

Fragmentación de ADN y cambios en la expresión de las proteínas Hsp70, Hsp90 y P53 en la piel de ratones BALB/c expuestos a luz ultravioleta UV (UVA, UVB, UVC)

DNA fragmentation and changes in the expression of Hsp70, Hsp90 and P53 proteins in the skin of BALB/c mice exposed to ultraviolet UV light (UVA, UVB, UVC).

Maricela Olarte-Saucedo,¹ David Alejandro García-López,² Jennifer Ortiz-Letechipia,³ Azucena Palafox-Herrera,⁴ Rosa Gabriela Reveles-Hernández,⁵ María Argelia López-Luna,⁶ Carlos Fernando Arechiga-Flores,⁷ Rómulo Bañuelos-Valenzuela,⁷ Sergio Hugo Sánchez-Rodríguez⁵

Resumen

OBJETIVO: Analizar cambios en la expresión de Hsp70, Hsp90, p53 y la fragmentación de ADN en células de piel de ratón BALB/c expuestos a radiación UVA, UVB y UVC, así como la posible disminución del daño cutáneo utilizando los antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT) por vía tópica.

MATERIAL Y MÉTODO: Estudio experimental básico efectuado de marzo de 2016 a febrero de 2019, en el que ratones BALB/c fueron expuestos a radiación UVA, UVB y UVC durante 30, 60 y 90 minutos, se obtuvieron extractos de piel. Las proteínas se caracterizaron por SDS-PAGE y Western-blot y se inmunodetectaron con anticuerpos monoclonales. Se evaluó la integridad del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.

RESULTADOS: Se observaron cambios en la morfología de la piel expuesta a luz UV, la Hsp70 y Hsp90 modificaron su expresión por luz UV (UVA, UVB, UVC) a los distintos tiempos de exposición, lo mismo sucedió con p53 donde su expresión se incrementó a 30 y 60 minutos de exposición. Al utilizar una crema con antioxidantes disminuyó levemente la expresión de Hsp70 y Hsp90, mientras que p53 aumentó. El ADN se fragmentó principalmente con luz UVB y UVC.

CONCLUSIÓN: La luz UV genera estrés celular modificando la expresión (incremento) de las proteínas Hsp70, Hsp90 y p53. Asimismo, se observa la fragmentación del ADN debido a luz UV.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de piel; radiación UV; fragmentación de ADN; p53.

Abstract

OBJECTIVE: To analyze changes in the expression of Hsp70, Hsp90, p53 and DNA fragmentation in BALB/c mouse skin cells exposed to UVA, UVB and UVC radiation, as well as the decrease in skin damage using the antioxidants superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) topically.

MATERIAL AND METHOD: A basic experimental study was done from March 2016 to February 2019 in which BALB/c mice were exposed to UVA, UVB and UVC radiation for 30, 60 and 90 minutes, skin extracts were obtained. The proteins were characterized by SDS-PAGE and Western-blot, and immunodetected with monoclonal antibodies. The DNA was evaluated for its integrity by electrophoresis in agarose gels.

RESULTS: Changes in the morphology of the skin exposed to UV light were observed, Hsp70 and Hsp90 modified their expression by UV light (UVA, UVB, UVC) at different

¹ Estudiante de Doctorado. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

² Maestría en Producción Animal y Zonas Áridas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas.

³ Maestría en Ciencias Nucleares. Unidad Académica de Ciencias Biológicas.

⁴ Químico farmacéutico biólogo. Unidad Académica de Ciencias Químicas.

⁵ Profesor investigador. Unidad Académica de Ciencias Biológicas.

⁶ Profesor investigador. Unidad Académica de Ciencias Químicas.

⁷ Profesor investigador. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.

Recibido: agosto 2019

Aceptado: septiembre 2019

Correspondencia

Sergio Hugo Sánchez Rodríguez
smdck@hotmail.com

Este artículo debe citarse como

Olarte-Saucedo M, García-López DA, Ortiz-Letechipia J, Palafox-Herrera A y col. Fragmentación de ADN y cambios en la expresión de las proteínas Hsp70, Hsp90 y P53 en la piel de ratones BALB/c expuestos a luz ultravioleta UV (UVA, UVB, UVC). Dermatol Rev Mex. 2020 mayo-junio;64(3):255-269.

exposure times, this was also the case with p53, where its expression increased at 30 and 60 minutes of exposure. By using a cream with antioxidants discreetly decreased the expression of Hsp70 and Hsp90, while p53 increased. The DNA was fragmented mainly with UVB and UVC light.

CONCLUSIONS: UV light generates cellular stress modifying the expression (increase) of Hsp70, Hsp90 and p53 proteins. Also, the fragmentation of DNA was observed, due to UV light.

KEYWORDS: Skin cancer; UV radiation; DNA fragmentation; p53.

ANTECEDENTES

La exposición a la radiación solar es el factor más importante de riesgo de la aparición de cáncer cutáneo, del que la radiación UV es el principal factor etiopatogénico. El sistema que más nos protege de la radiación UV en la Tierra es la capa de ozono, aunque existe deterioro en el grosor de ésta,¹ por lo que los efectos carcinogénicos de la radiación UV pueden atribuirse a esto y a la exposición exagerada al sol.²

La luz UV es una parte de la energía radiante proveniente del sol que constituye la porción más energética del espectro electromagnético que incide en la superficie de la Tierra. De la radiación UV que recibimos, 95% corresponde a UVA y solo 5% a la UVB, la UVC no llega a la superficie terrestre. La luz UVA envejece a las células de la piel y puede dañar el ADN a largo plazo. La UVB induce la aparición de eritema, edema, quemaduras en la piel, hiperplasia, inmunosupresión, daño en el ADN, fotoenvejecimiento y melanogénesis.³ La luz UVB es absorbida directamente por el ADN generando mutaciones, como: dímeros de ciclobutano de pirimidina (que pueden ser timina-timina, seguidos de citosina-timina y en menor proporción dímeros citosina-citosina) así como las transversiones citosina-citosina a timina-timina, denominadas mutaciones de huellas dactilares

UVB. Si estos cambios no son reparados, las mutaciones persisten a través de las subsecuentes subdivisiones causando células precancerosas actínicas, queratosas, así como células basales escamosas, carcinomas y melanomas.⁴ Asimismo, la luz UVC en células de mamíferos es absorbida por las proteínas, particularmente por los enlaces peptídicos y otras biomoléculas alterando su conformación,⁵ además, el daño producido por la luz UVC es 140 veces más elevado que los daños oxidativos de purinas, 280 veces más que los oxidativos de pirimidinas y 550 veces más que los sitios abásicos en el ADN con respecto a la luz UVA y UVB.³

La luz UV induce indirectamente daño oxidativo por la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), por transferencia de cargas de cromóforos endógenos excitados; estas modificaciones son rupturas de cadenas simples y dobles (SSBs y DSBs, respectivamente) que a su vez disminuyen las concentraciones de enzimas antioxidantes⁶ y la capacidad de reparar los procesos oxidativos en biomoléculas como el ADN, lípidos y proteínas, por ende, provoca envejecimiento celular, cáncer, procesos inflamatorios, entre otras alteraciones.⁷

Para contrarrestar el efecto nocivo de las EROs, los organismos aerobios cuentan con sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Los enzimáticos disminuyen la concentración intracelular de radicales libres, entre éstos destacan glutatión peroxidasa (GSH-Px), catalasa (CAT) y superoxidodismutasa (SOD). De igual manera, los antioxidantes no enzimáticos lipofílicos (la vitamina E o α -tocoferol, ubiquinol y la ubiquinona) e hidrofílicos (vitamina C o ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico) actúan de manera similar y mantienen concentraciones más altas en la epidermis con respecto a la dermis.⁸

Las células de la piel también tienen un grupo de proteínas que ayudan a amortiguar el estrés, éstas son las proteínas de estrés calórico (Hsp) que en condiciones normales ayudan al plegamiento de las proteínas, participan en los procesos de transporte a través de membranas, así como a su integración a diversos orgánulos. Una proteína de estrés importante es la Hsp70, actúa como chaperona y juega un papel importante en la homeostasia de proteínas en la célula,⁹ así como la Hsp90, que se relaciona con receptores de hormonas esteroideas en la regulación de su actividad biológica;¹⁰ además, tiene interés considerable como diana oncogénica porque las células tumorales y las proteínas oncogénicas dependen en gran medida de su actividad.¹¹ En diferentes procesos de estrés como choque térmico, exposición a metales pesados, a especies reactivas de oxígeno, a radiación como la luz ultravioleta, entre otros, estas proteínas se sobreexpresan para recuperar la homeostasia celular al renaturalizar proteínas o al inducir su destrucción cuando son dañadas.¹² Se ha investigado que existe relación directa entre la dosis de luz UV recibida y la expresión de Hsp70 en células humanas de la piel,¹³ así como por exposición a luz UVB en piel y córneas de ratón,^{14,15} de la misma manera para Hsp90 en células HeLa y HEK293 T,¹⁶ y células sanguíneas.¹¹

Respecto al daño al ADN por exposición a luz UV, la célula puede activar mecanismos

homeostáticos de reparación a través de la proteína p53 para la corrección al ADN o, bien, si el daño es mayor e irreparable, activa la muerte celular por apoptosis.¹⁷ La proteína p53 es activada por diversas señales de estrés. Entre sus funciones están la regulación de genes, recombinación de ADN, inducción de la apoptosis, en los procesos de reparación del ADN, la segregación cromosomal y la senescencia celular.¹⁸ La mutación de p53 se relaciona en más de 50% del cáncer presente en los seres humanos.¹⁹⁻²¹ Cuando existe una mutación en el gen p53, la vía protectora de la célula fracasa, ocurriendo la transformación neoplásica.²² Se ha encontrado relación directa respecto a la sobreexpresión de p53 y exposición a luz UV en células de la piel.²³⁻²⁵ En más de 90% de los melanomas no malignos p53 se encuentra mutado¹⁸ y en 90% de los carcinomas epidermoides cutáneos expresan mutaciones de p53, frente a 70% de las queratosis actínicas y 50% de los carcinomas basocelulares.²⁶

Por lo antes expuesto, y para entender mejor la respuesta homeostática de la piel por exposición a la luz ultravioleta, el objetivo de este estudio fue analizar cambios morfológicos de la piel, la expresión de Hsp70, Hsp90, p53 y la fragmentación de ADN en células de piel de ratón BALB/c expuestos a radiación UVA, UVB y UVC, así como también la posible disminución del daño cutáneo utilizando los antioxidantes superóxido-dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT) por vía tópica.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales experimentales

Como modelo experimental se usaron ratones machos de la cepa BALB/c (n = 12), de 12 semanas de edad con peso comprendido entre 24 y 26 g, se distribuyeron en cuatro grupos experimentales de tres ratones cada uno. Para

cada ensayo a evaluar se hicieron tres repeticiones, lo que dio un total de 16 unidades experimentales.²⁷ Los animales se mantuvieron separados en jaulas de plástico independientes, en un bioterio en condiciones controladas de temperatura (18-23°C), luz (con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas) y humedad (50-60%). Los ratones fueron monitoreados diariamente, alimentados e hidratados con agua purificada *ad libitum*.

Irradiación con luz UV (UVA, UVB, UVC)

Se utilizaron grupos de tres ratones BALB/c para cada condición, todos los ratones fueron rasurados por la parte dorsal 24 horas antes del ensayo (rasuradora Andis ProClip, Modelo AGC), un lote de ratones se utilizó como control que no fue irradiado con luz UV, otro lote fue expuesto a radiación UVA (365 nm), otro con radiación UVB (302 nm) y un último con radiación UVC (254 nm) por tiempos de exposición de 30, 60 y 90 minutos para cada tipo de luz UV. La lámpara de UV se colocó a 30 cm del dorso del animal. La dosis recibida de radiación UV (UVA, UVB y UVC) fue de: 212.4 J/cm² para 30 minutos, 424.8 J/cm² para 60 minutos y 637.2 J/cm² para 90 minutos.^{27,28} Después de irradiar los ratones, éstos se sacrificaron por desnucamiento. Todos los procedimientos realizados a los animales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Estudio histopatológico

Se obtuvo la piel de ratón BALB/c del grupo control (C) y los grupos expuestos a radiación UV, el tejido se procesó por la técnica histológica

mediante bloques de parafina, posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina.²⁹

Irradiación UVB más la aplicación de crema tópica con antioxidantes (CAT, SOD, GSH-px)

Para analizar si un antioxidante aplicado de manera exógena a la piel de los ratones tiene efecto protector visto por cambios de la expresión de algunas proteínas, a los ratones (n = 4) se les aplicó una crema con antioxidantes de manera tópica 30 minutos antes de irradiarlos, esta fase se realizó con un hisopo estéril, untando con movimientos suaves hasta cubrir la mayor superficie posible del cuerpo a irradiar, posteriormente se sometieron a irradiación bajo el protocolo mencionado para UVB. Después de la irradiación, los ratones se sacrificaron por desnucamiento.

Formulación de la crema protectora

Se formuló la crema con antioxidantes: glutatión peroxidasa (bovine erythrocytes G6137-100UN Sigma-Aldrich®), superóxido dismutasa (bovine liver S8160-15KU Sigma-Aldrich®) y catalasa (bovine liver C9322-1G Sigma-Aldrich®). Se preparó la crema base con 2.5 mL de aceite mineral, 1 g de ácido esteárico, 1 g de vaselina, 0.2 mL de trietanolamina, 5 mL de agua destilada y 0.15 mg de cada una de las enzimas diluidas en 100 µL de PBS de pH 7. Se colocó en un vaso de precipitado el aceite mineral y el ácido esteárico a baño maría a temperatura de 75°C, en otro vaso se preparó con agua la trietanolamina a baño maría a temperatura de 75°C. Posteriormente se mezclaron los contenidos de los vasos y se agregó la glicerina y cada una de las enzimas mezclando a temperatura de 25°C hasta obtener el cremado. La crema se colocó en envases de plástico estériles y se almacenó hasta su uso en el ultracongelador a -70°C.

Obtención de piel de ratones BALB/c y cuantificación de proteínas

Se obtuvo la piel por el método de disección con el fin de obtener un extracto antigénico para los ensayos de Western blot y análisis de ADN. Por separado, una fracción de la piel obtenida de los ratones control y otra fracción de los sometidos a irradiación, se les añadió 1 mL de buffer de lisis, que está compuesto de tritón X-100 a 1%, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM con pH de 7.6, inhibidor de proteasas 1 mM (PMSF; P-7626, Sigma Chemical Co, St Louis MO, Estados Unidos) y 10 µL de un coctel inhibidor de proteasas (11697498001, Roche). Las muestras de piel con buffer de lisis se mantuvieron en hielo y se homogenizaron utilizando un equipo IKA (Ultra-Turrax® T181351). El lisado se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica descrita por Bradford en 1976.³⁰ Posteriormente para cada muestra se caracterizaron 20 µg de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) a 7.5%, de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli en 1970.³¹

Western blot e inmunodetección con anticuerpos monoclonales

Las proteínas separadas en los geles SDS-PAGE se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (RPN303C, Amersham Laboratories, Buckinghamshire, Inglaterra), como describió Towbin en 1979.³² Se comprobó la existencia de proteínas en la membrana al teñirlas con rojo Ponceau, se lavaron las membranas con agua destilada para desteñirlas. Posteriormente éstas se sometieron a un bloqueo de lugares inespecíficos con una solución PBS-leche (caseína) a 3% por 24 horas. Bloqueadas las membranas se procedió a la inmunodetección con anticuerpos monoclonales específicos anti Hsp70 (W27: sc-24, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) dilución

1:500, anti Hsp90 (CN-17: sc-1055 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anti p53 (13-4100; Invitrogen, Estados Unidos) dilución 1:500 durante 1 h, después se procedió a realizar seis lavados intercalados con PBS y PBS-Tween a 3%, para después incubar con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa por una hora. Por último se realizaron otros seis lavados con PBS y PBS-Tween a 3%.

La unión antígeno-anticuerpo se observó mediante colorimetría usando una solución de diaminobencidina a 0.1% activada con peróxido de hidrógeno, se observó la aparición de bandas de color marrón sobre las membranas de nitrocelulosa. Asimismo, se utilizó el método de detección por quimioluminiscencia (ECL, Prime Western Blotting Detection Reagent, RPN22342). Mediante un equipo densitométrico (ChemiDoc™ XRS+, Mod Universal Hood II, Imagen Lab™ Software), con el fin de visualizar y cuantificar la proteína.

Análisis de la integridad del ADN genómico

Para extraer el ADN genómico se utilizó la técnica específica del reactivo (ADNzol® Regent de GibcoBRL 10503-027). Cada muestra biológica de piel se trituró con nitrógeno líquido en un mortero mezclado con el reactivo ADNzol®, posteriormente el ADN genómico se precipitó mediante etanol absoluto. Tras un lavado con etanol (75%), el ADN se disolvió en NaOH 8 mM para resuspenderlo. Una vez aislado el ADN se prosiguió a realizar la cuantificación de éste por espectrofotometría (260 nm) utilizando un sistema (Nanodrop Lite® de Thermo Scientific) para posteriormente realizar el corrimiento del ADN en geles de agarosa y evaluar su integridad.³³ Para realizar la electroforesis del ADN, se prepararon geles a 0.8% de agarosa en buffer TAE (tris ácido etilendiamin tetracético 5 M pH8), a los que se les adicionó bromuro de etidio para observar el ADN, posteriormente se prepararon las muestras

con buffer de carga y se colocaron en el gel junto con el marcador de peso molecular de ADN, se corrieron las muestras aproximadamente una hora a 80 volts. Al finalizar esto se prosiguió a generar imágenes digitales y observarlas en un fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS+, Mod Universal Hood II, Imagen Lab™ Software) para evaluar su integridad.³³ La integridad o degradación del ADN pudo evaluarse utilizando el siguiente criterio: si el ADN está íntegro, debe observarse una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de 1 cm de ancho con un sendero luminoso en el carril de la muestra en forma de cola de cometa.³³

Análisis estadístico

Para determinar la significación de las diferencias en las muestras extraídas de los animales modelo ratón irradiadas, no irradiadas y con ungüento, los valores de las variables dependientes: Hsp70, P53 y Hsp90 se analizaron mediante un análisis paramétrico de variancia ANOVA, donde las variables independientes fueron el nivel de radiación, tiempo de radiación y el ungüento.

Para medir y comparar las alteraciones causadas en la piel de los ratones, así como la integridad de ADN, éstas fueron evaluadas por un análisis no paramétrico Wilcoxon, donde las variables independientes serán nivel de radiación, el tiempo de radiación y el ungüento, seguido de una prueba de Dunnett de comparación múltiple para establecer la significación estadística. Los datos obtenidos se analizaron por SAS (SAS, 2010).

RESULTADOS

Cambios en la estructura de la piel de ratones BALB/c expuestos a radiación UV

Al analizar la piel sana (**Figura 1**), se observó en la epidermis el epitelio plano estratificado quera-

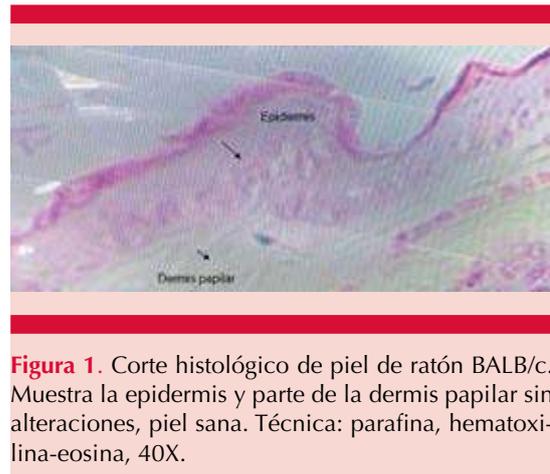


Figura 1. Corte histológico de piel de ratón BALB/c. Muestra la epidermis y parte de la dermis papilar sin alteraciones, piel sana. Técnica: parafina, hematoxilina-eosina, 40X.

tinizado, con polaridad celular, en la dermis se vio parte de la región papilar de tejido conectivo laxo areolar.

En la piel de ratones sometidos a radiación UV se observó nucleomegalia y binucleación en la epidermis, había focos con pérdida de la polaridad (**Figura 2A**). En la dermis se ve claramente edema trasudado y perivascular, filtrado inflamatorio moderado, acompañado por neutrófilos y eosinófilos, característico de una inflamación aguda, no se observó fibrosis (**Figura 2B y C**).

Expresión de la Hsp70 en la piel de ratón BALB/c expuesto a luz UVA, UVB y UVC

Para determinar si la luz UV induce estrés celular visto a través de la expresión de la proteína Hsp70, ratones BALB/c fueron expuestos a luz UV a diferentes tiempos. Se encontró que la Hsp70 se expresó en condiciones normales y se sobreexpresó en condiciones de estrés por radiación UVA, UVB y UVC. La expresión de Hsp70 se incrementó con radiación UVA a los 30, 60 y 90 minutos, con UVB a los 60 minutos y con UVC a los 90 minutos (**Figura 3**).

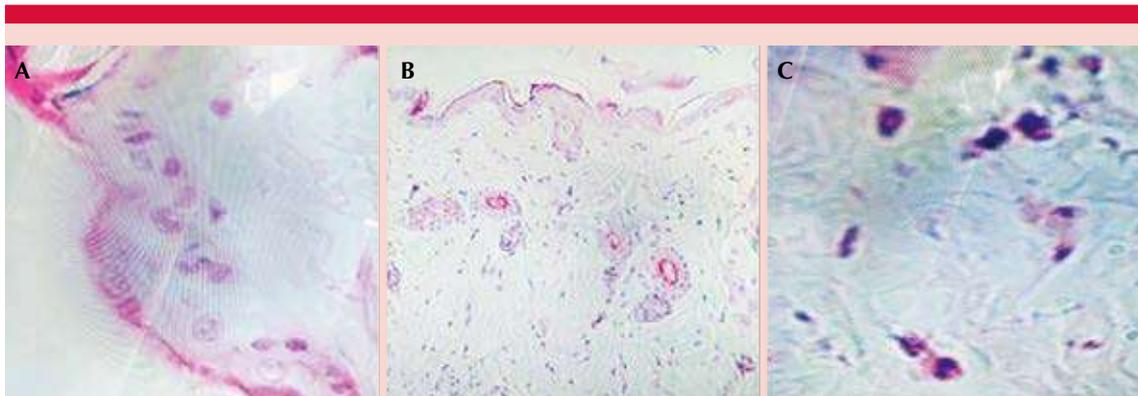


Figura 2. Piel de ratón BALB/c irradiada con radiación UV-B por 30 minutos. **A.** Pérdida de la polaridad del epitelio. **B.** Se señala filtrado inflamatorio moderado. **C.** Existencia de neutrófilos y eosinófilos en un proceso inflamatorio agudo. Técnica: parafina, hematoxilina-eosina (Ross y col., 2016).

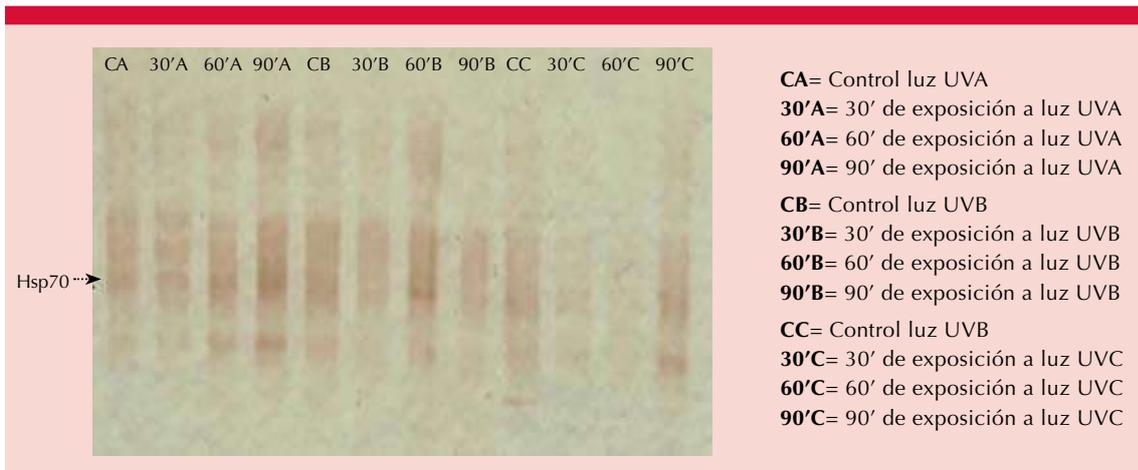


Figura 3. Expresión de la proteína Hsp70 en la piel de ratones BALB/c expuestos a radiación UV-A, UV-B y UV-C, a tiempos de 30, 60 y 90 minutos para cada tipo de radiación UV.

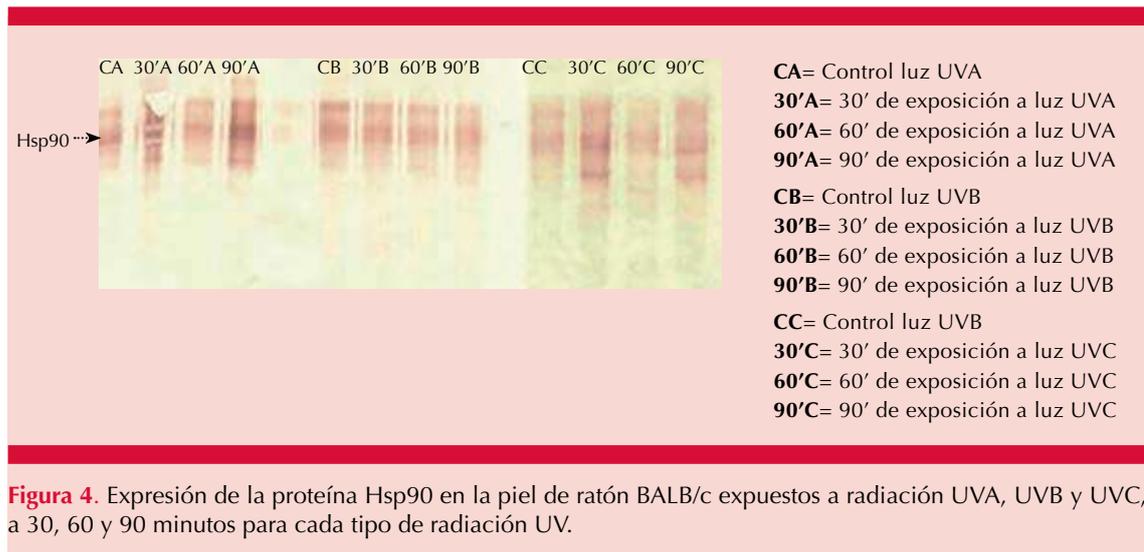
Expresión de la Hsp90 en la piel de ratón BALB/c expuesto a luz UVA, UVB y UVC

Asimismo, se determinó si la luz UV induce estrés celular visto a través de la expresión de la proteína Hsp90, donde ratones BALB/c se expusieron a luz UV a diferentes tiempos establecidos. Se encontró que la proteína Hsp90 se expresó en condiciones normales y se sobre-expresó en condiciones de estrés por radiación

UVA, UVB y UVC. La expresión de Hsp90 se incrementó con radiación UVA a los 30, 60 y 90 minutos con UVB a 30, 60 y 90 minutos y con UVC a 30 y 90 minutos (**Figura 4**).

Expresión de p53 de la piel de ratón BALB/c expuesto a luz UVA, UVB y UVC

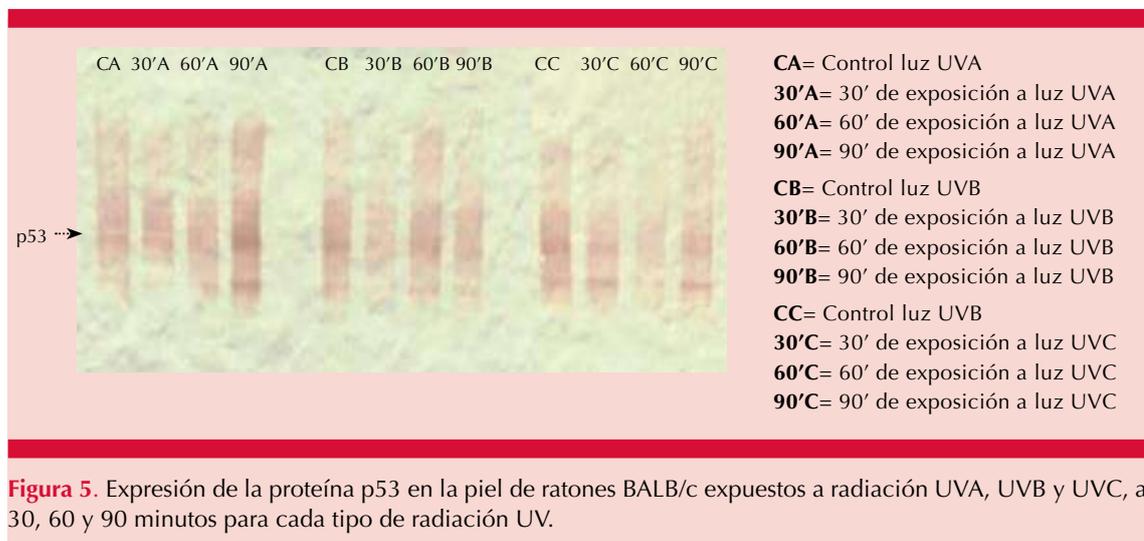
También se determinó si la luz UV induce estrés celular visto a través de la expresión de la proteí-



na p53, donde ratones BALB/c se expusieron a luz UV a diferentes tiempos. Se encontró que la proteína p53 se expresó en condiciones normales y se sobreexpresó en condiciones de estrés por radiación UVA, UVB y UVC. La expresión de p53 se incrementó con radiación UVA a los 30, 60 y 90 minutos con UVB a los 60 minutos y con UVC a los 30 y 90 minutos (**Figura 5**).

Fragmentación del ADN de la piel de ratón BALB/c expuesto a luz UVA, UVB y UVC

Como previamente observamos, la luz UVA, UVB y UVC induce estrés celular. Por lo anterior, se determinó si bajo estas condiciones, se encuentra dañado el ADN de las células, analizándolo mediante la fragmentación de esta molécula.



Se encontró que la fragmentación del ADN se da en condiciones de estrés por radiación UVA, UVB y UVC. La fragmentación de ADN se observó principalmente con la radiación UVA a los 30 y 60 minutos, con UVB a los 30 y 90 minutos y con UVC a los 30 y 60 minutos (**Figura 6**).

Crema con antioxidantes aplicada a ratones expuestos a luz UV

Debido a que la luz UV induce daño celular visto a través de la fragmentación del ADN y aumento en la expresión de las proteínas p53, Hsp70 y Hsp90, en este trabajo se elaboró una crema protectora para luz UV que contiene moléculas neutralizantes de los radicales libres, como la glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

Para determinar si esta crema con antioxidantes reduce el daño por luz UV en los ratones BALB/c, éstos fueron expuestos solo a la luz UVB durante 30 minutos, porque observamos que a partir de este tiempo se empieza a incrementar la expresión de las proteínas y el daño en el ADN.

Se encontró elevación de la proteína Hsp70 y Hsp90 en la piel de ratón por exposición a radiación UV y disminución de ésta con la crema con antioxidantes (**Figuras 7 y 8**). Cuando se analizó la expresión de la proteína p53 bajo las condiciones mencionadas, se observó discreto incremento en su expresión utilizando la crema con antioxidantes y disminución sin antioxidantes (**Figura 9**).

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar cambios morfológicos de la piel, la expresión de las proteínas Hsp70, Hsp90, p53 y la fragmentación del ADN en la piel de ratones BALB/c expuestos a la luz UV (UVA, UVB, UVC), así como la disminución del daño cutáneo utilizando los antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (CAT) por vía tópica.

Los resultados histopatológicos de la piel de ratón BALB/c expuestos a luz ultravioleta B por 30 minutos revelaron pérdida de la polaridad,

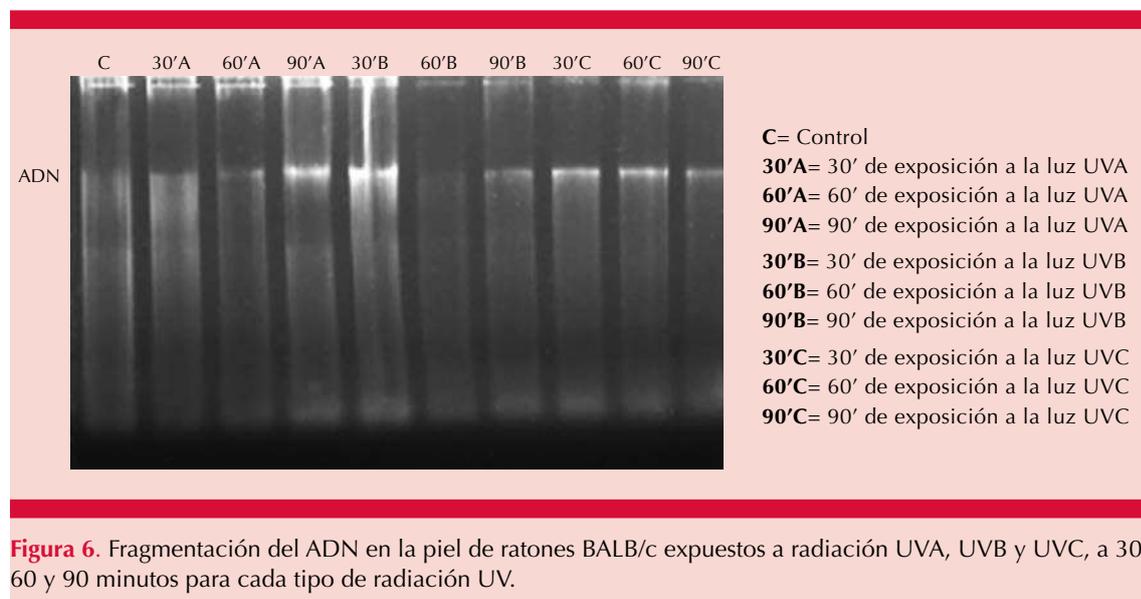


Figura 6. Fragmentación del ADN en la piel de ratones BALB/c expuestos a radiación UVA, UVB y UVC, a 30, 60 y 90 minutos para cada tipo de radiación UV.

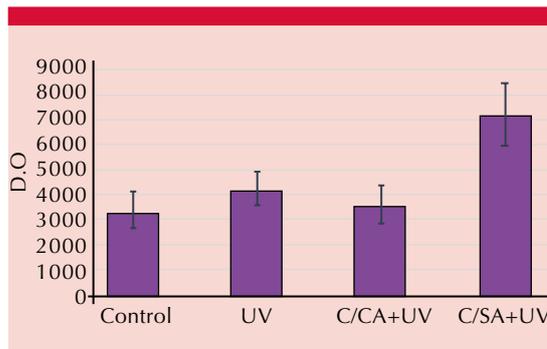


Figura 7. Expresión de la proteína Hsp70 en piel de ratón BALB/c. Se muestra la concentración de Hsp70 obtenida por densitometría (Bio-Rad®, Chemy-Doc). (C) control (piel no tratada). (UV) piel tratada con luz ultravioleta (302 nm) durante 30 minutos. (C/CA +UV) piel tratada con crema con antioxidantes por 30 minutos más luz UV por 30 minutos, (C/SA + UV) piel tratada con crema sin antioxidantes por 30 minutos más radiación ultravioleta por 30 minutos. Existe diferencia estadística entre las medias de densidad óptica ($p \leq 0.05$).

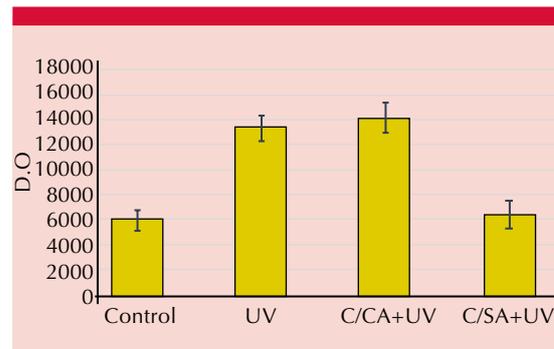


Figura 9. Expresión de la proteína p53 en piel de ratón BALB/c. Se muestra la concentración de p53 obtenida por densitometría (Bio-Rad®, Chemy-Doc). (C) control (piel no tratada). (UV) piel tratada con luz ultravioleta (302 nm) por 30 minutos. (C/CA +UV) piel tratada con crema con antioxidantes por 30 minutos más luz UV por 30 minutos, (C/SA + UV) piel tratada con crema sin antioxidantes por 30 minutos más radiación ultravioleta por 30 minutos. Existe diferencia estadística entre las medias de densidad óptica ($p \leq 0.05$).

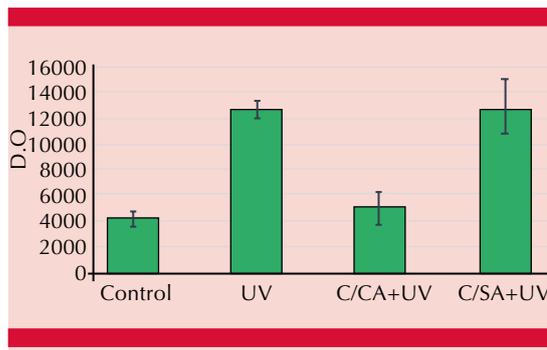


Figura 8. Expresión de la proteína Hsp90 en piel de ratón BALB/c. Se muestra la concentración de Hsp90 obtenida por densitometría (Bio-Rad®, Chemy-Doc). (C) control (piel no tratada). (UV) piel tratada con luz ultravioleta (302 nm) por 30 minutos. (C/CA + UV) piel tratada con crema con antioxidantes por 30 minutos más luz UV por 30 minutos, (C/SA + UV) piel tratada con crema sin antioxidantes por 30 minutos más radiación ultravioleta por 30 minutos. Existe diferencia estadística entre las medias de densidad óptica ($p \leq 0.05$).

nucleomegalia, binucleación en la epidermis e inflamación aguda en la dermis, no se logró observar fibrosis porque el sistema de reparación de tejidos es un proceso largo y el experimento se realizó en periodos cortos. Estos resultados son similares a los encontrados en trabajos previos³⁴ en los que la piel de ratones expuestos a luz UV mostró edema, eritema, aumento del grosor del estrato córneo e hiperplasia; otros investigadores³⁵ reportan hiperplasia epidérmica además de elasticidad de la piel disminuida al exponer ratones a campos de radiación UV.

Al determinar la expresión de la proteína Hsp70 en la piel de ratón BALB/c irradiada con luz UVA, UVB, UVC a diferentes tiempos, se encontró que la Hsp70 se expresó de manera basal en condiciones normales y se sobreexpresó en condiciones de estrés por exposición a radiación UV, cuyo incremento con UVA fue a los 30, 60 y 90 minutos, con UVB a los 60 minutos y con UVC a los 90 minutos. Estos resultados sugieren

que la piel de ratón, al exponerse a la radiación UV, sobreexpresa la proteína Hsp70 para mantener la homeostasia celular. Lo anterior va en concordancia con la función protectora de la Hsp70, ésta se sobreexpresa por estrés, tal como lo demuestran trabajos previos,³⁶ en los que células tumorales hepáticas, al ser expuestas a radiación UVC, tienen un efecto antiapoptótico por el incremento de la expresión de Hsp70. Asimismo, otros trabajos señalan que la proteína Hsp70 desempeña el papel de proteger a las células del estrés térmico y oxidativo,³⁷ por lo que su expresión se considera un bioindicador de estrés celular;^{9,38} en estudios anteriores también se demostró que, al exponer células de la piel a luz UV, la expresión de Hsp70 aumenta y tiene un efecto radioprotector,¹³ investigaciones recientes proporcionaron datos en los que la Hsp70 incrementa su expresión debido a su efecto citoprotector frente a la exposición a radiación UV en ratones.^{34,35} Sumado a lo anterior, otros trabajos han demostrado que en condiciones de estrés esta proteína se eleva para proporcionar protección a las proteínas celulares para promover la supervivencia de la célula o, bien, en casos extremos, si la célula muestra alteraciones irreparables, llevarla a la muerte celular.³⁹ Cuando se aplica la crema con los antioxidantes sobre la piel de los ratones y luego es irradiada con luz UV, se observa discreta disminución de la expresión de Hsp70, lo que nos hace suponer que los antioxidantes penetraron el estrato córneo de la epidermis y empezaron a neutralizar a los EROs, asimismo, se observa incremento de Hsp70 cuando se aplica la crema sin antioxidantes. Estudios anteriores⁴⁰ coinciden con nuestro trabajo, mismos que han demostrado que las células cuando son sometidas a condiciones de estrés por radiación UV, aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que pueden dañar a la célula, pero que pueden ser neutralizadas con antioxidantes y así evitar el daño.^{40,41} Otros autores han encontrado que la chaperona Hsp70 se expresa de manera

continua en la piel de ratón BALB/c, y que está presente en la epidermis y en la dermis, donde se expresa constitutivamente dentro de los queratinocitos⁴² y que en presencia de calor, estrés oxidativo, privación de glucosa y toxinas, actúan como citoprotectoras, impidiendo rutas apoptóticas, favoreciendo la supervivencia de las células bajo condiciones de estrés.⁴²

Al determinar la expresión de la proteína Hsp90 en la piel de ratón BALB/c cuando es irradiada con luz UV a diferentes tiempos, se encontró que la Hsp90 se expresó en condiciones normales y se sobreexpresó por radiación UVA a los 30, 60 y 90 minutos con UVB a 30, 60 y 90 minutos y con UVC a 30 y 90 minutos. Esta chaperona manifiesta un comportamiento similar en otros estudios realizados,¹¹ en los que se observa que al irradiar con luz UV carcinomas de células escamosas (CCE) de ratón, la Hsp90 se sobreexpresa y, al tratarlo con una crema tópica que contiene 17-[allylamino]-17-demethoxygeldanamycin (17AAG), disminuye su expresión con resultados prometedores para tratar el cáncer de piel con menos efectos tóxicos. Cuando se aplica la crema con los antioxidantes y radiación UV a la piel del ratón, se observa disminución en la expresión de la proteína Hsp90, lo que posiblemente indica que la crema neutraliza a los EROs, disminuye la oxidación celular y, por tanto, baja la expresión de la Hsp90; asimismo, cuando se utiliza una crema sin antioxidante, aumenta la expresión de la proteína Hsp90. Nuestros resultados infieren que la elevación de la Hsp90 da protección a la célula durante el estrés por exposición a luz UV.

Al determinar la expresión de la proteína p53 en la piel de ratón BALB/c cuando es irradiada con luz UV, se observa en ratones control una expresión basal de la proteína p53 y, al exponerlos a la radiación UV, se distingue el incremento en la expresión a medida que aumenta el tiempo de exposición (30, 60 y 90 minutos) en las diferentes

longitudes de onda utilizada (UVA, UVB, UVC). Debido a que el daño celular por exposición a luz UV es proporcional a la cantidad de energía recibida, la radiación UVA es menos energética por lo que necesita más tiempo para generar daño celular y poder hacer evidente la existencia de la proteína p53, por lo que la expresión de esta proteína se acentúa hasta los 90 minutos; por el contrario, al ser la luz UVC la más energética no requiere tanto tiempo de exposición para generar daño y se observó la sobreexpresión de p53 a partir de 30 minutos, disminuyendo su existencia a 60 y 90 minutos, lo que sugiere mayor daño celular con la posible activación del proceso de muerte celular. En el caso de la exposición a luz UVB, que es energéticamente intermedia, puede notarse mayor existencia de la proteína hasta 60 minutos, con disminución a 90 minutos, lo que sugiere que después de 60 minutos de exposición pudiera haber muerte celular debido a la no existencia de la proteína p53. La modificación en la expresión de p53 frente a agentes estresores físicos se ha observado en otros experimentos,⁴³ en los que al exponer queratinocitos y biopsias de piel a estrés térmico (calor) y radiación UVB, observaron incremento de la proteína p53; asimismo, encontraron que con calor más radiación UVB descienden las concentraciones de la proteína p53 y hay muerte celular, lo que sugiere que existe muerte celular por la baja expresión de la proteína p53;⁴³ en otros trabajos⁴⁴ se observó aumento de la proteína p53 en fibroblastos de embriones de ratón y células de melanoma amelanótico humano irradiadas con UVB, similar a lo encontrado por otros investigadores⁴⁵ en biopsias de piel humana con queratosis actínica y de ratones SKH-1 sin pelo expuestas a luz UV. Por otro lado, en estudios en los que se utilizó la radiación UV en conjunto con el frío sobre la piel, se observó aumento de EROs y de la producción de la proteína p53 y disminución de la apoptosis mediada por p53.^{46,47} Por lo anterior, en este estudio encontramos una relación directa entre la exposición a radiación UV y la expresión de p53 al generarse daño celular. Cuando se aplica

la crema con los antioxidantes y la piel del ratón BALB/c se expone a radiación UV, la expresión de la proteína p53 se sobreexpresa y disminuye cuando se expone con crema sin antioxidantes, lo que indica que la crema con los antioxidantes más la expresión de p53 ayudan a disminuir el daño inducido por la luz UV. Estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores, que argumentan que la radiación ultravioleta genera especies reactivas de oxígeno en la piel que pueden oxidar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, ocasionando daño crónico y agudo en la piel, y la aplicación de antioxidantes disminuye ese daño.⁴⁸

De manera general, podemos decir que el uso de antioxidantes en este estudio no disminuye de manera significativa la expresión de las proteínas Hsp70, Hsp90 y p53 cuando la piel es expuesta a luz UV. Este resultado puede deberse a la poca estabilidad y tiempo de vida media de los antioxidantes, en específico la SOD, cuya actividad disminuye de manera importante después de recibir radiación UV, aumentando el estrés oxidativo y generando daño crónico en la piel.⁴⁸ Será importante implementar en trabajos futuros, el uso de nuevas nanotecnologías para ingresar los antioxidantes al estrato córneo de la epidermis, por ejemplo, el uso de las nanopartículas lipídicas que incrementan la hidratación de la piel y disminuyen la pérdida de agua con toxicidad y citotoxicidad bajas.⁴⁹

Los efectos que provoca la radiación UV en el ADN son diversos y tienen consecuencias desfavorables a corto, mediano y largo plazos.⁵⁰ En este trabajo se encontró fragmentación del ADN por exposición a radiación UVA a 30 y 60 minutos, con UVB a 30 y 90 minutos y con UVC a 30 y 60 minutos; estos resultados se relacionan con otros trabajos⁵¹ que encontraron que la luz UVB produce daño al ADN en piel de ratón, asimismo, se ha reportado daño al ADN en queratinocitos epidérmicos y en fibroblastos dérmicos humanos expuestos a luz UV.⁵²

CONCLUSIONES

En cortes histológicos, se observa un proceso inflamatorio en la piel de ratón BALB/c debido a la exposición con luz ultravioleta.

La luz UV induce incremento en la expresión de la proteína Hsp70, Hsp90 y p53 en la piel de ratones BALB/c. El incremento en la expresión de estas proteínas es proporcional al tiempo de exposición.

La luz UV induce daño al ADN visto a través de la fragmentación de esta molécula en la piel de ratones BALB/c.

Al utilizar una crema con o sin antioxidantes en la piel de ratones expuestos a luz UV, se observó disminución leve en la expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90, mientras que la expresión de la proteína p53 aumenta con antioxidantes y disminuye sin antioxidantes.

Por lo anterior, la radiación UV bajo sus diferentes longitudes de onda (UVA, UVB, UVC) genera estrés y daño celular en la piel, que aumenta de manera proporcional a la dosis de radiación recibida.

REFERENCIAS

- Molina MJ, Rowland FS. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nat Rev* 1974;249(5460):810-812.
- Sánchez CF. Consideraciones sobre la capa de ozono y su relación con el cáncer de piel. *Rev Med Chile* 2006;(134):1185-1190.
- González-Púmariega M, Tamayo MV, Sánchez-Lamar Á. La radiación ultravioleta. su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Tehoria* 2009;18(2):69-80.
- Burke KE. Mechanisms of aging and development—A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants. *Mech Aging Dev* 2018;172:123-130. doi: 10.1016/j.mad.2017.12.003.
- Narita K, Asano K, Morimoto Y, Igarashi T, Nakane A. Chronic irradiation with 222-nm UVC light induces neither DNA damage nor epidermal lesions in mouse skin, even at high doses. *PLoS one* 2018;13(7):e0201259. doi: 10.1371/journal.pone.0201259.
- Ferramola SAM, Sancovich HA. Interacciones de las radiaciones electromagnéticas y especies reactivas del oxígeno sobre la piel. *Rev Argent Dermatol* 2006;87(2):113-120.
- Hicks JJ, Torres-Ramos YD, Sierra-Vargas MP. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr* 2006;14(4): 223-226.
- López LA, Aréchiga CF, Bañuelos R, Barbosa OY, Sánchez SH, Lazarova Z. Impacto del estrés oxidativo sobre las lesiones cutáneas causadas por radiaciones ionizantes / Impact of the oxidative stress on cutaneous lesions caused by ionizing radiations. *Mem Inst Invest Cienc Salud* 2012;8(1):89-99.
- Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(10):507-514. doi: 10.1016/j.tibs.2013.08.001.
- Pearl LH. The HSP90 molecular chaperone—an enigmatic ATPase [Abstract]. *Biopolymers* 2016;105(8):594-607. doi: 10.1002/bip.22835.
- Stankova K, Nikolov V, Boteva R. Hsp90 inhibitor geldanamycin as a radiation response modifier in human blood cells. *Dose Response* 2015;13(1):1-11. doi: 10.2203/dose-response.14-039.Stankova.
- Sarkar S, Roy S. A mini review on heat shock proteins (hsps): special emphasis on heat shock protein70 (hsp70). *IBS J Sci* 2017;(9):129-138.
- Roh BH, Kim DH, Cho MK, Park YL, Whang KU. Expression of heat shock protein 70 in human skin cells as a photoprotective function after UV exposure. *Ann Dermatol* 2008;20(4):184-189. doi: 10.5021/ad.2008.20.4.184.
- Lan CE, Wang YT, Lu CY, Fang AH, Wu CS. The effect of interaction of heat and UVB on human keratinocyte: Novel insights on UVB-induced carcinogenesis of the skin. *J Dermatol Sci* 2017;88(2):207-215. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.06.015.
- Lennikov A, Kitaichi N, Kase S, Noda K, Horie Y, Nakai A, Ohno S, Ishida SA. Induction of heat shock protein 70 ameliorates ultraviolet-induced photokeratitis in mice. *Int J Mol Med Sci* 2013;14(1): 2175-2189. doi: 10.3390/ijms14012175.
- Sekimoto T, Oda T, Pozo FM, Murakumo Y, Masutani C, Hanaoka F, Yamashita T. The molecular chaperone Hsp90 regulates accumulation of DNA polymerase η at replication stalling sites in UV-irradiated cells. *Mol Cell* 2010; 37(1):79-89. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.015.
- Lopez M, Anzola M, Cuevas SN, Aguirre JM, Martinez de Pancorbo M. p53, un gen supresor tumoral. *Gac Med Bilbao* 2001;98(1):21-27.
- Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2017;(17):93. doi: 10.1038/nrc.2016.138.
- Bai I, Zhu WG. p53: Structure, function and therapeutic applications. *J Cancer* 2006; (2): 141-153.

20. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol* 2011;(223):116-126. doi: 10.1002/path.2784.
21. Pirroli D, Alinovi CC, Capoluongo E, Satta MA, Concolino P, et al. Insight into a novel p53 single point mutation (G389E) by molecular dynamics simulation. *Int J Mol Sci* 2011;(12):128-140. doi: 10.3390/ijms12010128.
22. Wang J, Ouyang W, Li J, Wei L, Ma Q, Zhang Z, et al. Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 and nuclear factor κB induced by UV radiation. *J Cancer Res* 2005;65(15):6601-6611. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4184.
23. Brash DE, Rudolph JA, Simon A, Lin GJ, McKenna HP, Baden AJ, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88(22):10124-10128. doi: 10.1073/pnas.88.22.10124.
24. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene Res* 1993; 8(1):203-207.
25. De Pedro I, Alonso-Lecue P, Sanz-Gómez N, Freije A, Gandarillas A. Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation via a p53-independent, DNA damage-mitosis checkpoint. *Cell Death Dis* 2018;9(11):1094.
26. Cardona FCS, Barbosa COY, Alvarado-Cuevas ZD, Macías-Pérez ME, Sánchez Rodríguez SH. Expresión de Hsp70 en células MDCK inducida por compuestos de secreción del nematodo *T. spirrallis*. *Arch Med* 2008;4(1):1-16.
27. Hollands BIE, Gómez-Barry H, Miyares CCM. Modelo biológico para evaluar la acción fotoprotectora de un extracto de cordón umbilical humano. *Rev Cubana Farm* 2003;37(1):20-6.
28. Rivas MA, Rojas EE, Méndez JC, Contreras GA. Dosis eritémicas, sobreexposición a la radiación solar ultravioleta y su relación con el cáncer de piel en Arica, Chile. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* 2014;39(7):506-510.
29. Ross MH, Pawlina W. *Histología texto y atlas*. 7ª ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer; 2016.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
31. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat Rev* 1970;227:680-685.
32. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;(76):4350-4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
33. Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha MG. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, México. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales (SEMARNAT) 2014:27-50.
34. De la Coba F, Aguilera J, de Gálvez Álvarez M, Gallego Herrera. Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. *J Dermatol Sci* 2009;55(3):161-169. doi: 10.1016/j.jdermsci.2009.06.004.
35. Matsuda M, Hoshino T, Yamakawa N, Tahara K, Adachi H, Sobue G, et al. Suppression of UV-induced wrinkle formation by induction of HSP70 expression in mice. *J Invest Dermatol* 2013;133(4):919-928. doi: 10.1038/jid.2012.383.
36. Chen X, Liu S, Rao P, Bradshaw J, Weller R. Topical application of superoxidodismutase mediated by HIV-TAT peptide attenuates UVB induced damage in human skin. *Eur J Pharm Biopharm* 1999;107:285-294. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.07.023.
37. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:670-684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.
38. Multhoff, G, Pockley AG, Schmid TE, Schilling D. The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Lett* 2015;368(2):179-184. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.013.
39. Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2010;11(8):579-592. doi: 10.1038/nrm2941.
40. Pflaum, J, Schlosser S, Müller M. p53 family and cellular stress responses in cancer. *Front Oncol* 2014;4:285-285. doi: 10.3389/fonc.2014.00285.
41. Doctrow SR, Lopez Schock Duncan Jourdan Olasz EB, et al. A synthetic superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-207 mitigates radiation dermatitis and promotes wound healing in irradiated rat skin. *J Invest Dermatol* 2013;133(4):1088-1096. doi: 10.1038/jid.2012.410.
42. Yusuf N, Nasti Ahmad Chowdhury Mohiuddin H, Xu H, et al. *In vivo* suppression of heat shock protein (HSP)27 and HSP70 accelerates DMBA-induced skin carcinogenesis by inducing antigenic unresponsiveness to the initiating carcinogenic chemical. *J Immunol* 2015;194(10):4796-4803. doi: 10.4049/jimmunol.1402804.
43. Calapre L, Gray ES, Kurdykowski S. Heat-mediated reduction of apoptosis in UVB-damaged keratinocytes in vitro and in human skin *ex vivo*. *BMC Dermatol* 2016;(16):6-12.
44. Zhao B, Shah P, Qiang Lei, He TC, Budanov A, He YY. Distinct role of Sesn2 in response to UVB-induced DNA damage and UVA-induced oxidative stress in melanocytes. *J Photobiol* 2017;93(1):375-381. doi: 10.1111/php.12624.
45. Pillon A, Gomes B, Vandenberghe I, Cartron V, Cèbe P, Blanchet JC. Actinic keratosis modelling in mice: A translational study. *PLoS One* 2017;12(6):1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0179991.
46. Schmidt A, Von Woedtke T, Bekeschus S. Periodic exposure of keratinocytes to cold physical plasma: An *in*

- in vitro* model for Redox-related diseases of the skin. Oxid Med Cell Longev 2016; ID 9816072:1-17. <https://doi.org/10.1155/2016/9816072>.
47. Xu D, Xu Y, Cui Q. Cold atmospheric plasma as a potential tool for multiple myeloma treatment. *Oncotarget* 2018;9:1-12. doi: 10.18632/oncotarget.24649.
 48. Chen Xiaochao, Shutao Liu, Pingfan Rao, Jeremy Bradshaw, Richard Weller. Topical application of superoxidodismutase mediated by HIV-TAT peptide attenuates UVB induced damage in human skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;107:285-294. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.07.023.
 49. Souza C, de Freitas LAP, Berardo PM, Campos GM. Topical formulation containing beeswax-based nanoparticles improved in vivo skin barrier function. *AAPS PharmSciTech* 2017; (12249):017-0737. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1208%2Fs12249-017-0737-x>.
 50. Cadet J, Douki T, Ravanat JL, Di Mascio P. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem Photobiol Sci* 2009;8(7):903-911.
 51. Kibitel J, Hejmadit Alas O'Connor Sutherland Yarosh. UV-DNA damage in mouse and human cells induces the expression of tumor necrosis factor α . *Photochem Photobiol Sci* 1998;67(5):541-546.
 52. Schmidt-Rose T, Pollet D, Will K, Bergemann J, Wittern KP. Analysis of UV-B-induced DNA damage and its repair in heat-shocked skin cells. *J Photochem Photobiol B* 1999; 53(1):144-152. doi: 10.1016/s1011-1344(99)00141-4.

