sus componentes o por la liberación de "A" al exterior de éstas, se estudió la citotoxicidad de los extractos de las cápsulas en condiciones hidrofílicas y lipófilas basándonos en la ISO 10993-5:2009 y en el protocolo descrito por de García y cols. (2013). El ensayo se realizó en células humanas HaCaT, ya que los queratinocitos serían las primeras células expuestas al producto en una aplicación real sobre la piel.

Como control de citotoxicidad se utilizó "A" a un 0,005% (v/v) para cada condición. Sin embargo, el filtro "A" a esta concentración provocó una menor citotoxicidad de la esperada según los resultados de citotoxicidad obtenidos previamente. Este hecho puede deberse a que el tiempo de incubación puede favorecer la hidrólisis del grupo imina de la molécula al estar en contacto con el agua o a algún factor relacionado con las diferentes condiciones de incubación entre ambos ensayos, como el tiempo de contacto. Una hipótesis sería que "A" interacciona con los componentes del medio celular disminuyendo así su toxicidad directa en las células. No obstante, estudios posteriores serían necesarios para determinar la causa concreta. Por otro lado, se observó que los extractos de las cápsulas blancas provocaban citotoxicidad en condiciones lipófilas por lo que se sugiere que alguno de sus componentes se degradó o liberó provocando toxicidad en las células. La principal hipótesis es que esta toxicidad fue causada por la liberación de CTAB, un tensioactivo incorporado en la síntesis de las cápsulas que está descrito que es citotóxico (Zhang et al., 2015). Además, se observó como el color rojo de los extractos de ambas cápsulas, proveniente del rojo fenol que contiene el medio, desapareció. Una posible explicación podría ser que el CTAB se

degradó en el medio interaccionando con el rojo fenol, debido a sus cargas opuestas, dando lugar a la formación de micelas (N. Wang et al., 2015).

Las cápsulas de “A” R_20 mostraron más citotoxicidad en ambas condiciones que las cápsulas blancas, siendo más notable en la condición lipófila. Este hecho pudo deberse a la degradación de CTAB y al filtro “A” liberado. Por otro lado, la composición de las cápsulas de “A” R_20 y las blancas sin “A” puede variar en la proporción final de los componentes debido al proceso de síntesis, por lo que las diferencias en toxicidad entre los dos tipos de cápsulas también podrían deberse a una mayor liberación de CTAB de las R_20. Por esta razón, serían necesarios estudios que evaluaran en el medio de cultivo la presencia de CTBA o “A”, como por ejemplo mediante alguna técnica analítica como el HPLC.

También cabe mencionar que se realizaron otros ensayos con diferentes lotes de cápsulas y no se obtuvieron resultados adecuados. Así, no fue posible aplicar en las células un extracto limpio de sólido al no poderse filtrar correctamente debido al tamaño de las cápsulas y, en consecuencia, se observó una elevada citotoxicidad debida al propio contacto físico ejercido. Por tanto, se concluyó que este estudio basado en la norma ISO 10993-5:2009 no es válido para estudiar la citotoxicidad de los extractos de estas cápsulas.

Finalmente, se prosiguió con un estudio de fotoprotección en modelos de piel reconstituida con el escalado de cápsulas R_41. Este lote de cápsulas de “A” se escogió en base a la optimización de su composición de CTAB y su fotoactivación, realizados por la empresa responsable de la síntesis.

A través de diferentes marcadores se evaluó la protección de diferentes fórmulas con y sin cápsulas de “A”, además de con cápsulas de “A” con lignina, frente a una dosis de radiación solar simulada de 20 J/cm². Esta dosis es similar a la utilizada en diferentes estudios con modelos de piel, reconstituida o de cerdo, dónde se estudiaron los daños en la piel por efecto de la radiación solar sin que esta fuera potencialmente perjudicial (Ali et al., 2013; Bacqueville & Mavon, 2009; Pellevoisin et al., 2018). Además, se determinaron los valores de factor de protección solar (SPF), de protección UVA (UVA-

PF) y de absorbancia a 328 nm, dónde el filtro “A” presenta el pico de máxima absorción después de fototransformarse.

La fórmula solar con cápsulas (CAP-006-002), se combinó con otros filtros comerciales debido a dos motivos. El primero es que a tiempo 0 “A” no ofrece protección significativa en las regiones UVB y UVA, las que corresponden a las radiaciones que alcanzan la superficie terrestre siendo perjudiciales para el ser humano (Serpone, 2021), ya que su absorbancia, y en consecuencia su protección, incrementa con el tiempo de exposición solar. El segundo es que, el filtro “A”, solo ofrece protección en las regiones UVB+UVAII requiriendo protección en la región UVAI (ANEXO 2).

En la fórmula con las cápsulas incorporadas se observó a los 15 min un incremento de su absorbancia en el rango de 290 a 325 nm (aproximadamente), que se mantuvo hasta los 30 minutos. Además, este incremento también se observó en los valores de SPF y UVA-PF confirmando el incremento de protección debido a la fotoactivación de “A”.

En comparación con la fórmula control solamente con los filtros comerciales (CAP-006-001) se pudo observar como las cápsulas estabilizaron la protección en UVA-PF, pero no en SPF. Esto se debe a que el cálculo de SPF está más relacionado con la región UVB que con la UVA y solo refleja la protección en la región UVB. Además, el cálculo de UVA-PF está estandarizado conforme la norma ISO 2443:2012 al contrario que el cálculo de SPF, teniendo este último más variabilidad entre diferentes estudios. Con todos estos datos podemos deducir que el filtro “A” sí ayuda a incrementar la protección frente a la radiación UVA, pero la crema formulada con las cápsulas desestabiliza la emulsión perjudicando a su fotoestabilidad. Además, la aplicación de las fórmulas que contenían cápsulas no ofreció una apariencia homogénea presentando pequeños agregados, por lo que se deberían buscar métodos alternativos de formulación u optimizar las cápsulas para mejorar su dispersión.

Por otro lado, la incorporación de lignina a la fórmula CAP-006-002 resultando en la formula CAP-006-008 incrementó notablemente los valores de SPF, UVA-PF y de absorbancia a 328 nm, demostrando que la lignina aumenta sinérgicamente la capacidad fotoprotectora de las cápsulas de “A”. La lignina es un biopolímero de origen vegetal que se obtiene, principalmente, como producto de desecho de la industria de la

pulpa y el papel, que por sus características químicas y capacidades biológicas presenta un gran atractivo para diferentes aplicaciones que incluyen la industria cosmética y farmacéutica (Vinardell & Mitjans, 2017). Así, recientemente, se ha descrito que es capaz de aumentar el SPF cuando se incluye en formulaciones con capacidad fotoprotectora (Mejía-Giraldo et al., 2021; Qian et al., 2015), de manera similar a nuestro estudio. En este trabajo, se ensayó también la capacidad fotoprotectora en un modelo de piel reconstituida de epidermis y dermis, en el que solo la fórmula con lignina protegió significativamente frente a la muerte celular inducida por la radiación solar simulada a 20 J/cm². No obstante, sería interesante explorar otros estudios de viabilidad celular, como por ejemplo el método del MTT o de Alamar Blue, para estudiar más a fondo el mecanismo de protección (Nogueira et al., 2014). Además, observando los colores del medio del ensayo hipotetizamos que también hubo protección por parte de las formulaciones CAP-006-002 y CAP-006-001 frente a la mortalidad celular inducida por UV.

Mediante el ensayo de la LDH no se pudo demostrar una capacidad protectora para las condiciones con las formulaciones con filtros comerciales con y sin cápsulas de "A". Sin embargo, la tinción del tejido con hematoxilina y eosina mostró algunas diferencias entre el control irradiado y los tejidos tratados e irradiados. Así, en el caso del control irradiado se observaron unas vesículas en la zona de la epidermis. Este fenómeno llamado espongiosis y del cual se desconoce su mecanismo patogénico, se reconoce por la presencia de espacio intracelular entre los queratinocitos con elongación de los puentes intercelulares (David Weedon, 2010). Esta espongiosis no se observó en el caso de los tejidos irradiados y tratados con la fórmula de los filtros comerciales. En cambio, sí se detectó en el caso de las muestras irradiadas tratadas con las fórmulas con las cápsulas con y sin lignina. Sin embargo, esta alteración estructural fue bastante menos notoria en comparación con el control irradiado. Este hecho puede atribuirse a la menor fotoestabilidad causada por las cápsulas.

La inmunofluorescencia para detectar los dímeros de timina nos mostró como todas las fórmulas protegen frente a esta fotolesión, pero no pudimos diferenciar si la incorporación de las cápsulas con o sin lignina incrementaba la protección ya que en todos los casos fue total.

Tanto en el examen histológico como en la inmunotinción no fue posible observar ningún daño en la capa dérmica con las condiciones CTR+UV. Estos hechos nos podrían indicar que no hubo suficiente penetración por la luz UV con la dosis de 20 J/cm².

Valorando los resultados obtenidos, los siguientes pasos serían seguir optimizando las cápsulas de "A" para así mejorar sus propiedades galénicas, conocer el porcentaje de "A" que queda encapsulado y encontrar una combinación de filtros para obtener una combinación fotoestable entre ellos.

Actividad antitirosinasa y antioxidante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona

La floretina y la neohesperidina dihidrochalcona son moléculas pertenecientes a la familia de las chalconas, una clase de compuestos orgánicos con una estructura base de 1,3-diaril-2-propen-1-ona que se obtiene a través de muestras naturales (Rozmer & Perjési, 2016) o bien por procesos de semisíntesis de productos naturales existentes (Fathiazad & Afshar, 2004) o por síntesis completa (Zhuang et al., 2017).

Específicamente, la floretina (NF02) pertenece al grupo de las dihidrochalconas siendo un tipo de fenol natural que se puede encontrar en las hojas del manzano, el albaricoque de Manchuria y muchas otras frutas. La NF02 es un flavonoide con potentes propiedades antioxidantes y se ha reportado que tiene actividades antiinflamatorias, antibacterianas, antiacné (Chen et al., 2020) así como antineoplásicas y anticancerígenas (Alansari & Eskandrani, 2020).

Por su parte la neohesperidina dihidrochalcona se utiliza como edulcorante y se obtiene a partir de la modificación química de la neohesperidina, la cual es extraída de la fruta inmadura de la naranja amarga (*Citrus aurantium*), o también de la naringinina, un flavonoide presente en gran cantidad en las uvas (*Citrus paradisi*). Este producto es un precursor de antocianinas y además tiene actividades antioxidantes, efectos inhibidores de hepatitis y antiinflamatorias (S. Choi et al., 2021).

Debido a las propiedades biológicas antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antiangiogénicas, antimicrobianas y de modulador de enzimas de las chalconas, se ha descrito su potencial para prevenir o tratar diferentes trastornos de

la piel. Algunos de los ejemplos son como fotoprotector o para tratar trastornos de pigmentación, leishmaniasis cutánea, rosácea y de erupciones de la piel como el acné vulgaris, la dermatitis seborreica, la psoriasis o dermatitis atópica (Jumina et al., 2021).

Diversos estudios han descrito cómo las chalconas pueden inhibir la actividad de la tirosinasa debido a su estructura química. Algunos autores sugieren que el número de hidroxilos presentes en los bencenos es importante para la actividad inhibitoria, pero lo más sustancial sería la posición de éstos (Khatib et al., 2005; J. Liu et al., 2013; Nerya et al., 2004). Las posiciones 2,4 en el anillo B o la 4 en el anillo A serían las más significativas para esta actividad (Akhtar et al., 2015; Khatib et al., 2005; Nerya et al., 2004). Según Kostopoulou y Detsi (Kostopoulou & Detsi, 2018) la clave estaría en los grupos donadores de electrones como -OMe o -OH en el anillo B que contribuirían de una forma más eficaz en la actividad inhibitoria que los grupos atrayentes de electrones. Tanto la estructura de la floretina como la de la neohesperidina dihidrochalcona cumplen estos requisitos para ser unos potenciales inhibidores de la enzima tirosinasa. Así, en este proyecto se utilizaron la floretina (NF02) y la neohesperidina dihidrochalcona (NHDC) debido a sus potenciales como antioxidantes y a una posible actividad despigmentante en su mezcla 1 a 1.

La actividad citotóxica de NF02 y NHDC reveló un poder citotóxico más alto en los melanocitos que en los queratinocitos y fibroblastos. Los melanocitos protegen a los queratinocitos epidérmicos y los fibroblastos dérmicos de la radiación UV, así como de agentes tóxicos ambientales a través de la síntesis de melanina. Sin embargo, la función y supervivencia de los melanocitos se regula por factores paracrinos, sintetizados principalmente por queratinocitos y fibroblastos, manteniendo así la homeostasis y regulando la respuesta al estrés de los melanocitos. En los cultivos en monocapa, los melanocitos carecen de este tipo de regulación ya que no disponen en su entorno de otros tipos celulares, por lo que su capacidad de sobrevivir queda reducida (Upadhyay et al., 2021). Por tanto, es posible que los melanocitos sufrieran más toxicidad debido a este hecho.

Estudios anteriores realizados por la empresa mostraron como la mezcla 1 a 1 de la NF02 y la NHDC mostraban más actividad antitirosinasa que los productos por separado. Por

esto, el propósito era estudiar en melanocitos la capacidad despigmentante de esta mezcla.

La floretina es una chalcona descrita por su potencial despigmentante entre otros (Minsat et al., 2021). De manera interesante, Chen y cols. (2020) describieron cómo posiblemente la floretina podía actuar tanto de sustrato como de inhibidor de la enzima tirosinasa. Así, mediante el estudio del espectro UV-visible, estos autores mostraron como la floretina se consumía a través del tiempo cuando estaba en contacto con la enzima tirosinasa, concretamente cuando la floretina se encontraba a bajas concentraciones ($<333,33 \mu\text{M}$). En cambio, observaron que a una concentración más alta de $666,67 \mu\text{M}$, prácticamente no había consumición. Por otra parte, los autores describieron mediante diferentes ensayos (espectrofluorimetría y método computacional de acoplamiento molecular) cómo la floretina podría generar un complejo con la tirosinasa, dónde la molécula se unía al sitio activo de la enzima cuando se encontraba a altas concentraciones. Este complejo comportaría cambios conformacionales de la tirosinasa afectando así a su actividad de convertir la L-Dopa a L-Dopaquinona. De esta manera, la floretina ejercería un tipo de inhibición no competitiva (Chen et al., 2020).

La neohesperidina dihidrochalcona es un glucósido de dihidrochalcona derivada de la neohesperidina, que se puede obtener de subproductos de cítricos utilizada especialmente como edulcorante no nutritivo (Douglas Kinghorn et al., 2010; Gascon, 2007). No existen estudios donde demuestren su actividad despigmentante, pero sí hay estudios previos que describen la actividad antitirosinasa de la neohesperidina (Chang, 2009; Itoh et al., 2009). Además, también hay productos y patentes que contienen neohesperidina dihidrochalcona como uno de sus activos despigmentantes (Yohue et al., 2018).

La actividad de inhibición de la actividad tirosinasa se estudió mediante una técnica *in chemico* obteniendo buenos resultados para la mezcla de NF02 y NHDC en proporción 1 a 1 a 2 mG/mL . A la concentración más baja de $0,1 \text{ mG/mL}$ ($182,31 \mu\text{M}$) la NF02 podría actuar, según Chen y cols. (2020), como sustrato de la tirosinasa, mientras que a las demás concentraciones la NF02 actuaría como inhibidora ($>911,55 \mu\text{M}$). Por otra parte, la mezcla a proporciones 2 a 3 de NHDC y NF02 mostró una actividad inhibitoria menor.

No obstante, la reacción de la tirosinasa con los productos de estudio proporcionó un color amarillo intenso, muy próximo al color marrón del final del ensayo que corresponde a la conversión de L-dopa a L-dopaquinona. Este color amarillo lo atribuimos principalmente a la interacción de la floretina con la tirosinasa. Creemos que esta interferencia, a pesar de haberse restado en los resultados finales, pudo haber enmascarado el resultado de inhibición obteniendo así un valor irreal de la inhibición de la tirosinasa.

Para proseguir con el estudio de despigmentación se empezó a optimizar dos ensayos diferentes con melanocitos B16F0. Esta línea celular se cultivó en DMEM suplementado al 10% de FBS tal y como indicaba el proveedor (ECACC). Los ensayos consistieron en estudiar la inhibición de tirosinasa celular y la reducción de producción de melanina en los melanocitos. A pesar de realizar diferentes cambios de medio y de densidad, incluso incorporando α -MSH para inducir melanogénesis, no se logró obtener buenos resultados con el control positivo de inhibición, el ácido kójico. La hipótesis principal es que la línea celular disponible (B16F0) había perdido su capacidad de pigmentación.

Los melanocitos pierden su capacidad de sintetizar melanina, por lo que requieren estimuladores de melanogénesis como la α -MSH (S. Chung et al., 2019). Así, la Dra. Bennet de la universidad de St. George en Londres, comenta que las células B16 cultivadas con DMEM van perdiendo su capacidad de pigmentación. Esto se debería a que este medio contiene un nivel alto de L-tirosina en su composición, un sustrato importante del proceso de melanogénesis. El fenotipo celular va cambiando cuando se cultiva y probablemente la expresión del MITF, factor clave en el proceso de melanogénesis, se vería modificado durante el proceso. Por este motivo se adquirió una nueva línea celular de melanocitos, la B16F10, en la que se comprobó el cambio a nivel de producción de melanina. Pasados unos días en cultivo, se observó como el medio adquiría un color marrón debido a la melanina producida. Además, la morfología entre ambas líneas celulares era diferente. En la línea B16F10 se observaban las dendritas típicas del proceso de pigmentación. El color de las muestras celulares obtenidas también corroboraba este hecho.

Debido a los inconvenientes surgidos en la optimización de este ensayo, la empresa subcontrató un estudio externo para estudiar el potencial de estos compuestos en

melanocitos primarios, hTERT (ANEXO 3). Las mezclas de los productos, tanto a proporción 1 a 1 como 2 a 3, no presentaron reducción de melanina al contrario que la floretina, la cual si mostró efecto despigmentante por sí sola.

El poder de inhibición de la NF02 podría ser debido a la cantidad de grupos hidroxilos que posee en los anillos aromáticos y, especialmente, a la posición de éstos. Tanto la posición 4' del anillo A como la posición 4 del anillo B presentan un grupo hidroxilo los cuales están descritos por su potencial para proporcionar a una molécula la capacidad de inhibir la tirosinasa. A pesar de que la NHDC posee grupos hidroxilos, estos se encuentran en las posiciones 2' y 6' del anillo A y en la posición 3 del anillo B por lo que, si tuviera efecto despigmentante, seguramente fuera más débil que la NF02. Sin embargo, si posee un grupo electro donador en la posición 4 del anillo B, aunque éste no sería tan importante para su efecto antitirosinasa.

Ambos productos absorben luz UVB en condiciones ácidas y básicas. En cambio, en condición de pH básico la NF02 absorbe UVA y UVC mientras que la NHDC absorbe UVA, por lo que posiblemente la desprotonación de los grupos de sus estructuras llevan a un cambio de comportamiento respecto a la absorbancia de luz UV.

El siguiente estudio, fue el ensayo de inhibición de ROS inducidas por luz UVA. Como este ensayo se iba a realizar en condiciones de pH neutro y, además, en el mercado existen diferentes formulaciones cosméticas que contienen estos productos, se consideró innecesario realizar estudios previos de fotoseguridad. Además, al final del ensayo se determinó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford, de manera que se descartó la mortalidad celular debida a una posible fototoxicidad de los productos.

Comprobamos cómo la actividad antioxidante era mayor en la mezcla de los productos 1 a 1 que por sí solos, reduciendo la producción de ROS inducida por la luz UVA. Las chalconas, al poseer grupos arilo con sustituyentes -OH, son capaces de eliminar especies reactivas de oxígeno mediante el mecanismo de transferencia de átomos de hidrogeno, convirtiendo así sus grupos hidroxilos en radicales fenoxi. En consecuencia, la NF02 y la NHDC probablemente estarían eliminando las ROS a través de este mecanismo (Lahsani et al., 2014). Además, ambos están descritos por sus actividades

antioxidantes. La NF02, debido a sus grupos -OH del anillo A según Rezk y cols. (2002) (Rezk et al., 2002), ha demostrado en diferentes estudios tener la capacidad de eliminar radicales hidroxilos, radicales libres estables como el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el peroxinitrito y de prevenir la peroxidación lipídica (Minsat et al., 2021). Además, también se ha observado como aumentaba la actividad de Nrf2, SOD, GSH, CAT y GPx (de Oliveira, 2016). Por su parte, en un estudio de Choi y cols. (2007) (J.-M. Choi et al., 2007) la NHDC mostró actividad de eliminación de radicales y especies de oxígeno como $\cdot\text{ABTS}^+$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 y HOCl *in vitro*. También puede inhibir el DPPH, la peroxidación lipídica y la actividad de la xantina oxidasa (Nakamura et al., 2003; Suarez et al., 1998).

A pesar de que la mezcla de NF02 y NHDC no proporciona actividad despigmentante, sí podría ser de gran ayuda en casos dónde la melanogénesis se produjera por el incremento de ROS inducido por la luz UVA. La acumulación de los niveles de ROS activa la enzima tirosinasa a través de la movilización de la hormona estimulante de los melanocitos α en la epidermis estimulando a los melanocitos la producción de melanina (Y. Wang et al., 2018). Por otra parte, las ROS también estimulan la melanogénesis a través de la activación de la proteína p53 en los queratinocitos (Hseu et al., 2021). Además, Wang y cols. (2018) (Y. Wang et al., 2018) sugirieron que la combinación de productos antioxidantes y de productos con actividad antitirosinasa podrían mantener un importante efecto sinérgico cuando son combinados, aumentando así la eficacia entre ambos procesos.

6. CONCLUSIONES

Respecto a los objetivos planteados para los filtros UV SMART “A” y “B”, se concluye que:

1. Los filtros UV “A” y “B” presentan una elevada citotoxicidad en las condiciones ensayadas.
2. Las cápsulas R_20 se degradan o liberan “A”, aunque es necesario realizar ensayos analíticos posteriores para determinar los compuestos en el lixiviado.
3. Hay que optimizar o cambiar el proceso de síntesis de las cápsulas de “A” R_41 para conseguir un producto con mejores propiedades cosméticas y galénicas, no solo con el fin de obtener fórmulas de aplicación fácil y agradable, sino también para una óptima fotoestabilidad.
4. La adición de cápsulas de “A” a la fórmula solar incrementa el UVA-PF ofreciendo una mejor protección en la región UVA, pero no mejora el SPF y empeora la fotoestabilidad de la fórmula solar. Por ello, se sugiere que es necesario estudiar la combinación ideal de cápsulas con filtros solares comerciales que proporcione una óptima fotoestabilidad final.
5. La adición de cápsulas “A” a formulaciones con filtros comerciales, no mejora su capacidad protectora según los resultados de citotoxicidad y formación de dímeros de timina. Sin embargo, la adición de lignina mejora significativamente la fotoactivación de “A”, según los datos de UVA-PF, SPF y la disminución de la toxicidad frente a luz UV.
6. La presencia de espongiosis en los tejidos tratados con las fórmulas con cápsulas de “A” con y sin lignina e irradiados, se puede atribuir al empeoramiento de la fotoestabilidad de ambas fórmulas solares.

De los objetivos planteados para la evaluación de Floretina y Neohesperidina Dihidrochalcona se concluye que:

7. La mezcla de Floretina y Neohesperidina Dihidrochalcona en relación 1 a 1 no presenta actividad despigmentante en las condiciones ensayadas. No obstante, esta mezcla si ofrece una actividad antioxidante que es superior a la presentada por los compuestos por sí solos. Esta actividad sugiere su potencial uso en productos cosméticos antienvjecimiento.

8. La utilización de melanocitos murinos B16F10 para evaluar la capacidad inhibitoria de la tirosinasa, presenta aspectos críticos para ser de utilidad. Específicamente, es de suma importancia la elección del medio de cultivo y el número de pase celular para preservar la capacidad de estos melanocitos para sintetizar melanina.

7.REFERENCIAS

A

- Agarwal, N. (2018). Photocarcinogenesis and Molecular Mechanism. In *Photocarcinogenesis & Photoprotection* (pp. 29–44). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5493-8_4
- Ahmad, N., Gilliam, A. C., Katiyar, S. K., O'Brien, T. G., & Mukhtar, H. (2001). A Definitive Role of Ornithine Decarboxylase in Photocarcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, *159*(3), 885–892. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61764-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61764-6)
- Ahmad, S. I. (Ed.). (2017). *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* (Vol. 996). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5>
- Ainbinder, D., & Touitou, E. (2010). Skin Photodamage Prevention: State of the Art and New Prospects. In *Textbook of Aging Skin* (pp. 429–440). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89656-2_44
- Akhtar, M. N., Sakeh, N. M., Zareen, S., Gul, S., Lo, K. M., Ul-Haq, Z., Shah, S. A. A., & Ahmad, S. (2015). Design and synthesis of chalcone derivatives as potent tyrosinase inhibitors and their structural activity relationship. *Journal of Molecular Structure*, *1085*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.12.073>
- Alansari, W. S., & Eskandrani, A. A. (2020). The Anticarcinogenic Effect of the Apple Polyphenol Phloretin in an Experimental Rat Model of Hepatocellular Carcinoma. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *45*(6), 4589–4597. <https://doi.org/10.1007/s13369-020-04478-7>
- Ali, S. M., Bonnier, F., Ptasinski, K., Lambkin, H., Flynn, K., Lyng, F. M., & Byrne, H. J. (2013). Raman spectroscopic mapping for the analysis of solar radiation induced skin damage. *The Analyst*, *138*(14), 3946. <https://doi.org/10.1039/c3an36617k>
- Ambrogi, V., Latterini, L., Marmottini, F., Pagano, C., & Ricci, M. (2013). Mesoporous Silicate MCM-41 as a Particulate Carrier for Octyl Methoxycinnamate: Sunscreen Release and Photostability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *102*(5), 1468–1475. <https://doi.org/10.1002/jps.23478>
- Amer, M., & Metwalli, M. (2000). Topical liquiritin improves melasma. *International Journal of Dermatology*, *39*(4), 299–301. <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2000.00943.x>
- An, K. P., Athar, M., Tang, X., Katiyar, S. K., Russo, J., Beech, J., Aszterbaum, M., Kopelovich, L., Epstein, E. H., Mukhtar, H., & Bickers, D. R. (2007). Cyclooxygenase-2 Expression in Murine and Human Nonmelanoma Skin Cancers: Implications for Therapeutic Approaches. *Photochemistry and Photobiology*, *76*(1), 73–80. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760073CEIMAH2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760073CEIMAH2.0.CO2)
- Andres, E., Barry, M., Hundt, A., Dini, C., Corsini, E., Gibbs, S., Roggen, E. L., & Ferret, P.-J. (2017). Preliminary performance data of the RHE/IL-18 assay performed on

- SkinEthic™ RHE for the identification of contact sensitizers. *International Journal of Cosmetic Science*, 39(2), 121–132. <https://doi.org/10.1111/ics.12355>
- Antoniou, C., Kosmadaki, M. G., Stratigos, A. J., & Katsambas, A. D. (2010). Photoaging. *American Journal of Clinical Dermatology*, 11(2), 95–102. <https://doi.org/10.2165/11530210-000000000-00000>
- Antoniou, C., Kosmadaki, M., Stratigos, A., & Katsambas, A. (2008). Sunscreens - what's important to know. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2008.02580.x>
- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, 32(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
- Armstrong, B. K., & Kricger, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1–3), 8–18. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00198-1)
- Ashooriha, M., Khoshneviszadeh, M., Khoshneviszadeh, M., Moradi, S. E., Rafiei, A., Kardan, M., & Emami, S. (2019). 1,2,3-Triazole-based kojic acid analogs as potent tyrosinase inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic Chemistry*, 82, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.069>
- Ashton, K. J., Griffiths, L. R., Weinstein, S. R., & Maguire, D. J. (2001). Molecular Cytogenetic Analysis of Basal Cell Carcinoma DNA Using Comparative Genomic Hybridization. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(3), 683–686. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01434.x>
- Athar, M., An, K. P., Morel, K. D., Kim, A. L., Aszterbaum, M., Longley, J., Epstein, E. H., & Bickers, D. R. (2001). Ultraviolet B (UVB)-Induced COX-2 Expression in Murine Skin: An Immunohistochemical Study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(4), 1042–1047. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4201>
- B**
- Bacqueville, D., & Mavon, A. (2009). Comparative analysis of solar radiation-induced cellular damage between *ex vivo* porcine skin organ culture and *in vitro* reconstructed human epidermis. *International Journal of Cosmetic Science*, 31(4), 293–302. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00506.x>
- Bae-Harboe, Y.-S. C., & Park, H.-Y. (2012). Tyrosinase: A Central Regulatory Protein for Cutaneous Pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 2678–2680. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.324>
- Baker, T. J., Tyler, C. R., & Galloway, T. S. (2014). Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>

- Bakshi, A., Shafi, R., Nelson, J., Cantrell, W. C., Subhadarshani, S., Andea, A., Athar, M., & Elmets, C. A. (2020). The clinical course of actinic keratosis correlates with underlying molecular mechanisms. *British Journal of Dermatology*, *182*(4), 995–1002. <https://doi.org/10.1111/bjd.18338>
- Banavase Channakeshavaiah, R., & Andanooru Chandrappa, N. K. (2020). Topical metformin in the treatment of melasma: A preliminary clinical trial. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *19*(5), 1161–1164. <https://doi.org/10.1111/jocd.13145>
- Bandyopadhyay, D. (2009). Topical treatment of melasma. *Indian Journal of Dermatology*, *54*(4), 303. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.57602>
- Baranska, A., Shawket, A., Jouve, M., Baratin, M., Malosse, C., Voluzan, O., Manh, T. P. V., Fiore, F., Bajénoff, M., Benaroch, P., Dalod, M., Malissen, M., Henri, S., & Malissen, B. (2018). Unveiling skin macrophage dynamics explains both tattoo persistence and strenuous removal. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20171608>
- Bauer, D., Averett, L. A., de Smedt, A., Kleinman, M. H., Muster, W., Pettersen, B. A., & Robles, C. (2014). Standardized UV–vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *68*(1), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.11.007>
- Bernerd, F., Passeron, T., Castiel, I., & Marionnet, C. (2022). The Damaging Effects of Long UVA (UVA1) Rays: A Major Challenge to Preserve Skin Health and Integrity. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 23, Issue 15). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms23158243>
- Boukamp, P. (2005). Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis*, *26*(10), 1657–1667. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi123>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Buckman, S. (1998). COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*, *19*(5), 723–729. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.5.723>

C

- cancer.org. (2019). *What Are Basal and Squamous Cell Skin Cancers?. Type of Skin Cancers.*
- Carbone, S., Szwarcfarb, B., Reynoso, R., Ponzo, O., Cardoso, N., Ale, E., Moguilevsky, J., & Scacchi, P. (2010). In Vitro Effect of Octyl – Methoxycinnamate (OMC) on the Release of Gn-RH and Amino Acid Neurotransmitters by Hypothalamus of Adult

- Rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 118(05), 298–303. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1224153>
- Cataisson, C., Joseloff, E., Murillas, R., Wang, A., Atwell, C., Torgerson, S., Gerdes, M., Subleski, J., Gao, J.-L., Murphy, P. M., Wiltrout, R. H., Vinson, C., & Yuspa, S. H. (2003). Activation of Cutaneous Protein Kinase α Induces Keratinocyte Apoptosis and Intraepidermal Inflammation by Independent Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*, 171(5), 2703–2713. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2703>
- Chang, T.-S. (2009). An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440–2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Chen, J., Li, Q., Ye, Y., Huang, Z., Ruan, Z., & Jin, N. (2020). Phloretin as both a substrate and inhibitor of tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 226, 117642. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117642>
- Choi, J.-M., Yoon, B.-S., Lee, S.-K., Hwang, J.-K., & Ryang, R. (2007). Antioxidant Properties of Neohesperidin Dihydrochalcone: Inhibition of Hypochlorous Acid-Induced DNA Strand Breakage, Protein Degradation, and Cell Death. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(2), 324–330. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.324>
- Choi, S., Yu, S., Lee, J., & Kim, W. (2021). Effects of Neohesperidin Dihydrochalcone (NHDC) on Oxidative Phosphorylation, Cytokine Production, and Lipid Deposition. *Foods*, 10(6), 1408. <https://doi.org/10.3390/foods10061408>
- Choi, Y. K., Rho, Y. K., Yoo, K. H., Lim, Y. Y., Li, K., Kim, B. J., Seo, S. J., Kim, M. N., Hong, C. K., & Kim, D.-S. (2010). Effects of vitamin C vs. multivitamin on melanogenesis: comparative study *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Dermatology*, 49(2), 218–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04336.x>
- Chung, J. H., Seo, J. Y., Choi, H. R., Lee, M. K., Youn, C. S., Rhie, G., Cho, K. H., Kim, K. H., Park, K. C., & Eun, H. C. (2001). Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin *In Vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(5), 1218–1224. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01544.x>
- Chung, S., Lim, G. J., & Lee, J. Y. (2019). Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture. *Scientific Reports*, 9(1), 780. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37055-y>
- Clarkson-Bennett, H. (2022). *Cosmetic Animal Testing Around The World*. Red Orange Peach. *Red Orange Peach*. Available at: <https://redorangepeach.com/animal-cruelty/around-the-world/> (Accessed: October 17, 2022).
- Coelho, S. G., Choi, W., Brenner, M., Miyamura, Y., Yamaguchi, Y., Wolber, R., Smuda, C., Batzer, J., Kolbe, L., Ito, S., Wakamatsu, K., Zmudzka, B. Z., Beer, J. Z., Miller, S. A., & Hearing, V. J. (2009). Short- and Long-Term Effects of UV Radiation on the Pigmentation of Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14(1), 32–35. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.10>

- Costin, G.-E., & Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal*, *21*(4), 976–994. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6649rev>
- Cottrez, F., Boitel, E., Auriault, C., Aeby, P., & Groux, H. (2015). Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicology in Vitro*, *29*(4), 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.012>
- Cottrez, F., Boitel, E., Ourlin, J.-C., Peiffer, J.-L., Fabre, I., Henaoui, I.-S., Mari, B., Vallauri, A., Paquet, A., Barbry, P., Auriault, C., Aeby, P., & Groux, H. (2016). SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicology in Vitro*, *32*, 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.007>
- D**
- Dannenbergh, A. J., & Subbaramaiah, K. (2003). Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia. *Cancer Cell*, *4*(6), 431–436. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00310-6)
- David Weedon. (2010). The spongiotic reaction pattern. In *Skin Pathology* (3rd ed., pp. 93–122). Churchill Livingstone.
- Daya-Grosjean, L. (2008). Xeroderma Pigmentosum and Skin Cancer. In *Molecular Mechanisms of Xeroderma Pigmentosum* (pp. 19–27). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09599-8_3
- de Jager, T. L., Cockrell, A. E., & du Plessis, S. S. (2017). *Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species* (pp. 15–23). https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2
- de Oliveira, M. R. (2016). Phloretin-induced cytoprotective effects on mammalian cells: A mechanistic view and future directions. *BioFactors*, *42*(1), 13–40. <https://doi.org/10.1002/biof.1256>
- Dehdashtian, A., Stringer, T. P., Warren, A. J., Mu, E. W., Amirlak, B., & Shahabi, L. (2018). Anatomy and Physiology of the Skin. In *Melanoma* (pp. 15–26). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78310-9_2
- del Bino, S., Ito, S., Sok, J., Nakanishi, Y., Bastien, P., Wakamatsu, K., & Bernerd, F. (2015). Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *28*(6), 707–717. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12410>
- Denef, N., Neubüser, D., Perez, L., & Cohen, S. M. (2000). Hedgehog Induces Opposite Changes in Turnover and Subcellular Localization of Patched and Smoothed. *Cell*, *102*(4), 521–531. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00056-8)

- Deo, K., Dash, K., Sharma, Y., Virmani, N., & Oberai, C. (2013). Kojic acid vis-a-vis its combinations with hydroquinone and betamethasone valerate in melasma: A randomized, single blind, comparative study of efficacy and safety. *Indian Journal of Dermatology*, *58*(4), 281. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.113940>
- Diffey, B. (2017). *Sun Protection: A risk management approach*. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1377-3>
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Douglas Kinghorn, A., Chin, Y.-W., Pan, L., & Jia, Z. (2010). Natural Products as Sweeteners and Sweetness Modifiers. In *Comprehensive Natural Products II* (pp. 269–315). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00077-0>
- Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J., & Sage, E. (2003). Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation. *Biochemistry*, *42*(30), 9221–9226. <https://doi.org/10.1021/bi034593c>
- Driskell, R. R., Jahoda, C. A. B., Chuong, C.-M., Watt, F. M., & Horsley, V. (2014). Defining dermal adipose tissue. *Experimental Dermatology*, *23*(9), 629–631. <https://doi.org/10.1111/exd.12450>
- Dwivedi, A., Agarwal, N., Ray, L., & Tripathi, A. K. (2020). Skin aging & cancer: Ambient UV-R exposure. In *Skin Aging & Cancer: Ambient UV-R Exposure*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2541-0>

E

- Ebanks, J., Wickett, R., & Boissy, R. (2009). Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(9), 4066–4087. <https://doi.org/10.3390/ijms10094066>
- Egger, D., & Nebel, S. (2021). Introduction to 3D Cell Culture. In C. Kasper, Egger Dominik, & Antonina Lavrentieva (Eds.), *Basic Concepts on 3D Cell Culture* (pp. 1–26). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66749-8_1
- el Ghalbzouri, A., Jonkman, M. F., Dijkman, R., & Ponc, M. (2005). Basement Membrane Reconstruction in Human Skin Equivalents Is Regulated by Fibroblasts and/or Exogenously Activated Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *124*(1), 79–86. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23549.x>
- Elmets, C. A., Ledet, J. J., & Athar, M. (2014). Cyclooxygenases: Mediators of UV-Induced Skin Cancer and Potential Targets for Prevention. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(10), 2497–2502. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.192>
- Emnet, P., Gaw, S., Northcott, G., Storey, B., & Graham, L. (2015). Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two

- Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base. *Environmental Research*, 136, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.019>
- Ertam, I., Mutlu, B., Unal, I., Alper, S., Kivçak, B., & Ozer, O. (2008). Efficiency of ellagic acid and arbutin in melasma: A randomized, prospective, open-label study. *The Journal of Dermatology*, 35(9), 570–574. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2008.00522.x>
- Espinal-Perez, L. E., Moncada, B., & Castanedo-Cazares, J. P. (2004). A double-blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. *International Journal of Dermatology*, 43(8), 604–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02134.x>
- F**
- Fathiazad, F., & Afshar, J. (2004). An Investigation on Methylation Methods of Hesperidin. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 67–70.
- Fisher, G. J., Choi, H.-C., Bata-Csorgo, Z., Shao, Y., Datta, S., Wang, Z.-Q., Kang, S., & Voorhees, J. J. (2001). Ultraviolet Irradiation Increases Matrix Metalloproteinase-8 Protein in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(2), 219–226. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01432.x>
- Fisher, G. J., Datta, S., Wang, Z., Li, X.-Y., Quan, T., Chung, J. H., Kang, S., & Voorhees, J. J. (2000). c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *Journal of Clinical Investigation*, 106(5), 663–670. <https://doi.org/10.1172/JCI9362>
- Fivenson, D., Sabzevari, N., Qiblawi, S., Blitz, J., Norton, B. B., & Norton, S. A. (2021). Sunscreens: UV filters to protect us: Part 2-Increasing awareness of UV filters and their potential toxicities to us and our environment. In *International Journal of Women's Dermatology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 45–69). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.08.008>
- Fodor, L., & Dumitrascu, D. (2020). Skin Anatomy. In *Aesthetic Applications of Intense Pulsed Light* (pp. 1–12). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22829-3_1
- Freitas, J. v, Praça, F. S. G., Bentley, M. V. L. B., & Gaspar, L. R. (2015). Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. *International Journal of Pharmaceutics*, 484(1–2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.02.062>
- Fu, B., Li, H., Wang, X., Lee, F. S. C., & Cui, S. (2005). Isolation and Identification of Flavonoids in Licorice and a Study of Their Inhibitory Effects on Tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7408–7414. <https://doi.org/10.1021/jf051258h>

Fu, C., Chen, J., Lu, J., Yi, L., Tong, X., Kang, L., Pei, S., Ouyang, Y., Jiang, L., Ding, Y., Zhao, X., Li, S., Yang, Y., Huang, J., & Zeng, Q. (2020). Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Molecular Medicine Reports*.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10950>

G

Galibert, M.-D. (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *The EMBO Journal*, 20(17), 5022–5031. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.5022>

Ganguly, B., Hota, M., & Pradhan, J. (2022). *Skin Aging: Implications of UV Radiation, Reactive Oxygen Species and Natural Antioxidants*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.100102>

Garcia, S. N., Gutierrez, L., & McNulty, A. (2013). Real-time cellular analysis as a novel approach for *in vitro* cytotoxicity testing of medical device extracts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A(7), 2097–2106.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.34507>

Gascon, M. (2007). Masking agents for use in foods. In *Modifying Flavour in Food* (pp. 232–242). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845693367.232>

Gibbs, S., Corsini, E., Spiekstra, S. W., Galbiati, V., Fuchs, H. W., DeGeorge, G., Troese, M., Hayden, P., Deng, W., & Roggen, E. (2013). An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(2), 529–541. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.003>

Gibbs, S., van den Hoogenband, H. M., Kirtschig, G., Richters, C. D., Spiekstra, S. W., Breetveld, M., Scheper, R. J., & de Boer, E. M. (2006). Autologous full-thickness skin substitute for healing chronic wounds. *British Journal of Dermatology*, 155(2), 267–274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07266.x>

Goenka, S., Nagabhushanam, K., Majeed, M., & Simon, S. R. (2019). Calebin-A, a Curcuminoid Analog Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Mouse Melanoma Cells. *Cosmetics*, 6(3), 51. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6030051>

Graf, J. (2010). Antioxidants and Skin Care: The Essentials. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(1), 378–383. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181c2a571>

Grimes, P. E. (1995). Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Archives of Dermatology*, 131(12), 1453–1457.
<https://doi.org/10.1001/archderm.131.12.1453>

H

Halaban, R., Pomerantz, S. H., Marshall, S., Lambert, D. T., & Lerner, A. B. (1983). Regulation of tyrosinase in human melanocytes grown in culture. *Journal of Cell Biology*, 97(2), 480–488. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.480>

- Han, T. Y., Son, I. P., Jang, W. S., Chang, H. S., Kim, J. H., Sim, Y. H., Kim, D. H., Kim, B. J., Kim, M. N., Lee, H. K., Son, S. J., & Choi, B. S. (2011). Efficacy of hydrogel mask with 2% arbutin for melasma. *Korean Journal of Dermatology*.
- Hofseth, L. J., Saito, S., Hussain, S. P., Espey, M. G., Miranda, K. M., Araki, Y., Jhappan, C., Higashimoto, Y., He, P., Linke, S. P., Quezado, M. M., Zurer, I., Rotter, V., Wink, D. A., Appella, E., & Harris, C. C. (2003). Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(1), 143–148. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237083100>
- Holbech, H., Nørum, U., Korsgaard, B., & Bjerregaard, P. (2008). The Chemical UV-Filter 3-Benzylidene Camphor Causes an Oestrogenic Effect in an in vivo Fish Assay. *Pharmacology & Toxicology*, *91*(4), 204–208. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.auindex_1.x-i1
- Hseu, Y.-C., Vudhya Gowrisankar, Y., Wang, L.-W., Zhang, Y.-Z., Chen, X.-Z., Huang, P.-J., Yen, H.-R., & Yang, H.-L. (2021). The in vitro and in vivo depigmenting activity of pterostilbene through induction of autophagy in melanocytes and inhibition of UVA-irradiated α -MSH in keratinocytes via Nrf2-mediated antioxidant pathways. *Redox Biology*, *44*, 102007. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102007>
- Huang, Y., Law, J. C. F., Lam, T. K., & Leung, K. S. Y. (2021). Risks of organic UV filters: a review of environmental and human health concern studies. In *Science of the Total Environment* (Vol. 755). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142486>
- Huh, C. H., Seo, K. il, Park, J. Y., Lim, J. G., Eun, H. C., & Park, K. C. (2003). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin C iontophoresis in melasma. *Dermatology*. <https://doi.org/10.1159/000069943>
- Hunt, G., Kyne, S., Wakamatsu, K., Ito, S., & Thody, A. J. (1995). Nle4DPhe7 α -Melanocyte-Stimulating Hormone Increases the Eumelanin:Phaeomelanin Ratio in Cultured Human Melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *104*(1), 83–85. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12613565>
- Hussein, M. R., Haemel, A. K., & Wood, G. S. (2003). p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. *European Journal of Cancer Prevention*, *12*(2), 93–100. <https://doi.org/10.1097/00008469-200304000-00002>
- I
- Imokawa, G., Yada, Y., & Kimura, M. (1996). Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochemical Journal*, *314*(1), 305–312. <https://doi.org/10.1042/bj3140305>
- Issa, M. C. A., & Tamura, B. (Eds.). (2017). *Daily Routine in Cosmetic Dermatology* (Vol. 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12589-3>

Itoh, K., Hirata, N., Masuda, M., Naruto, S., Murata, K., Wakabayashi, K., & Matsuda, H. (2009). Inhibitory Effects of Citrus hassaku Extract and Its Flavanone Glycosides on Melanogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(3), 410–415. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.410>

J

Jablonski, N. G., & Chaplin, G. (2010). Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(supplement_2), 8962–8968. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914628107>

Janjua, N. R., Mogensen, B., Andersson, A.-M., Petersen, J. H., Henriksen, M., Skakkebaek, N. E., & Wulf, H. C. (2004). Systemic Absorption of the Sunscreens Benzophenone-3, Octyl-Methoxycinnamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene) Camphor After Whole-Body Topical Application and Reproductive Hormone Levels in Humans. *Journal of Investigative Dermatology*, 123(1), 57–61. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22725.x>

Jimbrow, K., Obata, H., Pathak, M. A., & Fitzpatrick, T. B. (1974). Mechanism of Depigmentation by Hydroquinone. *Journal of Investigative Dermatology*, 62(4), 436–449. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12701679>

Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A., & García-Borrón, J. C. (1994). A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *The Journal of Biological Chemistry*, 269(27), 17993–18000.

Joffe, R., Plaza, J. A., & Kajoian, A. (2020). Tip Chapter: Histology and Physiology of the Skin. In *Minimally Invasive Aesthetic Procedures* (pp. 179–192). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78265-2_26

Jumina, Harizal, & Steven Kurniawan, Y. (2021). Chalcones in Dermatology. In *Beauty - Cosmetic Science, Cultural Issues and Creative Developments*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91145>

K

Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology : EJD*, 12(4), 390–399; quiz 400–401.

Karlsson, I., Hillerström, L., Stenfeldt, A.-L., Mårtensson, J., & Börje, A. (2009). Photodegradation of Dibenzoylmethanes: Potential Cause of Photocontact Allergy to Sunscreens. *Chemical Research in Toxicology*, 22(11), 1881–1892. <https://doi.org/10.1021/tx900284e>

Karsili, T. N. v., Marchetti, B., Ashfold, M. N. R., & Domcke, W. (2014). Ab Initio Study of Potential Ultrafast Internal Conversion Routes in Oxybenzone, Caffeic Acid, and Ferulic Acid: Implications for Sunscreens. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118(51), 11999–12010. <https://doi.org/10.1021/jp507282d>

- Keshaw, H., Forbes, A., & Day, R. M. (2005). Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials*, *26*(19), 4171–4179. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.021>
- Khatib, S., Nerya, O., Musa, R., Shmuel, M., Tamir, S., & Vaya, J. (2005). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *13*(2), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.010>
- Klammer, H., Schlecht, C., Wuttke, W., Schmutzler, C., Gotthardt, I., Kohrle, J., & Jarry, H. (2007). Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary–thyroid function in rats. *Toxicology*, *238*(2–3), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.06.088>
- Kostopoulou, I., & Detsi, A. (2018). Recent Developments on Tyrosinase Inhibitors based on the Chalcone and Aurone Scaffolds. *Current Enzyme Inhibition*, *14*(1), 3–17. <https://doi.org/10.2174/1573408013666170208102614>
- Krol, E. S., Kramer-Stickland, K. A., & Liebler, D. C. (2000). Photoprotective actions of topically applied vitamin e*. *Drug Metabolism Reviews*, *32*(3–4), 413–420. <https://doi.org/10.1081/DMR-100102343>
- Krutmann, J., & Merk, H. F. (Eds.). (2018). *Environment and Skin*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43102-4>
- Kucuk, O. S. (2018). Current Treatment Approaches for Melasma. *Bezmialem Science*, 54–62. <https://doi.org/10.14235/bs.2018.1155>

L

- Lahsasni, S. A., al Korbi, F. H., & Aljaber, N. A.-A. (2014). Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant activities of some novel chalcones analogues. *Chemistry Central Journal*, *8*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-32>
- Langton, A. K., Sherratt, M. J., Griffiths, C. E. M., & Watson, R. E. B. (2010). Review Article: A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing. *International Journal of Cosmetic Science*, *32*(5), 330–339. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00574.x>
- Lee, A. Y. (2014). An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatologica Sinica*, *32*(4), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2014.09.006>
- Lee, A.-Y., & Noh, M. (2013). The regulation of epidermal melanogenesis via cAMP and/or PKC signaling pathways: insights for the development of hypopigmenting agents. *Archives of Pharmacal Research*, *36*(7), 792–801. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0130-6>
- Lee, J. W., Ratnakumar, K., Hung, K., Rokunohe, D., & Kawasumi, M. (2020). Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer.

- Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 478–499.
<https://doi.org/10.1111/php.13245>
- Leveque, N., Muret, P., Makki, S., Mac-Mary, S., Kantelip, J. P., & Humbert, P. (2004). Ex vivo Cutaneous Absorption Assessment of a Stabilized Ascorbic Acid Formulation Using a Microdialysis System. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(6), 298–303.
<https://doi.org/10.1159/000081115>
- Leveque, N., Robin, S., Makki, S., Muret, P., Rougier, A., & Humbert, P. (2003). Iron and Ascorbic Acid Concentrations in Human Dermis with Regard to Age and Body Sites. *Gerontology*, 49(2), 117–122. <https://doi.org/10.1159/000067951>
- Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., & Herlyn, M. (2011). The Three-Dimensional Human Skin Reconstruct Model: a Tool to Study Normal Skin and Melanoma Progression. *Journal of Visualized Experiments*, 54. <https://doi.org/10.3791/2937>
- Li, Z. (2011). In Vitro Micro-Tissue and -Organ Models for Toxicity Testing. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 551–563). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00503-1>
- Liu, J., Chen, C., Wu, F., & Zhao, L. (2013). Microwave-Assisted Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Activity of Chalcone Derivatives. *Chemical Biology & Drug Design*, 82(1), 39–47. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12126>
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (2002). Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 581–593. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>
- Liu-Smith, F., Jia, J., & Zheng, Y. (2017). UV-Induced Molecular Signaling Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer (pp. 27–40).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_3
- Lodén, M., Beitner, H., Gonzalez, H., Edström, D. W., Åkerström, U., Austad, J., Buraczewska-Norin, I., Matsson, M., & Wulf, H. C. (2011). Sunscreen use: controversies, challenges and regulatory aspects. *British Journal of Dermatology*, 165(2), 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10298.x>

M

- Maddodi, N., Jayanthi, A., & Setaluri, V. (2012). Shining Light on Skin Pigmentation: The Darker and the Brighter Side of Effects of UV Radiation†. *Photochemistry and Photobiology*, 88(5), 1075–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01138.x>
- Maeda, H., Akai, T., & Segi, M. (2017). Photo-Fries rearrangement of 1-pyrenyl esters. *Tetrahedron Letters*, 58(46), 4377–4380.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.10.007>

- Maeda, K., & Fukuda, M. (1996). Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276(2), 765–769.
- Marionnet, C., Pierrard, C., Vioux-Chagnoleau, C., Sok, J., Asselineau, D., & Bernerd, F. (2006). Interactions between Fibroblasts and Keratinocytes in Morphogenesis of Dermal Epidermal Junction in a Model of Reconstructed Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(5), 971–979. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700230>
- Mazurek, K., & Pierzchała, E. (2016). Comparison of efficacy of products containing azelaic acid in melasma treatment. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(3), 269–282. <https://doi.org/10.1111/jocd.12217>
- McKeseey, J., Tovar-Garza, A., & Pandya, A. G. (2020). Melasma Treatment: An Evidence-Based Review. *American Journal of Clinical Dermatology*, 21(2), 173–225. <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00488-w>
- Mejía-Giraldo, J. C., Scaiano, J. C., Gallardo-Cabrera, C., & Puertas-Mejía, M. A. (2021). Photoprotection and photostability of a new lignin-gelatin-baccharis antioquensis-based hybrid biomaterial. *Antioxidants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antiox10121904>
- Meyskens Jr., F. L., Farmer, P., & Fruehauf, J. P. (2001). Redox Regulation in Human Melanocytes and Melanoma. *Pigment Cell Research*, 14(3), 148–154. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140303.x>
- Miao, F., Su, M.-Y., Jiang, S., Luo, L.-F., Shi, Y., & Lei, T.-C. (2019). Intramelanocytic Acidification Plays a Role in the Antimelanogenic and Antioxidative Properties of Vitamin C and Its Derivatives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/2084805>
- Minsat, L., Peyrot, C., Brunissen, F., Renault, J.-H., & Allais, F. (2021). Synthesis of Biobased Phloretin Analogues: An Access to Antioxidant and Anti-Tyrosinase Compounds for Cosmetic Applications. *Antioxidants*, 10(4), 512. <https://doi.org/10.3390/antiox10040512>
- Miyamura, Y., Coelho, S. G., Schlenz, K., Batzer, J., Smuda, C., Choi, W., Brenner, M., Passeron, T., Zhang, G., Kolbe, L., Wolber, R., & Hearing, V. J. (2011). The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(1), 136–147. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00764.x>
- Mohania, D., Chandel, S., Kumar, P., Verma, V., Digvijay, K., Tripathi, D., Choudhury, K., Mitten, S. K., & Shah, D. (2017). *Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism* (pp. 71–87). https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_7

Montaudié, H., Bertolotto, C., Ballotti, R., & Passeron, T. (2014). Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. *EMC - Dermatología*, 48(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(14\)66800-X](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(14)66800-X)

Monteiro, R., Kishore, Bn., Bhat, R., Sukumar, D., Martis, J., & Ganesh, Hk. (2013). A comparative study of the efficacy of 4% hydroquinone vs 0.75% Kojic acid cream in the treatment of facial melasma. *Indian Journal of Dermatology*, 58(2), 157. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.108070>

Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., & Douki, T. (2006a). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13765–13770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604213103>

N

Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H., & Osawa, T. (2003). Dihydrochalcones: Evaluation as Novel Radical Scavenging Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3309–3312. <https://doi.org/10.1021/jf0341060>

Narayanapillai, S., Agarwal, C., Tilley, C., & Agarwal, R. (2012). Silibinin Is a Potent Sensitizer of UVA Radiation-induced Oxidative Stress and Apoptosis in Human Keratinocyte HaCaT Cells†. *Photochemistry and Photobiology*, 88(5), 1135–1140. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01050.x>

Naylor, E. C., Watson, R. E. B., & Sherratt, M. J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*, 69(3), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.04.011>

Nerya, O., Musa, R., Khatib, S., Tamir, S., & Vaya, J. (2004). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, 65(10), 1389–1395. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.016>

Nogueira, D., Mitjans, M., Rolim, C., & Vinardell, M. (2014). Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies. *Nanomaterials*, 4(2), 454–484. <https://doi.org/10.3390/nano4020454>

Nordlund, J. J. (2007). The Melanocyte and the Epidermal Melanin Unit: An Expanded Concept. *Dermatologic Clinics*, 25(3), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.det.2007.04.001>

O

Oak, A. S. W., Athar, M., Yusuf, N., & Elmetts, C. A. (2018). UV and Skin: Photocarcinogenesis. In *Environment and Skin* (pp. 67–103). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43102-4_8

OECD (1981), Test No. 101: UV-VIS Absorption Spectra, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069503-en>.

Osmond, M. J., & Mccall, M. J. (2010). Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology*, 4(1), 15–41. <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>

P

Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J. B., & Beiras, R. (2014). Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. *Chemosphere*, 104, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.053>

Park, H.-Y., Wu, C., Yonemoto, L., Murphy-Smith, M., Wu, H., Stachur, C. M., & Gilchrist, B. A. (2006). MITF mediates cAMP-induced protein kinase C- β expression in human melanocytes. *Biochemical Journal*, 395(3), 571–578. <https://doi.org/10.1042/BJ20051388>

Parvez, S., Kang, M., Chung, H.-S., Cho, C., Hong, M.-C., Shin, M.-K., & Bae, H. (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research*, 20(11), 921–934. <https://doi.org/10.1002/ptr.1954>

Pekmezci, E. (2019). A novel triple combination in treatment of melasma: Significant outcome with far less actives. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(6), 1700–1704. <https://doi.org/10.1111/jocd.12904>

Pellevoisin, C., Lelièvre, D., Bataillon, M., Boyera, N., Rigaudeau, A., Ovigne, J., Besné, I., & Seyler, N. (2018). 1156 T-SKIN, a new industrial reconstructed human skin model for dermatological and cosmetics research and development. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(5), S196. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.03.1170>

Perwez Hussain, S., & Harris, C. C. (2006). p53 Biological Network: At the Crossroads of the Cellular-Stress Response Pathway and Molecular Carcinogenesis. *Journal of Nippon Medical School*, 73(2), 54–64. <https://doi.org/10.1272/jnms.73.54>

Picardo, M., & Carrera, M. (2007). New and Experimental Treatments of Cloasma and Other Hypermelanoses. *Dermatologic Clinics*, 25(3), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.det.2007.04.012>

Pillaiyar, T., Manickam, M., & Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. In *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882>

Pinak, M. (2006). Enzymatic recognition of radiation-produced oxidative DNA lesion. Molecular dynamics approach. In *Modern Methods for Theoretical Physical*

Chemistry of Biopolymers (pp. 191–210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452220-7/50074-5>

Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2016). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 868. <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>

Poljšak, B., & Dahmane, R. (2012). Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and Practice*, *2012*, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2012/135206>

Poon, F., Kang, S., & Chien, A. L. (2015). Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, *31*(2), 65–74. <https://doi.org/10.1111/phpp.12145>

Potard, G., Laugel, C., Schaefer, H., & Marty, J.-P. (2000). The Stripping Technique: In vitro Absorption and Penetration of Five UV Filters on Excised Fresh Human Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, *13*(6), 336–344. <https://doi.org/10.1159/000029941>

Q

Qian, Y., Qiu, X., & Zhu, S. (2015). Lignin: A nature-inspired sun blocker for broadspectrum Sunscreens. *Green Chemistry*, *17*(1), 320–324. <https://doi.org/10.1039/c4gc01333f>

Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. v., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*, *1*(1), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.005>

R

Rajanala, S., Maymone, M. B. de C., & Vashi, N. A. (2019). Melasma pathogenesis: a review of the latest research, pathological findings, and investigational therapies. *Dermatology Online Journal*, *25*(10). <https://doi.org/10.5070/D32510045810>

Ramadon, D., McCrudden, M. T. C., Courtenay, A. J., & Donnelly, R. F. (2022). Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Delivery and Translational Research*, *12*(4), 758–791. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00909-6>

Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. D. P. (2015). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, *230*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>

Ray, R. S., Haldar, C., Dwivedi, A., Agarwal, N., & Singh, J. (Eds.). (2018). *Photocarcinogenesis & Photoprotection*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5493-8>

- Regazzetti, C., de Donatis, G. M., Ghorbel, H. H., Cardot-Leccia, N., Ambrosetti, D., Bahadoran, P., Chignon-Sicard, B., Lacour, J.-P., Ballotti, R., Mahns, A., & Passeron, T. (2015). Endothelial Cells Promote Pigmentation through Endothelin Receptor B Activation. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(12), 3096–3104. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.332>
- Rezk, B. M., Haenen, G. R. M. M., van der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (2002). The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(1), 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00618-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00618-6)
- Ribeiro, C. S., Leal, F., & Jeunon, T. (2017). *Skin Anatomy, Histology, and Physiology* (pp. 3–14). https://doi.org/10.1007/978-3-319-12589-3_1
- Rigel, D. S., Weiss, R. A., Lim, H. W., & Dover, J. S. (Eds.). (2004). *Photoaging*. CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9780203913482>
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., & Leiros, I. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 981–993. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8736-z>
- Rodrigues Neves, C., & Gibbs, S. (2018). *Progress on Reconstructed Human Skin Models for Allergy Research and Identifying Contact Sensitizers* (pp. 103–129). https://doi.org/10.1007/82_2018_88
- Romero, C., Aberdam, E., Larnier, C., & Ortonne, J. P. (1994). Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation. Involvement of the melanogenic enzymes expression. *Journal of Cell Science*.
- Rozmer, Z., & Perjési, P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 15(1), 87–120. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9387-8>

S

- Sabzevari, N., Qiblawi, S., Norton, S. A., & Fivenson, D. (2021). Sunscreens: UV filters to protect us: Part 1: Changing regulations and choices for optimal sun protection. In *International Journal of Women's Dermatology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 28–44). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.05.017>
- Sadick, N., Edison, B. L., John, G., Bohnert, K. L., & Green, B. (2019). An Advanced, Physician-Strength Retinol Peel Improves Signs of Aging and Acne Across a Range of Skin Types Including Melasma and Skin of Color. *Journal of Drugs in Dermatology : JDD*, 18(9), 918–923.
- Saito, K., Nukada, Y., Takenouchi, O., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., & Nishiyama, N. (2013). Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicology in Vitro*, 27(8), 2213–2224. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.08.007>

- Sambandan, D. R., & Ratner, D. (2011). Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(4), 748–758. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.01.005>
- Sánchez-Quiles, D., Blasco, J., & Tovar-Sánchez, A. (2020). *Sunscreen Components Are a New Environmental Concern in Coastal Waters: An Overview* (pp. 1–14). https://doi.org/10.1007/698_2019_439
- Sarkar, R., Garg, V., Bansal, S., Sethi, S., & Gupta, C. (2016). Comparative Evaluation of Efficacy and Tolerability of Glycolic Acid, Salicylic Mandelic Acid, and Phytic Acid Combination Peels in Melasma. *Dermatologic Surgery*, 42(3), 384–391. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000642>
- Schallreuter, K. U., & Wood, J. W. (1990). A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Archives of Dermatological Research*, 282(3), 168–171. <https://doi.org/10.1007/BF00372617>
- Schlessinger, D. I., Anoruo, M., & Schlessinger, J. (2022, May 8). *Biochemistry, Melanin*. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerkel, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W., & Lichtensteiger, W. (2004). Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—an update. *Toxicology*, 205(1–2), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.043>
- Schneider, S., Deckardt, K., Hellwig, J., Küttler, K., Mellert, W., Schulte, S., & van Ravenzwaay, B. (2005). Octyl methoxycinnamate: Two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration. *Food and Chemical Toxicology*, 43(7), 1083–1092. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.02.013>
- Schneider, S. L., & Lim, H. W. (2019a). Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(1), 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.06.033>
- Schneider, S. L., & Lim, H. W. (2019b). A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide. In *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* (Vol. 35, Issue 6, pp. 442–446). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/phpp.12439>
- Scott, T. L., Christian, P. A., Kesler, M. v., Donohue, K. M., Shelton, B., Wakamatsu, K., Ito, S., & D’Orazio, J. (2012). Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation. *Experimental Dermatology*, 21(10), 771–777. <https://doi.org/10.1111/exd.12012>
- Serpone, N. (2021). Sunscreens and their usefulness: have we made any progress in the last two decades? *Photochemical and Photobiological Sciences*, 20(2), 189–244. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00013-1>

- Serpone, N., Salinaro, A., Emeline, A. v., Horikoshi, S., Hidaka, H., & Zhao, J. (2002). An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(12), 970. <https://doi.org/10.1039/b206338g>
- Serri, R., & Iorizzo, M. (2008). Cosmeceuticals: focus on topical retinoids in photoaging. *Clinics in Dermatology*, 26(6), 633–635. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.09.016>
- Shah, S., & Aurangabadkar, S. (2019). Laser toning in melasma. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 12(2), 76. https://doi.org/10.4103/JCAS.JCAS_179_18
- Singh, B., Malhotra, H., Kumar, D., Mujtaba, S. F., & Upadhyay, A. K. (2019). Understanding Cellular and Molecular Events of Skin Aging and Cancer: An Integrative Perspective. In *Skin Aging & Cancer* (pp. 11–28). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2541-0_2
- Singh, J., Chopra, D., Dwivedi, A., & Ray, R. S. (2018). Photoaging. In *Photocarcinogenesis & Photoprotection* (pp. 65–75). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5493-8_7
- Sklar, L. R., Almutawa, F., Lim, H. W., & Hamzavi, I. (2013). Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 12(1), 54–64. <https://doi.org/10.1039/C2PP25152C>
- Smijs, T., & Pavel. (2011). Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*, 95. <https://doi.org/10.2147/NSA.S19419>
- Spiekstra, S. W., Breetveld, M., Rustemeyer, T., Scheper, R. J., & Gibbs, S. (2007). Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Repair and Regeneration*, 15(5), 708–717. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00280.x>
- Spiekstra, S. W., Toebak, M. J., Sampat-Sardjoepersad, S., van Beek, P. J., Boorsma, D. M., Stoof, T. J., von Blomberg, B. M. E., Scheper, R. J., Bruynzeel, D. P., Rustemeyer, T., & Gibbs, S. (2005). Induction of cytokine (interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Experimental Dermatology*, 14(2), 109–116. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2005.00226.x>
- Suarez, J., Herrera, M. D., & Marhuenda, E. (1998). In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine*, 5(6), 469–473. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80044-5](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80044-5)
- Subhadarshani, S., Athar, M., & Elmets, C. A. (2020). Photocarcinogenesis. In *Current Dermatology Reports* (Vol. 9, Issue 3, pp. 189–199). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13671-020-00307-0>

Suman, G., & Suman, S. (2019). Ultraviolet Radiation-Induced Immunomodulation: Skin Ageing and Cancer. In *Skin Aging & Cancer* (pp. 47–58). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2541-0_5

Szwarcfarb, B., Carbone, S., Reynoso, R., Bollero, G., Ponzo, O., Moguilevsky, J., & Scacchi, P. (2008). Octyl-Methoxycinnamate (OMC), an Ultraviolet (UV) Filter, Alters LHRH and Amino Acid Neurotransmitters Release from Hypothalamus of Immature Rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *116*(02), 94–98. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1004589>

T

Tewari, A., Sarkany, R. P., & Young, A. R. (2012). UVA1 Induces Cyclobutane Pyrimidine Dimers but Not 6-4 Photoproducts in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(2), 394–400. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.283>

Tjiu, J.-W., Chen, J.-S., Shun, C.-T., Lin, S.-J., Liao, Y.-H., Chu, C.-Y., Tsai, T.-F., Chiu, H.-C., Dai, Y.-S., Inoue, H., Yang, P.-C., Kuo, M.-L., & Jee, S.-H. (2009). Tumor-Associated Macrophage-Induced Invasion and Angiogenesis of Human Basal Cell Carcinoma Cells by Cyclooxygenase-2 Induction. *Journal of Investigative Dermatology*, *129*(4), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.310>

Tjiu, J.-W., Liao, Y.-H., Lin, S.-J., Huang, Y.-L., Tsai, W.-L., Chu, C.-Y., Kuo, M.-L., & Jee, S.-H. (2006). Cyclooxygenase-2 Overexpression in Human Basal Cell Carcinoma Cell Line Increases Antiapoptosis, Angiogenesis, and Tumorigenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(5), 1143–1151. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700191>

Toossi, P., Esmaili-Azad, M., & Saeedi, M. (2013). Evaluation of Licorice efficacy on melasma. In *Iranian Journal of Dermatology*.

Tripathi, S. S., Singh, S., & Singh, A. K. (2019). Human Skin Stem Cells, Aging, and Possible Antiaging Strategies. In *Skin Aging & Cancer* (pp. 29–40). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2541-0_3

U

Unión Europea. (2009). *Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos, 2009*.

Upadhyay, P. R., Ho, T., & Abdel-Malek, Z. A. (2021). Participation of keratinocyte- and fibroblast-derived factors in melanocyte homeostasis, the response to UV, and pigmentary disorders. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *34*(4), 762–776. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12985>

Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., & Sariboyaci, A. E. (2018). Cell and tissue culture: The base of biotechnology. In *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life* (Vol. 1, pp. 391–429). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8>

V

- Van den Broek, L. (2012). Development, validation and testing of a human tissue engineered hypertrophic scar model. *ALTEX*, 29(4), 389–402. <https://doi.org/10.14573/altex.2012.4.389>
- Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J., Wang, Z., Datta, S. C., Fisher, G. J., & Voorhees, J. J. (2000). Vitamin A Antagonizes Decreased Cell Growth and Elevated Collagen-Degrading Matrix Metalloproteinases and Stimulates Collagen Accumulation in Naturally Aged Human Skin1. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 480–486. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00902.x>
- Verma, A. (2014). Animal Tissue Culture. In *Animal Biotechnology* (pp. 211–231). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00012-2>
- Videira, I. F. dos S., Moura, D. F. L., & Magina, S. (2013). Mechanisms regulating melanogenesis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(1), 76–83. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962013000100009>
- Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2017). Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18061219>

W

- Wang, N., Su, C., & Xiao, S. (2015). Interaction of Phenol Red with cetyltrimethylammonium bromide in aqueous solution. *Coloration Technology*, 131(6), 434–438. <https://doi.org/10.1111/cote.12183>
- Wang, J. v, Schoenberg, E., & Saedi, N. (2019). Bakuchiol as a Trendy Ingredient in Skincare: Recent Evidence. *Skinmed*, 17(3), 188–189.
- Wang, Y., Hao, M.-M., Sun, Y., Wang, L.-F., Wang, H., Zhang, Y.-J., Li, H.-Y., Zhuang, P.-W., & Yang, Z. (2018). Synergistic Promotion on Tyrosinase Inhibition by Antioxidants. *Molecules*, 23(1), 106. <https://doi.org/10.3390/molecules23010106>
- Wheeler, D. L., Martin, K. E., Ness, K. J., Li, Y., Dreckschmidt, N. E., Wartman, M., Ananthaswamy, H. N., Mitchell, D. L., & Verma, A. K. (2004). Protein Kinase C ϵ Is an Endogenous Photosensitizer That Enhances Ultraviolet Radiation-Induced Cutaneous Damage and Development of Squamous Cell Carcinomas1. *Cancer Research*, 64(21), 7756–7765. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1881>

Y

- Yadav, N., & Banerjee, M. (2018). Molecular and Genetic Response of Human Skin Under Ultraviolet Radiation. In *Photocarcinogenesis & Photoprotection* (pp. 15–27). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5493-8_3

- Yadav, N., Parveen, S., Chakravarty, S., & Banerjee, M. (2019). Skin Anatomy and Morphology. In *Skin Aging & Cancer* (pp. 1–10). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2541-0_1
- Youge, W., Yecheng, X., Qiaoli, G. & Shenke, L. (2018). *Whitening and skin-protecting facial mask mud and preparation method thereof* (Patent No. CN108309821A).
- Yuan, S., Huang, J., Jiang, X., Huang, Y., Zhu, X., & Cai, Z. (2022). Environmental Fate and Toxicity of Sunscreen-Derived Inorganic Ultraviolet Filters in Aquatic Environments: A Review. In *Nanomaterials* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano12040699>

Z

- Zastrow, L., Groth, N., Klein, F., Kockott, D., Lademann, J., Renneberg, R., & Ferrero, L. (2009). The Missing Link – Light-Induced (280–1,600 nm) Free Radical Formation in Human Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(1), 31–44. <https://doi.org/10.1159/000188083>
- Zhang, Y., Newton, B., Lewis, E., Fu, P. P., Kafoury, R., Ray, P. C., & Yu, H. (2015). Cytotoxicity of organic surface coating agents used for nanoparticles synthesis and stability. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 762–768. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.01.017>
- Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews*, 117(12), 7762–7810. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>

8. ANEXOS

ANEXO 1. Composición de las fórmulas solares

Composición de la fórmula **CAP-006-001** con filtros comerciales. Fase A y B (Fase acuosa), Fase C (Fase Oleosa), Fase D (Ajuste pH), Fase E (Margen de agua):

Fase	Nombre comercial	INCI	Fabricante	Función	Cantidad (% p/p)
A	Deionized Water	Water (Aqua)	-	Solvente	22,60%
A	Bentone Hydroclay 2000	Hectorite	Elementis	Suspensor	0,50%
B	Glicerina Vegetal EP E422	Glycerin	Escuder	Humectante	2,00%
B	EDETA® BD	Disodium EDTA	BASF	Quelante	0,10%
B	Cosphaderm X34	Xanthan Gum	Cosphatech	Suspensor	0,30%
B	Euxyl PE9010	Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	Schulke	Conservante	1,00%
C	Parsol 340	Octocrylene	Merck	Filtro UVB	5,00%
C	Eusolex OS	Ethylhexyl salicylate	Merck	Filtro UVB	5,00%
C	Neoheliopan HMS	Homosalate	Symrise	Filtro UVB	7,00%
C	Xtend 226	Phenetyl Benzoate	Ashland	Emoliente	3,00%
C	NeoHeliopan BMT	Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	Symrise	Filtro UVAB	1,00%
C	Uvinul T150	Ethylhexyl Triazone	BASF	Filtro UVB	4,00%
C	Uvinul A plus granular	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	BASF	Filtro UVB	1,00%
C	Lanette O	Cetearyl Alcohol	BASF	Emulsionante/Factor de consistencia	2,50%
C	Tegocare 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	Evonik	Emulsionante	1,00%
C	TegoCare 450	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	Evonik	Emulsionante	1,00%
C	Amphisol K	Potassium Cetyl Phosphate	DSM	Emulsionante	0,50%
C	Dermofeel Toco 70 non GMO	Tocopherol (and) Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil	Evonik	Antioxidante	0,50%
D	Deionized Water	Water (Aqua)	Solución de ácido cítrico al 10%	Ajuste pH	0,11%
D	Citric Acid	Citric Acid			0,01%
E	Deionized Water	Water (Aqua)	-	Margen de agua final	41,88%
TOTAL					100,00%

Composición de la fórmula **CAP-006-002** con las cápsulas de “A” R_41. Fase A y B (Fase acuosa), Fase C (Fase Oleosa), Fase D (Dispersión cápsulas), Fase E (Ajuste pH), Fase F (Margen de agua):

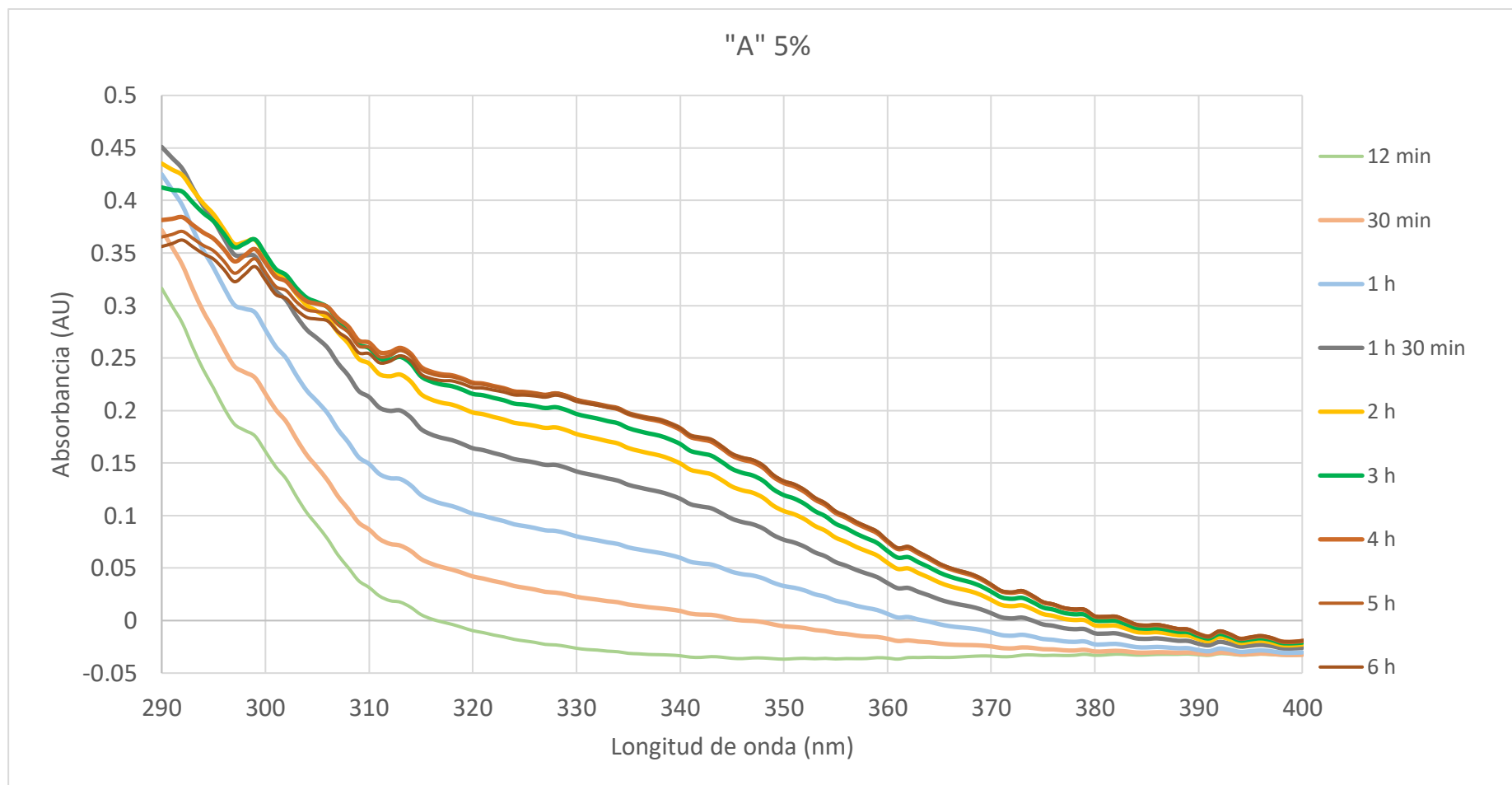
Fase	Nombre comercial	INCI	Fabricante	Función	Cantidad (% p/p)
A	Deionized Water	Water (Aqua)	-	Solvente	22,60%
A	Bentone Hydroclay 2000	Hectorite	Elementis	Suspensor	0,50%
B	Glicerina Vegetal EP E422	Glycerin	Escuder	Humectante	2,00%
B	EDETA® BD	Disodium EDTA	BASF	Quelante	0,10%
B	Cosphaderm X34	Xanthan Gum	Cosphatech	Suspensor	0,30%
B	Euxyl PE9010	Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	Schulke	Conservante	1,00%
C	Parsol 340	Octocrylene	Merck	Filtro UVB	5,00%
C	Eusolex OS	Ethylhexyl salicylate	Merck	Filtro UVB	5,00%
C	Neoheliopan HMS	Homosalate	Symrise	Filtro UVB	7,00%
C	Xtend 226	Phenetyl Benzoate	Ashland	Emoliente	3,00%
C	NeoHeliopan BMT	Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	Symrise	Filtro UVAB	1,00%
C	Uvinul T150	Ethylhexyl Triazone	BASF	Filtro UVB	4,00%
C	Uvinul A plus granular	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	BASF	Filtro UVB	1,00%
C	Lanette O	Cetearyl Alcohol	BASF	Emulsionante/Factor de consistencia	2,50%
C	Tegocare 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	Evonik	Emulsionante	1,00%
C	TegoCare 450	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	Evonik	Emulsionante	1,00%
C	Amphisol K	Potassium Cetyl Phosphate	DSM	Emulsionante	0,50%
C	Dermofeel Toco 70 non GMO	Tocopherol (and) Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil	Evonik	Antioxidante	0,50%
D	Capsules R_41	“A”, ...	Roka Furadada	Filtro UV	40,00%
E	Deionized Water	Water (Aqua)	Solución de ácido cítrico al 10%	Ajuste de pH	0,95%
E	Citric Acid	Citric Acid			0,11%
F	Deionized Water	Water (Aqua)	-	Margen de agua final	0,94%
TOTAL					100,00%

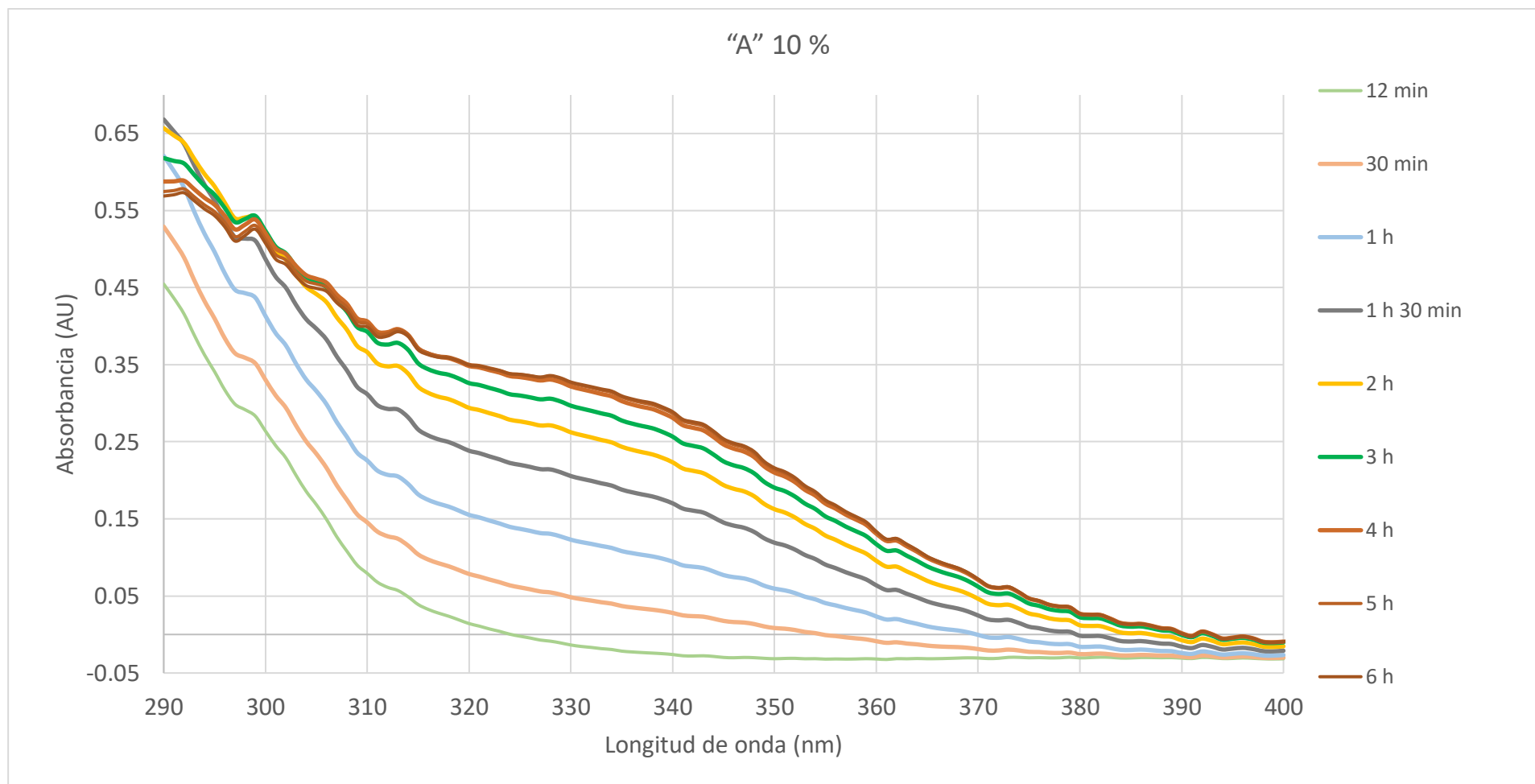
Composición de la fórmula **CAP-006-008** con las cápsulas de "A" R_41 y Lignina. Fase A y B (Fase acuosa), Fase C (Fase Oleosa), Fase D (Dispersión cápsulas), Fase E (Ajuste pH), Fase F (Margen de agua) y Fase G (Incorporación Lignina):

Fase	Nombre comercial	INCI	Fabricante	Función	Cantidad (% p/p)
A	Deionized Water	Water (Aqua)	-	Solvente	22,60%
A	Bentone Hydroclay 2000	Hectorite	Elementis	Suspensor	0,50%
B	Glicerina Vegetal EP E422	Glycerin	Escuder	Humectante	2,00%
B	EDETA® BD	Disodium EDTA	BASF	Quelante	0,10%
B	Cosphaderm X34	Xanthan Gum	Cosphatech	Suspensor	0,30%
B	Euxyl PE9010	Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	Schulke	Conservante	1,00%
C	Parsol 340	Octocrylene	Merck	Filtro UVB	5,00%
C	Eusolex OS	Ethylhexyl salicylate	Merck	Filtro UVB	5,00%
C	Neoheliopan HMS	Homosalate	Symrise	Filtro UVB	7,00%
C	Xtend 226	Phenetyl Benzoate	Ashland	Emoliente	3,00%
C	NeoHeliopan BMT	Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	Symrise	Filtro UVAB	1,00%
C	Uvinul T150	Ethylhexyl Triazone	BASF	Filtro UVB	4,00%
C	Uvinul A plus granular	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	BASF	Filtro UVB	1,00%
C	Lanette O	Cetearyl Alcohol	BASF	Emulsionante/Factor de consistencia	2,50%
C	Tegocare 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	Evonik	Emulsionante	1,00%
C	TegoCare 450	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	Evonik	Emulsionante	1,00%
C	Amphisol K	Potassium Cetyl Phosphate	DSM	Emulsionante	0,50%
C	Dermofeel Toco 70 non GMO	Tocopherol (and) Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil	Evonik	Antioxidante	0,50%
D	Capsules R_41	"A", ...	Roka Furadada	Filtro UV	40,00%
E	Deionized Water	Water (Aqua)	Solución de ácido cítrico al 10%	Ajuste de pH	0,95%
E	Citric Acid	Citric Acid			0,11%
F	Deionized Water	Water (Aqua)	-	Margen de agua final	0,94%
G	XXXXX	Lignin	XXXXXX	Booster	3,00 %
TOTAL					103,00%

ANEXO 2. Absorbancia del filtro UV "A"

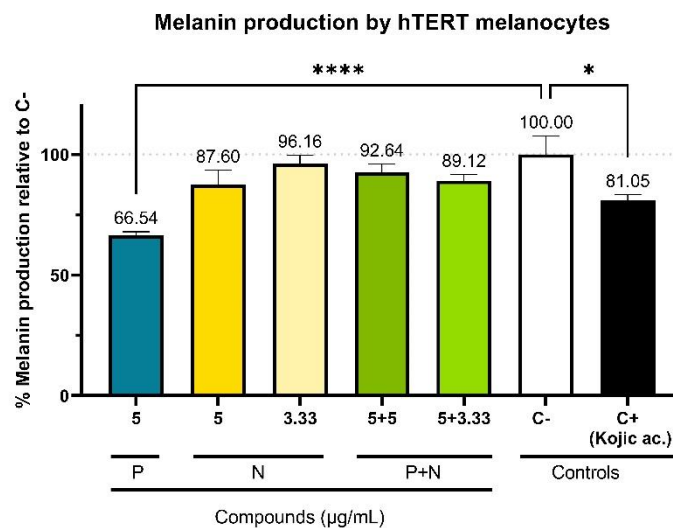
Espectro de absorbancia en el rango de 290-400 nm de "A" en dibutil adipato y a diferentes concentraciones, después de la irradiación en el simulador solar con una potencia de 765 w/m² a diferentes tiempos.





ANEXO 3. Estudio despigmentante de la mezcla de Floretina y Neohesperidina dihidrochalcona

Resultados del estudio de inhibición de melanina de la mezcla de Floretina (P) y Neohesperidina Dihidrochalcona (N):



Producción de melanina por melanocitos hTERT. Las células se expusieron a diferentes concentraciones y combinaciones de los compuestos durante 72 horas. Al finalizar la exposición, se determinó la producción de melanina que se normalizó con la concentración de proteína total. Los resultados se expresan como el promedio y el error estándar de 4 réplicas (N=4). El análisis estadístico se realizó utilizando una ANOVA de un factor seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * $p > 0,05$ y **** $p > 0,0001$ denotan diferencias significativas.

ANEXO 4. Publicaciones

Review

Melanogenesis and Melasma Treatment

Adriana Solange Maddaleno^{1,2}, Judit Camargo², Montserrat Mitjans¹ and Maria Pilar Vinardell^{1,*} 

¹ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; adrianamaddaleno@ub.edu (A.S.M.); montsemitjans@ub.edu (M.M.)

² Roka Furadada S. L., Llacuna 162-164, 08018 Barcelona, Spain; judit@rokafuradada.com

* Correspondence: mpvinardellmh@ub.edu; Tel.: +34-934024505

Abstract: Melanocytes are highly specialised dendritic cells that transfer melanin to keratinocytes in subcellular lysosome-like organelles called melanosomes, where melanin is synthesised and stored. Melanin is a complex pigment that provides colour and photoprotection to the skin, hair, and eyes of mammals. The regulation of melanogenesis includes various mechanisms and factors including genetic, environmental, and endocrine factors. Knowledge of the pigmentation process is important not only to understand hyperpigmentation but also to design treatments and therapies to treat them. Whitening cosmetics with anti-melanogenesis activity are very popular. In the present manuscript, we review the mechanisms and the signalling pathways involved in skin pigmentation and we specifically focus on the alteration of melanogenesis that leads to melasma and results in hyperpigmentation. Finally, current therapies and treatments including topical, oral, and phototherapies are discussed and described, with a special emphasis on the cosmetics' action.

Keywords: melanin synthesis; pigmentation; melasma; MITF



Citation: Maddaleno, A.S.; Camargo, J.; Mitjans, M.; Vinardell, M.P. Melanogenesis and Melasma Treatment. *Cosmetics* **2021**, *8*, 82. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030082>

Academic Editor: Nobutomo Ikarashi

Received: 27 July 2021

Accepted: 31 August 2021

Published: 2 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Melanin is a complex pigment that provides colour and photoprotection to the skin, hair, and eyes of mammals. Melanogenesis, the process through which melanocytes synthesise melanin, can be altered, producing pigmentary skin disorders such as melasma which result in hyperpigmentation. Melanocytes are highly specialised dendritic cells that transfer melanin to keratinocytes in subcellular lysosome-like organelles called melanosomes, where melanin is synthesised and stored. Fitzpatrick and Breathnach proposed in 1963 the “epidermal melanin unit”. This concept consisted of the interaction of 1 melanocyte and approximately 36 keratinocytes to produce pigmentation. More recently, the keratinocyte–Langerhans–melanocyte (KLM) unit has been proposed, which does not exclude the possibility of including other epidermal cells [1].

Several studies have suggested different mechanisms for the melanosome transfer such as cytophagocytosis, membrane fusion, shedding–phagocytosis, and exocytosis–endocytosis [2]. Melanogenesis can be regulated by genetic, environmental (ultraviolet (UV) radiation) and endocrine factors (pregnancy and ageing) [3]. Knowledge of the pigmentation process is important for designing bleaching products to treat skin hyperpigmentation.

2. Main Signalling Pathways in Melanogenesis

Multiple signalling pathways are involved in melanogenesis (Table 1), specifically in the regulation of the microphthalmia-associated transcription factor (MITF). The main signalling pathway in pigmentation involves melanocortin 1 receptor (MC1-R), which is activated by the α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) or adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which are products of proopiomelanocortin (POMC). MC1-R increases 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) synthesis by activating adenylate cyclase. PKA, activated by cAMP, phosphorylates CREB, which then acts as a transcription factor

of MITF (Figure 1) [4]. MITF is a basic helix–loop–helix leucine zipper that regulates the expression of melanogenic enzymes (tyrosinase, TYRP1 and TYRP2) and melanosome structural proteins (MART-1 and PMEL17) [5]. Previous studies have reported that melanocytes with a lower melanin content synthesise tyrosinase (TYR) more slowly and degrade it more quickly than melanocytes with a higher melanin content [6].

Table 1. Main activators of the melanogenesis pathways.

Key Signalling Pathways in Melanogenesis	Activators	References
MC1-R	α -MSH, ACTH	[4–6]
SCF-c-KIT receptor tyrosine kinase	SCF	[3,7,8]
Protein kinase C-dependent signalling	DAG	[9,10]
Endothelin pathway	ETs	[11–13]
H1 and H2 receptors	H1, H2	[14–16]
Keratinocyte-derived paracrine factors	IL-18, IL-33, GM-CSF, PGE2, PGF2 α	[17]
Fibroblast-derived paracrine factors	IL-33, PGE2, PGF2 α	[17]

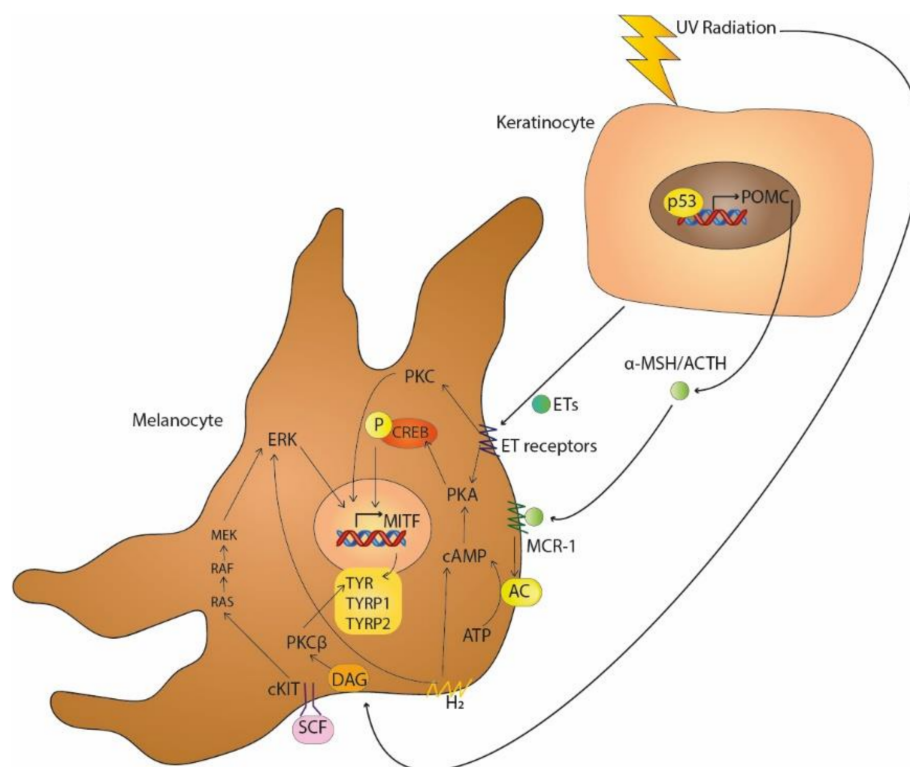


Figure 1. UV-induced melanogenesis by the secretion of α -MSH/ACTH and ETs by keratinocytes activating MCR-1 and G protein-coupled ETs receptors, respectively, and by the induction of DAG on melanocytes membranes. Paracrine pathways, such as SCF-c-KIT receptor tyrosine kinase and H₂ receptors, also induce melanogenesis.

The SCF-c-KIT receptor tyrosine kinase pathway is also involved in pigmentation. Stem cell factor (SCF), a paracrine factor located in fibroblasts, binds to its tyrosine kinase receptor c-KIT, which is produced by melanocytes, leads to the activation of the Ras-MAP kinase signalling pathway and the regulation of MITF by phosphorylation [7,8].

Protein kinase C (PKC)-dependent signalling regulates melanogenesis by activating the PKC β isoform via calcium and diacylglycerol (DAG), its endogenous activator. UV radiation (UVR) induces DAG formation in melanocyte membranes, causing its translocation from the cytoplasm to the membrane, where it upregulates PKC β , which then phosphorylates and activates tyrosinase. The receptor for activated C-kinase (RACK) controls the

translocation of PKC isoforms to specific cellular compartments. The translocation of the PKA/RACK complex to the melanosome membrane leads to tyrosinase activation in human melanocytes [9]. Furthermore, the MITF-M isoform has been proposed as a key transcription factor for PKC β , linking PKC- and cAMP-dependent signalling in the regulation of melanogenesis [10].

ET_A and ET_B are endothelin (ET) receptors belonging to the G protein-coupled receptor family. Keratinocytes exposed to UVB radiation and melanocytes secrete ETs that have a high affinity for ET_A and ET_B. ET-induced signalling dominates the activation of PKC through a specific ET receptor. This linkage activates PKC and PKA and leads to the increase in cAMP levels, thus increasing tyrosinase activity [11]. Moreover, endothelin-1 (ET-1), released by microvascular endothelial cells, increases melanogenesis through the phosphorylation of MITF and the increase in tyrosinase and dopachrome tautomerase levels. The activation of ET_B and the extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and p38 MAP kinases by endothelin induces melanogenesis [12]. Pigmentation can be stimulated or inhibited via the ET receptor by chemicals. β -cryptoxanthin and fucoxanthin can inhibit melanogenesis via the ET receptor and other receptors by reducing the phosphorylation of CREB, whereas sphingosylphosphorylcholine, vitamin D3 and kappa-elastin can stimulate melanogenesis via the ET receptor and c-KIT [13].

The H₁ and H₂ histamine receptors occur on the surfaces of human melanocytes and melanoma cells. The accumulation of cAMP and the subsequent activation of PKA are induced via the H₂ receptor, which activates ERK, CREB and Akt to stimulate melanogenesis [14]. Furthermore, it has been reported that the H₂ receptor-mediated expression of growth-differentiation factor 15 (GDF-15) could be involved in histamine-induced melanogenesis [15,16].

Hyperpigmentation is common after inflammation, although the mechanisms involved are not clear. Keratinocyte-derived paracrine factors such as interleukin (IL)-18, IL-33, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), prostaglandin E2 and prostaglandin F2 α stimulate melanogenesis, while tumour necrosis factor (TNF), IL-6 and IL-1 α can inhibit melanogenesis. Fibroblasts also secrete paracrine factors that can induce melanogenesis, such as IL-33, prostaglandin E2 and prostaglandin F2 α , as well as inhibitors of melanogenesis, such as TNF and IL-6 [17].

Tyrosinase is an oxidase enzyme that is fundamental in melanogenesis through its role in the hydroxylation of tyrosine to dihydroxyphenylalanine (DOPA) and the subsequent oxidation of DOPA to DOPA quinone. Two types of melanin are synthesised in melanogenesis: eumelanin, an insoluble polymer characterised by a brownish black colour; and pheomelanin, a reddish yellow soluble polymer. TRP1 and TRP2 are required for eumelanin synthesis from DOPA chrome which is produced by the action of tyrosinase on DOPA quinone, while pheomelanin synthesis from DOPA quinone requires the presence of sulphur derivatives [18].

Eumelanin and pheomelanin bind to cations, anions and drugs, among other things, providing protection to melanocytes [3].

3. Key Pathways in Melasma

Melasma is a skin disorder that mainly affects the face and is caused by hyperpigmentation resulting from the increased accumulation of melanin in the epidermis. It can be induced through different mechanisms, which are heterogeneous in different individuals and ethnic groups [19]. Melasma is more common in women of reproductive age and in females with Fitzpatrick skin types III–IV, corresponding to European and North African Mediterranean populations [20].

Several treatment options are currently available, but none of them are effective or work fast enough. Oral medications and dietary supplements can be used to treat melasma, although the most important ways of managing melasma are the use of sun protection and topical agents [21].

3.1. Ultraviolet Light

It is well known that the main inducer of melanogenesis is ultraviolet radiation (UVR). In keratinocytes and the photoreceptor cells located in the external layer of the epidermis, different paracrine factors such as fibroblast growth factor (bFGF), nerve growth factor (NFG), ET-1 and POMC-derived peptides, such as MSH, ACTH and beta-endorphin, are activated by UVR, starting the main signalling pathway of melanogenesis [19]. UVR can induce and activate p53 on melanocytes, a tumour suppressor protein and transcription factor that upregulates tyrosinase mRNA and protein expression [22]. Furthermore, the UVR-mediated activation of p38, a stress-response protein, activates the transcription factor upstream stimulatory factor 1 (USF-1), which induces the transcription of tyrosinase [23]. Melanogenesis can be stimulated by the binding of α -MSH to its receptor, MC1-R, promoting the synthesis of more eumelanin than pheomelanin and increasing tyrosinase activity [24]. Moreover, α -MSH induces the proliferation of melanocytes [25]. UVR has been found to decrease levels of bone morphogenetic proteins (BMPs) [9].

UVR is divided into different ranges of functional wavelengths. UVC has the shortest wavelengths (<280 nm), which are excluded by the Earth's atmosphere. UVB has wavelengths (280–320 nm) that overlap with the absorption spectrum of DNA; therefore, it can cause damage associated with mutagenesis and tumorigenesis. Lastly, UVA (320–380 nm), which is not absorbed by DNA, can generate oxidative stress by producing intracellular reactive oxygen species (ROS) via photochemical reactions [26]. By the formation of ROS and melanin degradation products on melanocytes by UV light, cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) are produced by chemiexcitation and energy transfer. Cytosine-containing CPDs are included in this group, which initiate mutations of cytosine in thymine [27].

Different types of pigmentation can result from UVR. Immediate pigmentation, induced by UVA, is a transitory darkening of the skin that is produced by the oxidation of melanin and the redistribution of melanosomes to the upper epidermal layers. This pigmentation occurs a few minutes after exposure, but disappears minutes or days later, making it non-photoprotective. UVA can also induce persistent pigmentation that is easier to observe in individuals with dark skin compared to fair-skinned people. Delayed pigmentation, mainly by UVA and UVB, occurs 3–4 days after exposure to UVR and persists for weeks. It is caused by an increase in the levels of epidermal melanin, particularly eumelanin, providing photoprotection against DNA damage and mutations [4,28,29].

3.2. Genetics

Melasma is caused by different exposure factors affecting genetically predisposed individuals. Thus, genetics are one of the most important causes of hyperpigmentation, as demonstrated by its occurrence within families (40–60%) [30,31]. Almost 279 genes are involved in the development of melasma [16,32].

3.3. Sex Hormones

Oestrogen and progesterone are involved in hyperpigmentation, which sometimes appears during the use of oral contraceptives, pregnancy and in post-pubertal women. Several studies have shown an increased expression of oestrogen receptors in the dermis and progesterone receptors in the epidermis of hyperpigmented skin, suggesting a possible role of these hormones in the pathogenesis of melasma [33,34]. During the third trimester of pregnancy, the stimuli for melanogenesis increase, with sex steroids only inducing melasma in synergy with UVB [35].

In melanocytes and keratinocytes, the binding of oestrogen to its receptors can activate the tyrosinase and MITF pathways. Sex steroids increase the transcription of the DCT and TYR genes, thereby promoting melanogenesis in normal human melanocytes. Other studies have shown an oestrogen-induced increase in the mRNA expression of tyrosinase, TYRP1 and TYRP2, as well as increased activity of tyrosinase in normal human melanocytes [36,37]. The oestrogen-mediated upregulation of PDZ domain-containing

protein (PDZK1) stimulates melanosome transfer to melanocytes and increases MITF and TYR expression in melanocytes [38].

While female sex steroids can have an important role in hyperpigmentation, male hormones appear not to have any role. UV radiation is the main factor for melanogenesis in men and interestingly, mustard oil can be another factor for hyperpigmentation in men in India, where it is used for hair growth and as an emollient [39]. Moreover, finasteride, an anti-androgen, might cause melasma in men [40].

3.4. Wnt Signalling Pathway

Wnt signalling plays a critical role in melanocyte development, melanogenesis and dendritogenesis [31]. The presence of Wnt ligands prevents β -catechin degradation, which stimulates MITF. WIF-1 is an important secreted antagonist of Wnt signalling. It inhibits Wnt signalling by preventing the binding of the ligands to their cell surface receptors [7]. WIF-1 downregulation occurs in dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes of melasma lesions, stimulating the melanogenesis and melanosome transfer. Although WIF-1 is not expressed in melanocytes [41], one study has reported the upregulation of WIF-1 in melasma skin lesions [32].

WIF-1 expression does not change after UV radiation. Thus, melanogenesis can be induced via the Wnt signalling pathway independently of UVR [40]. Wnt inhibitors, such as DKK1 agonists, can be used to act on the fibroblast-secreted factors and reduce the hyperpigmentation caused by Wnt signalling [42,43].

4. Treatments and Future Perspectives

Hydroquinone (HQ) monotherapy and triple combination cream are currently the most effective treatments for melasma despite the availability of different treatments (Table 2).

Table 2. Current treatments in melasma.

Current Treatments		Targets	References
Phenolic compounds	Hydroquinone	Tyrosinase inhibitor	[44–48] [17]
	Glabridin		
	Arbutin	Tyrosinase inhibitor	[49–51]
	Deoxyarbutin		[52–54]
Kojic acid Azelaic acid	[55–58] [48,59]		
Non-phenolic compounds	Vitamin C	Tyrosinase inhibitor	[60–65]
	Liquorice compounds	Melanin dispersion and epidermal melanin removal	[64,66,67]
	Curcumoid	α MSH-stimulated melanogenesis suppression and inhibition of melanosomes maturation	[68]
	Retinoids	Multiple targets (e.g., reduction in TYR transcription)	[69,70]
Triple combination cream		Multiple targets	[71,72]
Chemical peelings		Melanin removal	[73]
Laser and light therapies		Melanin removal	[54,74–76]
Oral treatments		Unknown	[77–79]

Although there is a wide variety of treatments for melasma, there is still a need to establish new and improved therapies with a lower risk of side effects for melasma patients. Society is increasingly looking for natural treatments to minimise negative health effects.

4.1. Phenolic and Non-Phenolic Compounds

Topical agents that act as tyrosinase inhibitors are the gold standard treatment for melasma. HQ is one of the most effective treatments, but its use is limited due to its cytotoxic activity and side effects such as irritation, erythema, irritant and allergic contact dermatitis, and amelanosis [44]. HQ inhibits the enzymatic oxidation of tyrosine to DOPA and suppresses other melanocytic processes [45,46]. It also induces ROS generation, causing the oxidative damage of membrane lipids and proteins (including tyrosinase) [47].

Arbutin, a natural tyrosinase inhibitor and HQ derivative, has been used in the treatment of melasma in combination with lasers or ellagic acid, as well as in hydrogel masks, all without undesirable side effects, thus demonstrating less toxicity than HQ [48,49]. It competitively and reversibly binds to tyrosinase without affecting the mRNA transcription of tyrosinase [50]. Deoxyarbutin, a synthetic derivative of arbutin, is a safer and effective skin-lightening agent, with similar inhibitory effects on tyrosinase activity as those of HQ and arbutin [51–54].

Kojic acid is a hydrophilic fungal metabolite that inhibits the catecholase activity of tyrosinase and has antioxidant activity [55,56]. It is commonly used in the treatment of melasma, especially in Asia and Japan, but can cause irritant contact dermatitis at high concentrations [57]. Studies have reported that kojic acid has limited efficacy as a monotherapy, producing better results in combination therapies [55,57]. A recent multicentre study across 20 dermatology clinics/ambulatories showed satisfactory effects with changes in severity index after three months of treatment [58].

Azelaic acid is a saturated dicarboxylic acid used as a treatment for skin pigmentation in several conditions such as acne and rosacea due to its anti-inflammatory property [48]. It was described that azelaic acid may directly or indirectly inhibit tyrosinase through the reduction in intracellular thioredoxin which inhibits tyrosinase by forming a bys-cysteinate inhibitors complex [59].

Vitamin C (ascorbic acid) can chelate copper ions, which are cofactors for melanogenesis. Vitamin C and its derivatives suppress tyrosinase activity through cytoplasmic acidification [60]. In addition, vitamin C has the ability to reduce o-quinones back to o-catechol, in the case of melanogenesis, reverting DOPA quinone to DOPA and preventing melanin synthesis [61]. However, its ability to decrease melanogenesis is lower than that of HQ [62,63]. Despite having low stability and fast oxidation and being ineffective as a monotherapy, vitamin C is a good adjuvant, with its efficiency increases when combined with liquorice extracts [64]. Moreover, the combination of vitamin C and vitamin E more significantly inhibits melanogenesis than vitamin C alone [65].

Glabridin is the main component of the hydrophobic fraction of liquorice and can potentially inhibit tyrosinase activity [64]. Moreover, the other components of liquorice, such as liquiritin and isoliquiritin, can disperse melanin and remove epidermal melanin [66,67]. However, there is no clinical evidence of its efficacy in the treatment of melasma despite the fact that various depigmentation creams containing liquorice extracts are sold over the counter [56].

Calebin-A (CBA) is a natural curcuminoid analogue from turmeric root (*Curcuma longa*). Recent studies showed that CBA (20 μ M) significantly suppressed α MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. CBA did not affect either intracellular tyrosinase activity or the direct activity of tyrosinase enzyme and did not affect intracellular α -glucosidase activity. CBA increased the acidification of cellular organelles and inhibited the maturation of melanosomes by significantly reducing the number of mature melanosomes [68].

Retinoids target multiple signalling pathways in melanogenesis. They reduce tyrosinase transcription and melanin synthesis, causing rapid pigment loss through epidermopoiesis [69]. Retinoids are used in monotherapy or in combination to treat melasma and post-inflammatory hyperpigmentation [70].

4.2. Other Therapies

The triple combination cream (TCC) contains 4% HQ, 0.05% tretinoin (retinoid) and 0.01% fluocinolone acetonide (fluorinated corticosteroid) [71]. Combination therapies have different side effects such as erythema, a burning sensation, a tingling sensation, and irritation, but these side effects are mild in most patients. The TCC can cause skin irritation and post-inflammatory hyperpigmentation depending on the colour of the skin [72].

Chemical peelings are used for several skin disorders despite causing skin irritation and post-inflammatory hyperpigmentation. Glycolic acid is the most widely used for chemical peelings, with salicylic acid representing a safer option for sensitive and dark phenotypes [73].

Laser and light resources/therapies should be used in resistant cases, although it can have adverse effects such as paradoxical hyperpigmentation, especially in high phototypes. Hence, depigmenting agents are required before and after treatment [56,74]. Intense pulsed light, fractional lasers and radiofrequency or pigment lasers are used in the treatment of melasma [75,76].

Oral treatments with systemic agents have emerged as potential therapies for melasma, such as tranexamic acid and plant-based supplements (e.g., polypodium leucotomos extract, carotenoids, and melatonin). Oral tranexamic acid is successfully used in Japan and seems to be more effective than topical therapy with tranexamic acid, although its mechanism of action is unknown [77,78]. Good results have been observed with the combination of tranexamic acid and laser irradiation [79].

4.3. Future Treatments

New therapies focusing on the multiple causes of hyperpigmentation, such as histamine synthesis, oestrogen upregulation, melanosome transfer and ROS generation, are being studied for the treatment of melasma since the targeting of melanin synthesis alone is not effective enough. Natural agents with a multimodal mechanism of action are being investigated due to their better safety profile compared to conventional drugs [80,81].

The following are examples of agents currently being assessed: resveratrol and p-Coumaric acid (antioxidants), loratadine and zinc (antihistamines), and niacinamide and liquiritin (prevents melanosome transfer) [82–84].

The triple therapy, a combination of HQ, an anti-oestrogen and a vascular endothelial growth factor inhibitor, seems to be the ideal skin-lightening agent [80].

5. Conclusions and Perspectives

MITF regulation is the key factor in melanogenesis and is therefore the main target for the induction of pigmentation in melasma. Although the main signalling pathways are known, new treatment should be developed to treat melasma due to the low efficacy or side effects of current treatments. Despite the importance of MITF regulation, other targets should be controlled on melasma treatment such as paracrine factors, the SCF-c-Kit and H₂ receptor, and other UV-induced factors such as ETs secretion and DAG formation. Moreover, melasma generally affects women, so treatments focused on oestrogens have to be considered to obtain better results.

There is an increasing need on the part of society to use natural products as opposed to synthetic products. For this reason, researchers are increasingly focusing on this type of product in addition to providing a reduction in side effects. Natural products that disrupt melanogenesis are a good option for new treatments for melasma due to their safety compared to conventional ones.

Author Contributions: Writing, A.S.M., M.M. and M.P.V.; project management, M.M. and M.P.V.; project scope definition and financial support, J.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Doctorats industrials (2019), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Nordlund, J.J. The melanocyte and the epidermal melanin unit: An expanded concept. *Dermatol. Clin.* **2007**, *25*, 271–281. [[CrossRef](#)]
2. Wu, X.; Hammer, J.A. Melanosome transfer: It is best to give and receive. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2014**, *29*, 1–7. [[CrossRef](#)]
3. Costin, G.E.; Hearing, V.J. Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **2007**, *21*, 976–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Videira, I.F.; Moura, D.F.; Magina, S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.* **2013**, *88*, 76–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ebanks, J.P.; Wickett, R.R.; Boissy, R.E. Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 4066–4087. [[CrossRef](#)]
6. Halaban, R.; Pomerantz, S.H.; Marshall, S.; Lambert, D.T.; Lerner, A.B. Regulation of Tyrosinase in Human Melanocytes Grown in Culture. *J. Cell. Biol.* **1983**, *97*, 480–488. [[CrossRef](#)]
7. Kawaguchi, M.; Suzuki, T. Melanogenesis and New Signaling Regulators for the Treatment of Melasma. In *Melasma and Vitiligo in Brown Skin*; Handog, E., Enriquez-Macarayo, M., Eds.; Springer: New Delhi, India, 2017; pp. 92–95.
8. Li, P.; Liu, L.; Chang, C.; Gao, R.; Leung, C. Silencing Stem Cell Factor Gene in Fibroblasts to Regulate Paracrine Factor Productions and Enhance c-Kit Expression in Melanocytes on Melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bae-Harboe, Y.C.; Park, H. Tyrosinase: A Central Regulatory Protein for Cutaneous Pigmentation. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 2678–2680. [[CrossRef](#)]
10. Park, H.; Wu, C.; Yonemoto, L.; Murphy-Smith, M.; Wu, H.; Stachur, C.M.; Gilchrist, B.A. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C- β expression in human melanocytes. *Biochem. J.* **2006**, *578*, 571–578. [[CrossRef](#)]
11. Imokawa, G.; Yada, Y.; Kimura, M. Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem. J.* **1996**, *312*, 305–312. [[CrossRef](#)]
12. Regazzetti, C.; De Donatis, G.M.; Ghorbel, H.H.; Cardot-leccia, N.; Ambrosetti, D.; Bahadoran, P.; Chignon-Sicard, B.; Lacour, J.; Ballotti, R.; Mahns, A.; et al. Endothelial Cells Promote Pigmentation through Endothelin Receptor B Activation. *J. Investig. Dermatol.* **2015**, *135*, 3096–3104. [[CrossRef](#)]
13. Lee, A.Y.; Noh, M. The regulation of epidermal melanogenesis via cAMP and/or PKC signaling pathways: Insights for the development of hypopigmenting agents. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36*, 792–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Reynolds, J.L.; Akhter, J.; Morris, D.L. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res.* **1996**, *6*, 95–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kim, N.H.; Lee, A.Y. Histamine effect on melanocyte proliferation and vitiliginous keratinocyte survival. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, 1073–1079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lee, H.J.; Park, M.K.; Lee, E.J.; Kim, Y.L.; Kim, H.J.; Kang, J.H.; Kim, H.M.; Lee, A.Y.; Lee, C.H. Histamine receptor 2-mediated growth-differentiation factor-15 expression is involved in histamine-induced melanogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 2124–2128. [[CrossRef](#)]
17. Fu, C.; Chen, J.; Lu, J.; Yi, L.U.; Tong, X. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol. Med. Rep.* **2020**, *21*, 1421–1430. [[CrossRef](#)]
18. Montaudié, H.; Bertolotto, C.; Ballotti, R.; Passeron, T. Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. *EMC Dermatol.* **2014**, *48*, 1–11. [[CrossRef](#)]
19. Lee, A.Y. An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatol. Sin.* **2014**, *32*, 233–239. [[CrossRef](#)]
20. Rajanala, S.; Maymone, M.B.C.; Vashi, N.A. Melasma pathogenesis: A review of the latest research, pathological findings, and investigational therapies. *Dermatol. Online J.* **2019**, *25*. [[CrossRef](#)]
21. Zhou, L.L.; Baibergenova, A. Melasma: Systematic review of the systemic treatments. *Int. J. Dermatol.* **2017**, *56*, 902–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Khlgatian, M.K.; Hadshiew, I.M.; Asawanonda, P.; Yaar, M.; Eller, M.S.; Fujita, M.; Norris, D.A.; Gilchrist, B.A. Tyrosinase gene expression is regulated by p53. *J. Investig. Dermatol.* **2002**, *118*, 126–132. [[CrossRef](#)]
23. Galibert, M.D.; Carreira, S.; Goding, C.R. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5022–5031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hunt, G.; Kyne, S.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Thody, A.J. Nle4DPhe7 α -melanocyte-stimulating hormone increases the eumelanin:phaeomelanin ratio in cultured human melanocytes. *J. Investig. Dermatol.* **1995**, *104*, 83–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Im, S.; Moro, O.; Peng, F.; Medrano, E.E.; Cornelius, J.; Babcock, G.; Nordlund, J.J.; Abdel-Malek, Z.A. Activation of the cyclic AMP pathway by α -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 47–54.

26. Ryter, S.W.; Hong, P.K.; Hoetzel, A.; Park, J.W.; Nakahira, K.; Wang, X.; Choi, A.M.K. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antiox. Redox Signal.* **2007**, *9*, 49–89. [[CrossRef](#)]
27. Premi, S.; Wallisch, S.; Mano, C.M.; Weiner, A.B.; Bacchiocchi, A.; Wakamatsu, K.; Bechara, E.J.; Halaban, R.; Douki, T.; Brash, D.E. Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science* **2015**, *347*, 842–847. [[CrossRef](#)]
28. Miyamura, Y.; Coelho, S.G.; Schlenz, K.; Batzer, J.; Smuda, C.; Choi, W.; Brenner, M.; Passeron, T.; Zhang, G.; Kolbe, L.; et al. The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin. *Pigment. Cell. Melanoma Res.* **2011**, *24*, 136–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Maddodi, N.; Jayanthi, A.; Setaluri, V. Shining light on skin pigmentation: The darker and the brighter side of effects of UV radiation. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 1075–1082. [[CrossRef](#)]
30. Holmo, N.F.; Ramos, G.B.; Salomão, H.; Werneck, R.I.; Mira, M.T.; Miot, L.D.B.; Miot, H.A. Complex segregation analysis of facial melasma in Brazil: Evidence for a genetic susceptibility with a dominant pattern of segregation. *Arch. Dermatol. Res.* **2018**, *310*, 827–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Passeron, T.; Picardo, M. Melasma, a photoaging disorder. *Pigment. Cell. Melanoma Res.* **2018**, *31*, 461–465. [[CrossRef](#)]
32. Kang, H.Y.; Suzuki, I.; Lee, D.J.; Ha, J.; Reiniche, P.; Aubert, J.; Deret, S.; Zugaj, D.; Voegel, J.J.; Ortonne, J.P. Transcriptional profiling shows altered expression of wnt pathway- and lipid metabolism-related genes as well as melanogenesis-related genes in melasma. *J. Investig. Dermatol.* **2011**, *131*, 1692–1700. [[CrossRef](#)]
33. Lieberman, R.; Moy, L. Estrogen receptor expression in melasma: Results from facial skin of affected patients. *J. Drugs Dermatol.* **2008**, *7*, 463–465. [[PubMed](#)]
34. Tamega Ade, A.; Miot, H.A.; Moço, N.P.; Silva, M.G.; Marques, M.E.; Miot, L.D. Gene and protein expression of oestrogen- β and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2015**, *37*, 222–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cario, M. How hormones may modulate human skin pigmentation in melasma: An in vitro perspective. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28*, 709–718. [[CrossRef](#)]
36. Kippenberger, S.; Loitsch, S.; Solano, F.; Bernd, A.; Kaufmann, R. Quantification of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 transcripts in human melanocytes by reverse transcriptase-competitive multiplex PCR—Regulation by steroid hormones. *J. Investig. Dermatol.* **1998**, *110*, 364–367.
37. Cohen, P.R. Melasma treatment: A novel approach using a topical agent that contains an anti-estrogen and a vascular endothelial growth factor inhibitor. *Med. Hypotheses* **2017**, *101*, 1–5. [[CrossRef](#)]
38. Kim, N.H.; Cheong, K.A.; Lee, T.R.; Lee, A.Y. PDZK1 upregulation in estrogen-related hyperpigmentation in Melasma. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 2622–2631. [[CrossRef](#)]
39. Handa, S.; De, D.; Khullar, G.; Radotra, B.D.; Sachdeva, N. The clinicoaetiological, hormonal and histopathological characteristics of melasma in men. *Clin. Exp. Dermatol.* **2018**, *43*, 36–41. [[CrossRef](#)]
40. Famenini, S.; Gharavi, N.M.; Beynet, D.P. Finasteride associated melasma in a Caucasian male. *J. Drugs Dermatol.* **2014**, *13*, 484–486.
41. Kim, J.Y.; Lee, T.R.; Lee, A.Y. Reduced WIF-1 expression stimulates skin hyperpigmentation in patients with melasma. *J. Investig. Derm.* **2013**, *133*, 191–200. [[CrossRef](#)]
42. Yamaguchi, Y.; Passeron, T.; Watabe, H.; Yasumoto, K.I.; Rouzaud, F.; Hoashi, T.; Hearing, V.J. The effects of dickkopf 1 on gene expression and wnt signaling by melanocytes: Mechanisms underlying its suppression of melanocyte function and proliferation. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 1217–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yamaguchi, Y.; Passeron, T.; Hoashi, T.; Watabe, H.; Rouzaud, F.; Yasumoto, K.; Hara, T.; Tohyama, C.; Katayama, I.; Miki, T.; et al. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/ β -catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J.* **2008**, *22*, 1009–1020. [[CrossRef](#)]
44. Bandyopadhyay, D. Topical treatment of melasma. *Indian J. Dermatol.* **2009**, *54*, 303–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Namasivayam, V. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 403–425. [[CrossRef](#)]
46. Baranska, A.; Shawket, A.; Jouve, M.; Baratin, M.; Malosse, C.; Voluzan, O.; Manh, T.P.V.; Fiore, F.; Bajénoff, M.; Benaroch, P.; et al. Unveiling skin macrophage dynamics explains both tattoo persistence and strenuous removal. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1115–1133. [[CrossRef](#)]
47. Jimbow, K.; Obata, H.; Pathak, M.A.; Fitzpatrick, T.B. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J. Investig. Dermatol.* **1974**, *62*, 436–449. [[CrossRef](#)]
48. Mazurek, K.; Pierzchała, E. Comparison of efficacy of products containing azelaic acid in melasma treatment. *J. Cosmet. Dermatol.* **2016**, *15*, 269–282. [[CrossRef](#)]
49. Ertam, I.; Mutlu, B.; Unal, I.; Alper, S.; Kivçak, B.; Ozer, O. Efficiency of ellagic acid and arbutin in melasma: A randomized, prospective, open-label study. *J. Dermatol.* **2008**, *35*, 570–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Han, T.Y.; Son, I.P.; Jang, W.S.; Chang, H.S.; Kim, J.H.; Sim, Y.H.; Kim, D.H.; Kim, B.J.; Kim, M.N.; Lee, H.K.; et al. Efficacy of hydrogel mask with 2% arbutin for melasma. *Korean J. Dermatol.* **2011**, *49*, 210–216.
51. Maeda, K.; Fukuda, M. Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *276*, 765–769. [[PubMed](#)]

52. Grimes, P.E. Melasma: Etiologic and Therapeutic Considerations. *Arch. Dermatol.* **1995**, *131*, 1453–1457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Parvez, S.; Kang, M.; Chung, H.S.; Cho, C.; Hong, M.C.; Shin, M.K.; Bae, H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 921–934. [[CrossRef](#)]
54. Picardo, M.; Carrera, M. New and Experimental Treatments of Cloasma and Other Hypermelanoses. *Dermatol. Clin.* **2007**, *25*, 353–362. [[CrossRef](#)]
55. Deo, K.S.; Dash, K.N.; Sharma, Y.K.; Virmani, N.C.; Oberai, C. Kojic acid vis-a-vis its combinations with hydroquinone and betamethasone valerate in melasma: A randomized, single blind, comparative study of efficacy and safety. *Indian J. Dermatol.* **2013**, *58*, 281–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Küçük, Ö.S. Current treatment approaches for melasma. *Bezm. Sci.* **2018**, *6*, 54–62. [[CrossRef](#)]
57. Monteiro, R.C.; Kishore, N.; Bhat, R.M.; Sukumar, D.; Martis, J.; Ganesh, K. A comparative study of the efficacy of 4% hydroquinone vs 0.75% Kojic acid cream in the treatment of facial melasma. *Indian J. Dermatol.* **2013**, *58*, 157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Berardesca, E.; Rigoni, C.; Cantù, A.; Cameli, N.; Tedeschi, A.; Donne Dermatologhe Italia; Laureti, T. Effectiveness of a new cosmetic treatment for melasma. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 1684–1690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Schallreuter, K.; Wood, J. A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Arch. Derm. Res.* **1990**, *282*, 168–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Miao, F.; Su, M.Y.; Jiang, S.; Luo, L.F.; Shi, Y.; Lei, T.C. Intramelanocytic Acidification Plays a Role in the Antimelanogenic and Antioxidative Properties of Vitamin C and Its Derivatives. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 2084805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Huh, C.H.; Seo, K.I.; Park, J.Y.; Lim, J.G.; Eun, H.C.; Park, K.C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin C iontophoresis in melasma. *Dermatology* **2003**, *206*, 316–320. [[CrossRef](#)]
62. Jiménez-Cervantes, C.; Solano, F.; Kobayashi, T.; Urabe, K.; Hearing, V.; Lozano, J. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17993–18000. [[CrossRef](#)]
63. Espinal-Perez, L.E.; Moncada, B.; Castaneda-Cazares, J.P. A double-blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. *Int. J. Dermatol.* **2004**, *43*, 604–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Fu, B.; Li, H.; Wang, X.; Lee, F.S.C.; Cui, S. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7408–7414. [[CrossRef](#)]
65. Choi, Y.K.; Rho, Y.K.; Yoo, K.H.; Lim, Y.Y.; Li, K.; Kim, B.J.; Seo, S.J.; Kim, M.N.; Hong, C.K.; Kim, D.S. Effects of vitamin C vs. multivitamin on melanogenesis: Comparative study in vitro and in vivo. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *49*, 218–226. [[CrossRef](#)]
66. Amer, M.; Metwalli, M. Topical liquiritin improves melasma. *Int. J. Dermatol.* **2000**, *39*, 299–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Toossi, P.; Esmaili-Azad, M.; Saeedi, M. Evaluation of Licorice efficacy on melasma. *Iran. J. Dermatol.* **2013**, *16*, 118–119.
68. Goenka, S.; Nagabhushanam, K.; Majeed, M.; Simon, S.R. Calebin-A, a Curcuminoid Analog Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Mouse Melanoma Cells. *Cosmetics* **2019**, *6*, 51. [[CrossRef](#)]
69. Romero, C.; Aberdam, E.; Larnier, C.; Ortonne, J.P. Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation. Involvement of the melanogenic enzymes expression. *J. Cell. Sci.* **1994**, *107*, 1095–1103. [[CrossRef](#)]
70. Wang, J.V.; Schoenberg, E.; Saedi, N. Bakuchiol as a Trendy Ingredient in Skincare: Recent Evidence. *Skinmed* **2019**, *17*, 188–189. [[PubMed](#)]
71. Banavase Channakeshavaiah, R.; Andanooru Chandrappa, N.K. Topical metformin in the treatment of melasma: A preliminary clinical trial. *J. Cosmet. Derm.* **2020**, *19*, 1161–1164. [[CrossRef](#)]
72. Pekmezci, E. A novel triple combination in treatment of melasma: Significant outcome with far less actives. *J. Cosmet. Derm.* **2019**, *18*, 1700–1704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sarkar, R.; Garg, V.; Bansal, S.; Sethi, S.; Gupta, C. Comparative evaluation of efficacy and tolerability of glycolic acid, salicylic Mandelic acid, and Phytic acid combination peels in Melasma. *Dermatol. Surg.* **2016**, *42*, 384–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Sadick, N.; Edison, B.L.; John, G.; Bohnert, K.L.; Green, B. An Advanced, Physician-Strength Retinol Peel Improves Signs of Aging and Acne Across a Range of Skin Types Including Melasma and Skin of Color. *J. Drugs Dermatol.* **2019**, *18*, 918–923. [[PubMed](#)]
75. McKesey, J.; Tovar-Garza, A.; Pandya, A.G. Melasma Treatment: An Evidence-Based Review. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2020**, *21*, 173–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Shah, S.D.; Aurangabadkar, S.J. Laser Toning in Melasma. *J. Cutan. Aesthet. Surg.* **2019**, *12*, 76–84. [[CrossRef](#)]
77. Del Rosario, E.; Florez-Pollack, S.; Zapata, L., Jr.; Hernandez, K.; Tovar-Garza, A.; Rodrigues, M.; Hynan, L.S.; Pandya, A.G. Randomized, placebo-controlled, double-blind study of oral tranexamic acid in the treatment of moderate-to-severe melasma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2018**, *78*, 363–369. [[CrossRef](#)]
78. Cho, H.H.; Choi, M.; Cho, S.; Lee, J.H. Role of oral tranexamic acid in melasma patients treated with IPL and low fluence QS Nd:YAG laser. *J. Dermatol. Treat.* **2013**, *24*, 292–296. [[CrossRef](#)]
79. Beyzaee, A.M.; Patil, A.; Goldust, M.; Moslemi, M.; Kazeminejad, A.; Rokni, G.R. Comparative Efficacy of Fractional CO2 Laser and Q-Switched Nd:YAG Laser in Combination Therapy with Tranexamic Acid in Refractory Melasma: Results of a Prospective Clinical Trial. *Cosmetics* **2021**, *8*, 37. [[CrossRef](#)]
80. Sarkar, R.; Bansal, A.; Ailawadi, P. Future therapies in melasma: What lies ahead? *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **2020**, *86*, 8–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Kim, K.; Huh, Y.; Lim, K.M. Anti-Pigmentary Natural Compounds and Their Mode of Action. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6206. [[CrossRef](#)]

-
82. Boo, Y.C. Human skin lightening efficacy of resveratrol and its analogs: From in vitro studies to cosmetic applications. *Antioxidants* **2019**, *8*, 332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 83. Boo, Y.C. p-coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects. *Antioxidants* **2019**, *8*, 275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 84. Moon, H.R.; Jo, S.Y.; Kim, H.T.; Lee, W.J.; Won, C.H.; Lee, M.W.; Choi, J.H.; Chang, S.E. Loratadine, an H 1 antihistamine, inhibits melanogenesis in human melanocytes. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 5971546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Volume 67 Issue 5 September-October 2022

Issue Highlights

- Alterations of the Gut Microbiota in Moderate to Severe Psoriasis Patients
- sICAM-1: A novel Potential Biomarker in Severe Acne Vulgaris
- Association between Paediatric Lichen Planus and Dyslipidemia
- Association of Moderate–Severe Atopic Dermatitis with Dental Anomalies
- Eponyms in Trichoscopy
- Congenital Varicella Syndrome with Isolated Limb Hypoplasia and Scarring
- Patterns and Trends of Tribal Leprosy
- Assessment of Oxidative/Nitrosative Stress and Raftlin in Vitiligo
- Efficacy and Safety of 30% Supramolecular Salicylic Acid Peeling for Papulopustular Rosacea
- Oral lesions in COVID-19
- Effective Treatment of Prurigo Nodularis with Dupilumab



Melanogenesis and Hypopigmentation: The Case of Vitiligo

M. Pilar Vinardell, Adriana Solange Maddaleno, Montserrat Mitjans

Abstract

Melanocytes are highly specialized dendritic cells that synthesize and store melanin in subcellular organelles called melanosomes, before transfer to keratinocytes. Melanin is a complex pigment that provides colour and photoprotection to the skin, hair and eyes. The process of synthesis of melanin is called melanogenesis and is regulated by various mechanisms and factors such as genetic, environmental and endocrine factors. The knowledge of the pigmentation process is important to understand hypopigmentation disorders such as vitiligo and also to design adequate treatments. In the present work, we review the signalling pathways involved in vitiligo. Finally, current therapies and treatments including topical, oral and phototherapies are discussed and described, emphasizing future therapies based on different pigmentation mechanisms.

From the Department Biochemistry and Physiology of the Universitat de Barcelona, Spain

Address for correspondence:

Prof. M. Pilar Vinardell,
Department Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Av. Joan XXIII 27-31, Barcelona, Spain.
E-mail: mpvinardellmh@ub.edu

KEY WORDS: Hypopigmentation, melanin synthesis, melanocyte, treatment, vitiligo

Introduction

Melanin is a complex pigment that provides colour and photoprotection to the skin, hair and eyes of mammals. Melanogenesis is the process through which melanocytes synthesise melanin and can be altered by decreasing the production of the pigment such as in the case of vitiligo.

Melanogenesis can be regulated by genetic, environmental (ultraviolet [UV] radiation) and endocrine factors. Knowledge of the pigmentation process is important for designing tanning products to treat hypopigmentation disorders such as vitiligo.^[1]

Vitiligo is an autoimmune acquired chronic skin disorder that is characterised by white macules resulting from the damage and loss of melanocytes. Although many disorders induce hypopigmentation, vitiligo is the most frequent cause of depigmentation worldwide affecting about 1% in the population.^[1,2] Vitiligo can be segmental, non-segmental or mixed. Segmental vitiligo presents one or more areas of depigmented skin usually only on one side of the body such as on the face, neck, trunks, arms or legs during childhood and usually stabilises in a few years. Non-segmental vitiligo is a chronic and progressive loss of melanin with well-defined white patches in the middle of normally pigmented skin, increasing in size over time and located on the hands, underarms, eyelids, ears, knees and ankles and whose progression is unpredictable. Vitiligo is usually associated with

different autoimmune disorders such as thyroid diseases, diabetes mellitus, lupus, inflammatory bowel disease, psoriasis and atopic dermatitis among others.^[3] Other authors have observed also metabolic comorbidities^[4] and psychological and psychiatric disorders.^[5]

Signalling Pathways in Vitiligo

Vitiligo is a complex disease and different hypotheses have been proposed for the multifactorial feature of vitiligo pathogenesis involving immunological, genetic, biochemical and environmental factors [Figure 1].^[6]

Oxidative stress

Oxidative stress has been suggested to be the first step in the loss of melanocytes in vitiligo, but it is not the unique initiating mechanism involved in the disease.^[1,7]

High levels of reactive oxygen species (ROS) are found in lesioned and non-lesioned skin, damaging melanocytes by generating autoantigens whose presentation by Langerhans cells and dendritic cells initiate an autoimmune response, bridging the gap between oxidative stress and adaptive immunity.^[8,9] Disruptions in metabolic processes such as melanogenesis and immune reactions can lead to the accumulation of ROS, although several studies suggest that mitochondrial damage altering the mitochondria structure of melanocytes is

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: WKHLRPMedknow_reprints@wolterskluwer.com

How to cite this article: Vinardell MP, Maddaleno AS, Mitjans M. Melanogenesis and hypopigmentation: The case of vitiligo. *Indian J Dermatol* 2022;67:524-30.

Received: December, 2021. **Accepted:** August, 2022.

Access this article online

Quick Response Code:



Website: www.e-ijd.org

DOI: 10.4103/ijd.ijd_1067_21

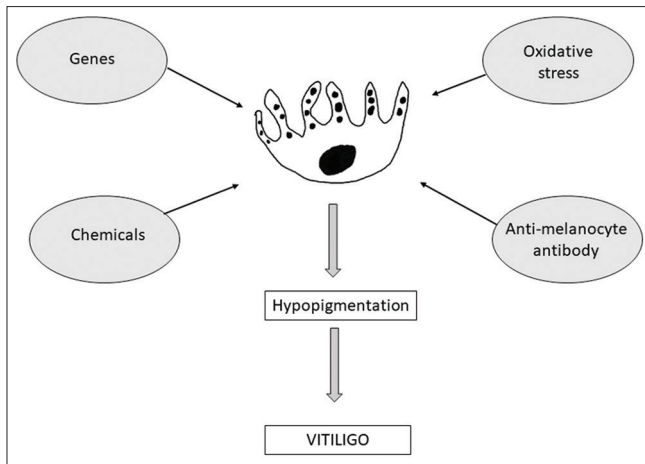


Figure 1: Multifactorial feature of vitiligo pathogenesis

the main cause of ROS accumulation.^[10,11] A recent study has observed that molecular hydrogen reverses hydrogen peroxide-induced apoptosis in melanocytes, protecting mitochondrial morphology and function in melanocytes under stress and promoting the activation of Nrf2 signalling.^[12]

ROS generation can also be induced by exogenous factors such as the environment, medical applications and other diseases.^[13,14] Studies have reported that melanocytes from vitiligo patients die upon exposure to exogenous stress *in vitro*, such as peroxide exposure, whereas melanocytes from healthy controls do not.^[15] Intracellular ROS include hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anions and hydroxyl radicals. H₂O₂ can disrupt melanin synthesis and can deactivate and deregulate acetylcholinesterase in the epidermis, providing more evidence of the role of oxidative stress in vitiligo.^[16] Zhang *et al.*^[17] showed that H₂O₂-induced apoptosis increases the level of calreticulin, which induces the expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- α (TNF- α).

The activity of superoxide dismutase (SOD), a metalloprotein that scavenges O₂⁻ and converts it into H₂O₂, is increased in the erythrocytes of vitiligo patients. H₂O₂ is converted into O₂ by catalase, whose expression is down regulated in vitiligo. The imbalance in the oxidative/antioxidative equilibrium is another cause of ROS accumulation. Several studies have reported an increase in malondialdehyde (MDA) levels in vitiligo patients, which is a product of lipid peroxidation reactions induced by oxidative stress.^[7]

Immunity

The immune-mediated destruction of melanocytes is the main factor causing vitiligo. Stressed melanocytes activate the innate immune system through cytokines secreted within the skin, that is, induced by the generation and release of damage-associated molecular

patterns (DAMPs).^[13] This has been demonstrated through the recruitment of innate immune cells, such as natural killer cells, as well as the production and release of highly pro-inflammatory proteins and cytokines including heat shock proteins, IL-1 β , IL-6 and IL-8. Moreover, it has been reported that CD8⁺ T cells induce the destruction of melanocytes.^[18,19]

Autoreactive T cells locate stressed melanocytes using the cytokines secreted within the skin. Studies have shown that IFN- γ and the IFN- γ -induced chemokines CXCL9 and CXCL10, which act as chemoattractants to guide T cell migration, are highly expressed in the skin and blood of vitiligo patients. The CXCL10/CXCR3 axis mediates T cell recruitment in progressive vitiligo, suggesting that the blocking of this mechanism could be a new form of therapy.^[20]

El-Gayyar *et al.*^[21] suggested that anti-melanocyte antibodies have an important role in the pathogenesis of non-segmental vitiligo, correlating with the severity of the disease. Furthermore, a higher prevalence of anti-thyroperoxidase, anti-thyroglobulin, antinuclear, anti-gastric parietal cell and anti-adrenal antibodies has been reported in vitiligo patients compared to healthy controls.^[22] Indeed, autoantibodies have an important role in disease pathology, confirming the important role of humoral immunity in vitiligo. Major melanocytic antigens include the proteins tyrosinase, TRP-1, TRP-2, Pmel17, SOX9, SOX10 and the type 1 membrane receptor for melanin-concentrating hormone (MCH-R1).^[23] SOX9 and SOX10, key transcription factors for melanocyte differentiation, have been reported many years ago to be autoantigens in vitiligo.^[24]

One of the proposed mechanisms for melanocyte destruction in vitiligo is the autoimmune intolerance via CD8⁺ and T helper 17 (Th17), which have an important role in exosomes in melanogenesis serving as mediators in the communication between keratinocytes and melanocytes.^[25]

Pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ and IL-8 and some anti-inflammatory/immunoregulatory cytokines such as IL-5 and IL-10 are increased in vitiligo patients. Mitra *et al.*^[26] suggested that the high level of IL-10 is due to the attempt to avoid the loss of melanocytes by the organism. However, other studies have shown a low level of IL-10.^[27] Zhou *et al.*^[28] indicated that IL-17 induces a stressful microenvironment for melanocytes, promoting autophagic cell apoptosis in vitiligo.

Microbiome

Different studies have demonstrated the relationship between alterations in the skin microbiome and some skin diseases such as psoriasis and atopic dermatitis.^[29,30] The first study correlating microbiota

and vitiligo demonstrated a dysbiosis in the diversity of the bacterial community of the areas with vitiligo hypopigmentation compared to normal skin. The authors observed distinctive distribution of bacterial populations with more *Actinobacterial* species, such as Actinomycetes, in areas of the skin without lesions and Firmicutes in areas with lesions.^[31]

More recent studies observed similar alterations in microbiota and associated the dysbiosis with mitochondrial damage. Moreover, the loss of protective bacteria in patients can be associated with an increase in immune responses.^[32]

Moreover, the role of the gut microbiome is known in the development of other skin diseases such as psoriasis autoimmune diseases. In the case of vitiligo, authors have found alterations in the gut microbiome composition and serum metabolites usually used as biomarkers of vitiligo. These findings can implicate the gut-skin axis in vitiligo pathogenesis.^[33]

Genetics

Among vitiligo patients, 15–20% have at least one first-degree relative with this disease. Furthermore, the risk of a patient's sibling developing vitiligo is 6%, whereas that of a monozygotic twin is 23%, illustrating the genetic basis of vitiligo.^[34]

At least 50 susceptibility loci for vitiligo have been identified by genome-wide association studies (GWAS), with 90% of these loci associated with innate and adaptive immunity and 10% associated with melanocytic antigens and stress response pathways, further demonstrating that immune mechanisms are the key in vitiligo.^[35]

The most significant genetic risk for vitiligo involves HLA-A polymorphisms, followed by HLA-DRB1/DQA1 and CPVL, which are related to antigen presentation. Moreover, genes associated with immune target cell lysis (*GZMB* and *FASLG*), adaptive immunity (*FOXP3*, *CTLA4*, *IL2RA*, *BACH2*, *CD80*, *CCR6*, *PTPN22* and α -*GZMB*), innate immunity (*TICAMI*, *IFIH1*, *CD80*, *NLRP1*, *CASP7*, *C1QTNF6* and *TRIF*), and melanocytes (*TYR*, *PMEL*, *MC1R*, *OCA2-HERC2* and *IRF4*) have been identified as risk factors for vitiligo.^[36]

Previous studies have demonstrated that the polymorphisms of superoxide dismutase (SOD), a crucial mitochondrial reactive oxygen species (ROS) scavenger, are genetic risk factors for the susceptibility and progression of vitiligo.^[37]

Chemical inducers

Different chemicals have been observed to induce skin depigmentation, that is, indistinguishable from idiopathic vitiligo. The mechanism of chemical-induced vitiligo is complex and still not clear.^[38,39] It has been

observed that some chemicals such as monobenzyl ether of hydroquinone (MBEH) and 4-tertiary butyl phenol can downregulate microphthalmia-associated transcription factor (MITF) leading to decreased melanin synthesis and thereby initiation of vitiligo.^[40] MBEH was the first chemical known as causing depigmentation and nowadays, MBEH is approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and is used therapeutically to complete and accelerate depigmentation to make the skin tone of patients with severe vitiligo uniform.^[41]

Several studies have confirmed that exposure to chemical agents, specifically phenolic and catechol derivatives found in dyes (including hair dyes), resins/adhesives and leather is associated with vitiligo. Phenols can act as tyrosinase analogues, affecting melanin synthesis and causing high levels of stress in melanocytes. Cell stress leads to ROS accumulation and the unfolded protein response, triggering immune reactions that destroy melanocytes and result in skin depigmentation.^[42]

Treatments and Future Perspectives

Finding the best treatment for vitiligo has become a challenge due to the complexity of the pathology of the condition. Therefore, vitiligo therapy must be personalised depending on each case and the degree of depigmentation. Safer and more effective treatments with long-lasting benefits are being studied because current treatments do not provide a long-lasting effect [Table 1].

Phototherapy

Phototherapy is the first-line treatment of choice for vitiligo. Narrowband UVB (NB-UVB) phototherapy induces re-pigmentation and is an effective treatment of vitiligo. This therapy provides good results on the face, trunk and limbs but topical treatment must be applied after phototherapy to prevent skin depigmentation. NB-UVB phototherapy can decrease the rate of new vitiligo lesions in non-segmental vitiligo patients, with earlier re-pigmentation in non-progressive vitiligo. Progressive patients required more doses of NB-UVB than non-progressive patients.^[43] The action of NB-UVB in the re-pigmentation of the skin can be attributed to an increase in the expression of the genes involved in pigmentation such as the TYR gene family constituted by tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) and tyrosinase-related protein 2 (TYRP2).^[44]

However, there are patients who do not respond to conventional phototherapies and in these cases, some studies have demonstrated that UVA1 laser can be an applicable therapeutic option.^[45,46]

Topical therapies

Topical corticosteroids are the most commonly used drug to treat vitiligo but there are concerns over side effects. Topical corticosteroids have been observed as effective

Table 1: Current therapies for vitiligo

Current therapies	References
<i>Vitiligo</i>	
<i>Phototherapy</i>	Frisoli ^[36] et al. (2020), Bhatia ^[43] et al. (2021), Awad ^[44] et al. (2021)
<i>Topical therapies</i>	Dellatorre ^[48] et al. (2020), Rokni ^[52] et al. (2017)
<i>Surgery</i>	Nahas ^[53] et al. (2017), Thakur ^[55] et al. (2019)
<i>Chemical depigmentation</i>	Rahman and Hasija ^[35] (2018),
<i>Laser therapy</i>	Rahman and Hasija ^[35] (2018),
<i>Skin camouflaging</i>	Derbyshire ^[56] (2019) Levy ^[57] et al. (2012)
<i>Immunotherapy</i>	Rashighi ^[60] et al. (2015), Speeckaert ^[61] et al. (2017)

in recent and facial lesions; however, to reduce the risk of side effects the administration should be limited to small areas, avoiding prolonged use and introducing another topical therapy after some weeks of continuous administration.^[47,48]

Topical corticosteroids exert anti-inflammatory responses, but re-pigmentation is more likely to occur on the face and neck than in the other areas. Moreover, topical corticosteroids can increase the efficacy of UVB and are indicated for small-localised patches. A combination of NB-UVB and topical corticosteroids has been demonstrated to be more effective than topical corticosteroids alone, presenting good tolerability both in adults and children.^[49,50]

Topical immunomodulators such as corticosteroids reduce the production of proinflammatory cytokines by inhibiting T-cell activity, thereby increasing pigmentation. Other immunomodulators can be used such as the macrolide antibiotic tacrolimus, which inhibits calcineurin action, thus preventing T-cell activation and the production of various inflammatory cytokines. Tacrolimus has been demonstrated to increase the proliferation of melanocytes.^[51] The topical application of tacrolimus is effective in the treatment of vitiligo and does not present the adverse effects observed with corticosteroids.^[52]

Other therapies

Surgery is used when medical therapies are not effective and consists of pigment cell transplantation. The melanocyte-keratinocyte transplantation procedure (MKTP) is the most popular option for the management of select patients with vitiligo. MKTP consists of cellular grafting in which cells from a donor are grafted to a treated area as a cellular suspension covering a larger area. The combination of surgery and other therapies as topical administration of immunomodulators is used to reduce immune response.^[53] Other adjuvant therapies include narrowband UVB phototherapy with a proliferative and

stimulatory effect on transplanted melanocytes.^[54] The use of epidermal cell suspension is usually performed in patients with clinical stability of a minimum of 12 months. The combination of epidermal suspension and dermal cell suspension gives a better response in patients with vitiligo and can be used early in the course of stable vitiligo without waiting for 12 months or more.^[55]

The best option to treat extensive vitiligo is the depigmentation of the pigmented areas by chemical or laser therapy. However, the efficacy of this treatment and the duration of its benefits are not enough.^[41]

Skin camouflage is the traditional application of pigmented creams that are designed to mask skin discoloration and can be useful where dermatological or surgical treatments may be considered invasive.^[56] Camouflaging the depigmented areas with cosmetic products can improve the social life of patients with vitiligo despite potential risks.^[57] Cosmetics can have a transient, semi-permanent or permanent (tattoos) effect. The most commonly used self-tanning product is dihydroxyacetone, whose effects increase with concentration.^[58] It is noticeable that 10% is the highest concentration allowed in the European Union for the purpose of tanning, and from 2022, all cosmetics containing more than 10% of dihydroxyacetone will be banned in Europe.^[59]

Future Perspectives

Emerging treatments will focus on the re-pigmentation of the skin through regulating autoimmunity, controlling melanocyte stress, and regenerating or depigmenting the remaining small-pigmented areas of the skin.

Targeted immunotherapy is one of the most important ways of treating vitiligo. Examples of this type of emerging therapy include the interference of IFN- γ -CXCL10 signalling,^[60] and the use of JAK inhibitors, STAT inhibitors and immune checkpoint inhibitors.^[61]

The regeneration of melanocytes can be stimulated with α -MSH analogues such as afamelanotide, which can improve the efficacy of phototherapy,^[62] and with Wnt activators.^[63]

ROS generation in patients with vitiligo can be resolved by reducing melanocyte stress through the use of antioxidants such as oral or topical natural health products.^[64]

As mentioned above, in vitiligo patients with small areas of pigmentation, depigmenting products can be used to achieve a uniform skin tone. For this reason, compounds with low toxicity and no side effects are currently being investigated for depigmenting skin.

As reviewed, several factors account for the pathophysiology of vitiligo but still open questions

remain. However, a better knowledge of the pathogenesis of hypopigmentation epigenetic regulation by genomic imprinting can reveal the specific functional genes and their regulatory elements and pathways. In this sense, omics analysis, by Cai *et al.*^[65] performed for vitiligo, can open a new perspective to understanding the causes, mechanisms and specific treatments for different skin pigmentation disorders.

Conclusions

In vitiligo, the destruction of melanocytes by the immune system is the major cause of this disease. Although the main signalling pathways are known, new therapies should be developed to treat vitiligo due to the low efficacy or side effects of current treatments. Therapies that can modulate the immune system, which is the main driver of hypopigmentation, are the best option to repigment the skin. Other agents that stimulate melanocytes can also be useful in inducing pigmentation.

Financial support and sponsorship

Nil.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, Van Geel N. Vitiligo. *Lancet* 2015;386:74-84.
- Brown AE, Qiu CC, Drozd B, Sklover LR, Vickers CM, Hsu S. The color of skin: White diseases of the skin, nails, and mucosa. *Clin Dermatol* 2019;37:561-79.
- Dahir AM, Thomsen SF. Comorbidities in vitiligo: Comprehensive review. *Int J Dermatol* 2018;57:1157-64.
- D'Arino A, Picardo M, Truglio M, Pacifico A, Iacovelli P. Metabolic comorbidities in vitiligo: A brief review and report of new data from a single-center experience. *Int J Mol Sci* 2021;22:8820. doi: 10.3390/ijms22168820.
- Simons RE, Zevy DL, Jafferany M. Psychodermatology of vitiligo: Psychological impact and consequences. *Dermatol Ther* 2020;33:e13418.
- Bergqvist C, Ezzedine K. Vitiligo: A focus on pathogenesis and its therapeutic implications. *J Dermatol* 2021;48:252-70.
- Speeckaert R, Dugardin J, Lambert J, Lapeere H, Verhaeghe E, Speeckaert MM, *et al.* Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: A systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018;32:1089-98.
- Chiarella P. Vitiligo susceptibility at workplace and in daily life: The contribution of oxidative stress gene polymorphisms. *Biomedical Dermatol* 2019;3:1-12.
- Wang Y, Li S, Li C. 2019. Perspectives of new advances in the pathogenesis of vitiligo: From oxidative stress to autoimmunity. *Med Sci Monitor* 2019;25:1017-23.
- Dell'Anna ML, Ottaviani M, Kovacs D, Mirabilii S, Brown DA, Cota C, *et al.* Energetic mitochondrial failing in vitiligo and possible rescue by cardiolipin. *Sci Rep* 2017;7:13663.
- Sahoo A, Lee B, Boniface K, Seneschal J, Sahoo SK, Seki T, *et al.* MicroRNA-211 regulates oxidative phosphorylation and energy metabolism in human vitiligo. *J Invest Dermatol* 2017;137:1965-74.
- Fang W, Tang L, Wang G, Lin J, Liao W, Pan W, *et al.* Molecular hydrogen protects human melanocytes from oxidative stress by activating Nrf2 signaling. *J Invest Dermatol* 2020;140:2230-41.
- Richmond JM, Frisoli ML, Harris JE. Innate immune mechanisms in vitiligo: Danger from within. *Curr Opin Immunol* 2013;25:676-82.
- Xie H, Zhou F, Liu L, Zhu G, Li Q, Li C, *et al.* Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity? *J Dermatol Sci* 2016;81:3-9.
- Ahn Y, Seo J, Lee EJ, Kim JY, Park MY, Hwang S, *et al.* ATP-P2X7-induced inflammasome activation contributes to melanocyte death and CD8+ T-cell trafficking to the skin in vitiligo. *J Invest Dermatol* 2020;140:1794-804.
- Said ER, Nagui NAER, Rashed LA, Mostafa WZ. Oxidative stress and the cholinergic system in non-segmental vitiligo: Effect of narrow band ultraviolet b. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2021;37:306-12.
- Zhang Y, Liu L, Jin L, Yi X, Dang E, Yang Y, *et al.* Oxidative stress-induced calreticulin expression and translocation: New insights into the destruction of melanocytes. *J Invest Dermatol* 2014;134:183-91.
- Wu J, Zhou M, Wan Y, Xu A. CD8+ T cells from vitiligo perilesional margins induce autologous melanocyte apoptosis. *Mol Med Rep* 2013;7:237-41.
- Riding RL, Harris JE. The role of memory CD8(+) T cells in vitiligo. *J Immunol* 2019;203:11-9.
- Wang XX, Wang QQ, Wu JQ, Jiang M, Chen L, Zhang CF, *et al.* Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. *Br J Dermatol* 2016;174:1318-26.
- El-Gayyar M, Helmy M, Amer E, Elsaied MA, Gaballah MA. Antimelanocyte antibodies: A possible role in patients with vitiligo. *Indian J Dermatol* 2020;65:33-7.
- Liu CW, Huang YC. Vitiligo and autoantibodies: A systematic review and meta-analysis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2018;16: 845-53.
- Unal A, Ozkol HU, Bayram Y, Akdeniz N. Comparison of tyrosinase antibody, tyrosinase-related protein-1 and -2 antibodies, melanin-concentrating hormone receptor antibody levels with autologous serum skin test and autologous plasma skin test results in patients with vitiligo. *Postepy Dermatol Alergol* 2021;38:473-9.
- Hedstrand H, Ekwall O, Olsson MJ, Landgren E, Kemp EH, Weetman AP, *et al.* The transcription factors SOX9 and SOX10 are vitiligo autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Biol Chem* 2001;276:35390-5.
- Wong PM, Yang L, Yang L, Wu H, Li W, Ma X, Katayama I, Zhang H. New insight into the role of exosomes in vitiligo. *Autoimmun Rev* 2020;19:102664. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102664.
- Mitra S, De Sarkar S, Pradhan A, Pati AK, Pradhan R, Mondal D, *et al.* Levels of oxidative damage and proinflammatory cytokines are enhanced in patients with active vitiligo. *Free Radic Res* 2017;51 (11-12):986-94.
- Gomes IA, de Carvalho FO, de Menezes AF, Almeida FM, Shanmugam S, de Souza Siqueira Quintans J, *et al.* The role of interleukins in vitiligo: A systematic review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018;32:2097-111.
- Zhou J, An X, Dong J, Wang Y, Zhong H, Duan L, *et al.* IL-17

- induces cellular stress microenvironment of melanocytes to promote autophagic cell apoptosis in vitiligo. *FASEB J* 2018;32:4899-916.
29. Zeeuwen PL, Kleerebezem M, Timmerman HM, Schalkwijk J. Microbiome and skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13:514-20.
 30. Hidalgo-Cantabrana C, Gomez J, Delgado S, et al. Gut microbiota dysbiosis in a cohort of patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2019;181:1287-95.
 31. Ganju P, Nagpal S, Mohammed MH, Requena-López S, Queiro-Silva R, Margolles A, Coto E, et al. Microbial community profiling shows dysbiosis in the lesional skin of Vitiligo subjects. *Sci Rep* 2016;6:18761.
 32. Bziouche H, SimonytėSjodin K, West CE, Khemis A, Rocchi S, Passeron T, et al. Analysis of matched skin and gut microbiome of patients with vitiligo reveals deep skin dysbiosis: Link with mitochondrial and immune changes. *J Invest Dermatol* 2021;141:2280-90.
 33. Ni Q, Ye Z, Wang Y, Chen J, Zhang W, Ma C, et al. Gut microbial dysbiosis and plasma metabolic profile in individuals with vitiligo. *Front Microbiol* 2020;11:592248. doi: 10.3389/fmicb.2020.592248.
 34. Spritz RA. Modern vitiligo genetics sheds new light on an ancient disease. *J Dermatol* 2013;40:310-8.
 35. Rahman R, Hasija Y. Exploring vitiligo susceptibility and management: A brief review. *Biomedical Dermatol* 2018;2:1-13.
 36. Frisoli ML, Essien K, Harris JE. Vitiligo: Mechanisms of pathogenesis and treatment. *Annu Rev Immunol* 2020;38:621-48.
 37. Laddha NC, Dwivedi M, Gani AR, Shajil EM, Begum R. Involvement of superoxide dismutase isoenzymes and their genetic variants in progression of and higher susceptibility to vitiligo. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1110-25.
 38. Alam M, Ghosh S. Effect of chemical exposure in induction and evolution of vitiligo: Correlation between duration of exposure and disease, site of exposure and onset, and impact upon avoidance. *Clin Epidemiol Glob Health* 2015;3:S91-95.
 39. Kammeyer A, Willemsen KJ, Ouwerkerk W, Bakker WJ, Ratsma D, Pronk SD, et al. Mechanism of action of 4-substituted phenols to induce vitiligo and antimelanoma immunity. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019;32:540-52.
 40. Kaushik H, Kaul D, Kumaran MS, Parsad D. Chemical induced pathognomonic features observed in human vitiligo are mediated through miR-2909 R Nomics pathway. *J Dermatol Sci* 2020;100:92-8.
 41. Harris JE. Chemical-induced vitiligo. *Dermatol Clin* 2017;35:151-61.
 42. Toosi S, Orlow SJ, Manga P. Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. *J Invest Dermatol* 2012;132:2601-9.
 43. Bhatia S, Khaitan BK, Gupta V, Khandpur S, Sahni K, Sreenivas V. Efficacy of NB-UVB in progressive versus non-progressive non-segmental vitiligo: A prospective comparative study. *Indian Dermatol Online J* 2021;12:701-5.
 44. Awad SS, Moftah NH, Rashed LA, Touni AA, Telep RAA. Evaluation of the effect of narrow band-ultraviolet B on the expression of tyrosinase, TYRP-1, and TYRP-2 mRNA in vitiligo skin and their correlations with clinical improvement: A retrospective study. *Dermatol Ther* 2021;34:e14649.
 45. Lotti T, Tchernev G, Wollina U, França K, Lotti J, Satolli F, et al. Successful treatment with UVA 1 laser of non-responder vitiligo patients. *Open Access Maced J Med Sci* 2018;6:43-5.
 46. Babino G, Giunta A, Esposito M, Saraceno R, Pavlidis A, Del Duca E, et al. UVA1 laser in the treatment of vitiligo. *Photomed Laser Surg* 2016;34:200-4.
 47. de la Fuente-Garcia A, Gomez-Flores M, Mancillas-Adame L, Ocampo-Candiani J, Welsh-Lozano O, Pérez JZ, et al. Role of the ACTH test and estimation of a safe dose for high potency steroids in vitiligo: A prospective randomized study. *Indian Dermatol Online J* 2014;5:117-21.
 48. Dellatorre G, Antelo DAP, Bedrikow RB, Cestari TF, Follador I, Ramos DG, et al. Consensus on the treatment of vitiligo-Brazilian Society of Dermatology. *An Bras Dermatol* 2020;95(Suppl 1):70-82.
 49. Batchelor JM, Thomas KS, Akram P, Azad J, Bewley A, Chalmers JR, et al. Home-based narrowband UVB, topical corticosteroid or combination for children and adults with vitiligo: HI-Light Vitiligo three-arm RCT. *Health Technol Assess* 2020;24:1-128. doi: 10.3310/hta24640.
 50. Thomas KS, Batchelor JM, Akram P, Chalmers JR, Haines RH, Meakin GD, et al. Randomized controlled trial of topical corticosteroid and home-based narrowband ultraviolet B for active and limited vitiligo: Results of the hi-light vitiligo Trial. *Br J Dermatol* 2021;184:828-39.
 51. Sisti A, Sisti G, Oranges CM. Effectiveness and safety of topical tacrolimus monotherapy for repigmentation in vitiligo: A comprehensive literature review. *An Bras Dermatol* 2016;91:187-95.
 52. Rokni GR, Golpour M, Gorji AH, Khalilian A, Ghasemi H. Effectiveness and safety of topical tacrolimus in treatment of vitiligo. *J Adv Pharm Technol Res* 2017;8:29-33.
 53. Nahhas AF, Mohammad TF, Hamzavi IH. Vitiligo surgery: Shuffling melanocytes. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2017;18:S34-7.
 54. Majid I, Imran S. Ultrathin split-thickness skin grafting followed by narrowband UVB therapy for stable vitiligo: An effective and cosmetically satisfying treatment option. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2012;78:159-64.
 55. Thakur V, Kumar S, Kumaran MS, Kaushik H, Srivastava N, Parsad D. Efficacy of transplantation of combination of noncultured dermal and epidermal cell suspension vs epidermal cell suspension alone in vitiligo: A randomized clinical trial. *JAMA Dermatol* 2019;155:204-10.
 56. Derbyshire E. Innovations in skin camouflaging techniques: Where are we scientifically? *Int J Cosmet Sci* 2019;41:526-33.
 57. Levy LL, Emer JJ. Emotional benefit of cosmetic camouflage in the treatment of facial skin conditions: Personal experience and review. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2012;5:173-82.
 58. Rajatanavin N, Suwanachote S, Kulkollakarn S. Dihydroxyacetone: A safe camouflaging option in vitiligo. *Int J Dermatol* 2008;47:402-6.
 59. Available from: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING_Annex%20III_v2.pdf [Last accessed on 2021 Nov 04].
 60. Rashighi M, Harris JE. Interfering with the IFN- γ /CXCL10 pathway to develop new targeted treatments for vitiligo. *Ann Transl Med* 2015;3:343.
 61. Speckaert R, van Geel N. Targeting CTLA-4, PD-L1 and IDO to modulate immune responses in vitiligo. *Exp Dermatol* 2017;26:630-4.
 62. Grimes PE, Hamzavi I, Leibold M, Ortonne JP, Lim HW. The efficacy of afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for repigmentation of vitiligo. *JAMA Dermatol* 2013;149:68-73.
 63. Harris JE. Melanocyte regeneration in vitiligo requires WNT

- beneath their wings. *J Invest Dermatol* 2015;135:2921-3.
64. Konstantinova VA, Olisova OY, Gladko VV, Burova EP. Vitiligo-new treatment approach. *Clin CosmetInvestig Dermatol* 2019;12:911-7.
65. Cai M, Yuan T, Huang H, Gui L, Zhang L, Meng Z, Wu W, Sheng Y, Zhang X. Integrative analysis of omics data reveals regulatory network of CDK10 in vitiligo risk. *Front Genet* 2021;12:634553. doi: 10.3389/fgene. 2021.634553.