



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

***Estudio del efecto de la radiación UV sobre las propiedades eléctricas en un tejido ex vivo, como contribución al desarrollo de las metodologías in vitro para la determinación del FPS***

**Aura Rocío Hernández Camargo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de ciencias, Área Curricular de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia  
2020





***Estudio del efecto de la radiación UV sobre las propiedades eléctricas en un tejido ex vivo, como contribución al desarrollo de las metodologías in vitro para la determinación del FPS***

**Aura Rocío Hernández Camargo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctora en Ciencias Farmacéuticas**

Directora:

Ph.D., Bibiana Margarita Vallejo Díaz

Grupo de Investigación:

Investigación en procesos de transformación de materiales para la industria farmacéutica

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia

2020



*A mi madre, por su inmenso amor y apoyo incondicional, por ser mi gran ejemplo de tenacidad, disciplina y constancia.*



## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional de Colombia, mi alma mater, por ser mi fuente de oportunidades, por todo lo que he crecido en ella.

A la Facultad de Ciencias y en especial a la Vicerrectoría de Investigación, por su apoyo en la financiación del proyecto de investigación 34727 y en la movilidad.

A Colciencias y su programa “Doctorados en Colombia” por su apoyo financiero en mis estudios de doctorado.

Al Departamento de Farmacia y en especial a la planta docente por la formación brindada y por todo el apoyo recibido durante estos años de formación.

A la dirección de bienestar de sede, en especial a la división de deportes de competencia, por permitir mi desarrollo deportivo paralelamente, por su total apoyo y acompañamiento.

Al Centro Agropecuario Marengo, por facilitarme los animales para la investigación.

A la Universidad de Malmö – Suecia, por recibirme en mi estancia doctoral y por facilitarme sus instalaciones y equipos con total disposición.

A la profesora Bibiana Vallejo, por su acompañamiento en este proceso de formación, por sus enseñanzas y apoyo constante, por su confianza.

A la profesora Clara Plazas, por ser siempre una voz de aliento, un apoyo permanente, una mano amiga.

Al profesor Helber Barbosa, por su gran apoyo y confianza permanente.

Al profesor Tautgirdas Ruzgas, por sus enseñanzas y apoyo constante en mi formación como investigadora, por su confianza siempre.

A Sebastian Bjorklund, por su apoyo y enseñanzas en la investigación.

A mis compañeros del grupo de investigación (locales y extranjeros) en especial a Fabián Garay, Ruth Peña, Nutchá Larpant y Skaidre Jankovskaja por su constante colaboración, disposición y amistad.

A la profesora Marcela Aragón, por su confianza permanente y gran apoyo en mi proceso de formación docente, por su compañía y amistad.

A los grandes y especiales amigos que me deja esta etapa, sin su apoyo, aliento, compañía y amistad no habría sido posible recorrer este largo camino. Cada uno de ustedes ha hecho de mi un mejor ser humano.

A mi familia, en especial a mi madre, por su incondicionalidad, por su infinito amor, por su confianza.

A Dios, por cada minuto de mi vida, cada experiencia, cada aprendizaje cada momento inolvidable.

## Resumen

La luz solar corresponde al espectro de radiación electromagnética proveniente del sol que incluye la radiación ultravioleta, visible e infrarroja, y resulta vital la exposición para varios procesos bioquímicos en los seres humanos. Sin embargo, la radiación ultravioleta en particular tiene varios efectos nocivos sobre la estructura y función de la piel. En este trabajo, estudiamos el modelo *ex vivo* de piel de cerdo para evaluar el efecto de la radiación ultravioleta B (UVB) mediante un enfoque biofísico a través de sus propiedades eléctricas.

Para ello, caracterizamos el modelo biológico en términos de su integridad y función de barrera, definimos sus condiciones de almacenamiento y conservación. Posteriormente, estudiamos sus características eléctricas empleando la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica y desarrollamos una metodología que permitiera estudiar el efecto de la radiación de manera *in vitro*, la cual tuvo en cuenta el sistema antioxidante de la piel, en especial la enzima catalasa, inhibidores como azida de sodio, y agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno.

Los resultados mostraron que una dosis de  $180 J/cm^2$  siendo muy alta comparada con la exposición solar cotidiana, no afecta por si sola las variables eléctricas y que se requieren condiciones de estrés oxidativo inducido para ver un efecto sobre la resistencia eléctrica del tejido; del mismo modo, las condiciones de estrés oxidativo por si solas no la afectan, lo cual sugirió que el efecto observado si fue debido a la radiación y cuya dosis mencionada provocó una pérdida de la resistencia cercana al 50%.

Finalmente, se desafió la metodología desarrollada y la variable respuesta definida mediante la inclusión de protectores solares de diferente valor de Factor de Protección Solar (FPS), demostrando que mediante una variable de tipo eléctrica si es posible identificar el efecto de la radiación UVB sobre la piel y establecer un modelo de correlación entre la respuesta eléctrica de la piel y los diferentes valores de protección evaluados, este

resultado, eventualmente podría utilizarse como una evaluación cuantificable en la determinación del FPS.

**Palabras clave: Radiación UVB, propiedades eléctricas, estrés oxidativo inducido.**

## **Abstract**

Sunlight corresponds to the spectrum of electromagnetic radiation from the sun that includes ultraviolet, visible and infrared radiation, and the exposition for some biochemical processes in humans is vital. However, ultraviolet radiation in particular has several harmful effects on the structure and function of the skin. In this work, we study the ex vivo model of pigskin as a suitable substrate to evaluate the effect of UVB radiation with a biophysical approach through its electrical properties.

For this, we characterize the biological model in terms of its integrity and barrier function, we define its storage and conservation conditions. Subsequently, we studied its electrical properties by Electric Impedance Spectroscopy and developed a methodology that allowed us to study the effect of radiation in vitro, which took into account the skin antioxidant system, especially the enzyme catalase, inhibitors such as azide and oxidative agents such as hydrogen peroxide.

The results showed that a dose of  $180 \text{ J/cm}^2$  being very high compared to the daily sun exposure, does not affect the electrical variable by itself and conditions of induced oxidative stress are required to see any effect on the tissue electrical resistance; Similarly, oxidative stress conditions do not affect it by themselves, which suggested that the effect observed was due to radiation and that mentioned dose caused a loss of resistance close to 50%.

Finally, the methodology and the variable defined were challenged with the inclusion of sunscreens of different Sun Protection Factor (SPF) demonstrating that by means of an



electric type variable it is possible to identify the effect of UVB radiation on the skin and establish a correlation model between the electrical response of the skin and the different levels of protection evaluated, this result, could eventually be used as a quantifiable evaluation in the determination of SPF.

**Keywords: UVB radiation, electrical properties, induced oxidative stress.**

# Contenido

RESUMEN .....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABLAS.....	XVI
LISTA DE ECUACIONES .....	XVII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	XVIII
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>1. ESTUDIO DE LA IDONEIDAD DEL MODELO <i>EX VIVO</i> DE PIEL DE CERDO PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA RADIACIÓN UVB. ....</b>	<b>7</b>
1.1 ASPECTOS TEÓRICOS.....	7
1.1.1 Descripción de la piel.....	7
1.1.2 Modelo biológico de la piel de cerdo como alternativa de uso a la piel humana.....	12
1.1.3 Estrategias para la conservación de muestras <i>ex vivo</i> de la piel de cerdo. ....	18
1.1.4 Métodos de evaluación de la integridad del tejido.....	19
1.2 METODOLOGÍA .....	25
1.2.1 Materiales.....	25
1.2.2 Equipos .....	26
1.2.3 Obtención de las muestras .....	26
1.2.4 Almacenamiento de las muestras.....	27
1.2.5 Evaluación de las características estructurales mediante control histológico.....	28
1.2.6 Evaluación de la función de barrera como criterio de integridad del tejido .....	28
1.2.7 Análisis estadístico.....	29
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
1.3.1 Características del modelo <i>ex vivo</i> .....	29
1.3.2 Evaluación de las características estructurales de las muestras de piel utilizadas.....	31
1.3.3 Seguimiento en el tiempo a las condiciones de almacenamiento .....	34
1.3.4 Evaluación de la función de barrera de la piel mediante la técnica TEWL.....	38
1.4 CONCLUSIONES .....	40
<b>2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN UVB SOBRE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LA PIEL: EL ESTRÉS OXIDATIVO, UNA CONDICIÓN DETERMINANTE. ....</b>	<b>43</b>
2.1 ASPECTOS TEÓRICOS.....	43
2.1.1 La radiación solar .....	43
2.1.2 Efectos de la radiación solar sobre seres humanos .....	45
2.1.3 Estrés oxidativo debido a la radiación UV .....	46
2.1.4 Catalasa: una de las enzimas más importantes del sistema antioxidante de la piel.....	49
2.1.5 Amperometría con electrodo de oxígeno, una herramienta para evaluar la actividad enzimática de catalasa .....	51
2.1.6 Características eléctricas de la piel.....	53

2.1.7	<i>Espectroscopía de impedancia eléctrica: una metodología para evaluar características eléctricas de la piel.....</i>	<i>56</i>
2.2	METODOLOGÍA.....	62
2.2.1	<i>Materiales.....</i>	<i>62</i>
2.2.2	<i>Equipos .....</i>	<i>62</i>
2.2.3	<i>Preparación de las muestras de piel .....</i>	<i>63</i>
2.2.4	<i>Preparación del electrodo de oxígeno cubierto con la piel (SCOE) .....</i>	<i>64</i>
2.2.5	<i>Monitoreo amperométrico de la actividad de catalasa con el SCOE .....</i>	<i>64</i>
2.2.6	<i>Mediciones de espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS) de las muestras de piel.....</i>	<i>65</i>
2.2.7	<i>Condiciones de irradiación de las muestras de piel y diseño experimental .....</i>	<i>67</i>
2.2.8	<i>Evaluación histológica del efecto de la radiación UVB sobre las estructuras de la piel.....</i>	<i>69</i>
2.2.9	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>70</i>
2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	70
2.3.1	<i>Respuesta amperométrica por la actividad enzimática de catalasa .....</i>	<i>73</i>
2.3.2	<i>Desarrollo de la metodología basada en estrés oxidativo como alternativa para encontrar una respuesta eléctrica.....</i>	<i>77</i>
2.3.3	<i>Efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel ex vivo bajo condiciones de estrés oxidativo .....</i>	<i>82</i>
2.4	CONCLUSIONES.....	93
<b>3.</b>	<b>DESAFÍO DE LA VARIABLE RESPUESTA FRENTE AL ESTÍMULO DE LA RADIACIÓN UVB: COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....</b>	<b>95</b>
3.1	ASPECTOS TEÓRICOS .....	95
3.1.1	<i>El Factor de Protección Solar FPS y la metodología para su determinación .....</i>	<i>96</i>
3.1.2	<i>Alternativas de evaluación in vitro, para la determinación del FPS.....</i>	<i>99</i>
3.1.3	<i>Los filtros solares .....</i>	<i>106</i>
3.2	METODOLOGÍA.....	108
3.2.1	<i>Materiales.....</i>	<i>108</i>
3.2.2	<i>Equipos .....</i>	<i>109</i>
3.2.3	<i>Preparación de las muestras de piel .....</i>	<i>110</i>
3.2.4	<i>Mediciones de espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS) de las muestras de piel.....</i>	<i>110</i>
3.2.5	<i>Inclusión de productos de protección solar comerciales sobre las muestras de piel .....</i>	<i>112</i>
3.2.6	<i>Condiciones de radiación de las muestras de piel.....</i>	<i>113</i>
3.2.7	<i>Evaluación microscópica de las muestras de piel .....</i>	<i>113</i>
3.2.8	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>114</i>
3.2.9	<i>Modelamiento matemático.....</i>	<i>114</i>
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	115
3.4	CONCLUSIONES.....	134
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>135</b>
4.1	CONCLUSIONES.....	135
4.2	RECOMENDACIONES .....	136
	<b>ANEXO A: PRODUCTIVIDAD .....</b>	<b>137</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>143</b>

## Lista de figuras

	PÁG.
<b>Figura 1-1:</b> Representación esquemática de la estructura de la piel.....	8
<b>Figura 1-2:</b> Ilustración de la profundidad de penetración de la radiación UVB y UVA en la piel. ....	12
<b>Figura 1-3:</b> Comparación histológica de las características entre la piel de cerdo y la piel humana.....	14
<b>Figura 1-4:</b> Fotografía del montaje para la determinación de TEWL.....	29
<b>Figura 1-5:</b> Microfotografía de muestra de piel de cerdo <i>ex vivo</i> , almacenada a 4 °C sin ningún medio durante 6 meses.....	37
<b>Figura 1-6:</b> Evaluación de la función de barrera de las muestras de piel de cerdo <i>ex vivo</i> mediante la TEWL, para los medios de conservación utilizados durante 3 momentos de muestreo. ....	38
<b>Figura 2-1:</b> Representación esquemática del electrodo de oxígeno (I) y del montaje del biosensor SCOE (II) para evaluación de la actividad de catalasa en la piel. ....	52
<b>Figura 2-2:</b> Descripción del circuito eléctrico y el fundamento de la medición en el electrodo de oxígeno. ....	53
<b>Figura 2-3:</b> Representación esquemática del modelo eléctrico descrito para la piel.....	54
<b>Figura 2-4:</b> Método de 4 electrodos para la determinación de la impedancia de la piel..	60
<b>Figura 2-5:</b> Representación esquemática de la configuración de 4 electrodos utilizada en la medición de EIS.....	65
<b>Figura 2-6:</b> Fotografía del montaje de celda de Franz donde se sometió la piel a la radiación UVB.....	69
<b>Figura 2-7:</b> Respuesta cronoamperométrica mediante el SCOE para (a) la piel de cerdo completa y (b) estrato córneo, ambos en PBS pH 7.4. ....	74
<b>Figura 2-8:</b> Evaluación del efecto de la radiación UVB bajo condiciones de estrés inducido sobre la resistencia de la membrana de piel.....	79
<b>Figura 2-9:</b> Representación de Nyquist en la evaluación de la impedancia de las muestras de piel de cerdo <i>ex vivo</i> sometidas a condiciones de estrés oxidativo y radiación UVB.....	83
<b>Figura 2-10:</b> Efecto de la radiación UVB sobre la variable $R_{mem}$ de las muestras de piel <i>ex vivo</i> bajo condiciones de estrés oxidativo inducido en función del tiempo. (a) porcentaje de cambio de $\Delta R_{mem}$ ; (b) porcentaje de pérdida de $R_{mem}$ durante el tiempo de exposición evaluado. ....	84

<b>Figura 2-11:</b> Demostración del método gráfico para determinar los parámetros de fase constante a partir de EIS. ....	86
<b>Figura 2-12:</b> Efecto de la radiación UVB sobre la variable $C_{\text{eff}}$ de las muestras de piel <i>ex vivo</i> (a) Comparación de la $C_{\text{eff}}$ de tres muestras distintas en su estado inicial y luego de 5 horas de exposición. (b) Aumento de la capacitancia durante el tiempo de exposición evaluado. ....	86
<b>Figura 2-13:</b> Microfotografía de piel de cerdo <i>ex vivo</i> en condiciones de estrés oxidativo inducido (a) y (c) sin exposición a la radiación UVB (b) y (d) con exposición a radiación UVB. ....	88
<b>Figura 3-1:</b> Línea del tiempo sobre la introducción del concepto de FPS para la evaluación de eficacia de productos de protección solar. ....	97
<b>Figura 3-2:</b> Representación esquemática del montaje realizado para el estudio con productos de protección solar. ....	113
<b>Figura 3-3:</b> Evaluación de la respuesta eléctrica mediante $\Delta R_{\text{mem}}$ cuando se incluyen productos fotoprotectores de diferente valor de FPS bajo una dosis de radiación UVB fija. ....	116
<b>Figura 3-4:</b> Efecto de inclusión de productos de protección frente a la radiación UVB con diferente FPS sobre la respuesta de la variable eléctrica $R_{\text{mem}}$ como indicador de protección. ....	119
<b>Figura 3-5:</b> Ilustración de la respuesta de la variable $R_{\text{mem}}$ frente a una dosis fija de radiación UVB al usar protectores solares con diferente valor de FPS. ....	120
<b>Figura 3-6:</b> Evaluación de la respuesta eléctrica mediante $\Delta C_{\text{eff}}$ cuando se incluyen productos fotoprotectores de diferente valor de FPS bajo una dosis de radiación UVB fija. ....	124
<b>Figura 3-7:</b> Representación cartesiana de los cambios presentados en la variable respuesta $\Delta R_{\text{mem}}$ mediante las pendientes obtenidas por el uso de diferentes niveles de protección solar. ....	129
<b>Figura 3-8:</b> Ángulo de apertura obtenido para el mayor nivel de protección evaluado FPS 70. ....	131

## Lista de tablas

	PÁG.
<b>Tabla 1-1:</b> Comparación de las principales características de la piel humana y la de cerdo .....	13
<b>Tabla 1-2:</b> Sustratos alternativos utilizados en estudios de determinación de FPS in vitro. ....	16
<b>Tabla 1-3:</b> Comparación de las técnicas disponibles para evaluar función barrera como medida de integridad de la piel in vitro .....	22
<b>Tabla 1-4:</b> Características iniciales de las muestras de piel de cerdo <i>ex vivo</i> involucradas en el estudio.....	31
<b>Tabla 1-5:</b> Descripción histológica de las muestras de piel de cerdo <i>ex vivo</i> estudiadas según la región del cuerpo.....	31
<b>Tabla 1-6:</b> Microfotografías de las muestras de piel de cerdo <i>ex vivo</i> , estudiadas en el tiempo de almacenamiento con dos medios de conservación PBS y glicerina. ....	34
<b>Tabla 2-1:</b> Combinaciones experimentales evaluadas para determinar las condiciones de estrés oxidativo más viables en el estudio.....	78
<b>Tabla 2-2:</b> Resumen de la evaluación estadística de regresión simple para los datos de $\Delta R_{mem}$ en función del tiempo de exposición a la radiación UVB. ....	93
<b>Tabla 3-1:</b> Comparación entre las regulaciones FDA y COLIPA en cuanto a metodología de evaluación y lo armonizado por ISO 24444 de 2010 para el ensayo evaluación de FPS. ....	98
<b>Tabla 3-2:</b> Componentes activos frente a la radiación de los productos comerciales utilizados en el experimento. ....	108
<b>Tabla 3-3:</b> Microfotografías de piel de cerdo <i>ex vivo</i> expuestas a la radiación UVB durante 5 horas y tratadas con cremas de diferente FPS. ....	121
<b>Tabla 3-4:</b> Ángulos de apertura calculados en radianes $\theta$ (Rad) y grados $\theta$ (°) para cada valor experimental de $\Delta R_{mem}$ en cada nivel de protección FPS.....	132
<b>Tabla 3-5:</b> Rangos del ángulo de apertura establecidos de acuerdo con los valores experimentales de $\Delta R_{mem}$ para determinado valor de FPS.....	133

## Lista de ecuaciones

	PÁG.
<b>Ecuación 1-1:</b> Densidad de flujo basado en la ley de difusión de Fick.....	24
<b>Ecuación 2-1:</b> Impedancia para CPE .....	58
<b>Ecuación 2-2:</b> Impedancia total del sistema .....	58
<b>Ecuación 2-3:</b> Capacitancia efectiva .....	61
<b>Ecuación 2-4:</b> Valor de cambio de $R_{mem}$ de acuerdo con el tiempo evaluado.....	66
<b>Ecuación 2-5:</b> Valor de cambio de $C_{eff}$ de acuerdo con el tiempo evaluado.....	66
<b>Ecuación 2-6:</b> Ecuación exponencial para el comportamiento de la variable respuesta en función del tiempo de exposición.....	93
<b>Ecuación 3-1:</b> Estimación de FPS para el método <i>in vivo</i> .....	97
<b>Ecuación 3-2:</b> Estimación de SPF mediante la metodología <i>in vitro</i> de transmitancia difusa.....	100
<b>Ecuación 3-3:</b> Estimación de FPS mediante la técnica <i>in vitro</i> de espectrofotometría.	101
<b>Ecuación 3-4:</b> Determinación de la tangente del ángulo entre 2 rectas en el mismo plano .....	130
<b>Ecuación 3-5:</b> Cálculo del ángulo de apertura entre 2 rectas en el mismo plano .....	131
<b>Ecuación 3-6:</b> Cálculo del ángulo de apertura para la protección solar basado en los valores de $\Delta R_{mem}$ entre la referencia y los productos evaluados .....	131

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura /símbolo	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A	Amperios, medida de corriente
$\alpha$	Alfa, elemento de fase constante
$C_{\text{eff}}$	Capacitancia efectiva de la piel
CPE	<i>Constant Phase Elements</i> : Elementos de Fase Constante
COLIPA	The European Cosmetic and Perfumery Association, actualmente Cosmetic Europe
DE	Desviación estándar de la media
$\Delta C_{\text{eff}}$	Cambio en el valor de la capacitancia efectiva
$\Delta R_{\text{mem}}$	Cambio en el valor de la resistencia de la membrana de piel
EIS	<i>Electrical Impedance Spectroscopy</i> : Espectroscopía de Impedancia Eléctrica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> : Agencia regulatoria en EEUU
FPS	Factor de Protección Solar
h	Hora
H/E	Hematocilina / Eosina
HR	Humedad Relativa
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> : Organización internacional de normalización.
ISTD	<i>Internal Standard</i> : Método para determinación de la función de barrera de la piel
MED	<i>Minimal Erythmal Dose</i> : Dosis mínima eritemal
p/p	Medida de concentración peso a peso
PMMA	<i>Poly(methyl methacrylate)</i> : Polimetilmetacrilato
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> : Buffer fosfato salino
Q	Elemento de fase constante asociado a la capacitancia
Rad	Radianes
$R_{\text{mem}}$	Resistencia eléctrica de la membrana de piel
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> : Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
$R_{\text{sol}}$	Resistencia eléctrica de la solución
SCOE	<i>Skin Covered Oxygen Electrode</i> : Electrodo de oxígeno cubierto con piel
TEER	<i>Trans Epithelial Electrical Resistance</i> : Resistencia eléctrica transepitelial
T	Temperatura



---

TEWL	<i>Trans Epidermal Water Loss</i> : Pérdida de agua transepidermal
TWF	<i>Trans Epidermal Water Flux</i> : Flujo de agua transepidermal
$\theta$	Theta, ángulo de apertura
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A (400-320nm)
UVAPF	<i>Ultraviolet A Protection Factor</i> : Factor de protección UVA
UVB	Ultravioleta B (320-290 nm)
UVC	Ultravioleta C (290-200 nm)
$Z_1$	Impedancia parte real (dentro de fase)
$Z_2$	Impedancia parte imaginaria (fuera de fase)



## Introducción

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y realiza muchas funciones importantes, entre ellas, ser una barrera en contra de la pérdida de agua, así como de la entrada de xenobióticos tóxicos, patógenos microbianos y en general proporcionar una protección al cuerpo (Kupper and Fuhlbrigge, 2004; Madison, 2003). Teniendo en cuenta que son varios los agentes externos que pueden comprometer la integridad de la piel, tales como el estrés oxidativo (Bickers and Athar, 2006) y la exposición a la radiación ultravioleta (UV) (D'Orazio et al., 2013), es muy difícil asignar con precisión un único agente desencadenante de problemas en la piel.

Para abordar este tema desafiante y avanzar en el conocimiento general de cómo se llega a alterar la homeóstasis de la piel a pesar de todos sus mecanismos de defensa, es importante trabajar en el desarrollo de métodos *in vitro* confiables que permitan una evaluación acertada de los mecanismos relevantes responsables de los daños en la piel y que ayuden a entender las combinaciones de agentes agresores que intervienen en el desarrollo de los efectos más nocivos.

En cuanto a la radiación solar, ésta es la principal fuente de radiación UV la cual es necesaria para inducir efectos benéficos como la producción del precursor de la vitamina D3 en la epidermis y la dermis, a través de la acción fotoquímica de los rayos UVB (IARC, 1992). Sin embargo, la exposición no controlada y excesiva es un problema de salud frecuente, pues puede causar daños irreversibles en varias estructuras, afectando la integridad mecánica (Biniek et al., 2012) e incluso daño en el ADN desencadenando el cáncer (Briganti and Picardo, 2003). Paralelamente, la radiación UV (A y B) puede inducir la producción de especies reactivas de oxígeno en el organismo, dentro de las que se destacan el radical anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) (D'Orazio et al., 2013) que pueden causar un daño oxidativo significativo de las proteínas y lípidos de la piel (Briganti and Picardo, 2003), lo que resulta en un ataque a la integridad de la piel desde dos fuentes simultáneas a pesar del robusto sistema antioxidante que esta posee (Podda and Grundmann-Kollmann, 2001).

De otra parte, se han reportado estudios que utilizan mediciones eléctricas de la piel para evidenciar cambios en la integridad de la piel de manera *in vitro* con piel humana (Fasano and Hinderliter, 2004; White et al., 2011), así como con piel de cerdo donde evidencian que además, es un modelo adecuado que permite exploraciones de propiedades eléctricas con similares respuestas a las obtenidas con humanos (Karacolak et al., 2012). Estudios de este tipo también han demostrado que varios parámetros biofísicos de la piel se ven afectados por el envejecimiento (Firooz et al., 2012) que puede ser natural o acelerado por agentes agresores externos como la radiación UV y que pueden ser determinados electricamente mediante impedancia eléctrica (Simić-Krstić et al., 2014).

Para contrarrestar la sobreexposición y así disminuir los efectos deletéreos de la radiación UV sobre la piel, la industria ha enfocado sus esfuerzos en desarrollar productos de protección efectivos, que consisten en formulaciones tópicas con ingredientes activos que actúan como filtros bien sea orgánicos o inorgánicos y que, mediante diversos mecanismos mitigan la cantidad de radiación que alcanza la piel (Schalka and Reis, 2011). Sin embargo, para demostrar su eficacia y así obtener el permiso de comercialización por las agencias regulatorias correspondientes, deben cumplir con la evaluación *in vivo* en seres humanos voluntarios la cual está basada en la generación de eritema a partir de la exposición a un simulador solar y que corresponde a un punto final biológico atribuido principalmente a la irradiación UVB y que se valora visualmente (ISO 24444, 2010). Esto sin lugar a duda ha generado constantemente cuestionamientos éticos a nivel mundial, además de ser una metodología costosa y demorada en la obtención del resultado al ser realizados en pocos países y por lo mismo, puede existir diferencia entre la población voluntaria y la población local donde será utilizado el producto.

En consecuencia, diversas investigaciones se han enfocado en desarrollar metodologías alternativas *in vitro* para demostrar la protección frente a la radiación (Pelizzo et al., 2012), la mayoría evaluando el uso de un sustrato alternativo que reproduzca la respuesta de la piel con gran cantidad de variaciones por la complejidad de este órgano. Sin embargo, no se ha logrado establecer una cercanía contundente con la respuesta *in vivo* y por tanto, en la actualidad no es aceptada ninguna otra metodología para demostrar protección solar.

Teniendo en cuenta que la respuesta biológica *in vivo* siempre ha sido tan diferente a lo obtenido *in vitro*, el desafío que decidimos asumir en la realización de este trabajo fue explorar desde un punto de vista eléctrico, el efecto sobre las estructuras de la piel a partir

de un modelo biológico *ex vivo* que ha demostrado ser muy similar a la piel humana como lo es la piel de cerdo, con el ánimo de entender de que otras maneras se logra alterar el equilibrio que la mantiene sana y se desencadenan los efectos nocivos ya conocidos.

Para tal fin, la hipótesis planteada en el presente trabajo fue: “Los cambios en un tejido *ex vivo* por efecto de la radiación UV pueden ser estimados mediante una variable de tipo eléctrica y a su vez pueden ser correlacionados con valores de FPS”.

Para confirmar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

Estudiar los cambios a nivel eléctrico de un modelo *ex vivo* de piel de cerdo expuesto a la radiación UV y su posible aplicación en la estimación de valores de FPS.

### **Objetivos Específicos**

1. Estudiar y caracterizar el modelo *ex vivo* de piel de cerdo como un sustrato alternativo para la estimación del efecto de la radiación UV.
2. Establecer la característica eléctrica del modelo *ex vivo* de piel de cerdo que sirva como indicador de integridad y como una variable respuesta asociada a cambios en la misma.
3. Desarrollar e implementar una metodología que permita evaluar los cambios eléctricos en el modelo *ex vivo* asociados a la radiación UV como contribución al estudio de las metodologías *in vitro* para la evaluación de FPS.
4. Proponer un modelo matemático que permita correlacionar los cambios ocurridos en la piel de cerdo *ex vivo*, con los valores de FPS obtenidos *in vivo* y que pueda ser utilizado como método alternativo en la determinación de FPS.

Para lograr el cumplimiento de los objetivos el trabajo fue desarrollado en varias etapas que conllevan a la comprobación de la hipótesis y que se estructuraron en 3 capítulos, cada uno de ellos contiene los aspectos teóricos relacionados con los resultados, materiales y equipos utilizados, la metodología seguida, resultados y discusión, así como conclusiones parciales.

En el capítulo I se presenta el estudio y caracterización del modelo biológico utilizado para lo cual, se usa la histología y la microscopía óptica en los seguimientos y caracterizaciones realizados. Se evaluó la obtención de muestras de diferentes regiones, medios de almacenamiento y conservación en el tiempo, evaluando el tiempo límite de uso bajo las condiciones de almacenamiento más adecuadas, para su uso confiable durante el estudio propuesto. Adicionalmente, se presenta la evaluación de la integridad de la función barrera mediante la determinación de Pérdida de agua transepidermal TEWL (por sus siglas en inglés) y respondiendo de esta manera al objetivo específico 1.

En el capítulo II se abordan las características eléctricas de la piel evaluando su respuesta frente al estímulo de la radiación a través de la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica y estudiando su asociación con el daño causado a las estructuras del tejido. Asimismo, se estudian aspectos biológicos y otros mecanismos estimulados por la radiación como la actividad enzimática antioxidante de la piel y la producción de especies reactivas de oxígeno para finalmente, desarrollar una metodología novedosa que combina los aspectos mencionados y que permiten cuantificar el efecto de la radiación UVB sobre una variable eléctrica; con este capítulo respondemos a los objetivos específicos 2 y 3.

Una vez definida la variable respuesta frente al estímulo de la radiación UV como la Resistencia eléctrica de la membrana de piel ( $R_{mem}$ ), el capítulo III presenta el estudio del comportamiento de esa variable respuesta frente a la protección que ofrecen los productos *protectores solares* que fueron tomados del mercado como un grupo de productos de prueba con distinto valor de FPS para determinar su sensibilidad al estímulo de la radiación y establecer si responde de manera coherente a esos diferentes valores de FPS utilizados. Posteriormente, se presenta un modelo matemático que describe el comportamiento del tejido a través del análisis de la variable respuesta, bajo una exposición a la radiación UVB definida y bajo diferentes niveles de protección que ofrecen los distintos valores de FPS, en comparación con la no protección, dando respuesta al objetivo específico 4.

Finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones del trabajo, la productividad asociada al desarrollo de la investigación y la lista bibliográfica que respalda los resultados obtenidos.

Vale la pena resaltar que este trabajo presenta aportes al conocimiento de manera original e innovadora al encontrar y proponer unas condiciones de ensayo diferentes, demostrando que ocurren otros fenómenos acumulativos, paralelos y diferentes que causan un

desequilibrio en la homeóstasis del tejido y que pueden ser establecidos mediante evaluaciones cuantitativas como lo es la respuesta eléctrica. En este sentido, se proyecta la frontera del conocimiento hacia la explicación de los cambios eléctricos en un tejido como un potencial desencadenante de efectos a largo plazo.

Es así como, desde el ejercicio de las Ciencias Farmacéuticas se aporta al conocimiento que responde a los desafíos científicos y tecnológicos presentes en diferentes aspectos relacionados con la salud de los seres humanos mediante la investigación aplicada. Este trabajo permitió además, fortalecer nuestras investigaciones relacionadas con los efectos de la radiación y que eventualmente puedan ser aplicadas como metodologías alternativas para la evaluación de FPS en el país. Finalmente, es relevante mencionar que esta investigación permitió la creación de una alianza con el Centro de Investigación de Biopelículas para Biointerfases de la universidad de Malmö en Suecia, un grupo reconocido y destacado a nivel internacional y con la cual se podrán llevar a cabo futuras investigaciones en conjunto.





# 1. Estudio de la idoneidad del modelo *ex vivo* de piel de cerdo para la evaluación de los efectos de la radiación UVB.

## 1.1 Aspectos teóricos

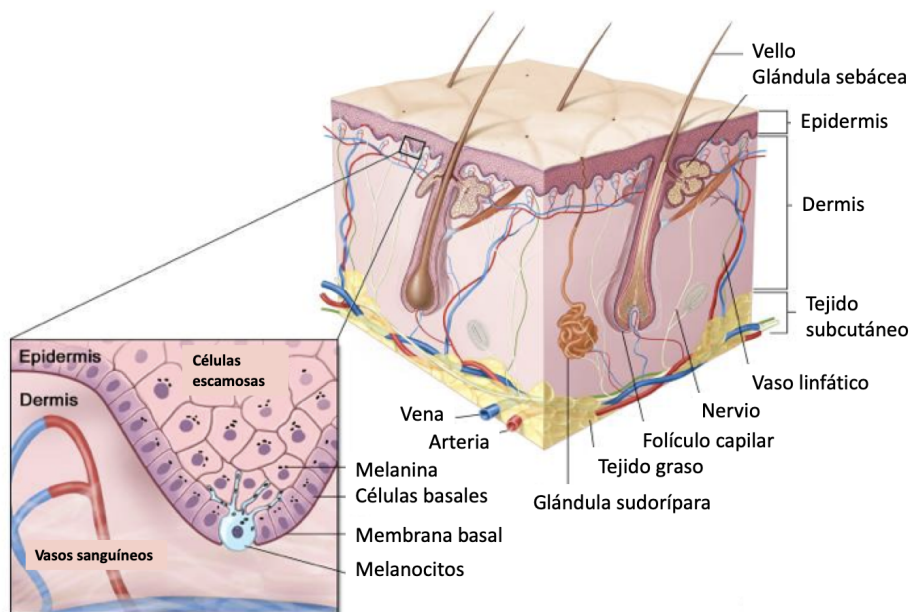
El uso de un modelo biológico como sustrato de experimentación es decir, sobre el cual ocurre el proceso de interés, ha demostrado ser una herramienta determinante en el desempeño de las pruebas encaminadas a predecir comportamientos en las condiciones de uso real. En este capítulo se abordará el estudio de la piel de cerdo desde sus características histológicas, en la obtención de muestras de diferentes regiones, medios de almacenamiento y conservación en el tiempo, con el fin de caracterizarlo y determinar el tiempo límite de uso bajo las condiciones de almacenamiento más adecuadas, para su uso confiable durante el estudio propuesto. Adicionalmente, se evaluará la integridad de la función barrera mediante la determinación de la pérdida de agua transepidermal TEWL), uno de los métodos más utilizados para este fin por su practicidad, reproducibilidad y confiabilidad.

### 1.1.1 Descripción de la piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo en cuanto a su área superficial y peso; es el encargado de múltiples funciones, de diferente complejidad y todas muy importantes como la percepción, el metabolismo, la eliminación, el transporte, la termorregulación, la protección externa y en general, la comunicación con el entorno (Planz et al., 2016).

La piel consta de una compleja organización multicapa la cual se encuentra en una renovación cíclica, dinámica y continua, debido a una serie de eventos de diferenciación celular. Tal característica la convierte en un poderoso escudo protector contra la penetración de sustancias, microorganismos y otros agentes ambientales. Desde el punto de vista histológico, como se observa en la figura 1-1, la piel se compone de tres principales regiones: *epidermis* (multicapa más externa) representa el componente más importante de la función barrera en la piel, *dermis* que corresponde al tejido conectivo (debajo de la epidermis) que representa la fuerza y elasticidad de esa barrera con colágeno, fibras elásticas embebidas en proteoglicanos y la hipodermis que es la capa más interna que además de brindar soporte incluye el reservorio energético (Geneser, 2000; Planz et al., 2016).

**Figura 1-1:** Representación esquemática de la estructura de la piel



Adaptado de: (Bethesda (MD) and National Cancer Institute (US), 2008).

**LA EPIDERMIS**, es un epitelio pavimentoso estratificado, parcialmente queratinizado y avascular, constituido por células de cuatro tipos: Queratinocitos mayoritariamente (90%), melanocitos (5%), células de Langerhans (3-5%) y células de Merkel (<0.1%). Dependiendo del sitio del cuerpo, se observan variaciones considerables en el espesor epidérmico que van desde 0,1 *mm* en los párpados hasta 1,5 *mm* en las palmas y las

plantas de los pies. También se ha designado una clasificación de *epidermis viable* donde ocurre todo el proceso de diferenciación celular y *epidermis no viable* para referirse específicamente al estrato córneo. Además, ésta estructura multicapa se encuentra estratificada de acuerdo con su grado de diferenciación celular en:

**Estrato basal o germinativo:** constituido por una sola hilera de células cilíndricas que se asientan sobre una membrana basal que constituyen las denominadas "células madre" o "stem cells", donde ocurre la división celular. La membrana basal separa el compartimento epidérmico del tejido conectivo subyacente y refuerza particularmente la diafonía celular dentro de estas diferentes capas. Esta estructura altamente especializada actúa principalmente como interfaz de apoyo para la conexión de células, lo que permite una organización celular jerárquica (Geerligts, 2010).

**Estrato espinoso:** compuesto por 5 a 10 hileras de células poliédricas que se van aplanando capa a capa, unidas entre sí por puentes intercelulares o desmosomas. El espacio intercelular está ocupado por la sustancia cementante o glucocáliz que contiene gluco y lipoproteínas, cuya consistencia permite la cohesión intercelular y el paso de sustancias nutritivas (Geerligts, 2010).

**Estrato granuloso:** consiste en dos o tres hileras que se disponen en forma horizontal, que se caracterizan por la aparición de gránulos irregulares basófilos (queratohialina) dentro del citoplasma. En el citoplasma existe el queratinosoma (cuerpos de Odean) que se adhiere a la membrana y contiene glucoesfingolípidos y enzimas (lipasas, fosfolipasas) que se vuelcan en el espacio interqueratinocítico. En esta etapa de diferenciación celular, ocurre la degradación de núcleos y mitocondrias y el citoplasma parece llenarse de queratohialina así como la membrana celular se hace más gruesa gradualmente (Geerligts, 2010).

**Estrato córneo:** constituido por células anucleadas, planas y hexagonales cuya descamación es permanente en ciclos recurrentes regulares, y que son el producto terminal de la diferenciación epidérmica iniciada en la capa basal (cornificación). El espesor de esta multicapa varía según la región del cuerpo, aunque en general contiene entre 15 – 25 capas de corneocitos y la distancia entre corneocitos vecinos es alrededor de 0,1 – 0,3  $\mu m$ . Las células más profundas son más gruesas, con más densidad de queratina y una envoltura más frágil, mientras que las más externas ya tienen una estructura

cornificada rígida. Como consecuencia, este estrato actúa como una envoltura protectora del ser humano particularmente en términos de barrera, dándole a la piel rigidez, flexibilidad e impermeabilidad. Su organización estructural general se puede describir como un concepto "ladrillo y mezcla". Dentro de esta estructura, los corneocitos como cuerpos de células muertas aplastadas de queratinocitos- representan los "ladrillos", que están rodeados por una matriz lipídica intercelular que constituye la "mezcla". Los lípidos están dispuestos en hojas lamelares, que consisten en bicapas similares a membranas de ceramidas, colesterol y ácidos grasos junto con pequeñas cantidades de fosfolípidos y glucosilceramidas. Adicionalmente, se encuentran los desmosomas, también llamados córneosomas, que son enlaces especializados entre corneocitos formados por proteínas y que, junto con los lípidos, mantienen la integridad del estrato córneo. En las líneas más externas de este estrato, los desmosomas sufren degradación proteolítica. En cuanto al contenido de agua del estrato córneo en condiciones normales, éste varía entre el 5-10% cerca a la superficie y hasta el 30% cerca a la transición con la epidermis viable. En una situación *in vitro*, el estrato córneo puede hincharse hasta 400% su espesor original (Geerligts, 2010).

La **unión dermo-epidérmica**, es el límite entre estas dos estructuras, y se convierte en una barrera física para células y moléculas grandes. Es considerada una lámina basal, altamente especializada y una ruta altamente selectiva para la migración celular y macromolecular, induciendo la diferenciación celular y actuando sobre el metabolismo del microambiente. En esta unión se han identificado 4 zonas marcadas: 1) La membrana plasmática y hemidesmosomas de los queratinocitos basales, 2) Una lámina "lúcida" con filamentos de anclaje, 3) Una lámina densa y 4) Una zona fibrilar amorfa. El grado de unión está reforzado por parte de la epidermis que penetra la dermis papilar formando las papilas o crestas (Geneser, 2000).

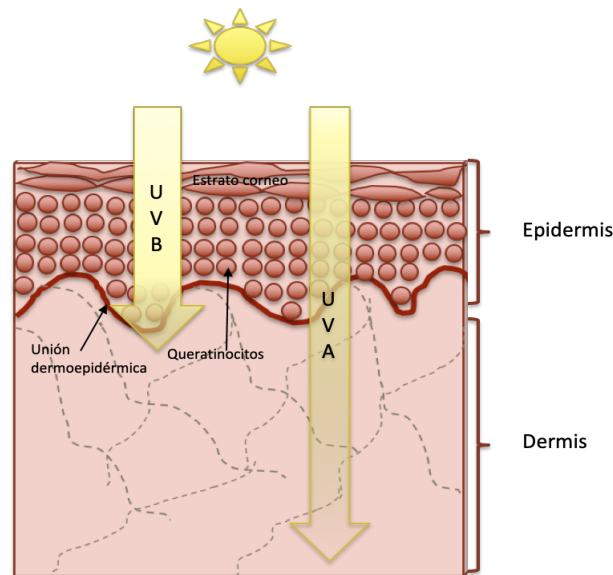
**LA DERMIS**, es un tejido conectivo diferenciado con espesor que oscila entre 1 a 4 mm, el cual exhibe un compartimiento altamente vascularizado y rico en colágeno. Puede ser dividida en dos regiones anatómicas: dermis papilar que es la región más delgada, aproximadamente el 10% de la dermis y sus fibras de colágeno y elastina se ven particularmente orientadas en forma vertical y conectadas a la unión dermo-epidérmica, y la dermis reticular, caracterizada porque tiene mayor densidad de estas fibras que además se encuentran orientadas horizontalmente. En general, su organización estructural corresponde a una "red" compuesta de grandes fibras de colágeno, elastina y reticulares,

que son responsables de las características mecánicas favorables de la piel humana, la excelente resistencia mecánica y su flexibilidad. Se encuentra también la denominada sustancia fundamental amorfa que actúa como un gel que mantiene la estructura de las fibras. Además, contiene vasos sanguíneos pequeños para la alimentación y el transporte de desechos, así como los nervios sensoriales. Otros componentes estructurales abarcan folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas con conductos en la superficie de la piel profundamente incrustados en el compartimento dérmico (Geerlign, 2010). En cuanto a las células que la componen se encuentran los *fibroblastos*, siendo las células más abundantes y destacadas por presentar unas distintivas características por sus prolongaciones citoplasmáticas. Son encargadas de la producción de las fibras colágenas, elásticas y reticulares. Los *macrófagos* cuya principal función es fagocitaria envolviendo y destruyendo cuerpos extraños detectados; y *mastocitos* que son células cuya función principal es liberar sustancias asociadas a la respuesta inmune como histamina o heparina, ante diferentes estímulos (Geneser, 2000).

**LA HIPODERMIS**, es la capa más profunda de la piel con fibroblastos, macrófagos y adipocitos como células residentes en esta región. Los adipocitos son células llenas de lípidos con un tamaño de gota alrededor de  $50 \mu m$ , mientras que el citoplasma y el núcleo aparecen como un borde delgado en la periferia de la célula. Cada adipocito está conectado con al menos un capilar sanguíneo, lo que permite el intercambio metabólico. Esta capa desempeña un papel importante al anclar la dermis a la fascia profunda del músculo y los huesos situados más abajo mediante bandas fibrosas y además, posee como función principal el suministro de energía y aislamiento térmico (Kolarsick et al., 2011).

Como se aprecia en la anterior descripción, la piel humana está compuesta por una gran cantidad de estructuras definidas y especializadas con funciones únicas que en conjunto constituyen un órgano muy importante de comunicación con el entorno. Conocer cada una de estas, así como su comportamiento desde el punto de vista biofísico es muy importante para la investigación pues es la piel, el principal órgano blanco en el estudio del efecto de la radiación UVB. En especial, entender más detalladamente el comportamiento desde el estrato córneo hasta la dermis, que como se observa en la figura 1-2 son las regiones que se encontrarían principalmente afectadas por la penetración de los rayos UVB.

**Figura 1-2:** Ilustración de la profundidad de penetración de la radiación UVB y UVA en la piel.



### 1.1.2 Modelo biológico de la piel de cerdo como alternativa de uso a la piel humana

El modelo de piel de cerdo ha sido ampliamente utilizado en metodologías *in vitro* para el estudio de diferentes fenómenos relacionados con la piel, debido a su gran similitud anatómica y fisiológica con la piel humana (Crovara Pesca et al., 2012; Flaten et al., 2015; Simon and Maibach, 2000; Summerfield et al., 2015). Como se resume en la tabla 1-1, los grosores de las diferentes capas resultan ser similares y aunque dependan del sitio del cuerpo, en general hay una relación muy cercana entre ambos modelos. También se ha documentado una relación similar de crestas y cuerpos papilares dermales lo que redundaría en una rugosidad muy cercana entre la piel de cerdo y la humana. Asimismo, ambos presentan un abundante tejido adiposo subdérmico aunque mayoritario en la piel de cerdo. En cuanto al colágeno, su composición bioquímica es similar al de la dermis humana y por esta razón ha sido un excelente modelo para estudiar la cicatrización de heridas (Sullivan et al., 2001). Como propiedades mecánicas, se ha descrito que la piel de cerdo presenta una elasticidad inferior a la piel humana. En el caso del tamaño, la orientación y distribución de los vasos sanguíneos de la dermis son similares en ambos casos. Sin embargo, el plexo

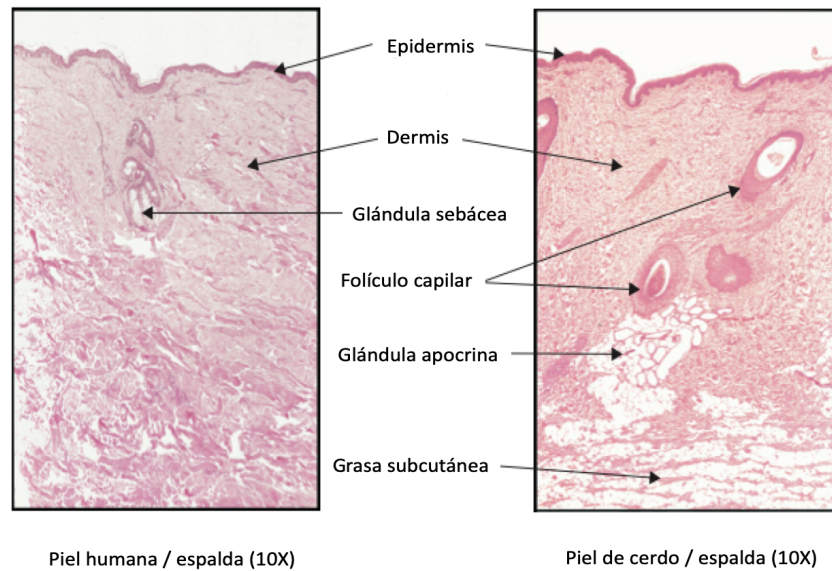
subepidermal que suministra las estructuras anexas (uñas, vello) es un poco menos desarrollado en los cerdos, aunque ambos presentan vello corporal disperso. Una gran diferencia es que la piel de cerdo no contiene glándulas ecrinas y a diferencia de la piel humana, las glándulas apocrinas se distribuyen a través de la superficie de la piel (Sullivan et al., 2001).

**Tabla 1-1:** Comparación de las principales características de la piel humana y la de cerdo

Característica	Piel Humana	Piel de cerdo
<b>Grosor estrato córneo</b>		
<sup>1</sup> (Flaten et al., 2015)	16 – 29 $\mu\text{m}^{(1)}$	20 – 26 $\mu\text{m}^{(2)}$
<sup>2</sup> (Jacobi et al., 2007)		
<b>Grosor epidermis</b>		
(Jacobi et al., 2007)	60 – 82 $\mu\text{m}$	60 – 85 $\mu\text{m}$
<b>Grosor dermis</b>		
(Jacobi et al., 2007)	0,6 – 3,0 mm	~ 1,86 mm
<b>Relación grosor dermis – epidermis</b>		
(Jacobi et al., 2007)	10 :1	13:1
<b>Crestas papilares</b>	Si	Si
<b>Grasa subdérmica</b>	Si	Si
<b>Glándulas ecrinas</b>	Si	No
<b>Glándulas apocrinas</b>	No	Si
<b>Densidad de vello</b>		
(Flaten et al., 2015)	14 – 32 vello / $\text{cm}^2$	20 vello / $\text{cm}^2$
<b>Diámetro de vello</b>		
(Popov et al., 2007)	~ 18 $\mu\text{m}$	~ 82 $\mu\text{m}$

En cuanto a las características funcionales también se ha reportado gran similitud, el tiempo de renovación epidérmica, el tipo de proteínas de queratina y la composición lipídica del estrato córneo, así como los procesos de reepitelización e histológicamente, como se observa en la figura 1-3, la tinción evidencia la cercanía estructural. En general, la fisiología de la piel de cerdo es semejante a la de los humanos al igual que los principales sistemas y órganos en cuanto a su anatomía y función. (Sullivan et al., 2001).

**Figura 1-3:** Comparación histológica de las características entre la piel de cerdo y la piel humana



Adaptado de: (Sullivan et al., 2001).

La piel humana obtenida de cirugías plásticas o de cadáveres siempre se ha considerado el modelo ideal para distintas evaluaciones *in vitro* tanto de fármacos como de cosméticos. Sin embargo, no siempre está disponible fácilmente ni se encontrará bajo condiciones adecuadas para investigación. Por esta razón, se han buscado modelos alternativos que mimeticen la respuesta de la piel humana explorando modelos animales *ex vivo* como piel de roedores, que aunque son de más fácil consecución, no reproducen las propiedades de barrera de la piel de humanos (Abd et al., 2016); otro de ellos es la piel de cerdo, que ha demostrado ser un modelo óptimo e idóneo para evaluar procesos de transporte y permeabilidad de fármacos (Barbero and Frasch, 2009; Jacobi et al., 2005; Laffleur and Bernkop-Schnürch, 2017) así como de filtros solares, ingredientes activos en formulaciones tópicas cosméticas (Haque et al., 2016; Klimová et al., 2015), proporcionando resultados reproducibles y similares a los obtenidos con piel humana. Otros estudios que han utilizado piel de cerdo como modelo biológico dada la gran similitud, se han dedicado a entender la complejidad del conjunto de estructuras que conforman la piel y cómo se establece la función de barrera (Bouwstra, 2003; Davies et al., 2015), así como estudios que evalúan y reportan la similitud de las características eléctricas entre la piel humana y de cerdo, para aplicación en el campo biomédico en el



desarrollo de dispositivos implantables para aplicación en humanos (Karacolak et al., 2012).

Es de resaltar que, en el campo cosmético el modelo *ex vivo* de piel de cerdo ha sido de preferencia utilizado y optimizado para evaluar metodologías alternativas en la determinación del factor de protección solar (FPS), el desempeño frente a la radiación UVA y también la fotoestabilidad, simulando condiciones de uso real sobre éste como un sustrato biológico. Estos estudios *in vitro* han comparado simultáneamente los resultados con la utilización de piel humana, encontrando que el modelo de piel de cerdo no muestra diferencias significativas y que por lo tanto es idóneo para emplearse como alternativa a ésta (Crovara Pescia et al., 2012). Asimismo, ha demostrado ser el sustrato más adecuado para la predicción del FPS y en general del desempeño de los protectores solares comparado con sustratos artificiales desarrollados como placas de polimetilmetacrilato (PMMA) con rugosidad similar a la de la piel (Sohn et al., 2016b, 2015). Estos estudios demostraron que no solamente la rugosidad del sustrato es importante ya que otros factores como la afinidad de los productos por la superficie influyen en la predicción, es decir, la facilidad con que se esparce el producto y cómo este se adhiere a la superficie, son factores que no permiten un buen acercamiento en las determinaciones cuando se emplean otros sustratos, lo que si ocurre con la piel de cerdo.

Un resumen de los sustratos que se han utilizado para la determinación alternativa del FPS se encuentra en la tabla 1-2 donde se evidencia que la piel de cerdo *ex vivo* muestra ventajas sobre los otros modelos por varias razones como, la similitud en las características de función barrera, en la rugosidad, en la textura de la superficie con afinidad por el producto a aplicar y en general, la facilidad para conseguirla que es la principal ventaja frente al modelo de piel humana.

**Tabla 1-2:** Sustratos alternativos utilizados en estudios de determinación de FPS in vitro.

<b>Tipo de sustrato</b>	<b>Nombre</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Referencia</b>
<b>Inerte</b>	Biofill®: Película de celulosa con fibras entrelazadas, sintetizada por bacterias del tipo <i>Acetobacter Xylosum</i>	Apariencia muy cercana a la piel humana.	costoso, sobrestimación del FPS.	(Alves et al., 1991)
	Cinta Transpore®	Disponible, económica.	Alta variabilidad de poros intra-lote. Sobrestimación del FPS.	(Pearse and Edwards, 1993)
	Vitro-Skin™: Sustrato polimérico para hidratar	Tipografía similar a la piel humana, fácil aplicación y adherencia.	Costoso, interfiere en algunas longitudes de onda con el paso de la radiación. No correlación	(Springsteen et al., 1999)
	Película de policloruro de vinilo	Alta transmitancia en la región UV, bajo costo.	No reproduce la textura de la piel. No correlación	(Springsteen et al., 1999)
	Teflón® politetrafluoroetileno (PTFE)	Buena transmitancia, alta fotoestabilidad y fácil consecución	Baja correlación para FPS	(Garoli et al., 2009)
	Platos de cuarzo rugoso	Alta transmitancia en la región UV.	costoso, poca adherencia del producto por lo que no produce buena correlación	(Garoli et al., 2009)
	Placas de PMMA de diferente rugosidad	Alta transmitancia en la región UV.	Costoso, no resultados	(Miura et al., 2012;

		Imita rugosidad de la piel humana. Fotoestable.	concluyentes en la correlación	Pissavini et al., 2009)
<b>Tejido reconstruido</b>	Episkin® piel humana reconstruida	Muy similar a la piel humana. Control de la variabilidad entre las muestras	costoso, no resultados concluyentes en la correlación	(Bernerd and Asselineau, 2008)
<b>Natural</b>	Piel de rata	Modelo biológico, animales de experimentación	Baja reproducibilidad, no resultados concluyentes en la correlación	(Sayre et al., 1979)
	Piel de cerdo	No diferencias significativas con la piel humana. Fácil consecución	Variabilidad entre cepas y propias de su origen	(Klimová et al., 2015; Sohn et al., 2015)
	Piel humana	Modelo ideal	No siempre está disponible. Cuestionamientos éticos	(Pearse and Edwards, 1993)

No obstante, el modelo de piel de cerdo por su idiosincrasia como modelo biológico, presenta alta variabilidad entre los animales utilizados, lo que requiere una oportuna caracterización y estandarización de los criterios de inclusión de las muestras, así como el control de las condiciones de almacenamiento, manipulación y preparación de estas para que mantengan su integridad, con el fin de disminuir el impacto de esa variabilidad en los resultados experimentales.

### **1.1.3 Estrategias para la conservación de muestras *ex vivo* de la piel de cerdo.**

Como se mencionó previamente, las condiciones de almacenamiento del sustrato biológico juegan un papel muy importante en la investigación ya que garantizan la utilización de este con la confianza de su integridad y la no ocurrencia de falsos positivos en las etapas posteriores de evaluación del efecto de la radiación UVB. En este punto es importante mencionar las diferencias entre integridad y viabilidad de la piel que, aunque son características complementarias no necesariamente son dependientes la una de la otra. Por integridad de la piel se entiende conservar las características estructurales que le brindan su principal cualidad de función barrera y por viabilidad se entiende, mantener la actividad metabólica a nivel mitocondrial y que además requiere de integridad estructural de las células que la conforman. Dependiendo de la metodología de conservación utilizada, se podrán garantizar estas características. Para esto, las muestras deberán ser evaluadas dependiendo de la necesidad del estudio previo a su utilización o demostrando previamente que, bajo las condiciones utilizadas, tales características se mantienen durante un tiempo determinado.

Los métodos actualmente utilizados en bancos de piel para su conservación pueden dividirse en de corto y de largo plazo. A corto plazo una de las medidas más utilizadas es la refrigeración (4°C) con lo cual se reduce la tasa metabólica y por tanto la demanda nutricional del tejido. Adicionalmente, se han desarrollado medios especializados para acompañar la refrigeración con nutrientes, comercializadas mediante siglas como HHBSS (por solución salina equilibrada HEPES de Hank), RPMI-1640 (por su lugar de desarrollo Instituto en memoria a Roswell Park), McCoy's 5<sup>a</sup> (por su creador Thomas McCoy) o soluciones salinas isotónicas como la de fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés), los cuales pueden ayudar a mantener la viabilidad de las muestras (Geerligts, 2010; Robb et al., 2001).

A largo plazo, se tiene como principal herramienta la criopreservación, congelación a bajas temperaturas (-20°C, -80°C, -130°C) y pueden incluirse otros factores como el medio conductor, la velocidad de enfriamiento y uso de agentes crioprotectores que eviten formación de cristales de hielo con lo que se pueden conservar incluso por años. Algunos de estos agentes son el glicerol y el dimetil sulfóxido DMSO, que actúan como solventes

para las sales y evitan la contracción de las células durante el enfriamiento (Bravo et al., 2000; Horch et al., 2005).

### **1.1.4 Métodos de evaluación de la integridad del tejido**

Monitorear la integridad de las muestras de piel *ex vivo* durante el almacenamiento va a permitir establecer el tiempo durante el cual podrán ser utilizadas en el estudio; en otras palabras, garantizar que durante el periodo de uso definido, las muestras conserven sus características iniciales de estructura, basado en su estatus de integridad que permita distinguir los cambios asociados con la exposición a la radiación UVB. Entre los más utilizados se encuentra el seguimiento histológico y métodos que evalúan la función de barrera de la piel:

#### **➤ Método de seguimiento histológico**

El análisis microscópico de los componentes de un tejido permite identificar la arquitectura de sus componentes y analizar los aspectos morfológicos celulares; tal identificación establece un punto de partida de las características estructurales originales, desde la obtención de la muestra donde se considera el mejor estado del tejido (sano) para poder identificar en posteriores seguimientos, cambios sufridos bien sea por las condiciones de almacenamiento o debidos a la radiación UVB. Esta caracterización es realizada mediante histología a través de tinciones, la más común es la realizada con eosina / hematoxilina en donde el colorante hematoxilina tiñe las estructuras ácidas como las encontradas en los núcleos de color púrpura y el colorante eosina tiñe las básicas como citoplasmas de color rosa (Celis and Romero, 2015).

Sin embargo, el procesamiento de las muestras para ser observadas involucran una serie de pasos que incluyen: Colección, fijación, deshidratación y lavado, inclusión en parafina, microtomía, tinción y montaje que se describen más adelante (Azevedo Tosta et al., 2018). Cada uno de estos pasos es definitivo para la correcta evaluación de las muestras por ejemplo, de no realizarse una correcta deshidratación del tejido, la tinción posterior es inefectiva y no podrán distinguirse las estructuras. Durante la etapa de corte mediante microtomo, es muy frecuente que se dañe la muestra o se generen fragmentos que no

reflejen la realidad de la muestra generando errores en la interpretación. Otro paso importante es la tinción que de no ser adecuada en aspectos como tiempo de exposición al colorante, concentración o pH de las soluciones, puede generar errores de interpretación en cuanto a la calidad de las estructuras de las células al no incorporarse. Finalmente, en el montaje se pueden incluir elementos que no correspondan a la muestra (burbujas, polvo, microorganismos) y que afectan la calidad de la lámina para la interpretación de los resultados.

**La colección** corresponde a la obtención de la muestra desde el organismo. En particular, en el caso de las muestras de piel, esta etapa ocurre al momento *post mortem* como condición inicial y se realizan colecciones adicionales durante el tiempo de almacenamiento, con el fin de observar si se generaron alteraciones.

**La fijación** se realiza con el ánimo de detener el proceso natural de degradación o digestión enzimática previniendo cualquier alteración adicional, física o química. Las muestras se sumergen en una solución del fijador, que dentro de los más utilizados, está el formaldehído o formol.

**La deshidratación y lavado** se realiza previo al corte y tiene como fin eliminar todo el agua del tejido. Para ello se utilizan soluciones con diferentes concentraciones de alcohol, donde las muestras se van sumergiendo gradualmente de la menos concentrada (75%) a la más concentrada (95%) y finalmente, el lavado se hace con xilol para darle paso a la inclusión en parafina.

**La inclusión en parafina** ocurre para reemplazar todo el agua eliminada por lo cual, el tejido es embebido en parafina caliente y se obtiene un bloque que al solidificar, está listo para el corte.

**El corte** se realiza mediante un microtomo sobre los bloques de parafina que contienen al tejido. Estos cortes son realizados de  $4\mu m$  de espesor y se extienden en agua caliente para posteriormente ser colocados en láminas de vidrio. De esta manera la parafina sale del tejido y nuevamente recibe agua.

**La tinción** se realiza una vez se ha hidratado el tejido y es posible ya que luego de la deshidratación, el tejido se vuelve translúcido.

**El montaje** corresponde a la etapa final del procesamiento de las muestras para histología y consiste en colocar los cortes teñidos sobre una lámina de vidrio, adicionar pegamento y colocar encima una laminilla cubreobjetos que dejará completamente fija la muestra para las posteriores observaciones al microscopio.

Además existen tinciones específicas que permiten reconocer estructuras particulares y/o hacer énfasis en ellas para realizar seguimiento y establecer el comportamiento. Una de ellas corresponde a la tinción tricrómica de Masson que distingue 3 colores y permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I y IV mediante el procesamiento con hematoxilina férrica, escarlatafucsina y tratamiento con solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico para finalmente realizar la tinción con solución de azul de anilina que es la que finalmente permitirá distinguir el colágeno (Cáceres et al., 2017).

➤ **Métodos que evalúan la función barrera de la piel de manera *in vitro***

Como hemos mencionado previamente, el estrato córneo con su estructura bilaminar altamente ordenada perteneciente a la matriz lipídica extracelular, es determinante en la función barrera y por tanto en la permeabilidad de la piel. Dicha función es entonces la que permite proteger el organismo contra sustancias nocivas del medio ambiente impidiendo que ingresen y de otra parte, evitando la evaporación de agua del tejido viable subyacente, es decir epidermis y dermis. Por esta razón se han desarrollado varios métodos utilizados en la determinación de la integridad de las muestras de piel en estudios *in vitro* como evaluaciones de rutina previas a desarrollos experimentales definidos.

La mayoría de estos métodos están enfocados a evaluar la permeación de sustancias a través de la piel como se resume en la tabla 1-3, por ejemplo, la técnica de pérdida de agua transepidermal (TEWL) permite cuantificar la cantidad de agua que puede difundir a través del estrato córneo hacia la superficie de la piel y relacionar la cantidad de agua perdida, con la integridad de la función barrera; bajo unos límites establecidos se determina que un mayor valor de TEWL sugiere un daño en las estructuras de la piel, por cuanto se está permitiendo una alta permeación de agua desde la misma. La técnica flujo de agua transepidermal (TWF) utiliza para la determinación de integridad, agua radiomarcada con tritio (<sup>3</sup>Hidrógeno) y evalúa la cantidad de ésta que atraviesa un área determinada por

unidad de tiempo; al igual que la TEWL, la TWF también cuenta con límites de normalidad establecidos. La técnica de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) evalúa mediante unos electrodos conectados a ambos lados de la piel, la resistencia al flujo de electrones que la pueden atravesar posterior al suministro de una corriente conocida; en este caso la integridad está determinada por una relación proporcional de que a mayor resistencia, mayor integridad de la piel, contando además con valores límite de aceptación. La técnica de permeación de azul de metileno evalúa mediante cuantificación espectrofotométrica, el paso de este colorante a un medio acuoso ubicado debajo de la muestra de piel; al igual que en la TEWL y la TWF, se evalúa la capacidad de la piel para impedir la permeación de una sustancia y así determinar su integridad. Finalmente, se incluye la técnica de estándar interno de referencia (ISTD) en el que se incluye una sustancia estándar radiomarcada y se evalúa el coeficiente de reparto simultáneamente con el experimento de interés para el que se vaya a utilizar la muestra de piel; el valor de integridad se establece mediante datos históricos de otros compuestos de referencia con valores similares de coeficiente de reparto (Guth et al., 2015).

**Tabla 1-3:** Comparación de las técnicas disponibles para evaluar función barrera como medida de integridad de la piel in vitro

Técnica	Valores de aceptación	Ventajas	Desventajas
<b>TEWL</b> (Guth et al., 2015; Levin and Maibach, 2005)	$< 10 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$	Rápida medición, buena reproducibilidad, amplio uso en control de muestras.	Depende del tipo de piel, mejor con piel natural que con modelos cultivados.
<b>TWF</b> <b>(marcaje con <math>^3\text{H}</math>)</b> (Fasano et al., 2002; Guth et al., 2015)	$< 4,5 \times 10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$	Buena sensibilidad en las determinaciones.	Usa mucha agua y puede deteriorar la piel al final del ensayo; alta variabilidad y requiere instalaciones adecuadas para radioactividad.



<b>TEER</b> (Davies et al., 2004; Fasano et al., 2002)	> 2K $\Omega$	Rápida determinación, buena reproducibilidad.	Requiere mantener las muestras en agua, lo que puede alterarlas para experimentos posteriores.
<b>Permeación de azul de metileno</b> (Guth et al., 2015)	NR (Mediante curva de calibración)	Facilidad de evaluación en cuanto a reactivos e instrumentación.	Requiere mayores tiempos de evaluación.
<b>ISTD (marcaje con <sup>3</sup>H o <sup>14</sup>C)</b> (Guth et al., 2015)	NR Datos históricos de log P para los estándares de referencia	Medición en simultáneo con los demás experimentos.	Puede interferir con ensayos de permeación de otras sustancias. Requiere instalaciones adecuadas para radioactividad

NR: no reporta

De la anterior revisión es posible descartar algunas técnicas que por su complejidad operativa, como es el caso de las que utilizan compuestos radiomarcados no serían las más adecuadas para el propósito de la investigación. En su lugar, la técnica TEWL resulta ser adecuada, debido a su sencillez en la medición, alta sensibilidad en la determinación y concluyente en sus resultados.

Específicamente, en la técnica TEWL la medición está definida como la cantidad de agua que se difunde a través de un área fija del estrato córneo hacia la superficie de la piel por unidad de tiempo. Una vez el agua alcanza la superficie de la piel, se evapora y en el aire adyacente a la superficie (cuya cantidad de agua corresponde a la humedad del ambiente), se genera una densidad de flujo de vapor de agua es decir, una cantidad de agua (en forma de vapor), por unidad de area por unidad de tiempo. Si el flujo de vapor de la superficie de la piel fuera cero, entonces la humedad absoluta del aire adyacente a la piel sería la misma que la humedad ambiental. A medida que aumenta el flujo de vapor, la humedad al lado de la piel se eleva por encima de la humedad ambiental. Esto crea un gradiente de humedad sobre la superficie de la piel que es proporcional al flujo de vapor, es decir a la pérdida de agua (Alexander et al., 2018; Imhof et al., 2009).

El fundamento físico de esta técnica así como el aparato de medición fue descrito por primera vez en 1977 por Gert Nilsson (Nilsson, 1977) y se encuentra basado en la primera ley de Fick que describe la difusión en términos de flujo, el cual es proporcional al gradiente de evaporación de agua entre la superficie de la piel y la atmósfera circundante, como se muestra en la ecuación 1-1 a continuación:

**Ecuación 1-1:** Densidad de flujo basado en la ley de difusión de Fick.

$$J = -D \frac{dc}{dz}$$

Donde,

J= densidad de flujo [ $Kg m^{-2} s^{-1}$ ]

D= Coeficiente de difusión del vapor del agua [ $m^2 s^{-1}$ ]

C= Concentración de agua [ $Kg m^{-3}$ ]

Z= distancia de difusión a la superficie de la piel [ $m$ ]

Entonces, la densidad de flujo indica la masa de agua por área de difusión, en un tiempo determinado. Las unidades se encuentran expresadas en el sistema internacional, sin embargo, como estos valores son muy pequeños, se ha aceptado en la comunidad científica expresar ese cambio de flujo en  $g m^{-2} h^{-1}$ . Esa densidad de flujo es calculada a partir de lecturas de humedad relativa (HR) y temperatura (T) por una combinación de sensores (respectivos) ubicados sobre un mismo eje en la sonda que consiste en un cilindro abierto de área fija. Este tipo de sondas se conocen como de tipo “camara abierta”, que es la más usada pero con la desventaja de que es muy sensible a las condiciones ambientales y pueden formarse microambientes en la superficie de la piel que alteran la medición. La estrategia para contrarrestar este efecto, es garantizar mínimos cambios posibles en el ambiente mientras se realiza la medición. Otros dispositivos han sido desarrollados para disminuir la variabilidad por el entorno, como la cámara no ventilada o la cámara de condensador cuya finalidad es mejorar la sensibilidad del equipo reduciendo

la formación de microambientes que introduzcan variabilidad sobre la medición (Alexander et al., 2018).

En cuanto a las mediciones *in vitro* de la TEWL para caracterizar la integridad de la piel *ex vivo*, el montaje corresponde a una evaluación en celdas de Franz donde la piel en su parte interna está en contacto con un medio acuoso como una solución amortiguadora de pH 7,4 (o PBS) y en su parte externa luego de su rehidratación, es secada cuidadosamente para estimar el gradiente de vapor de agua a través de ella. Varios estudios han demostrado que esta medición resulta adecuada para establecer cambios en la función de barrera de muestras *ex vivo* siendo una metodología sencilla, práctica y con buena predictibilidad, que también ha sido muy utilizada para la selección de muestras de piel que serían utilizadas en estudios de permeación donde se requiere contar con una función de barrera en buen estado (Alexander et al., 2018; Döge et al., 2017; Sundaram et al., 2016; Q. Zhang et al., 2018).

## 1.2 Metodología

El desarrollo experimental estuvo orientado a determinar: 1) la región del cuerpo del animal para obtener las muestras de piel, evaluando 3 partes: oreja, abdomen y extremidad posterior parte interna; 2) el mejor medio de almacenamiento entre glicerina y la solución amortiguadora pH 7,4 (PBS), en términos del mayor tiempo de conservación sin alteración de las características estructurales. Para ello se hicieron controles histológicos en el tiempo hasta 6 meses, así como evaluación de la función de barrera mediante la técnica TEWL al inicio, a los 3 y 6 meses de almacenamiento.

### 1.2.1 Materiales

Tabletas para solución amortiguadora de fosfato salino pH 7,4 (PBS) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Darmstadt). Glicerina 97% pureza fue adquirida de JT Baker. Todas las soluciones se prepararon usando agua ultrapura con una resistividad de  $18,2 \Omega \cdot cm$ ; cada tableta se disuelve en 200 mL de agua.

Celdas de Franz con diámetro de 0,9 *cm*, y volumen de 6,0 *mL*, fabricadas por PermeGear Inc. (Hellertown, PA, USA).

Para la obtención de muestras y cortes se utilizó el kit de cirugía surgimax®.

## 1.2.2 Equipos

Nevera -20°C Whirlpool modelo EV201NXM005

Dermoanalizador multisonda modelo MPA 10 de Courage + Khazaka electronic GmbH.  
Sonda Tewameter VT 310 para determinación *in vitro*.

Para el control histológico se utilizó un microscopio óptico Leica DM500 CH-9435 (Heerbrugg, Suiza).

## 1.2.3 Obtención de las muestras

Con el fin de estandarizar las características macroscópicas de la piel desde su recolección y así disminuir la variabilidad de cada muestra, así como posibles interferencias, fue necesario establecer algunos parámetros iniciales respecto a la procedencia de la piel tales como edad del animal, color de la piel, región del cuerpo con poco pelo y buen estado en general de la piel a recolectar.

La piel de cerdo fue obtenida de especímenes recién nacidos que murieron durante el parto o que siendo menores a 30 días (edad reconocida como recién nacidos), por motivos ajenos a la investigación, debían ser sacrificados. Es de aclarar que, en el caso de estos animales sacrificados, como criterio de inclusión, la enfermedad o la razón del sacrificio no debía estar afectando la calidad de la piel.

Respecto a la uniformidad de color de la piel a utilizar, es importante mencionar que estos animales presentaban algunas manchas de color café en el cuerpo. Por lo tanto, la muestra debía ser tomada de regiones sin manchas donde el color correspondía a un rosado uniforme. En cuanto a las regiones de muestreo, se seleccionaron tres: Orejas, abdomen y parte anterior de patas traseras, que además de contar con uniformidad de color, fueron seleccionadas por la baja velloidad comparada con el resto del cuerpo.

Una vez ocurría el deceso del animal, se realizaba la valoración visual descrita para definir si cumplía con los criterios de inclusión; de ser afirmativo, se realizaba un exhaustivo lavado con agua y jabón con el fin de eliminar suciedad que nos pudiera causar molestias a la hora del corte. Para realizar el corte de la piel escogida, se utilizaba el kit de cirugía cortando cuidadosamente hasta el espesor completo es decir hasta el límite con músculo por la fascia subcutánea. La piel que iba saliendo se colocaba sobre papel filtro previamente humedecido con la solución de PBS mientras se finalizaba el procedimiento. Posteriormente, se depositaban las muestras en el medio de almacenamiento correspondiente (Glicerina o PBS), y se llevaban a la nevera para congelar. La evaluación y seguimiento se realizaron periódicamente mediante microscopía óptica utilizando técnica histología con tinción eosina/hematoxilina y mediante la TEWL en 3 momentos durante el almacenamiento.

Los animales fueron obtenidos del Centro de Investigaciones Agropecuarias Marengo C.A.M de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Adicionalmente, el comité de ética de la Facultad de Ciencias avaló el proyecto de investigación, mediante acta 1 de fecha 5 de febrero de 2018. De igual forma se siguieron los protocolos internos de la Universidad Nacional de Colombia en cuanto al manejo y disposición del material biológico.

#### **1.2.4 Almacenamiento de las muestras**

Una vez extraídas las muestras de piel, estas fueron divididas en grupos de almacenamiento de acuerdo con los medios a utilizar: PBS y glicerina, donde eran completamente sumergidas y mantenidas en la nevera a -20 °C con el fin de determinar cual de estos medios era el más apropiado para mantener las características estructurales e integridad de la piel. Las muestras para cada medio de almacenamiento fueron subdivididas en varios compartimentos pequeños, con el fin de sacar uno a uno de la nevera al momento de realizar las evaluaciones periódicas sin afectar la temperatura del resto del material y sin introducir contaminación al recipiente de almacenamiento.

### **1.2.5 Evaluación de las características estructurales mediante control histológico**

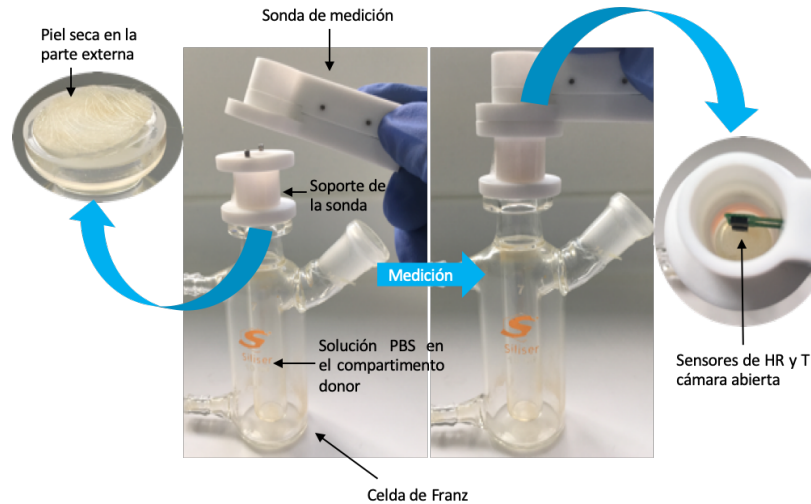
Desde el momento del deceso (tiempo cero) se tomaron muestras de las tres regiones estudiadas introduciéndolas directamente en la solución de formaldehído para el tratamiento histológico (fijación), con el fin de evaluar comparativamente cada una de sus características estructurales. Posteriormente, cada 3 semanas hasta 18 semanas y luego 6 semanas hasta completar 24 semanas (6 meses), fueron tomadas muestras pertenecientes a cada medio de almacenamiento descrito previamente, las muestras fueron evaluadas a nivel microscópico mediante histología con tinción eosina/hematoxilina con el ánimo de determinar posibles cambios estructurales dependiendo del medio de conservación utilizado, así como los asociados al tiempo. Las láminas obtenidas producto del procesamiento histotecnológico fueron evaluadas y revisadas con la ayuda de un médico experto, la Doctora María Inés Maldonado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

### **1.2.6 Evaluación de la función de barrera como criterio de integridad del tejido**

Desde el momento del deceso (tiempo cero) y a los 3 y 6 meses de almacenamiento, las muestras fueron evaluadas en términos de su capacidad de función de barrera mediante la pérdida de agua transepidermal (TEWL) en celdas de Franz, donde el compartimento receptor es cargado con la solución de PBS que entra en contacto con la parte interna de la piel y el compartimento donador se encuentra vacío; la superficie de la muestra de piel debe estar seca para determinar el gradiente de vapor de agua que se genera entre la superficie de la muestra y el ambiente posterior como se observa en la figura 1-4; como se mencionó previamente, los resultados obtenidos en este equipo son obtenidos en términos de gradiente de flujo de agua en unidades de  $g\ m^{-2}\ h^{-1}$ . Las muestras de piel son retiradas de su medio de almacenamiento, descongeladas lentamente a temperatura ambiente y lavadas varias veces con solución PBS, en especial las almacenadas en glicerina para asegurar su remoción. Una vez se coloca la piel en la celda de Franz en contacto con la solución amortiguadora y secada su superficie, se deja durante 1 hora antes de iniciar las

medidas con el ánimo de permitir un equilibrio de acuerdo con la metodología reportada por Guth y colaboradores (Guth et al., 2015).

**Figura 1-4:** Fotografía del montaje para la determinación de TEWL.



## 1.2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado a través del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad, Inc.) a los datos obtenidos en la evaluación de la función de barrera de la piel. Las comparaciones múltiples de medias no pareadas fueron realizadas por ANOVA de dos vías. Los niveles de significancia fueron determinados a través de comparaciones múltiples utilizando análisis de Tukey con nivel de confianza de 95%. Los datos son presentados como el promedio y su respectiva desviación estándar.

## 1.3 Resultados y Discusión

### 1.3.1 Características del modelo *ex vivo*

Como se mencionó previamente, la edad de los animales utilizados para obtener las muestras de piel fue uno de los criterios de inclusión utilizados. Esto debido a que se tenía

la facilidad de acceder a los animales que mueren durante el parto y además, se encontraron reportes respecto al grosor de la piel en estos recién nacidos, en los que se afirma que resulta ser muy similar a la piel humana adulta y, por tanto, era posible reducir esa diferencia siendo un modelo mucho más cercano a la piel humana. En este sentido, se incluyeron animales hasta los 30 días de nacidos ya que hasta ese momento aún se consideran recién nacidos y presentan una piel delgada apta para ser utilizada como modelo alternativo. Dentro de los estudios mencionados se encuentra el realizado por Cilurzo y colaboradores, quienes han demostrado que la piel de cerdo recién nacido es un modelo idóneo para la evaluación de permeabilidad *in vitro* de fármacos parcialmente solubles en agua, con densidades de flujo similares a las reportadas para la piel humana (Cilurzo et al., 2007). Del mismo modo, Mura y colaboradores han encontrado que el uso de la piel de cerdo de recién nacido como modelo biológico en estudios de penetración de fármacos es adecuado y genera resultados reproducibles (Mura et al., 2009).

De otra parte, como se observa en la tabla 1-4, el grosor de la piel obtenida varía dependiendo de la región de la cual proviene. Vale la pena recordar que el corte fue realizado con el fin de obtener la totalidad de piel presente, es decir el tejido extraído corresponde hasta la fascia subcutánea (o hasta el pericondrio en el caso de las orejas). Sin embargo, esto es congruente con lo reportado por Jacobi y colaboradores quienes reportan rangos de espesor diferentes para cada capa de la piel de cerdo, en el caso de la dermis (la capa mayoritaria), reporta un grosor de 1,86 *mm* y comparando con la piel humana, que reporta para la espalda un grosor entre 1,80 – 1,90 *mm*, en otras regiones del cuerpo, reporta un grosor alrededor de 1,00 *mm* (Jacobi et al., 2007). Así entonces, al tratarse de un recién nacido, el grosor de la piel que como se observa no excede 1,00 *mm*, se encuentra dentro del rango de piel humana reportado y que ha sido descrito también en otros estudios de permeabilidad (Flaten et al., 2015). Esto significa que las muestras de piel utilizadas en este estudio corresponden a un modelo biológico muy cercano a la piel humana en todas sus características.



**Tabla 1-4:** Características iniciales de las muestras de piel de cerdo *ex vivo* involucradas en el estudio

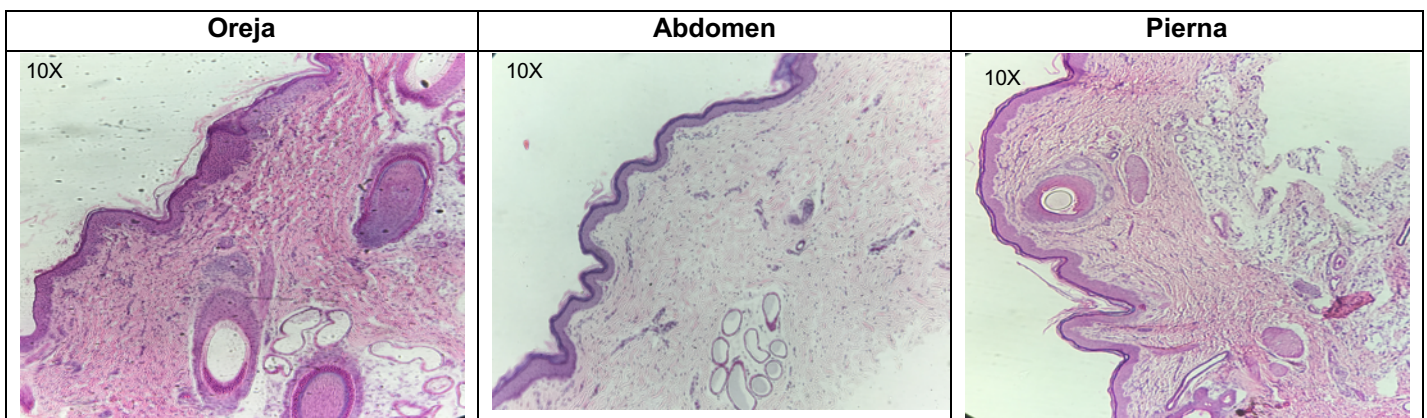
Región de origen	Grosor (mm)*	Color
Oreja	0,59 ± 0,11	rosado sin manchas
Abdomen	0,74 ± 0,08	
Pierna parte interna	0,95 ± 0,16	

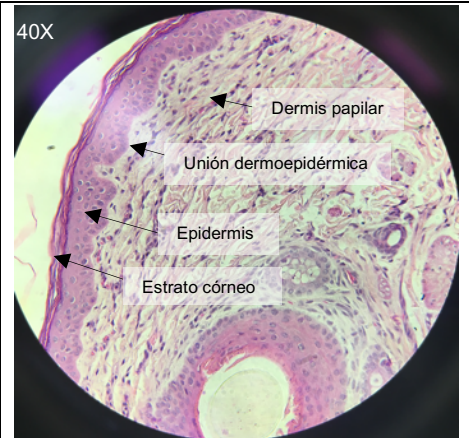
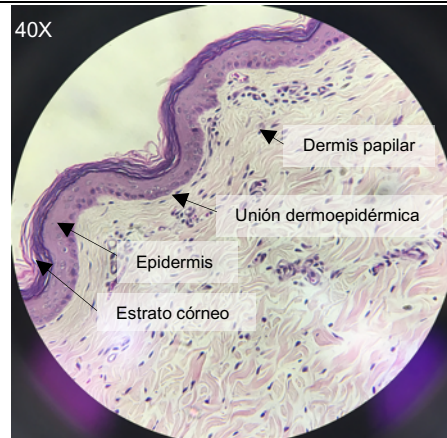
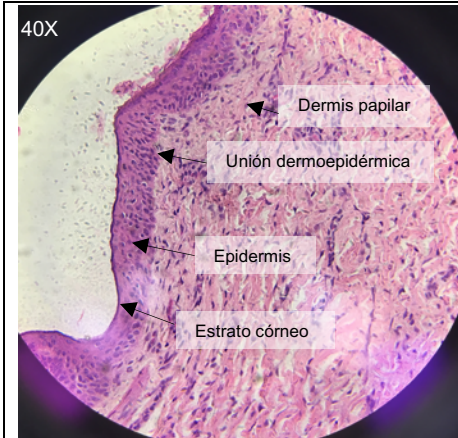
\* El grosor fue evaluado para 30 muestras y es reportado el promedio ± la desviación estándar.

### 1.3.2 Evaluación de las características estructurales de las muestras de piel utilizadas.

Las muestras de piel recogidas en el momento del sacrificio del animal fueron clasificadas como tiempo cero y corresponden a las muestras de control de las características originales del tejido. A partir de estas, se realizó la caracterización de las estructuras que conforman la piel para cada una de las partes de donde fue tomada la muestra, como se observa en la tabla 1-5 donde las microfotografías corresponden a un corte transversal con tinción hematoxilina / eosina en la fila 1 aumento 10X y en la fila 2 aumento 40X:

**Tabla 1-5:** Descripción histológica de las muestras de piel de cerdo *ex vivo* estudiadas según la región del cuerpo.





**Epidermis:** Estratos bien diferenciados, sin interrupciones. Los queratinocitos, con núcleo definido, eucromáticos y forma redondeada conforman cada una de las capas.

**Estrato córneo:** bien definido, continuo y ligeramente separado.

**Estrato granuloso:** 1 capa. Estrato espinoso: entre 3 y 4 capas. Queratinocitos con halo blanco alrededor del núcleo. Se observan algunas células de Langerhans que se reconocen por su núcleo arriñonado y citoplasma cromóforo.

**Estrato Basal:** 1 capa. Se observan queratinocitos de predominio cúbico alto. Es escasa la presencia de melanocitos.

**Unión dermoepidérmica** se observan pocas crestas, no continuas y son de poca profundidad.

#### **Dermis:**

**Dermis papilar,** se caracteriza por presentar tejido conjuntivo laxo, densidad media celular de predominio fibroblástico. Se evidencian algunos capilares sanguíneos.

**Dermis profunda,** se aprecia un tejido conjuntivo denso irregular compuesto por fibras de colágeno y elásticas continuas. El aspecto denso del tejido posiblemente se deba a una menor cantidad de sustancia fundamental.

Se evidencian abundantes fibroblastos y algunos fibrocitos, macrófagos (histiocitos), linfocitos, así como algunas células con gránulos basófilos con apariencia de mastocitos.

**Epidermis:** Estratos bien diferenciados, sin interrupciones y conformados por queratinocitos con núcleo definido, eucromáticos y de forma redondeada.

**Estrato córneo:** bien definido, continuo y ondulado y separado en algunas ondulaciones.

**Estrato granuloso:** 1 capa. Estrato espinoso: entre 3 y 4 capas. Queratinocitos con halo blanco alrededor del núcleo. Se observan algunas células de Langerhans que se reconocen por su núcleo arriñonado y citoplasma cromóforo.

**Estrato Basal:** 1 capa. Se observan queratinocitos de predominio cúbico alto. Es escasa la presencia de melanocitos.

**Unión dermoepidérmica** se observa la presencia de crestas continuas y profundas en toda su extensión.

#### **Dermis:**

**Dermis papilar,** se caracteriza por presentar tejido conjuntivo laxo, muy organizado y definido, de alta densidad celular con predominio fibroblástico. Se evidencian algunos capilares sanguíneos.

**Dermis profunda,** se aprecia un tejido conjuntivo denso, organizado y definido compuesto por fibras de colágeno y elásticas continuas bien definidas.

Se evidencian abundantes fibroblastos y algunos fibrocitos, macrófagos (histiocitos), linfocitos, así como algunas células con gránulos basófilos con apariencia de mastocitos.

**Epidermis:** Estratos bien diferenciados, sin interrupciones. Los queratinocitos que los conforman presentan núcleo definido, de tipo eucromático y forma redondeada.

**Estrato córneo:** bien definido, no continuo y ligeramente separado en algunas ondulaciones.

**Estrato granuloso:** 1 capa. Estrato espinoso: 3 capas. Queratinocitos con halo blanco alrededor del núcleo. Se observan algunas células de Langerhans que se reconocen por su núcleo arriñonado y citoplasma cromóforo.

**Estrato Basal:** 1 capa. Se observan queratinocitos de predominio cúbico alto. Es escasa la presencia de melanocitos.

**Unión dermoepidérmica** se observa la presencia de crestas continuas y profundas en toda su extensión.

#### **Dermis:**

**Dermis papilar,** se caracteriza por presentar tejido conjuntivo laxo, ordenado y de alta densidad celular de predominio fibroblástico. Se evidencian algunos capilares sanguíneos.

**Dermis profunda,** se aprecia un tejido conjuntivo denso, algo irregular en su estructura y compuesto por fibras continuas de colágeno y elásticas.

Se evidencian abundantes fibroblastos y algunos fibrocitos, macrófagos (histiocitos), linfocitos, así como algunas células con gránulos basófilos con apariencia de mastocitos.

<p><b>Hipodermis:</b> Constituida por tejido adiposo unilocular, se observa una alta cantidad de glándulas sudoríparas apocrinas y folículos pilosos.</p>	<p><b>Hipodermis:</b> Constituida por tejido adiposo unilocular, En este corte no se observan folículos pilosos y pocas glándulas sudoríparas apocrinas.</p>	<p><b>Hipodermis:</b> Constituida por tejido adiposo unilocular, se observa una alta cantidad de glándulas sudoríparas apocrinas y algunos folículos pilosos.</p>
---	--	---

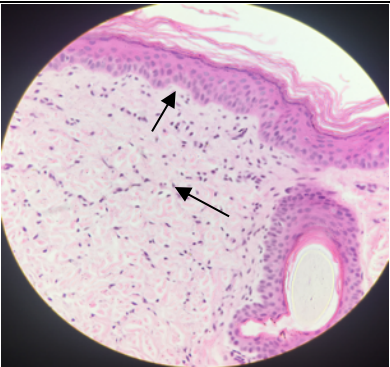
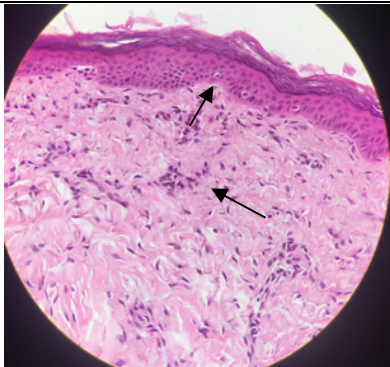
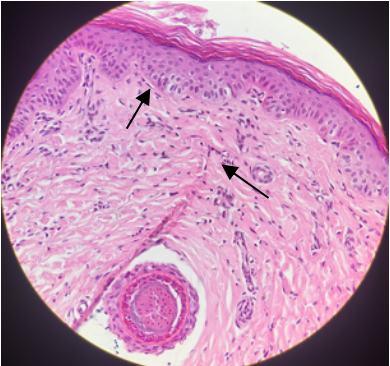
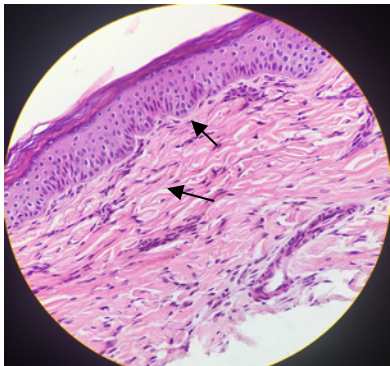
El estudio histológico fue realizado en las muestras tanto en el tiempo inicial como periódicamente durante el almacenamiento hasta 6 meses como se mencionó en la metodología. De acuerdo con la descripción microscópica de la tabla 1-5, las características estructurales de la piel no varían entre las diferentes regiones del cuerpo del animal que fueron escogidas para ser estudiadas en cuanto a la disposición de las capas en los diferentes estratos, la morfología y desarrollo celular. Teniendo en cuenta que la variación encontrada fue en el grosor y que incluso las tres regiones se encuentran dentro de lo reportado para una comparación adecuada con la piel humana, es posible inferir que cualquiera de estas regiones puede ser utilizada para llevar a cabo el estudio propuesto asociado al efecto de la radiación UVB. Adicionalmente, es importante mencionar que, aunque la piel obtenida de un espécimen recién nacido sea similar en grosor al de la piel humana, la cantidad de muestra a la que se puede acceder es muy limitada pues son animales cuyo peso se encuentra alrededor de 1 Kg. Por ejemplo, a esa edad el grado de diferenciación de las células cartilaginosas de la oreja no es muy alto y resulta de hecho, muy difícil separar la piel del tejido cartilaginoso, donde parece ser una sola estructura. De otra parte, no se puede obtener piel de la totalidad de región abdominal o la región anterior de la pierna trasera, pues la densidad de vello de los recién nacidos es muy alta lo que sería una interferencia en estudios posteriores como ya ha sido reportado anteriormente (Cilurzo et al., 2007).

Sin embargo, cabe mencionar que la región más utilizada en los estudios previamente revisados donde se utiliza el modelo *ex vivo* de piel de cerdo es la oreja, por la facilidad de consecución y poca vello. Por lo tanto, las muestras a utilizar posteriormente podría ser de cualquiera de estas tres regiones y aunque para evaluar el almacenamiento, se continúa con la región abdominal y pierna anterior, no se descarta la utilización de orejas más adelante.

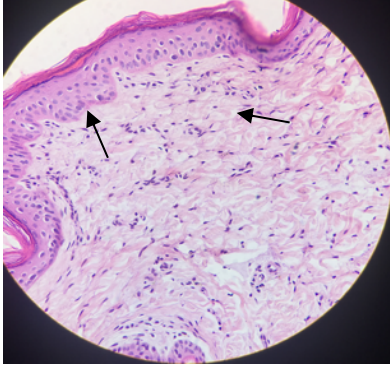
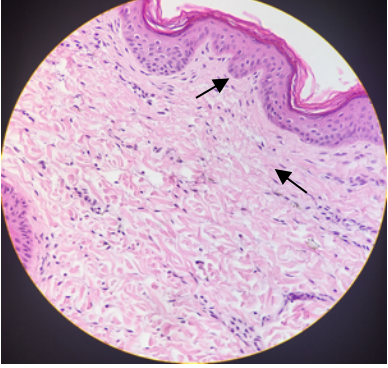
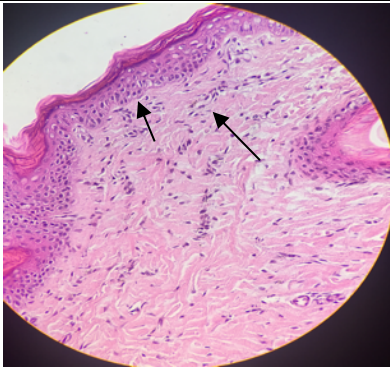
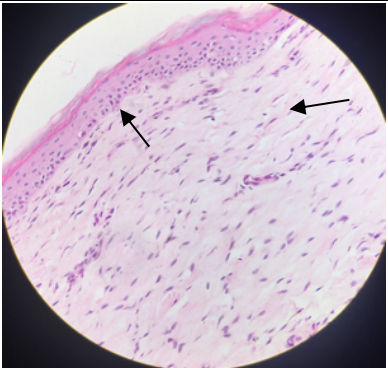
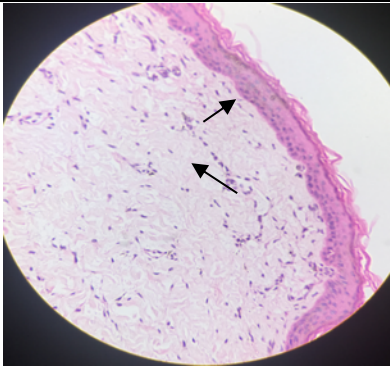
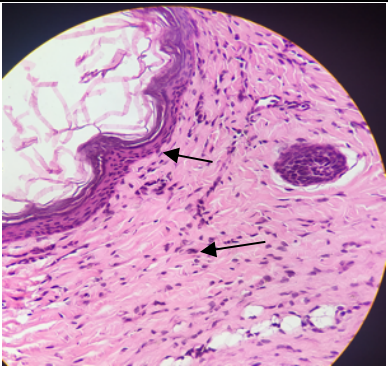
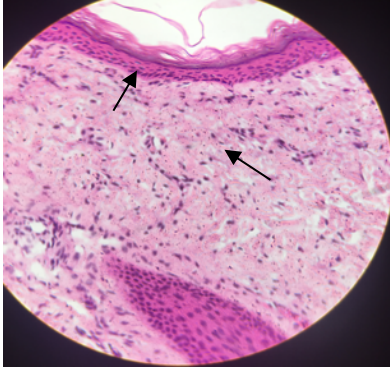
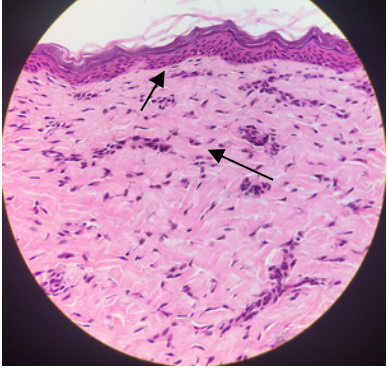
### 1.3.3 Seguimiento en el tiempo a las condiciones de almacenamiento

En cuanto a las condiciones de almacenamiento evaluadas, las muestras utilizadas fueron las de la región abdominal, tomadas de la nevera de cada uno de los 2 medios evaluados y fijadas directamente en formol de acuerdo con el procedimiento de histotecnología para las tinciones correspondientes. A partir de las láminas obtenidas, se realizó la evaluación de los posibles cambios estructurales tomando como punto de comparación las láminas de tiempo cero descritas anteriormente. A continuación se presenta la tabla 1-6 donde se observan las muestras correspondientes a cada tiempo de muestreo hasta 24 semanas.

**Tabla 1-6:** Microfotografías de las muestras de piel de cerdo *ex vivo*, estudiadas en el tiempo de almacenamiento con dos medios de conservación PBS y glicerina.

Tiempo de evaluación	Almacenamiento en PBS	Almacenamiento en glicerina
Semana 3		
Semana 6		



<p>Semana 12</p>		
<p>Semana 15</p>		
<p>Semana 18</p>		
<p>Semana 24</p>		

Corte transversal con tinción hematoxilina / eosina en aumento 40X.

De acuerdo con las microfotografías de la tabla 1-6, durante el tiempo de observación de las muestras en los medios de almacenamiento evaluados encontramos que se mantienen

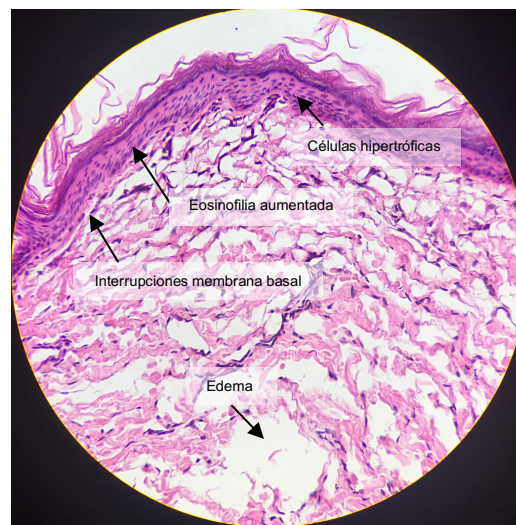
las características estructurales en buen estado para ambos casos pues se mantienen definidas las características descritas en la tabla 1-3 para la epidermis y sus diferentes estratos, los queratinocitos mantienen su forma y organización, la unión dermoepidérmica se mantiene intacta como se señala en las flechas así como la ondulación en cuanto a presencia y profundidad de las crestas. En cuanto a la dermis, siempre se mantuvo una estructura ordenada y definida de las fibras de colágeno y elásticas que la conforman indicado también mediante las flechas en las microfotografías. No se encontraron indicativos de daño ni degradación en ninguno de los dos medios de conservación. En conclusión, cualquiera de los dos medios puede ser utilizado para el almacenamiento de las muestras hasta 24 semanas, conservando sus características estructurales. Al comparar con lo reportado en la literatura, se encuentra que la glicerina se usa mayoritariamente como medio de conservación hasta dos años e incluso a temperatura de refrigeración 4 °C gracias a su baja toxicidad, bajo costo y de fácil consecución (Bravo et al., 2000; Mackie, 2002; Richters et al., 1996).

Teniendo en cuenta que los medios estudiados mantuvieron la integridad y organización de las estructuras de la piel de cerdo durante su almacenamiento, pensamos que la conservación de los tejidos depende principalmente de la temperatura como ya se ha documentado (Sukumar and Kar, 2019), y las características del medio le dan una ventaja especial en el tiempo de acuerdo a lo reportado como agentes de conservación, es decir en el caso de la solución de PBS de características isotónicas, mantiene la concentración de sales sin alterar la presión osmótica de las células evitando que se hinchen o se contraigan a la hora del congelamiento y en el caso de la glicerina o glicerol, gracias a su capacidad de penetrar las membranas, además de reducir la cantidad de sal intracelular que pueda cristalizar, evita la formación de hielo al menos hasta -38 °C y con esto, el daño mecánico por rompimiento de las estructuras que conforman el tejido con los cristales del agua (Bhattacharya, 2018).

Con el ánimo de conocer los efectos del almacenamiento a condiciones no controladas es decir, sin medio de conservación y a una temperatura de 4°C (nevera convencional), se mantuvo una muestra del tejido de piel de cerdo *ex vivo* bajo estas condiciones hasta las 24 semanas, tiempo en el cual, se realizó evaluación histológica y se encontró que las estructuras de la piel se ven afectadas considerablemente como se observa en la figura 1-5; se observan signos de necrosis en general para todo el tejido, en el epitelio por ejemplo, la tinción rosada esta exacerbada, lo que se conoce como eosinofilia aumentada y que se

atribuye a la pérdida de ARN citoplasmático (Stanley et al., 2015). La membrana basal por su parte presenta edema e interrupciones en varios fragmentos, así como células hipertróficas con citoplasma vacuolado formando halos cromóforos perinucleares que nos confirman la necrosis. En cuanto a la dermis, se presenta alto edema, mayoritariamente intersticial evidenciado por los espacios en la matriz extracelular y la ruptura de algunas fibras del tejido conjuntivo y finalmente, ya no es evidente la vascularización probablemente por el mismo edema en toda la extensión de la dermis.

**Figura 1-5:** Microfotografía de muestra de piel de cerdo *ex vivo*, almacenada a 4 °C sin ningún medio durante 6 meses.



Corte trasversal con tinción hematoxilina/eosina bajo el aumento de 40X

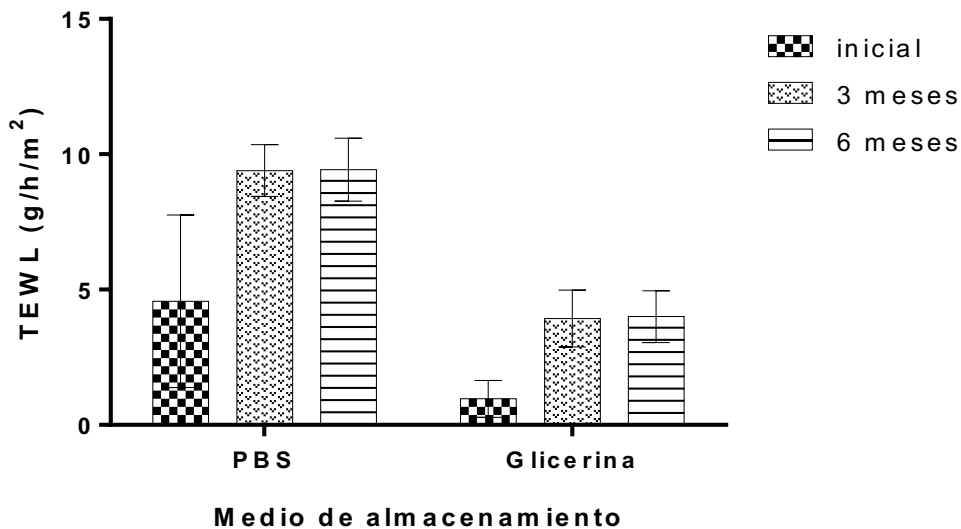
Con estos resultados es evidente que es necesario establecer condiciones de almacenamiento adecuadas para los tejidos *ex vivo* como fue estudiado en el presente capítulo, mediante el uso de un medio de conservación y baja temperatura (-20 °C) que permitan mantener las características estructurales del tejido en buen estado y, en concordancia con lo revisado en la literatura, la glicerina es una opción adecuada para mantener almacenadas las muestras mientras se realizan los estudios posteriores sobre el efecto de la radiación UVB. Incluso es posible pensar que incluir una combinación, resulta adecuado para aprovechar las características crioprotectoras e higroscópicas de la glicerina, así como la isotonicidad de la solución amortiguadora (PBS) para garantizar las buenas condiciones del tejido, sin atribuir degradación por efecto del almacenamiento y que puedan ser utilizadas en estudios posteriores, pues como lo evaluaron otros autores

la concentración de glicerina puede ser incluso del 10% en el medio y aún mantiene sus características crioprotectoras (Bravo et al., 2000).

### 1.3.4 Evaluación de la función de barrera de la piel mediante la técnica TEWL

El ensayo de pérdida de agua transepidermal *in vitro* fue realizado en condiciones de temperatura y humedad controladas en un espacio cerrado, la temperatura promedio fue de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  y la humedad relativa se mantuvo entre 50 y 60% en las diferentes mediciones, como lo recomienda el fabricante del equipo para disminuir la variabilidad en la lectura y la interferencia con el entorno. Se evaluaron 3 muestras de piel por cada medio de almacenamiento en 3 momentos diferentes: 0, 3 y 6 meses; se decidió realizar para cada muestra, 10 lecturas repetidas y el valor final de la TEWL corresponde al promedio de las 10 lecturas en cada caso. A continuación se presenta en la figura 1-6, los resultados obtenidos para la evaluación de la función de barrera en los casos de almacenamiento estudiados.

**Figura 1-6:** Evaluación de la función de barrera de las muestras de piel de cerdo *ex vivo* mediante la TEWL, para los medios de conservación utilizados durante 3 momentos de muestreo.



Los datos corresponden al promedio ( $n=3$ ) y las barras de error representan la desviación estándar, con un valor  $P > 0,05$ .



En los resultados presentados en la figura 1-6, el tiempo designado como inicial corresponde a 1 semana de almacenamiento en el medio correspondiente una vez tomada la muestra, esto debido a la disponibilidad del equipo utilizado y la logística de traslado de las muestras desde el criadero de Marengo a donde se encontraba el equipo. Por tal razón, se aprecian diferencias entre los valores iniciales para cada caso y a partir de estos, los correspondientes cambios durante el almacenamiento. En términos globales, los resultados muestran que el gradiente de flujo equivalente a la pérdida de agua transepidermal fue significativamente mayor en las muestras almacenadas en PBS frente a las almacenadas en glicerina, lo cual se explica porque la glicerina además de ser un agente crioprotector, tiene características humectantes al ser una sustancia tipo poliól, higroscópica, es decir, que tiene la capacidad de retener agua, en este caso, retiene eficientemente el agua en la superficie de la piel como se ha explicado por otros investigadores (Björklund et al., 2013a). Sin embargo, es importante resaltar que en el caso de las muestras almacenadas en PBS, el mayor gradiente de flujo se registró alrededor de  $10 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  que, al comparar con la literatura, este valor se ha reportado como el límite de aceptación para una piel sana en humanos en evaluaciones *in vivo* donde valores de la TEWL entre  $5\text{--}10 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  dependiendo del sitio de medición, son aceptables para una función de barrera intacta (Fokuhl and Müller-Goymann, 2013). En cuanto a las evaluaciones *in vitro* con piel humana, también se ha reportado como valor límite de aceptación de la TEWL  $10 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para que puedan ser usadas en estudios de permeación (Döge et al., 2017; Q. Zhang et al., 2018). Para el caso de evaluaciones *in vitro* con piel de cerdo, recientemente se han reportado como valores aceptables de la TEWL menores a  $15 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  (Barba et al., 2019). Por lo tanto, los resultados aquí presentados demuestran una buena conservación del tejido durante todo el tiempo de estudio y mostraron que la glicerina presenta ventajas a la hora de la conservación, pues los valores de la TEWL son inferiores a los límites de aceptación reportados, es decir, se encuentran conservadas durante el tiempo de observación y aceptables para estudios posteriores.

En cuanto a los cambios presentados en el tiempo respecto a los valores iniciales, si se presentan cambios en el gradiente de flujo de agua que reflejan cambios en la función de barrera de la piel, pero como se ha mencionado, se encuentran dentro del límite de aceptación para una función de barrera conservada. Durante los 3 y los 6 meses de almacenamiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) en los valores de la TEWL, por lo que es posible inferir que la conservación es efectiva

durante el tiempo de observación, en el medio PBS hasta el límite máximo de la pérdida de agua aceptable y en glicerina, dentro de los valores aceptados para una piel en buen estado. Esto significa que se mantiene la integridad de la función de barrera de la piel de las muestras *ex vivo*, lo cual es muy importante para el estudio posterior del efecto de la radiación UVB a través de mediciones eléctricas sobre la piel, pues se ha demostrado que la impedancia de la piel se encuentra principalmente en el estrato córneo y esta capa es la principal responsable de la función de barrera de la piel (Björklund et al., 2013c).

Además, estos resultados se encuentran estrechamente relacionados con lo observado histológicamente, donde vimos una adecuada conservación de la integridad de las estructuras que conforman el tejido a lo largo del tiempo y que se refleja en valores bajos y aceptables de la TEWL para una función de barrera adecuada, demostrando que esta técnica de medición es útil para evaluar la integridad del tejido mediante la función barrera como indicador, lo cual ha sido respaldado en recientes estudios que además muestran que esta medición presenta una buena sensibilidad al distinguir entre muestras de piel tratadas con agentes modificadores de las propiedades de barrera como lo son el laurilsulfato de sodio y la acetona (Barba et al., 2019).

## 1.4 Conclusiones

Basados en los resultados podemos concluir que:

Las muestras *ex vivo* de piel de cerdo pueden ser obtenidas de cualquiera de las regiones estudiadas (oreja, abdomen, pierna anterior) pues histológicamente se identificaron sus similitudes estructurales, es decir que el modelo biológico es adecuado para ser utilizado en los estudios posteriores.

Las muestras *ex vivo* de piel de cerdo pueden ser almacenadas por un periodo de seis meses bajo las condiciones de almacenamiento estudiadas, es decir bajo medios de almacenamiento como PBS o glicerina a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  conservando sus características estructurales iniciales y la integridad de su función barrera.

---

La glicerina ofrece una mejor conservación de la función de barrera de la piel determinada por los bajos valores de la TEWL encontrados en las muestras almacenadas en este medio y de acuerdo con la literatura es un medio ampliamente utilizado por su practicidad, baja toxicidad y costo.

La evaluación histológica nos permitió hacer un adecuado seguimiento en el tiempo de las características estructurales de las muestras de piel de cerdo en cuanto a su mantenimiento y conservación, lo cual fue consecuente con lo encontrado posteriormente en la evaluación de la función de barrera mediante la técnica de la TEWL, reconocida por su pertinencia en la evaluación de integridad de la piel.

Se determinó que la función de barrera se mantiene intacta durante el tiempo de almacenamiento estudiado, lo cual es un indicador muy importante para las muestras de piel que serán utilizadas posteriormente en la evaluación de las características eléctricas, con el fin de establecer el efecto de la radiación UVB.



# 2. Evaluación del efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel: El estrés oxidativo, una condición determinante.

## 2.1 Aspectos teóricos

El efecto de la radiación ultravioleta B (UVB) sobre la piel ha sido estudiado a lo largo de los años bajo diferentes enfoques, particularmente se han orientado a entender los mecanismos por los cuales esta radiación puede desencadenar efectos tan nocivos como el cáncer. En este capítulo se abordarán las características eléctricas de la piel como variables de respuesta al estímulo de la radiación y su asociación al daño causado a las estructuras del tejido. Se abordarán conceptos físicos, metodologías para medir variables eléctricas y la manera en que pueden ser alteradas en un modelo *ex vivo* de piel de cerdo. Adicionalmente, se profundizará en aspectos biológicos como la actividad enzimática en la piel y los mecanismos de defensa del tejido frente a factores externos como la radiación.

### 2.1.1 La radiación solar

El espectro solar está incluido en la región electromagnética y comprende tres zonas fundamentales: luz visible (5%), ultravioleta (45%) e infrarroja (50%). Aunque las radiaciones en el rango del visible son las más penetrantes, las radiaciones ultravioleta son las responsables de los efectos más significativos a nivel biológico. Además, dicha radiación ultravioleta se encuentra dividida en **UVC** 290–200 *nm* que aún no llega a la superficie de la tierra pues es absorbida por la capa de ozono de la estratosfera, **UVB** 320–290 *nm* muy energética y es responsable de la quemadura y la predisposición al cáncer de piel y **UVA** 400–320 *nm* que se subdivide en **UVAI** (340–400 *nm*) y **UVAII** (320–340

nm), responsable del envejecimiento prematuro y la generación de radicales libres (Batlle, 2005; Diffey and Robson, 1989).

De otra parte, la intensidad de la radiación depende de varios aspectos, entre ellos: *La altura del sol*, cuanto más alto esté el sol en el cielo, más intensa es la radiación UV. Así, ésta varía según la hora del día y la época del año. Fuera de las zonas tropicales, las mayores intensidades de la radiación UV se producen cuando el sol alcanza su máxima altura, alrededor del mediodía solar durante los meses de verano. *La latitud*, cuanto más cerca del ecuador, más intensa es la radiación UV. *La nubosidad*, ya que dicha intensidad es máxima cuando no hay nubes, pero puede ser alta incluso con nubes. *La dispersión*, puede producir el mismo efecto que la reflexión por diferentes superficies, aumentando la intensidad total de la radiación UV. *La altitud*, a mayor altitud la atmósfera es más delgada y absorbe una menor proporción de radiación UV. Con cada 1000 metros de incremento de la altitud, la intensidad de la radiación UV aumenta en un 10 a 12%. *El ozono*, que absorbe parte de la radiación UV evitando que ésta alcance la superficie terrestre; la concentración de ozono varía a lo largo del año e incluso del día. *La reflexión por el suelo*, debido a que diferentes tipos de superficies reflejan o dispersan la radiación UV en diversa medida. Por ejemplo, la nieve reciente puede reflejar hasta un 80% de la radiación UV; la arena seca de la playa, alrededor de un 15% y la espuma del agua del mar, alrededor de un 25% (WHO, 2003).

La radiación en Colombia ha sido medida en términos de energía y con base en las regiones en que se divide el país. De acuerdo con el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM, La intensidad de la radiación solar en la región Andina colombiana muestra que las zonas de los valles del Cauca y Magdalena poseen el mayor potencial energético y a medida que se asciende hacia las cimas de las cordilleras, ese potencial va disminuyendo gradualmente, con excepción de algunos núcleos localizados en zonas llamadas altiplanos, donde se observa un potencial solar mayor comparado con el de las laderas. En las regiones costeras: atlántica y pacífica, los resultados de la evaluación del recurso solar del país muestran en la región noreste de la costa atlántica (La Guajira) un potencial solar promedio diario entre 5,0 y 6,0 kWh/m<sup>2</sup>, el mayor del país. Este valor va disminuyendo gradualmente en dirección sur-oeste hacia la costa pacífica, donde se presenta el menor potencial solar del país, con valores menores de 3,5 kWh/m<sup>2</sup>, aunque posee una gran zona con valores entre 4,0 y 4,5 kWh/m<sup>2</sup>. Las regiones de la Orinoquia y Amazonia, que comprenden las planicies de los Llanos Orientales y zonas de

las selvas colombianas, presentan una variación ascendente de la radiación solar en sentido suroeste-noreste, verificándose valores asimilables a los de La Guajira en el noreste (Puerto Carreño) (IDEAM, 2005). Con base en lo anterior, la radiación en Colombia es considerada de gran interés para su utilización como recurso alternativo de fuente de energía. Sin embargo, hablando de exposición solar es de especial cuidado considerar los efectos y promover la protección frente a la radiación por la cantidad de energía que estaría recibiendo la piel.

### **2.1.2 Efectos de la radiación solar sobre seres humanos**

Dentro de los efectos biológicos más relevantes y asociados como se mencionó anteriormente a la radiación UV, se encuentran los de tipo benéfico como el de estimular la síntesis de vitamina D, importante para incrementar la absorción del calcio y así prevenir enfermedades como el raquitismo y la osteoporosis (Wilkinson and Moore, 1990); adicionalmente favorecer la circulación sanguínea, aumentar la formación de hemoglobina y a nivel del sistema nervioso autónomo, estimular la síntesis de serotonina, neurotransmisor responsable del estado anímico (Lambert et al., 2002).

Asimismo se encuentran los efectos nocivos dentro de los cuales se incluyen a nivel de la piel, el eritema, el edema, la pigmentación, el engrosamiento de la epidermis y efectos a largo plazo como el fotoenvejecimiento, la inmunosupresión y la fotocarcinogénesis (Kullavanijaya and Lim, 2005).

Es importante profundizar en estos efectos nocivos pues son acumulativos y van surgiendo con el tiempo incluso luego de una respuesta adaptativa de la piel en contra de los rayos UV. Inmediatamente después de la exposición al sol, la piel desencadena una respuesta inflamatoria descrita previamente con signos como el eritema y el edema, seguido por la pigmentación pues los rayos UV regulan la producción y acumulación de pigmento de melanina en la piel; también ocurre el engrosamiento desde el estrato córneo, epidermis y dermis debido a una proliferación celular mediada por factores de crecimiento epidérmico. Estas medidas son establecidas con el fin de mejorar la protección frente a una nueva exposición (Matsumura and Ananthaswamy, 2004).

Por otro lado, existen los efectos más profundos y con mayores consecuencias que se han descrito a nivel de daño en el ADN, por producción de dos tipos de dímeros, dímeros de ciclobutano entre residuos adyacentes de timina o citosina, y fotoproductos de pirimidina entre residuos de pirimidina adyacentes que conducen a mutaciones en las secuencias del ADN y que pueden ser reparadas por diversos mecanismos como la reparación directa, la reparación por escisión de base, la reparación de desajustes, la reparación de rotura de doble cadena y la reparación por escisión de nucleótidos que es la más común en daños por radiación UV (Soehnge et al., 1997). Otro mecanismo adicional a la reparación es la muerte celular programada o apoptosis, en ambos casos la proteína P53 juega un papel muy importante pues para el primer caso, induce una detención del ciclo celular en la fase G1, lo que permite la reparación del daño del ADN antes de su replicación en la fase S. En el segundo caso, activa las vías apoptóticas bien sea aumentando la expresión de genes promotores o disminuyendo la expresión de los genes supresores de apoptosis. Sin embargo, estas reparaciones no ocurren indefinidamente, no son totalmente eficientes y algo de daño queda acumulándose, apareciendo efectos acumulativos a largo plazo de deterioro estructural y funcional hasta el caso más grave, el cáncer (Matsumura and Ananthaswamy, 2004).

En cuanto a la inmunosupresión que favorece la aparición de cáncer tras el daño irreparable del ADN, se ha descrito que inicia desde la interrupción en la comunicación de las células de Langerhans (presentadoras de antígeno) con los ganglios linfáticos regionales, así como en el contacto con otras citoquinas producidas en los queratinocitos (Matsumura and Ananthaswamy, 2004).

### **2.1.3 Estrés oxidativo debido a la radiación UV**

Las especies reactivas de oxígeno ROS son moléculas o iones con un único electrón no apareado en su capa más externa y de allí se origina su reactividad. Se pueden clasificar en radicales libres de oxígeno como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), radicales orgánicos ( $R^{\cdot}$ ), radicales peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ), radicales alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ), radicales tiilo ( $RS^{\cdot}$ ), radicales sulfonilo ( $ROS^{\cdot}$ ), tiil peroxilo ( $RSSO^{\cdot}$ ) y disulfidos ( $RSSR$ ), y en no radicales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), singlete de oxígeno ( $O_2$ ), ozono o trioxígeno ( $O_3$ ), hidroperóxidos orgánicos ( $ROOH$ ), hipocloruro ( $HOCl$ ), peroxinitrito ( $ONO^-$ ), anión nitrosoperoxocarbonato ( $O=NOOCO_2^-$ ), dióxido de dinitrógeno ( $N_2O_2$ ), nitronio



(NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) y lípidos altamente reactivos o compuestos carbonilo derivados de carbohidratos (Liou and Storz, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno se generan dentro de los tejidos de los mamíferos mediante reacciones redox que involucran grupos de transferencia de electrones como quinolinas, sus precursores fenólicos, complejos metálicos, compuestos nitro aromáticos e iminas conjugadas, que gracias a su reactividad, interactúan fácilmente con numerosas moléculas celulares que regulan muchos procesos bioquímicos (Kovacic and Jacintho, 2001). Los oxidantes, como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y <sup>•</sup>OH también se producen en las células durante el transporte de electrones mitocondriales y microsomales y a partir de las oxidaciones de NADPH, así como en las lipodioxigenasas y a bajas concentraciones desempeñan papeles muy importantes como mediadores de tejidos y residuos de reacciones energéticas o de defensa así como en entidades endógenas como fagocitos y enzimas, como las citocromo P450 monooxigenasas (CYP450) (Heck et al., 2003).

La formación de ROS también puede ser causada por agentes externos y uno de los principales responsables es la radiación UV. Los fotones provenientes de la luz penetran la piel y en su camino interactúan con cromóforos celulares entre los que se destacan riboflavinas, bilirrubinas, grupos hemo, porfirinas, ácido urocánico y la melanina en sus dos formas químicas, eumelanina y feomelanina. En estos compuestos se absorben fotones que conducen a un estado excitado de los cromóforos llamado estado singlete excitado. Después de esta reacción inicial, pueden tener lugar dos reacciones: una caída al estado fundamental con la emisión de calor o fluorescencia o un cruce entre sistemas que conduce a un estado triplete excitado. Este estado de triplete excitado es solo un estado intermedio que puede reaccionar tanto con el ADN como con el oxígeno molecular, lo que resulta en la modificación del ADN o en la producción de ROS, que a su vez conducen a daño celular (Prasad and Pospíšil, 2012; Rinnerthaler et al., 2015).

Dentro de los ROS, los más abundantes en la piel son el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH y el O<sub>2</sub><sup>-</sup> (D'Orazio et al., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que el estrés oxidativo provocado en la piel por la radiación UV es causado por el agotamiento de las enzimas antioxidantes endógenas (Bickers and Athar, 2006; Pillai et al., 2005; Podda et al., 1998).

Ahora bien, el robusto sistema antioxidante está conformado por agentes no enzimáticos como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C) y glutatión reducido

(GSH) que es un oligopéptido compuesto por tres aminoácidos: cisteína, glicina y glutamina, e incluso algunos aminoácidos como triptófano, tirosina, histidina y cisteína que se encuentren libres (Dröge, 2002). También por agentes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD) que inactiva los aniones superóxido convirtiéndolos en oxígeno molecular ( $O_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y la catalasa (CAT), enzima encargada de depurar  $H_2O_2$  y convertirlo en agua ( $H_2O$ ) y  $O_2$ , (D’Orazio et al., 2013; Heck et al., 2003; Kovacic and Jacintho, 2001).

Bajo esas condiciones se mantiene un sistema homeostático tipo “homeóstasis redox” entre la formación y eliminación de ROS. Cualquier alteración que sufra este sistema se puede definir como un desequilibrio que desencadena un estado de estrés oxidativo, es decir un desbalance entre eventos oxidativos y antioxidantes. Además, cuando la cantidad de ROS en un tejido como la piel excede cierto umbral y los sistemas reparadores no pueden mantener la homeóstasis, las células pueden verse abrumadas y proliferar de manera anormal, también pueden inducir lesiones en los tejidos y contribuir al desarrollo de cáncer de piel (Dröge, 2002; Glorieux and Calderon, 2017; Lee and Wei, 2000).

En el estrés oxidativo, moléculas como las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos son susceptibles al ataque de ROS causando su oxidación, cambios estructurales y, por tanto, alterando sus funciones biológicas. En el caso del ADN, los ROS pueden inducir rompimientos individuales, bases oxidadas, pérdida de una base purínica o pirimidínica por ruptura de enlaces glicosídicos causando sitios abásicos, puentes intra e intercatenarios o incluso enlaces cruzados de ADN-proteína que pueden conducir a mutaciones irreparables (Dröge, 2002).

Particularmente hablando del peróxido de hidrógeno, además de ser un agente tóxico y precursor de otras especies mucho más reactivas como el  $\cdot OH$  vía reacción de Fenton con metales de transición como hierro y cobre (Liou and Storz, 2010), ha sido definido recientemente como un segundo mensajero que desencadena muchos procesos biológicos como cambios de morfología, proliferación celular, vías de señalización, actividad proteica o apoptosis (Finkel, 2011; Sies, 2017). El  $H_2O_2$  es una de las formas más estables de ROS y su generación en la piel puede ser inducida por factores tanto exógenos como endógenos. Los factores exógenos incluyen patógenos, productos químicos, luz ultravioleta y otros. Los factores endógenos están representados por diferentes

inflamaciones agudas y crónicas, que incluyen hiperglicemia y productos enzimáticos antioxidantes (Xu et al., 2018).

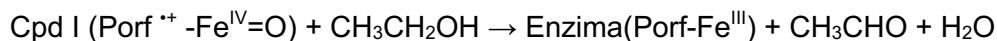
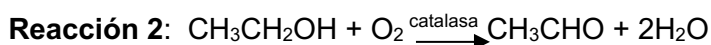
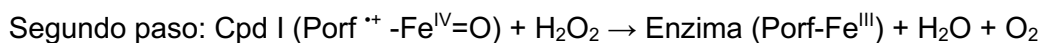
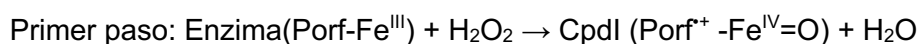
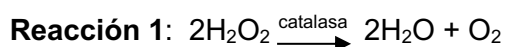
En cuanto a la toxicidad celular del  $H_2O_2$ , ésta depende de su concentración. De hecho, la concentración fisiológica *in vivo* es de alrededor de  $0,1 \mu M$  y concentraciones superiores a  $1,0 \mu M$  ya son consideradas como condiciones de estrés oxidativo y pueden ser perjudiciales para las células (Sies, 2017). Otros estudios han evaluado concentraciones entre  $50$  y  $100 \mu M$  que generan un estado similar a la senescencia caracterizado por una disminución de la proliferación celular y con concentraciones de  $300$  a  $400 \mu M$  que conducen a la muerte celular (Bladier et al., 1997; Rhie et al., 2001a). Dentro de los diferentes ROS, algunos estudios han asociado directamente al  $H_2O_2$  en altas concentraciones con la formación de cáncer de piel, promoviendo el crecimiento celular anormal, la progresión y metástasis. Se ha encontrado que una vez las células cancerígenas han sido formadas, estas a su vez promueven la producción de  $H_2O_2$  que inducen el estrés oxidativo en células adyacentes y por lo tanto conducen a la formación de nuevas células cancerígenas (Lisanti et al., 2011; Szatrowski and Nathan, 1991).

#### **2.1.4 Catalasa: una de las enzimas más importantes del sistema antioxidante de la piel**

El sistema antioxidante de la piel está conformado principal y mayoritariamente por agentes enzimáticos como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, peroxiredoxina y hemo oxigenasa (Wagener et al., 2013). Particularmente, la enzima catalasa es mayoritaria en la piel y su actividad es hasta 8 veces mayor en la epidermis en comparación con la dermis y de hecho no solo está presente en el tejido viable sino también en las capas más superficiales de la piel como el estrato córneo, que se considera un tejido muerto, aunque con menor actividad (Giacomoni et al., 2000; Hellemans et al., 2003). Gracias a su abundancia en estas capas, se ha reconocido como una enzima importante en el proceso de fotoprotección de la piel; se ha encontrado en estudios *in vivo* con seres humanos que disminuye su expresión con dosis agudas de radiación entre 24 y 48 horas después de la exposición, pero que se recupera hacia las 72 horas posteriores. Adicionalmente, con dosis crónicas de radiación (durante toda la vida), la actividad se ve incrementada en epidermis

y dermis y además, es la única enzima que responde significativamente a la exposición a la radiación (Hellemans et al., 2003; Rhie et al., 2001a, 2001b).

La catalasa es una enzima tetramérica compuesta por subunidades de 62 kDa dispuestas de forma tetraédrica, cada una de las cuales contiene 4 dominios distintos y un grupo hemo correspondiente al sitio activo y un sitio de unión a NADPH (Scibior and Czczot, 2006). Este grupo hemo está compuesto por una molécula de hierro que se une a una estructura similar a un anillo llamado anillo de porfirina. Este sitio activo está profundamente inmerso en el centro de la estructura tridimensional, pero es accesible para el peróxido de hidrógeno desde la superficie a través de canales. Los cuatro dominios incluyen: (1) un brazo N-terminal que contiene una histina distal, un aminoácido esencial para la reacción de catalasa; (2) un dominio  $\beta$ -barril que contiene ocho  $\beta$ -barriles dispuestos de forma antiparalela con seis inserciones  $\alpha$ -helicoidales, que confieren el núcleo hidrófobo de la proteína necesario para la estructura tridimensional de la enzima; (3) un dominio de conexión que contiene el residuo de tirosina que se une al grupo hemo; y finalmente (4) un dominio  $\alpha$ -helicoidal, que es importante para la unión al cofactor NADPH (Glorieux et al., 2015; Putnam et al., 2000). Como se ha mencionado previamente, la principal función de la catalasa es un proceso de desintoxicación de peróxido de hidrógeno como se muestra en la reacción 1, donde es de resaltar la producción de oxígeno molecular y también lleva a cabo procesos de tipo peroxidasa oxidando compuestos donadores de hidrógeno, como polifenoles o etanol, con producción de acetaldehído de acuerdo con la reacción 2 (Glorieux et al., 2015; Kirkman and Gaetani, 2007).



En cuanto a la reacción 1, el mecanismo de conversión incluye 2 pasos, en el primero la catalasa se oxida a un intermediario de hierro hipervalente, conocido como compuesto I (Cpd I) que es un radical catiónico de oxoferril porfirina, este Cpd I reacciona rápidamente con una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  en un proceso redox de dos

electrones. En el caso de la reacción 2, como se mencionaba anteriormente son reacciones peroxidáticas que ocurren cuando los niveles de  $H_2O_2$  son bajos, un típico ejemplo es la conversión de etanol a acetaldehído contribuyendo a su metabolismo hepático.

De otra parte, la catalasa puede ser inhibida químicamente mediante compuestos como 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) o compuestos nitrogenados como cianuro (CN) o azida sódica ( $NaN_3$ ) ya que el nitrógeno bloquea el acceso del grupo hemo a otros ligandos potenciales. Interactúa con la histidina distal y un residuo de asparagina, lo que sugiere que compite con el peróxido de hidrógeno por la unión al hemo. Mientras tanto, el 3AT interactúa con la histidina distal, lo que conduce a una formación de aductos y, por lo tanto, bloquea la reacción de la catalasa de manera irreversible (Kankala et al., 2015; Putnam et al., 2000).

### **2.1.5 Amperometría con electrodo de oxígeno, una herramienta para evaluar la actividad enzimática de catalasa**

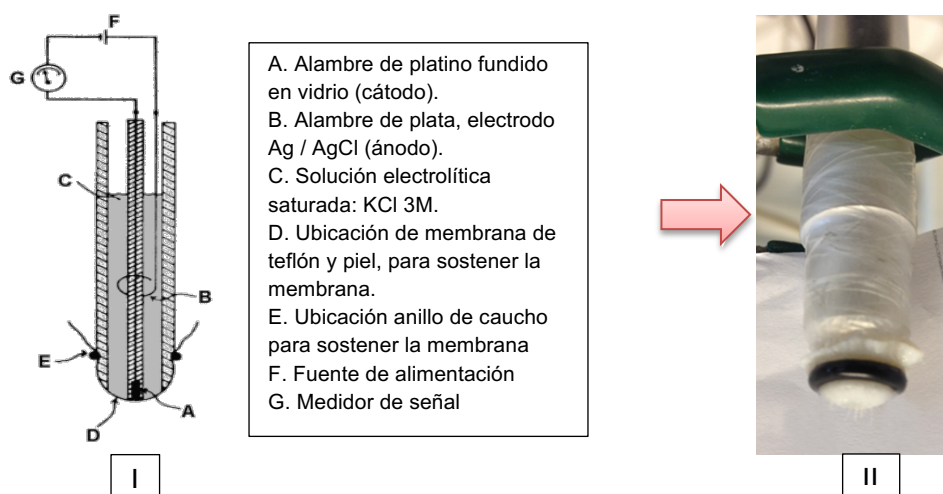
Un electrodo de oxígeno es un sensor amperométrico que produce una corriente eléctrica en función de la presión parcial de oxígeno molecular en el medio estudiado. Responde al principio electroquímico de la transferencia de electrones debida a una reacción química, lo que lo hace una herramienta analítica robusta, sencilla y con un amplio rango de aplicaciones, entre ellas en el campo biológico, como es el caso del desarrollo de los biosensores. El primer desarrollo en este campo correspondió al electrodo de oxígeno Clark en 1962 que fue diseñado para evaluar el contenido de oxígeno en la sangre y usado en los hospitales durante procedimientos quirúrgicos (Clark and Lyons, 2006). Desde entonces, otras aplicaciones se han desarrollado para la evaluación de función enzimática pues se basan en la actividad biocatalítica sobre el analito utilizado, con enzimas que contienen un grupo activo específico para oxidación o reducción (O'Neill et al., 2008; Turner et al., 1987).

El primer biosensor reportado que usó catalasa como enzima productora del analito  $O_2$  fue desarrollado en 1982 y la fuente enzimática correspondía a una porción de hígado bovino que era colocada en la superficie del electrodo (Mascini et al., 1982). Recientemente, las principales aplicaciones de biosensores corresponden a la utilización de enzimas en la piel como la glucosa oxidasa mediante la penetración de su sustrato la glucosa a través de ésta y su aplicación al desarrollo de un sensor *in vitro* de niveles de glucosa (Ullah et al.,

2018); también la catalasa que mediante la transformación de  $H_2O_2$  en  $O_2$  es posible determinar su capacidad de depuración de ROS (Nocchi et al., 2017). Además, se han explorado biosensores con metaloproteínas como la mioglobina por sus propiedades redox para detección de  $H_2O_2$  (Yoon et al., 2017).

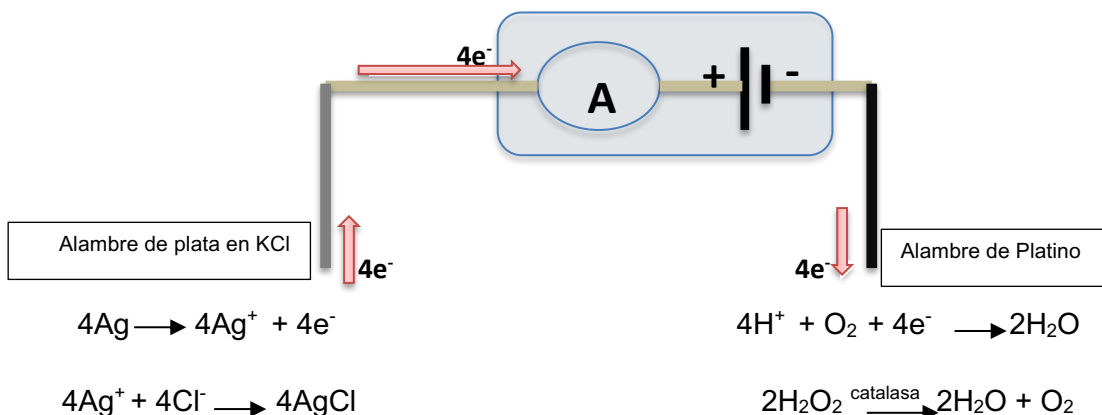
El electrodo de oxígeno cubierto con piel (SCOE por sus siglas en inglés) que desarrolló Nocchi y colaboradores, además de haber demostrado ser una herramienta útil en el estudio de la actividad enzimática de la catalasa, previamente había demostrado ser útil en estudios de penetración transdérmica de compuestos biológicamente activos que presentan grupos oxidables como es el caso del flavonoide quercetina o del ácido ascórbico (Gari et al., 2015; Rembiesa et al., 2015). En términos generales, el electrodo de oxígeno está compuesto por un alambre de platino que corresponde al cátodo, este a su vez está conectado a un ánodo que corresponde a un alambre de plata bañado en cloruro de plata y ambos inmersos en una solución electrolítica saturada de cloruro de potasio (KCl) 3 M. Este sistema electrodo/electrolito está cubierto por vidrio y en la punta se separa del resto de componentes mediante una membrana de teflón de  $5\mu m$  que recubre la superficie del electrodo, dicha cubierta es impermeable al agua y a los iones, pero permeable al oxígeno; finalmente se ubica la piel, ajustada al montaje mencionado mediante un anillo de caucho y que conforma el biosensor, donde se generará la reacción enzimática que produce el analito de interés para ser detectado por el electrodo. Todo el sistema se sumerge en una celda que contiene el sustrato de la enzima, en el caso particular de la catalasa, dicha celda contiene  $H_2O_2$  disuelto en una solución de PBS. La figura 2-1 representa la configuración del electrodo cubierto por piel.

**Figura 2-1:** Representación esquemática del electrodo de oxígeno (I) y del montaje del biosensor SCOE (II) para evaluación de la actividad de catalasa en la piel.



De acuerdo con el montaje anterior la reacción que sucede es la descrita en la figura 2-2 a continuación:

**Figura 2-2:** Descripción del circuito eléctrico y el fundamento de la medición en el electrodo de oxígeno.



En la descripción de la figura 2-2, el circuito está alimentado por una fuente de 0,7 V y la medición se realiza en términos de corriente (Amperios); la oxidación de la plata conduce a la generación de 4 electrones, esta reacción es promovida por la presencia de iones de cloruro de la solución electrolítica de cloruro de potasio para formar cloruro de plata, los iones de plata son consumidos y esta reacción es termodinámicamente favorable a la producción de electrones. Estos cuatro electrones formados se dirigen hacia el cátodo de platino donde ocurre la reducción de oxígeno molecular a agua, esto genera un aumento en la corriente registrada (reductora) la cual es directamente proporcional a la presión parcial de  $\text{O}_2$  contenida en el medio estudiado. Como el oxígeno proviene de la actividad de la catalasa, esta corriente registrada será proporcional a la actividad catalítica de la enzima en la depuración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para convertirlo en  $\text{O}_2$ .

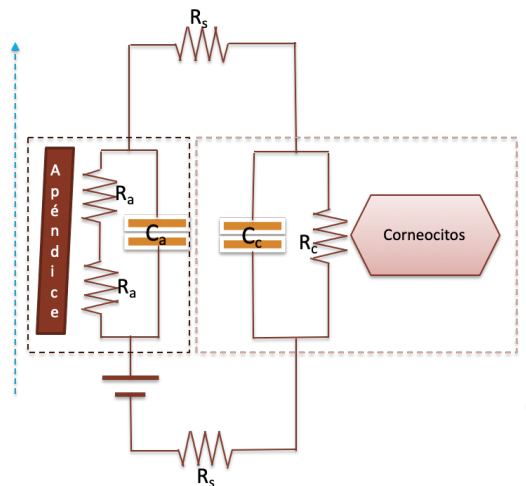
### 2.1.6 Características eléctricas de la piel

Cada una de las estructuras y regiones de la piel poseen propiedades eléctricas muy particulares que dependiendo de su constitución y estado, determinarán la conducta de las propiedades eléctricas en función de la frecuencia empleada (Moncada et al., 2010). Las características eléctricas de la piel, han sido modeladas y reconocidas por la

comunidad científica como un sistema de resistores y capacitores en donde la corriente puede fluir a través de 2 vías principales, una a través de la matriz lipídica del estrato córneo con poca conducción y la otra a través de los apéndices (folículos pilosos, glándulas sudoríparas), que se asocian con una alta densidad de corriente (Chizmadzhev et al., 1998; Vargas Luna et al., 2015).

Particularmente, el estrato córneo se considera como un dieléctrico, con un dominio lipídico conformado por la membrana de los corneocitos y estos a su vez en estado hidratado, contienen agua y iones donde habría la mayor conductividad, entonces la caída del potencial ocurriría entre cada corneocito. Tales características se traducirían en un circuito con resistores en paralelo y capacitores en serie a través del estrato córneo (Chizmadzhev et al., 1998) como se representa en la figura 2-3:

**Figura 2-3:** Representación esquemática del modelo eléctrico descrito para la piel.



$R_s$ : Resistencia de la solución;  $R_a$ : Resistencia del apéndice;  $R_c$ : Resistencia del corneocito;  $C_a$ : Capacitancia del apéndice;  $C_c$ : Capacitancia del corneocito.

En cuanto a los apéndices, estos han sido modelados como tubos cilíndricos semiinfinitos llenos de electrolitos que atraviesan un dieléctrico que separa 2 compartimentos, es decir el estrato córneo. En el caso del vello, la parte externa encima del estrato córneo se caracteriza porque no hay conducción mientras que internamente, la pared del cilindro cuenta con una capacitancia específica y una conductancia inducida (Chizmadzhev et al., 1998).



Con el fin de dar claridad en estos aspectos, resulta importante revisar los conceptos eléctricos que se relacionan con la piel:

**Voltaje:** Es la fuerza eléctrica que hace que la corriente fluya en un circuito. Es una magnitud vectorial y por tanto tiene magnitud y dirección. Se mide en voltios (V) (Ivorra, 2002).

**Corriente:** Denota el flujo de carga eléctrica (Q) a través de una sección transversal en un segundo. Se mide en amperios (A) que equivale a: *Culombio s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>* (Ivorra, 2002).

**Impedancia:** Oposición eléctrica total de un material (piel) al paso de una corriente alterna a través de éste a diferentes frecuencias. A bajas frecuencias está relacionada principalmente con las propiedades resistivas del ambiente extracelular mientras que, a altas frecuencias, incluye propiedades resistivas intracelulares y extracelulares, así como propiedades capacitivas de las membranas celulares, Se mide en ohmios ( $\Omega$ ) (Birgersson et al., 2011).

**Capacitancia:** Propiedad de un cuerpo para almacenar una carga y oponerse a cualquier cambio de voltaje a través de éste. Sus unidades son faradios por unidad de área: *F cm<sup>-2</sup>* (Chizmadzhev et al., 1998; Lawler et al., 1960).

**Reactancia:** Es la oposición al flujo de una corriente alterna resultante de la fuerza electromotriz acumulada por un condensador o un inductor. En este sentido es la parte imaginaria de la impedancia pues junto con la resistencia eléctrica, determinan la impedancia total de un componente o circuito. Se mide en ohmios ( $\Omega$ ) (Lawler et al., 1960).

**Resistencia:** La resistencia eléctrica es la oposición al flujo de corriente eléctrica a través de un conductor, se mide en ohmios ( $\Omega$ ). De manera opuesta, la conductancia eléctrica es la facilidad que ofrece un material al paso de la corriente eléctrica. En un tejido biológico la resistencia o la conductancia depende de la permeabilidad de iones que tenga el tejido en cuestión. El estrato córneo seco es un tejido casi impermeable, pero presenta humedad en virtud de los canales acuosos entre las placas de queratina y posiblemente, entre las fibrillas de queratina, lo que lo hace ser conductor libremente. La capa germinativa en virtud de los grandes canaliculos intersticiales es bastante conductora, pero la capa granulosa, posiblemente constituye una barrera al igual que la unión dermo-epidérmica, donde las células están estrechamente unidas (Chizmadzhev et al., 1998; Edelberg, 1977).

Retomando el modelo eléctrico descrito para la piel por sus características dieléctricas, es pertinente mencionar que la manera de evaluar dichas características es mediante mediciones de impedancia eléctrica, pues como se ha mencionado previamente, éstas dependen de la frecuencia empleada (Karacolak et al., 2012). Este método consiste en aplicar un voltaje sinusoidal de pequeña amplitud y medir el potencial o la corriente de respuesta, es decir, se evalúa la respuesta eléctrica del tejido tras recibir un estímulo. Para este tipo de mediciones se han descrito metodologías no invasivas como la medición por medio de electrodos, la medición de la corriente inducida por campos magnéticos y métodos híbridos que combinan las dos anteriores (Moncada et al., 2010).

La medición con electrodos es la más utilizada en tejidos biológicos y pueden utilizarse combinaciones de 2, 3 o 4 electrodos, cuya precisión mejora a medida que aumenta el número de estos; la configuración de 4 electrodos es la más precisa ya que la corriente aplicada se realiza a través de 2 electrodos y la lectura del cambio de potencial se realiza mediante 2 electrodos distintos, de esta manera se eliminan interferencias asociadas a éstos como impedancias propias (Garay et al., 2018; Moncada et al., 2010). En cuanto a la medición por inducción magnética, se mide la corriente circundante una vez el tejido se ha sometido a un campo magnético o eléctrico y en lugar de usar electrodos, se utilizan bobinas inductoras en combinaciones hasta de 5 unidades; sin embargo, la medición es más compleja y de difícil registro en señales pequeñas. En el caso de los métodos híbridos, la corriente se induce a través de bobinas y se miden cambios de potencial con electrodos superficiales; estos son más utilizados en evaluaciones *in vivo* con fines de diagnóstico y alcanzan tejidos profundos como hueso (Moncada et al., 2010).

### **2.1.7 Espectroscopía de impedancia eléctrica: una metodología para evaluar características eléctricas de la piel**

La espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS por sus siglas en inglés) se basa en el estudio de las propiedades eléctricas pasivas de los tejidos biológicos, es decir, que corresponden a la respuesta eléctrica del tejido después de un estímulo externo de voltaje o corriente (Simic-Krstic et al., 2012; White et al., 2011). Por lo tanto, después de aplicar corrientes sinusoidales de bajo nivel (o voltaje) es decir, en un ancho de banda de

frecuencia dado por electrodos externos, se mide el cambio de potencial al cambio de corriente. Debido a las diferencias de fase entre las señales medidas y los valores de entrada de acuerdo con la frecuencia de modulación, la impedancia se expresa como un número complejo que varía con dicha frecuencia en el tiempo. La impedancia eléctrica medida a bajas frecuencias está relacionada principalmente con las propiedades resistivas del entorno extracelular, mientras que la impedancia eléctrica a altas frecuencias está relacionada tanto con las propiedades resistivas de los entornos intracelulares y extracelulares como con las propiedades capacitivas (reactancia) de las membranas celulares. Como se mencionó anteriormente, el análisis de impedancia de la piel se ha centrado en el modelo común de un circuito equivalente que consiste en una resistencia líder en serie con una disposición paralela de una resistencia y un condensador o capacitor, representado en la figura 2-3 como el corneocito (Björklund et al., 2013c; Simic-Krstic et al., 2012; Yamamoto and Yamamoto, 1976). En este modelo, la transferencia de iones a través de la membrana está representada por R y la acumulación de iones (o agotamiento) en las interfases por C; los dos procesos ocurren de manera independiente, por eso se ubican en paralelo y no se comportan de manera proporcional. Posteriormente, se realiza un análisis matemático mediante el modelo de “elementos de fase constante” (CPE por sus siglas en inglés) en el que las distribuciones de resistividad y permitividad dentro de la membrana, resultarían de una composición de capas no homogéneas (Córdoba-Torres, 2017; Hirschorn et al., 2010; White et al., 2011).

La impedancia de cualquier circuito puede ser descrita como la suma de los componentes que ocurren tanto dentro de la fase como fuera de ella y que se conocen como parte real y parte imaginaria respectivamente. Los elementos de fase constante corresponderían a lo que en el modelo del circuito eléctrico de piel es la capacitancia y fueron desarrollados para ajustar con precisión los valores de impedancia modelados a las mediciones de bioimpedancia reales (Kalia and Guy, 1995). Los CPE no son físicamente realizables con componentes eléctricos normales agrupados, pero generalmente se describe como una capacitancia que depende de la frecuencia. En este sentido, la impedancia de los CPE se describe mediante la ecuación 2-1 así:

**Ecuación 2-1:** Impedancia para CPE

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(i * 2\pi f)^\alpha Q}$$

Donde,

$Z_{CPE}$  = impedancia de los elementos de fase constante [ $\Omega$ ]

$i$  = Corriente medida angular [A]

$2 \pi f$  = frecuencia angular utilizada [Hz]

$\alpha$  = parámetro empírico, elemento de fase constante (0-1)

$Q$  = elemento de fase constante asociado a la capacitancia [ $F \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$ ]

y por lo tanto, para determinar la impedancia del sistema se realiza mediante la ecuación 2-2 de la siguiente manera:

**Ecuación 2-2:** Impedancia total del sistema

$$Z = R_{sol} + \frac{R_{mem}}{1 + (i * 2\pi f)^\alpha Q * R_{mem}}$$

Donde,

$R_{sol}$  = Resistencia de la solución [ $\Omega$ ]

$R_{mem}$  = Resistencia de la membrana de piel [ $\Omega$ ]

$i$  = Corriente medida angular [A]

$2 \pi f$  = frecuencia angular utilizada [Hz]

$\alpha$  = parámetro empírico (0-1)

$Q$  = elemento de fase constante asociado a la capacitancia [ $F \text{ m}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$ ]

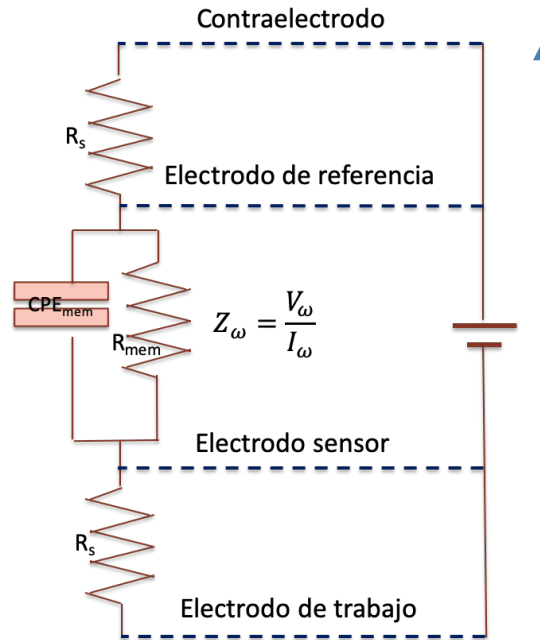
Esta última expresión es conocida como la ecuación Cole-Cole en memoria a sus autores, los hermanos Cole en 1941 (Cole and Cole, 1941) y hoy en día es usada por la mayoría

de investigadores en el campo de la bioimpedancia para describir sus resultados. En ella, como se mencionó previamente,  $\alpha$  corresponde a un parámetro empírico de los CPE con valores entre 0 y 1, que cuando  $\alpha = 1$  la impedancia es puramente capacitiva mientras que cuando  $\alpha = 0$  la impedancia es completamente debida a la resistencia; este parámetro se encuentra asociado a procesos de difusión de especies iónicas y característico de las frecuencias de relajación de las varias estructuras que conforman el tejido (Clemente et al., 2013; Ivorra, 2002). Respecto al elemento de fase constante  $Q$ , cuando  $\alpha = 1$ , éste se comporta como un capacitor ideal con unidades de  $[F m^{-2}]$ , a partir del cual se puede determinar la capacitancia efectiva como se mostrará más adelante.

Bajo estas condiciones también es importante definir que, como la corriente es una variable tiempo dependiente y hay interacciones adicionales dentro del sistema, es necesario utilizar corriente alterna a varias frecuencias para determinar todos los componentes del circuito. Para ello se utiliza un dispositivo electrónico llamado potencióstato, en el cual se genera la corriente alterna a múltiples frecuencias y se mide el voltaje. Adicionalmente, el software de estos equipos requiere escoger el circuito equivalente para determinar la impedancia del tejido.

En cuanto al montaje, se ha definido que un sistema de 4 electrodos es el más adecuado para reducir la incertidumbre de las mediciones al minimizar el efecto de resistividad por contacto. Una representación de este montaje es mostrado a continuación en la figura 2-4.

**Figura 2-4:** Método de 4 electrodos para la determinación de la impedancia de la piel.



$R_s$ : Resistencia de la solución;  $R_{mem}$ : Resistencia de la piel  $CPE_{mem}$ : elementos de fase constante de la impedancia de la piel;  $Z_\omega$ : impedancia medida a cada frecuencia;  $V_\omega$ : Voltaje en cada frecuencia;  $I_\omega$ : corriente en cada frecuencia.

En este método, el potenciostato aplica un voltaje entre los electrodos de trabajo y contraelectrodo normalmente 10mV de amplitud, para asegurar un voltaje definido entre los electrodos de referencia y trabajo. A su vez, el potenciostato monitorea la corriente que fluye a través del electrodo de trabajo, es decir la corriente que fluye a través de la piel. De otra parte, el potenciostato mide el voltaje entre los electrodos de referencia y el sensor para luego calcular la impedancia de la piel en cada frecuencia, para estas mediciones pueden fijarse entre 20-40 frecuencias diferentes. Los valores de impedancia obtenidos son 2 datos de números reales en cada frecuencia,  $Z_1$ =parte real (en fase) y  $Z_2$  parte imaginaria (fuera de fase).

La resistencia del tejido ( $R_{mem}$ ) está completamente representada en el componente real de la impedancia mientras que la capacitancia lo está en el componente imaginario y que la podemos calcular como **Capacitancia efectiva** ( $C_{eff}$ ) a partir del desarrollo matemático de los elementos de fase constante. Para ello, uno de los métodos más empleados es el método gráfico, con el que se determina el parámetro  $\alpha$  que se obtiene a partir de la

pendiente de la parte imaginaria de la impedancia representada en función de la frecuencia (altas frecuencias) en una escala logarítmica; el parámetro  $Q$ , que hace referencia a la carga almacenada se obtiene del tratamiento matemático realizado a la impedancia de la parte imaginaria para calcular  $Z_{CPE}$  (Ecuación 2-1) y con esto se puede calcular  $C_{eff}$  mediante la ecuación 2-3. Este es un procedimiento en el que se considera que las capas de la epidermis tienen una distribución constante en el tiempo al determinar la impedancia (Hirschorn et al., 2010; Orazem et al., 2006).

**Ecuación 2-3:** Capacitancia efectiva

$$C_{eff} = Q^{1/\alpha} R^{1-\alpha/\alpha}$$

Donde,

$C_{eff}$  = Capacitancia efectiva de la piel [ $nF\ cm^{-2}$ ]

$Q$  = elemento de fase constante asociado a la capacitancia [ $F\ m^{-2}\ s^{\alpha-1}$ ]

$\alpha$  = parámetro empírico, elemento de fase constante (0-1)

$R$  = Resistencia de la piel (obtenida del componente real de la impedancia) [ $\Omega\ cm^{-2}$ ]

Esta técnica electroquímica ha sido utilizada en diversas aplicaciones y particularmente ha llamado la atención en la investigación de la piel. Por ejemplo, se ha demostrado que la EIS es un método robusto, simple y preciso para la caracterización de la piel sana y enferma, como la piel afectada por cáncer (Aberg et al., 2004; Balasubramani et al., 2009; F. Zhang et al., 2018). También ha demostrado ser muy sensible para detectar cambios de las propiedades de barrera de la piel en evaluaciones *in vitro*, como en los cambios inducidos por la hidratación, que conducen a cambios significativos de las corrientes resistivas y capacitivas (Björklund et al., 2016, 2013c) e incluso los elementos de fase constante han demostrado ser un tipo de biomarcadores de envejecimiento en estudios *in vivo* (Simić-Krstić et al., 2014).

## 2.2 Metodología

A continuación se describen las evaluaciones realizadas al modelo de piel de cerdo para estudiar el efecto de la radiación UVB, estudiando la actividad enzimática de catalasa tanto de la piel con epidermis completa, como sólo de la capa más externa de la epidermis por aparte (estrato córneo), mediante amperometría y posteriormente, se estudian las condiciones que permiten evaluar la respuesta eléctrica de la piel (completa) mediante la técnica de impedancia. Una vez caracterizada eléctricamente la piel intacta, se presenta el desarrollo experimental para establecer el efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas del tejido.

### 2.2.1 Materiales

Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% o 9,8 M), solución de PBS (pH 7,4) en tabletas, azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) y tripsina, se adquirieron de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Todas las soluciones se prepararon usando agua ultrapura con una resistividad de  $18,2 \Omega \cdot \text{cm}$ . Celdas de Franz con diámetro de 0,9 cm, y volumen de 6,0 mL, fabricadas por PermeGear Inc. (Hellertown, PA, USA). Suspensión de alúmina en partículas de 1  $\mu\text{m}$  fabricada por Buehler (Struers, Dinamarca). Membrana de Teflón de 0.5  $\mu\text{m}$ , obtenida de Algimantas Jonuška (Vilnius, Lithuania).

### 2.2.2 Equipos

Potenciostato CompactStat de IVIUM Technologies (Eindhoven, Países Bajos). El electrodo de oxígeno consistía en una membrana de teflón de 5  $\mu\text{m}$  de espesor, un electrodo de platino (Pt) de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro fundido en vidrio y un electrodo interno de referencia de Ag/AgCl fabricado por Optronika UAB (Vilnius, Lituania). El software usado para registrar la corriente del electrodo de oxígeno fue *JuniorAssist2059*.

Para la evaluación de la impedancia eléctrica, también se usó un Potenciostato de Ivium Technologies (Eindhoven, Países Bajos). En el montaje de 4 electrodos, los electrodos de trabajo y contraelectrodo fueron de alambre de platino, mientras que para los electrodos



sensor y de referencia se usaron electrodos de Ag/AgCl/KCl fabricados por World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA). Los datos fueron obtenidos del software “*Ivium equivalent circuit evaluator*”.

Para la irradiación de las muestras se utilizó una lámpara UVB modelo Philips PL-9 9W / 01 / 2P que emite fotones con longitudes de onda entre 306 y 316 *nm*, con un pico a 312 *nm* (sin ninguna radiación significativa en otras longitudes de onda). Esta lámpara opera mediante un sistema Kernel modelo KN-4003BL (Kernel Medical Equipment Company, Xuzhou, China). El control de la radiación emitida por la lámpara se realizó mediante un Medidor UV: UV-340A, (Lutron Electronic Company, Taipei, Taiwán). Las muestras de piel fueron cortadas con un dermatomo TCM 3000 BL (Nouvag, Konstanz, Alemania).

Para el control histológico se utilizó un microscopio óptico Leica DM500 CH-9435 (Heerbrugg, Suiza).

### **2.2.3 Preparación de las muestras de piel**

Las muestras de piel fueron obtenidas de animales de criadero de los cuales se utilizaron las orejas. A la llegada al laboratorio, fueron congeladas a -80 °C mientras su uso (inferior a 3 semanas), que para esto se descongelaban lentamente y se limpiaban con abundante agua. Posteriormente, fueron divididas en tiras con un bisturí y se eliminó cuidadosamente el vello. De estas tiras fueron sacados cortes con el dermatomo de aproximadamente 0,5 *mm* de grosor (es decir, incluyendo dermis y epidermis) y de ellos, cortes circulares de 16,0 *mm* de diámetro mediante un punzón de este tamaño que resultaba adecuado para ajustarse tanto al electrodo de oxígeno como a las celdas de Franz. Estos cortes se mantuvieron congelados a -20 °C no más de cuatro semanas mientras su uso. Previo al montaje en cualquiera de los sistemas, las muestras eran descongeladas colocándolas en un papel de filtro empapado con PBS y se mantenían durante 1–2 horas a temperatura ambiente (22 °C).

Para la determinación de actividad catalítica en el estrato córneo, dicha membrana fue obtenida de las muestras de piel anteriormente descritas una vez tratadas con solución de tripsina al 0,1% en PBS durante 24 horas a 4 °C. Después de eso, el estrato córneo fue

removido fácilmente con unas pinzas, se lavó con PBS y se limpió con aplicadores con punta de algodón para eliminar el tejido residual. Las membranas obtenidas tenían aproximadamente 10-30  $\mu\text{m}$  de grosor y una vez obtenidas se montaron inmediatamente en el electrodo de oxígeno.

#### **2.2.4 Preparación del electrodo de oxígeno cubierto con la piel (SCOE)**

Para iniciar todas las mediciones, la superficie del electrodo de oxígeno (el cátodo de platino) debió ser pulida usando la suspensión de alúmina y enjuagada con agua ultrapura con el propósito de eliminar cualquier impureza que afectara la medición. El cuerpo del electrodo se llenó con solución saturada de KCl y para evitar escapes se revistió con una banda de parafilm®, la superficie del electrodo se cubrió con la membrana de teflón. A continuación, el electrodo se cubrió con una membrana de piel de epidermis completa o una membrana de estrato córneo dependiendo la medición a realizar, directamente en la parte superior de la membrana de teflón y se aseguró con un pequeño anillo de caucho. Para las mediciones, el sistema SCOE fue colocado en la superficie de una celda electroquímica con volumen constante de 10 mL de PBS pH 7,4 como se mostró previamente en la figura 2-1.

#### **2.2.5 Monitoreo amperométrico de la actividad de catalasa con el SCOE**

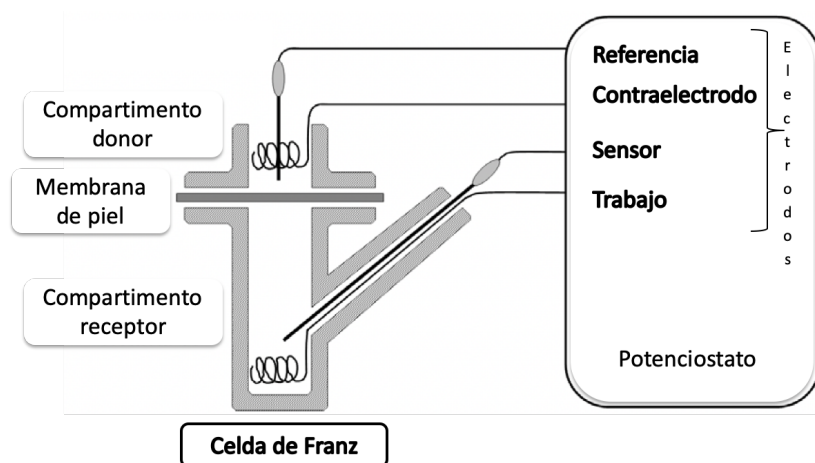
El SCOE (con membrana de piel o sólo estrato córneo) se conectó al potencióstato en una configuración de dos electrodos y la medición amperométrica se realizó aplicando -0,7 V de voltaje sinusoidal a través del electrodo Ag/AgCl/KCl (saturado) hacia el cátodo Pt, del electrodo de oxígeno; estas condiciones fueron estandarizadas dentro del grupo de investigación y habían sido reportadas previamente por Nocchi y colaboradores (Nocchi et al., 2017). Después de que se estableció una corriente de referencia o línea base, se adicionó una cantidad definida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la celda electroquímica para obtener una concentración conocida; en este punto, gracias a la actividad de la enzima catalasa presente, la corriente de reducción del electrodo de oxígeno aumentó al detectar la generación de  $\text{O}_2$ . En todos los experimentos, la solución que rodea el electrodo de oxígeno se agitó continuamente a 250 rpm y todas las mediciones se realizaron a

temperatura ambiente (22 °C). Para verificar la inhibición de la catalasa y por tanto la pérdida de la corriente reductora, se adicionó a la celda electrolítica una cantidad conocida de  $\text{NaN}_3$ ; las adiciones posteriores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no generaron ninguna respuesta, es decir no hubo cambios en la corriente reductora que estaba siendo medida.

### 2.2.6 Mediciones de espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS) de las muestras de piel

Las mediciones de EIS se realizaron con una configuración de cuatro electrodos en un montaje de celda de Franz conectado al potenciostato como se observa en la figura 2-5. Todas las mediciones se realizaron bajo control de temperatura a 22 °C. El rango de frecuencia fue de 0,1 Hz a 1,0 MHz con seis frecuencias por década (36 en total) y la amplitud del voltaje sinusoidal alterno aplicado fue de 100 mV entre los electrodos de trabajo y contraelectrodo, de modo que la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia sea igual al valor establecido del potenciostato; estas condiciones fueron estandarizadas dentro del grupo de investigación. La diferencia de potencial aplicada genera una corriente de respuesta entre el electrodo de referencia y el electrodo sensor, que es medida en el potenciostato.

**Figura 2-5:** Representación esquemática de la configuración de 4 electrodos utilizada en la medición de EIS.



Los datos se analizaron de acuerdo con un circuito equivalente que consiste en una resistencia correspondiente a la solución de trabajo llamada  $R_{sol}$ , en serie con una combinación paralela de una resistencia correspondiente a la de la membrana de la piel, llamada  $R_{mem}$  y un elemento de fase constante (CPE) como se mostró previamente en la Figura 2-4. Los valores de resistencia se obtuvieron de la parte real de la impedancia en las regiones de frecuencia donde la parte imaginaria proporciona una contribución mínima a la impedancia total. Para  $R_{sol}$ , esta región corresponde a altas frecuencias en el rango de aproximadamente 0,1–0,2 MHz. La región de frecuencia correspondiente para  $R_{mem}$  ocurre a bajas frecuencias cercanas a la corriente continua donde es igual a la impedancia de la parte real menos la resistencia de la solución  $R_{mem} = Z_1 - R_{sol}$ ; en este caso la  $R_{sol}$  se mantuvo constante en 200  $\Omega$  y siempre fue al menos un orden de magnitud inferior a  $R_{mem}$ . En este análisis, todos los datos fueron normalizados con el área de la membrana de la piel (0,64  $cm^2$ ) para obtener unidades de resistencia por unidad de área ( $Ohm \cdot cm^2$ ). En cuanto a los elementos de fase constante, la capacitancia efectiva  $C_{eff}$  se derivó de la región de alta frecuencia de los datos de impedancia de la parte imaginaria. Debido a la variabilidad natural de la piel, los datos de impedancia de la piel fueron analizados de manera individual en términos del cambio en función del tiempo ( $t$ ) tanto de  $R_{mem}$  y  $C_{eff}$  a partir de sus valores iniciales como el porcentaje de cambio en la variable por efecto de la radiación UVB de acuerdo con la ecuación 2-4 y 2-5 respectivamente:

**Ecuación 2-4:** Valor de cambio de  $R_{mem}$  de acuerdo con el tiempo evaluado.

$$\Delta R_{mem} = \frac{R_{mem}(t) - R_{mem}(0)}{R_{mem}(t)} * 100\%$$

Donde,

$\Delta R_{mem}$  = Porcentaje de cambio de la resistencia de la piel [%]

$R_{mem}(t)$  = Valor de la resistencia en el tiempo evaluado de exposición a la radiación UVB [ $Ohm \cdot cm^2$ ]

$R_{mem}(0)$  = Valor de la resistencia en el tiempo inicial sin exposición a la radiación UVB [ $Ohm \cdot cm^2$ ]

**Ecuación 2-5:** Valor de cambio de  $C_{eff}$  de acuerdo con el tiempo evaluado.

$$\Delta C_{eff} = \frac{C_{eff}(t) - C_{eff}(0)}{C_{eff}(t)} * 100\%$$

Donde,

$\Delta C_{\text{eff}}$  = Porcentaje de cambio de la capacitancia de la piel [%]

$C_{\text{eff}}(t)$  = Valor de la capacitancia en el tiempo evaluado de exposición a la radiación UVB [ $nF\text{ cm}^{-2}$ ]

$C_{\text{eff}}(0)$  = Valor de la capacitancia en el tiempo inicial sin exposición a la radiación UVB [ $nF\text{ cm}^{-2}$ ]

### 2.2.7 Condiciones de irradiación de las muestras de piel y diseño experimental

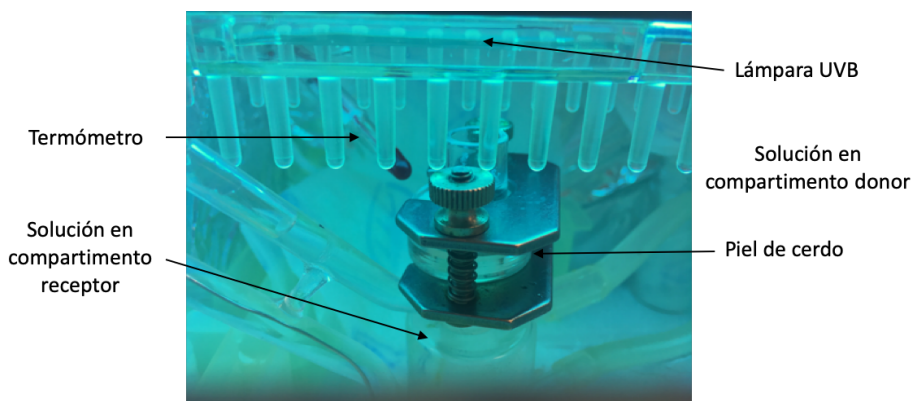
Para la exposición a la radiación UVB de las muestras de piel de cerdo, se utilizó la lámpara descrita en la sección 2.2.2 la cual era encendida siempre al menos 10 minutos antes del experimento para garantizar un flujo de radiación estable. Se realizaron controles de radiación de la misma y se determinó una irradiancia de  $0,01\text{ W/cm}^2$  a una distancia de  $2\text{ cm}$ , que corresponde a la distancia utilizada constantemente entre la membrana de la piel y la fuente de luz. Bajo estas condiciones la energía que recibía cada muestra durante 1 hora de exposición era de  $36\text{ J/cm}^2$  hasta un máximo de  $180\text{ J/cm}^2$  durante todo el experimento. Cabe señalar que estas dosis son altas en comparación con la radiación solar UVB natural que recibiría la piel en condiciones normales. Esto con la intención de amplificar los efectos que pudiéramos observar con dosis acumulativas de radiación. Por ejemplo, algunos trabajos han reportado diferentes dosis de exposición, una evaluación de fotoestabilidad de filtros solares usó una dosis de  $18,3\text{ J/cm}^2$  correspondientes a una exposición de 1 hora en verano al mediodía en la Rivera Francesa (Crovara Pescia et al., 2012). En un estudio sobre daño lipídico por efecto de la radiación UV en células, utilizaron  $2,5\text{ J/cm}^2$  (Olivier et al., 2017) e incluso estudios dirigidos a evaluar el efecto de la radiación UVB sobre la función barrera de la piel usó dosis hasta de  $800,0\text{ J/cm}^2$ , reportando que corresponde a 60 días continuos de exposición solar (Biniek et al., 2012). Finalmente, un informe de la Organización Mundial de la Salud reporta que la dosis anual de radiación UVB mundial oscila entre aproximadamente  $30\text{-}130\text{ J/cm}^2$  dependiendo de la latitud (IARC, 2010).

En cuanto a la experimentación, una vez evaluada la actividad enzimática de la catalasa tanto en las muestras de piel (completas), como en el estrato córneo, se procedió a

investigar el efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel. Para esto, fue necesario explorar varias alternativas metodológicas que como se describirá más adelante y se discutirá en detalle en la sección “Resultados y Discusión”, se resumen en una combinación de la radiación UVB y unas condiciones particulares de estrés oxidativo provocado, de manera **directa** por una carga del agente oxidante  $H_2O_2$  al sistema y de manera **indirecta**, por la inhibición de la enzima catalasa que se encarga de su depuración, esto mediante la adición de  $NaN_3$ ; estas combinaciones fueron resultado de la evaluación de la actividad enzimática donde se determinó la necesidad de buscar alternativas para generar un desequilibrio en el sistema biológico. Las mediciones fueron realizadas en las celdas de Franz directamente. El compartimento receptor de la celda de Franz se llenó con solución de PBS desgasificada que contenía una concentración definida de los agentes inductores de estrés oxidativo mencionados, posteriormente se montó la membrana de la piel y se completó el compartimento donador con la misma solución, se mantuvieron por 1 hora, para alcanzar un estado estable en cuanto a la hidratación de la piel. Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos de control de cada una de las condiciones estudiadas es decir, un caso sin incluir  $NaN_3$ , otro caso sin incluir  $H_2O_2$  y uno final sin incluir ambos agentes.

En cuanto a las mediciones de EIS, al inicio del experimento se realizaron cada hora durante 3 horas sin incluir aún la exposición a la radiación UVB para de esta manera, establecer valores de referencia tanto de la piel como del efecto que pudiera generar la inclusión de los agentes inductores de estrés oxidativo por sí mismos. Cada muestra de piel presentó valores diferentes de impedancia eléctrica debido principalmente al grado de diferenciación de los corneocitos en la zona puntual, por esta razón era muy importante evaluar su particularidad previo a la exposición a la radiación UVB. Posteriormente, sin mover la configuración de la celda de Franz, las muestras de piel fueron sometidas a la radiación UVB hasta 5 horas y hora a hora, se realizó la medición de la impedancia eléctrica. La solución del compartimento donador así como del receptor permanecieron siempre en la configuración para asegurar la acción completa de los agentes inductores de estrés oxidativo y mantener siempre las muestras de piel sumergidas en la solución. Adicionalmente, para evitar mover las muestras y que se generaran interferencias, sólo se desconectaban los electrodos del potencióstato al momento de introducirlas a la cámara de exposición, una imagen de esto se presenta en la figura 2-6.

**Figura 2-6:** Fotografía del montaje de celda de Franz donde se sometió la piel a la radiación UVB.



Cabe señalar que el calor generado por la lámpara UVB en la cámara de exposición fue contrarrestado enfriando el sistema simultáneamente y aseguramos una temperatura constante de 22 °C. Todas las mediciones se realizaron por triplicado ( $n = 3$ ) en las siguientes condiciones experimentales:

- Exposición a la radiación UVB sin incluir agentes inductores de estrés oxidativo directo ni indirecto (ni  $H_2O_2$ , ni  $NaN_3$ ).
- Exposición a la radiación UVB con presencia de  $NaN_3$  10,0 *mM* en la solución de PBS tanto en el compartimento donador como receptor.
- Exposición a la radiación UVB con presencia de  $H_2O_2$  1,0 *mM* en la solución de PBS tanto en el compartimento donador como receptor.
- Exposición a la radiación UVB con presencia de  $NaN_3$  10,0 *mM* y diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ , a saber: 0,5; 1,0; 5,0; 50,0; 980,0 *mM*  $H_2O_2$  en la solución de PBS tanto en el compartimento donador como receptor.

### 2.2.8 Evaluación histológica del efecto de la radiación UVB sobre las estructuras de la piel

Se empleó la microscopía óptica con el ánimo de complementar el estudio del efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel asociándolo a efectos estructurales, es decir sobre la integridad de las membranas de piel. Para ello, se usaron las muestras que fueron tratadas con agentes de estrés oxidativo es decir, PBS que

contenía  $\text{NaN}_3$  10,0 *mM* y  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0 *mM* y que se expusieron a radiación UVB durante 5 horas (correspondiente a una dosis de 180  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Para la comparación con muestras no expuestas a la radiación UVB, estas se mantuvieron solamente en la solución de PBS que contenía  $\text{NaN}_3$  10,0 *mM* y  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0 *mM* durante 5 horas. A continuación, a las muestras de piel se les realizó el procedimiento estándar para microscopía, descrito en el capítulo I con tinción hematoxilina y eosina. Adicionalmente, se realizó una coloración adicional con la tinción tricrómica de Masson para visualizar las fibras de colágeno tipo I y IV y poder observar el efecto sobre ellas.

### 2.2.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética de los valores obtenidos, junto con la desviación estándar respectiva y correspondían a valores de  $\Delta R_{\text{mem}}$  o  $\Delta C_{\text{eff}}$  como corresponda. Entre los grupos los resultados se analizaron mediante una prueba *t* de dos colas, suponiendo una varianza igual, y una prueba de Tukey para las comparaciones; los valores de *P* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Para describir la naturaleza de los datos obtenidos, los datos de  $\Delta R_{\text{mem}}$  se sometieron a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnovcon, la corrección de Lilliefors, la prueba de autocorrelación de Durbin-Watson y la prueba de homocedasticidad de Breusch-Pagan para determinar la distribución estadística más adecuada, bajo análisis de prueba de hipótesis. Para eso se utilizó el software RWizard® cuyos algoritmos involucran las pruebas de hipótesis para la verificación de la bondad del ajuste.

## 2.3 Resultados y Discusión

Para iniciar los resultados de esta parte, es importante mencionar que el proponer evaluar cambios eléctricos en tejidos *ex vivo* de piel de cerdo ocasionados por la radiación fue un gran desafío en muchos sentidos ya que sólo se conocía lo reportado en la literatura respecto a las mediciones eléctricas realizadas en tejido pero con otros fines investigativos. Surgió entonces la iniciativa de fijar las condiciones para diseñar un equipo de evaluación



de propiedades eléctricas en piel y con el apoyo de estudiantes de ingeniería electrónica se logró diseñar un dispositivo prototipo para el registro de señales bioeléctricas con electrodos de superficie (Garay et al., 2018), bajo unas condiciones experimentales inicialmente fijadas de exposición a la radiación UVB, no se logró detectar una respuesta significativa sobre variables como resistencia o capacitancia de acuerdo con el circuito descrito para la piel. Sin embargo, fue posible identificar cambios en términos de energía, pues con respecto a la suministrada, ocurría una atenuación de la señal en las muestras irradiadas mientras que en las no irradiadas no se presentaba. Éstos fueron unos indicios claros de que sí había un efecto debido a la radiación y que la respuesta eléctrica del tejido podía ser una promisorio herramienta de estimación del daño causado por la radiación. No obstante, se consideró que el prototipo no era lo suficientemente sensible para mostrar dichos cambios en las variables eléctricas de la piel y que por lo tanto, se debían explorar alternativas adicionales con mayor sensibilidad.

Fue entonces cuando se encontró la colaboración con el grupo del profesor Tautgirdas Ruzgas en la Universidad de Malmö Suecia, quienes eran expertos en caracterización eléctrica de muestras de piel y contaban con los equipos de mayor sensibilidad. Se llevaron a cabo las determinaciones de impedancia eléctrica sobre muestras de piel intactas y posteriormente expuestas a la radiación UVB a diferentes tiempos y bajo condiciones estandarizadas de medición. A pesar de lo cual, no se logró detectar ningún cambio en las variables asociadas (resistencia y capacitancia) causado por la radiación pues los valores registrados para estas variables permanecían intactos con o sin radiación. Este se consideró el primer hallazgo de la investigación, las muestras de piel de cerdo sumergidas en solución de PBS no se ven afectadas a nivel de sus características eléctricas por la radiación, a pesar de una dosis alta de hasta  $216 \text{ J/cm}^2$  correspondientes a 6 horas de radiación UVB. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que existe algo adicional que las protege de la radiación y no permite ver cambios biofísicos que reflejen variación en su impedancia; para ello, se planteó la necesidad de explorar a fondo el modelo biológico *ex vivo* y las características que permanecen conservadas (*post mortem*) que impedían ver cambios asociados a la radiación.

Se realizó entonces una búsqueda sistemática en la literatura que nos permitiera entender el porqué de la **no respuesta eléctrica** tras la exposición a la radiación, empezando por entender como se comporta la piel con estímulos externos al cuerpo. Se encontró que la piel es uno de los órganos que está más directamente expuesto a los rayos UV de la luz

solar y al ambiente externo, rico en oxígeno y sus especies reactivas, lo cual hace que sea un blanco importante para los procesos fotoquímicamente perjudiciales y el estrés oxidativo causado por ROS y que además, en varias ocasiones son desencadenados por la radiación misma. Entonces, era de esperarse que estuvieran ocurriendo cambios debidos a la radiación pero, que por alguna razón, no era posible determinarlos mediante esta metodología.

Se empezó a cuestionar el papel del estrés oxidativo en estos procesos y los mecanismos naturales de defensa de la piel es decir, el sistema antioxidante para lo cual se encontró que aunque dichos mecanismos dérmicos de defensa antioxidante estén trabajando todo el tiempo en mantener la homeóstasis, estos pueden agotarse por la exposición aguda o crónica a la radiación y, junto con el estrés oxidativo, hacen que la piel sea susceptible a diferentes desórdenes e incluso daños irreversibles (Briganti and Picardo, 2003; D’Orazio et al., 2013; Wagener et al., 2013). Este entendimiento fue la principal motivación para desarrollar una metodología *in vitro* con variaciones relacionadas al mecanismo de defensa antioxidante de la piel que ayudaran a avanzar en la comprensión del desencadenamiento del daño debido a la radiación, y que mediante una técnica cuantitativa como la EIS pudieramos aproximarnos a una evaluación confiable de su efecto a nivel de estructura y función de la piel.

De esta manera, nació la idea de explorar la actividad de catalasa en las muestras *ex vivo* de piel de cerdo, que como se revisó previamente para la piel humana es su principal enzima antioxidante. Esto significaba conocer el mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo provocado por la radiación UVB por lo que adicionalmente, se consideró la posibilidad de generar un ambiente hostil de exceso de radicales libres y de ser necesario, provocar la inhibición de dicha enzima para favorecer los procesos de daño en el tejido una vez se ha alterado la homeóstasis en el mismo. Por esta razón, el orden de la investigación fue primero, establecer la actividad enzimática de catalasa tanto en la piel completa como en el estrato córneo; esta última por ser la primera capa de la piel que recibe la radiación y que además tiene una importante contribución en las propiedades eléctricas como se describió previamente; segundo, una vez confirmada la actividad catalítica, se evaluó la actividad inhibitoria de  $\text{NaN}_3$  a una concentración conocida; tercero, una vez determinado que la concentración de  $\text{NaN}_3$  evaluada era suficiente para la inhibición, se iniciaron las mediciones por EIS, incluyendo diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como fuente de especies reactivas de oxígeno para generar el estrés oxidativo, y así

determinar la combinación más adecuada es decir, la mezcla que permitiera obtener la mayor respuesta en términos de cambio de impedancia ( $\Delta R_{\text{mem}}$  y/o  $\Delta C_{\text{eff}}$ ) tras la exposición a la radiación UVB. Finalmente, con las condiciones definidas de estudio se evaluó el efecto de la radiación UVB sobre la integridad de la piel en términos de respuesta eléctrica, en función del tiempo de exposición.

### **2.3.1 Respuesta amperométrica por la actividad enzimática de catalasa**

La actividad de la catalasa fue estudiada mediante una metodología *in vitro*, de un electrodo de oxígeno cubierto por una membrana de piel (y estrato córneo), en la cual se encuentra ésta enzima y por lo tanto, se espera una producción de oxígeno después de la adición de diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que actúa como su sustrato, pues debido a la actividad enzimática de la catalasa, ocurre la conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  el cual es detectado mediante el monitoreo de la corriente reductora asociada como se describió previamente (Figura 2-2); del mismo modo, se evaluó la inhibición de dicha enzima tras la inclusión de  $\text{NaN}_3$ .

El siguiente hallazgo de consideración, fue encontrar una respuesta amperométrica resultante de la producción de oxígeno en la piel *ex vivo* de cerdo cercana a los 10 nA, lo que nos indica que este modelo biológico bajo las condiciones de uso, resulta adecuado para evaluar la actividad enzimática mediante la configuración del SCOE, y por lo tanto confirma que es un sustrato idóneo como modelo alternativo a la piel humana. De otra parte, el protocolo de almacenamiento, además de conservar la integridad de los tejidos como se demostró en el capítulo I, mantiene la viabilidad del mismo en términos de actividad enzimática de la catalasa, siendo completamente satisfactoria en todas las muestras estudiadas a pesar del tratamiento de congelación-descongelación, lo que estaría en concordancia con estudios que han reportado condiciones de almacenamiento similares a las utilizadas aquí, respaldando nuestro hallazgo (Bravo et al., 2000).

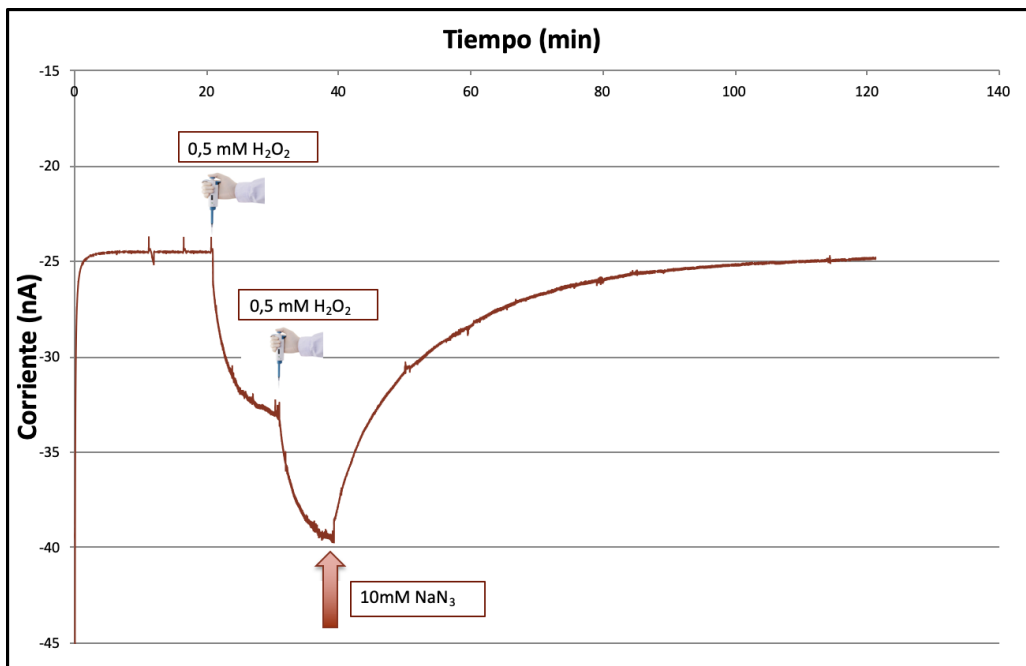
Otro resultado significativo para esta investigación, fue el hecho de encontrar actividad enzimática de la catalasa en la capa más superficial de la piel, el estrato córneo, a pesar de que es considerada una estructura muerta y además pertenece a un modelo *ex vivo* de piel de cerdo. Probablemente al encontrarse el tejido conservado, las células que iban

migrando hacia el estrato córneo mantenían en su estructura una porción de la enzima que permitió la conversión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$ , aunque en mucha menor proporción ( $1\text{nA}$ ) comparada con la muestra de piel completa. Esto significa que es una enzima bastante resistente por el hecho de mantenerse activa en un entorno sólido, pues se ha reportado que la mayoría de las proteínas y los lípidos de esta capa se encuentran en un estado molecular rígido (Björklund et al., 2013b).

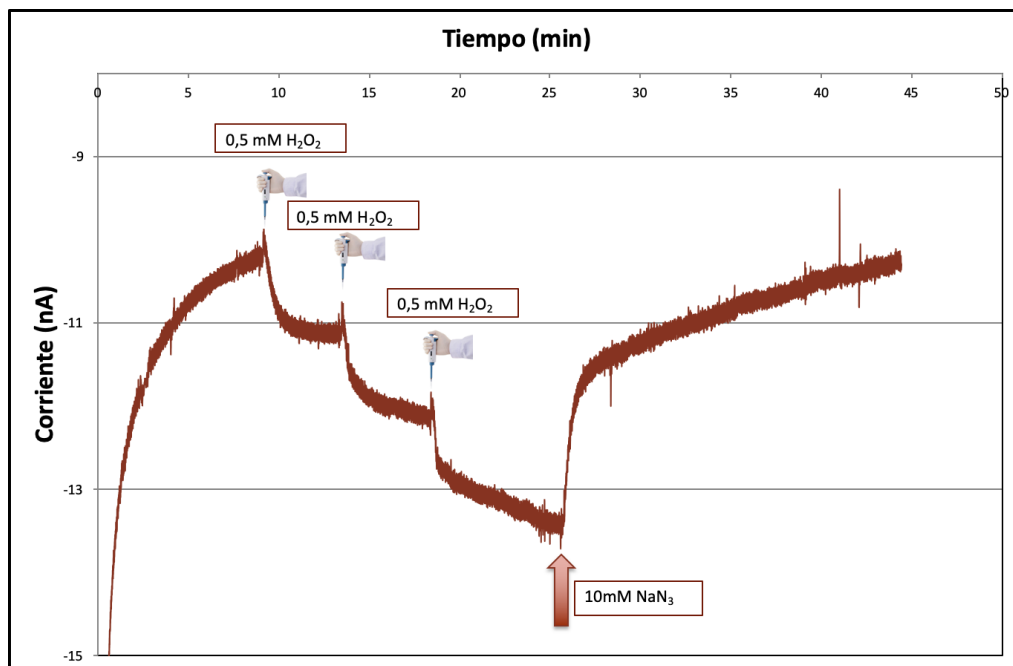
A continuación en la figura 2-7 se presentan los resultados de la medición amperométrica de la actividad de catalasa tanto para la piel de cerdo (completa) como para el estrato córneo, en función del tiempo. En esta respuesta se registra una corriente reductora (y por ello su signo negativo), debida a la producción de oxígeno. La parte inicial corresponde a la corriente de referencia del estado estacionario, hasta 20 minutos en la piel completa y hasta 9 minutos en el estrato córneo, debida al  $\text{O}_2$  disuelto en el PBS. Posteriormente, las adiciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,5\text{ mM}$  cada vez) reflejan la actividad de la catalasa por el aumento drástico en la corriente reductora registrada.

**Figura 2-7:** Respuesta cronoamperométrica mediante el SCOE para (a) la piel de cerdo completa y (b) estrato córneo, ambos en PBS pH 7.4.

(a)



b)



Con estas mediciones encontramos en primera medida que se requieren alrededor de 10-30 minutos para obtener una línea base estable, que se asocia a una concentración constante de oxígeno en la celda electroquímica. Para este caso en particular, ésta correspondió a  $[O_2] = 0,26 \text{ mM}$  (medida a una temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y una presión atmosférica de  $1 \text{ atm}$ ). En cuanto a la variación en el tiempo de estabilización, es asociada a diferencias estructurales y fisiológicas entre la piel completa y la membrana individual de estrato córneo, por ejemplo, el equilibrio de la membrana de la piel después de la inmersión en la solución de PBS, es un proceso más complejo que puede implicar entre otros, cambios inducidos por la hidratación sobre las propiedades moleculares de los componentes proteicos y lipídicos, el hinchamiento de los corneocitos y la redistribución de iones entre la membrana y la solución amortiguadora como ha sido reportado previamente (Björklund et al., 2010). En el estrato córneo, estos procesos son mucho más rápidos, al ser una capa tan delgada comparada con la piel y la cantidad de corneocitos a hidratar es menor alcanzando el equilibrio en menos tiempo.

Analizando la respuesta frente a las adiciones de  $H_2O_2$ , se encontró que los cambios escalonados en la corriente medida para ambos casos, son evidencia de una producción de  $O_2$  desde la membrana estudiada, lo que demuestra que la catalasa está presente en una forma activa y capaz de convertir  $H_2O_2$  en  $O_2$ . Particularmente, en el caso (a) la piel

de cerdo completa (membrana que contiene epidermis completa y parte de la dermis), después del establecimiento de una línea base estable, hacia el minuto 20 se incluyó la primera adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lo que resultó en un cambio del flujo de la corriente de aproximadamente 8,5 nA y hacia el minuto 30 se incluyó una segunda adición de la misma cantidad de sustrato que resultó en un cambio alrededor de 6,5 nA. Teniendo en cuenta que esta corriente medida corresponde a la concentración de  $\text{O}_2$  que llega al detector del electrodo, generada por la conversión enzimática, se podría decir que esa concentración de  $\text{O}_2$  es proporcional a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos resultados confirman que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  penetra la membrana de la piel donde la catalasa presente se encuentra activa y hace la depuración correspondiente, convirtiéndolo al  $\text{O}_2$  que es detectado en el electrodo; este resultado es complementado con el hecho de que la adición de  $\text{NaN}_3$  hacia el minuto 40, genera una caída en el flujo de corriente alcanzado, regresando a la línea base inicial registrada, esto se traduce en una disminución de la concentración de  $\text{O}_2$ , debido a la pérdida de actividad de la catalasa.

En el caso (b) el estrato córneo, se evidencia la actividad enzimática como respuesta a la adición del sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aunque en menor proporción, pues tras cada adición se generó un cambio en la corriente medida de alrededor de 1nA y que corresponde a la concentración de  $\text{O}_2$  generado enzimáticamente, y del mismo modo que en la piel completa, luego de la adición de  $\text{NaN}_3$ , se presentó la caída en la concentración de  $\text{O}_2$  registrada por el retorno del flujo de la corriente a la línea base. Como es evidente, la respuesta de la catalasa en el estrato córneo es mucho más rápida que en la piel completa así como la proporción de su respuesta es mucho menor comparativamente. Una de las razones por lo que la respuesta es más rápida es que el camino que recorre el  $\text{O}_2$  es mucho menor al difundir desde la solución hasta el electrodo que lo detecta, pues el grosor de ésta capa es de aproximadamente 10-30  $\mu\text{m}$  mientras que las membranas de piel completa contaban con un grosor de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ ; además, calculando el coeficiente de difusión, se comprobó que en el caso del estrato córneo éste resulta ser al menos 2 órdenes de magnitud mayor que para la piel completa.

Adicionalmente, es importante considerar la mayor afinidad del  $\text{O}_2$  por el agua que se encuentra en las estructuras de la piel completa, siendo menor en el estrato córneo, lo que puede influir en la tardanza del transporte de las moléculas de  $\text{O}_2$  cuando requiere atravesar la piel completa. Sin embargo, es posible que durante el proceso de separación del estrato córneo del resto de la piel se hayan generado defectos de barrera de tipo

macroscópico, que podrían facilitar la penetración del  $H_2O_2$  para su conversión y la posterior difusión del  $O_2$  hacia el electrodo. En síntesis, haber encontrado actividad enzimática de catalasa en esta capa de la piel de cerdo *ex vivo* es un interesante resultado para esta investigación, primero porque puede ser asociado con el mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo que genera la radiación UVB y que a causa de dicha actividad, no había sido posible evidenciar ningún efecto sobre las características eléctricas. Por el contrario, a partir de este resultado, debe ser considerada la actividad antioxidante de la catalasa para desarrollar la metodología de evaluación de las propiedades eléctricas. Y segundo, el hecho de que el estrato córneo de la piel de cerdo refleje actividad enzimática de la catalasa al igual que como ha sido reportado para el estrato córneo en humanos (Hellemans et al., 2003), demuestra una vez más su idoneidad como modelo alternativo.

### **2.3.2 Desarrollo de la metodología basada en estrés oxidativo como alternativa para encontrar una respuesta eléctrica.**

De acuerdo con los resultados de la sección anterior (2.3.1), haber encontrado actividad enzimática de la catalasa en las muestras de piel de cerdo *ex vivo* y siendo ésta una enzima representativa y mayoritaria del sistema antioxidante de la piel, se planteó la hipótesis de que la catalasa activa estaba ejerciendo una protección al tejido frente a la radiación UVB y que por tal razón, bajo las condiciones de exposición establecidas, no se podía detectar ningún cambio a nivel eléctrico en las muestras irradiadas respecto a su condición previa a la exposición. Bajo este planteamiento, se decidió impedir dicha protección y direccionar la investigación hacia el estudio del efecto combinado de la radiación UVB y el estrés oxidativo inducido, sobre las propiedades eléctricas de la piel. Para ello, se planteó generar un ambiente hostil en la piel que simulara además de sobreexposición a la radiación, otras condiciones asociadas al efecto de la misma, como lo es el estrés oxidativo a partir de un desequilibrio en el sistema de defensa antioxidante. Por un lado, mediante la adición de  $H_2O_2$  a la solución de trabajo, buscando aumentar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el sistema; para ello se evaluaron diferentes concentraciones del agente oxidante. Por otro lado, mediante la adición de  $NaN_3$  en la misma solución, buscando la inhibición de la catalasa, para evitar que se depurara el  $H_2O_2$  adicionado y otras ROS

producidas por la exposición a la radiación UVB. Estos dos efectos simultáneos nos permitirían inducir un estrés oxidativo en las muestras, alterando directamente su homeostasis y sus posibilidades de defensa frente a la radiación. A estas condiciones planteadas las llamaremos de aquí en adelante “condiciones de estrés inducido”.

De acuerdo con lo anterior, las combinaciones de estrés inducido estudiadas se resumen en la tabla 2-1 y la respuesta al efecto generado sobre las características eléctricas fue evaluada mediante EIS sobre el cambio en  $R_{mem}$ , que se obtenía directamente de la parte real de la impedancia registrada. En todos los casos la solución de PBS (solución base de trabajo) fue incluida tanto en el compartimento donador como en el receptor de la celda de Franz y en ella se incluían los agentes a evaluar previamente disueltos.

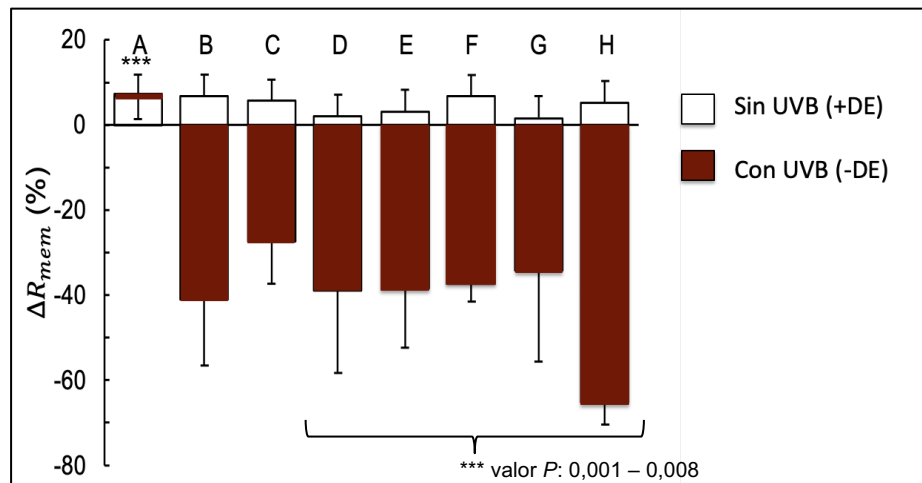
**Tabla 2-1:** Combinaciones experimentales evaluadas para determinar las condiciones de estrés oxidativo más viables en el estudio.

Condición	NaN3 10,0 mM	H2O2 (x) mM
A	No	No
B	Si	No
C	No	1,0 mM
D	Si	0,5 mM
E	Si	1,0 mM
F	Si	5,0 mM
G	Si	50,0 mM
H	Si	980,0 mM

Cada una de las condiciones experimentales mencionadas, fueron evaluadas por triplicado, todas con un tiempo de estabilización en el sistema de 3 horas sin exposición a la radiación y posteriormente todas bajo la misma dosis de exposición a la radiación UVB; la respuesta fue monitoreada cada hora, hasta 5 horas que equivale a una dosis de radiación de  $180 J/cm^2$ . A continuación, la figura 2-8, resume este desarrollo metodológico sobre las condiciones propuestas para la evaluación del efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel.



**Figura 2-8:** Evaluación del efecto de la radiación UVB bajo condiciones de estrés inducido sobre la resistencia de la membrana de piel.



Los datos corresponden al valor promedio de  $n=3$  y las barras de error muestran la desviación estándar (DE).

Vale la pena señalar que en la figura 2-8 se presentan valores positivos y negativos en el eje de las ordenadas lo cual corresponde a los cambios en la variable respuesta  $R_{mem}$ ; al inicio del experimento y sin exposición a la radiación (3 horas) se encontró un ligero aumento de la resistencia en todas las muestras y por esta razón, tales resultados presentan valores positivos dentro del cambio evaluado ( $\Delta R_{mem}$ ). Por otro lado, con la exposición a la radiación UVB, en todos los casos se presentó una pérdida de los valores de  $R_{mem}$  respecto al valor inicial y por esta razón el porcentaje de cambio se representa con valores negativos.

Teniendo esto en consideración, es posible establecer como resultado general que en ningún caso hay pérdida de los valores de  $R_{mem}$  mientras no haya exposición a la radiación UVB, esta importante observación demuestra que ni  $\text{NaN}_3$  ni  $\text{H}_2\text{O}_2$  influyen en el cambio de  $R_{mem}$  por sí solos bajo las condiciones experimentales actuales pues en todos los casos, los resultados de las muestras sin irradiación UVB, son similares en comparación con la solución de PBS pura (valores de  $P > 0,05$  entre grupos en todos los casos). De hecho notamos que, durante esa primera etapa del experimento, la membrana de piel tiene ligeros aumentos de la resistencia que asociamos a procesos de hidratación e hinchamiento de los corneocitos hasta alcanzar un estado estable donde también la variable  $R_{mem}$  se estabiliza, en nuestro sistema esto ocurrió dentro de las 3 horas iniciales.

Para el caso de las condiciones fijadas en la evaluación, los experimentos A, B y C corresponden a controles separados de cada uno de los componentes a incluir en el sistema con el fin de evaluar el efecto que producen sobre las propiedades eléctricas con y sin exposición a la radiación. Así entonces, el experimento A solo incluye solución de PBS es decir, no se incluyó ningún agente inductor de estrés oxidativo y como se observa, después del ligero incremento de  $\Delta R_{\text{mem}}$  durante las primeras 3 horas de estabilización y la posterior exposición a la dosis mencionada de radiación UVB (5 horas), no hubo ninguna respuesta en la variable estudiada, pues se encontró que los valores de  $R_{\text{mem}}$  tras la exposición a la radiación se mantuvieron constantes y además no son diferentes estadísticamente de los encontrados cuando no había exposición (valor  $P > 0,05$ ) a pesar de la alta dosis de radiación utilizada ( $180 \text{ J/cm}^2$ ). Este resultado confirma lo encontrado inicialmente respecto a que no es posible observar cambios sobre la impedancia de las muestras de piel sin alterar la homeóstasis en su sistema antioxidante. Para el experimento B, se incluyó en la solución de PBS el inhibidor de la enzima catalasa  $\text{NaN}_3$  a la misma concentración utilizada en los ensayos de amperometría, es decir  $10,0 \text{ mM}$  y como se había planteado, el sólo hecho de inhibir la catalasa ya evitaba la protección al estrés oxidativo generado por la radiación y por tanto, fue posible encontrar cambios en la variable respuesta representado por una pérdida de  $R_{\text{mem}}$  alrededor del 40% con la dosis de radiación aplicada. Para el caso del experimento C, se incluyó en la solución de PBS el agente oxidante generador de radicales libres y sustrato de la catalasa, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , también a una de las concentraciones usadas en el ensayo de amperometría  $1,0 \text{ mM}$ . Al igual que en el caso del experimento B, el resultado fue una significativa disminución de  $R_{\text{mem}}$  después de la exposición a la radiación UVB comparado con el experimento A. Esto comprobaba que el sólo hecho de aumentar la cantidad de radicales libres alteraba la homeóstasis y por lo tanto el mecanismo de defensa natural se hace menos eficiente, permitiendo detectar cambios a nivel eléctrico en el modelo estudiado.

En vista de estos nuevos hallazgos, la siguiente hipótesis planteada fue, manteniendo las condiciones de radiación y la catalasa inhibida con la adición de  $\text{NaN}_3$ , evaluar si a diferentes concentraciones del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se alcanzaba una respuesta proporcional sobre la variable respuesta  $R_{\text{mem}}$  es decir si al aumentar la concentración, se alcanzaba mayor pérdida de los valores registrados en dicha variable. Para ello se utilizaron concentraciones entre  $0,5$  y  $50,0 \text{ mM}$  que corresponden a los experimentos D-G. Como resultado, no hubo una respuesta proporcional al aumento, de hecho no hay diferencias significativas entre

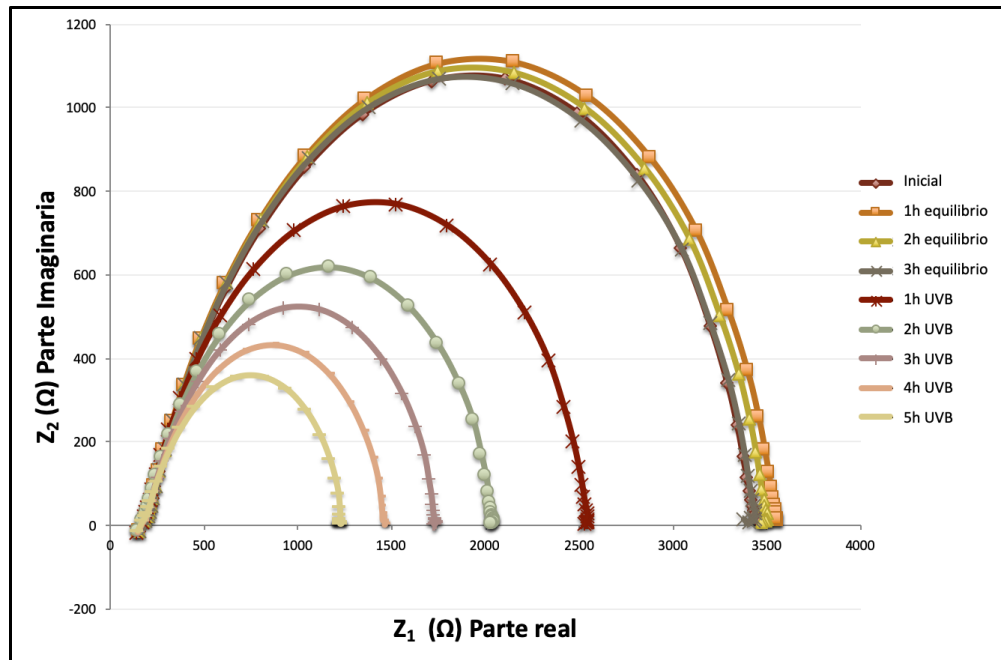
estas condiciones, por lo que se infiere que los cambios sobre la variable  $R_{\text{mem}}$  no dependen de la cantidad de ROS presentes en el sistema y que solo basta con generar un desequilibrio en el sistema antioxidante para desencadenar la respuesta eléctrica. Con el ánimo de complementar esta parte se decidió evaluar una última combinación, esta vez con la concentración más alta del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se podía obtener desde el frasco original del reactivo y que en el sistema corresponde a  $980,0 \text{ mM}$ ; en este caso, ocurrió la disminución más drástica de la variable  $R_{\text{mem}}$  alcanzando hasta un 65% de cambio (experimento H). Sin embargo, esto quizás no sea sorprendente teniendo en cuenta que para esa alta concentración de un agente oxidante como  $\text{H}_2\text{O}_2$  existe la posibilidad de tener capacidad corrosiva causando daño directo sobre las estructuras del tejido como se reporta en la ficha de seguridad del producto, lo que provoca directamente una pérdida de sus propiedades de barrera, es decir ya no habría oposición al flujo de electrones.

En resumen, es evidente que hay un efecto significativo de la combinación entre radiación UVB y condiciones de estrés inducido sobre la variable respuesta  $R_{\text{mem}}$ , basados en la evaluación estadística se encontraron valores  $P$  que varían entre 0,001 y 0,008 respecto al grupo A, que no presentaba condiciones de estrés inducido. Por lo tanto, es posible afirmar que usando cualquiera de las condiciones de estrés oxidativo evaluadas, junto con la dosis aguda de radiación UVB, se detecta una respuesta significativa sobre la variable  $R_{\text{mem}}$  que en todos los casos corresponde a una disminución respecto al valor inicial en el estado estable (3 horas en celda de Franz sin exposición). Con base en lo anterior, se decidió utilizar la concentración conocida de  $\text{NaN}_3$  ( $10,0 \text{ mM}$ ) y dentro de las concentraciones evaluadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se escogió como concentración razonable la de  $1,0 \text{ mM}$ , la misma utilizada en la evaluación de la actividad enzimática, como protocolo de tratamiento para los demás experimentos de aquí en adelante, es decir el experimento E. Así, se garantizan unas condiciones adecuadas de estrés oxidativo inducido pues simultáneo a la inhibición de la catalasa (es decir, con la adición de  $\text{NaN}_3$ ), se aumentó la cantidad de ROS desde una fuente conocida (es decir, de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) de manera suficiente. Otra de las razones que se consideró fue que a concentraciones más altas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se generaba mayor cantidad de burbujas, que podrían resultar en un desafío a la hora de realizar las mediciones de impedancia pues dicho gas podría afectar los valores de resistencia de la membrana al quedar atrapado justo debajo de esta.

### **2.3.3 Efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel *ex vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo**

Con la metodología desarrollada en el apartado anterior, fue posible estudiar el efecto de la radiación UVB sobre las características eléctricas de la piel mediante EIS. Bajo esta técnica, se estudiaron los componentes del circuito que se han descrito para la piel, por un lado la resistencia del tejido que corresponde a la resistencia al transporte de iones que circulan a través del sistema una vez se ha inducido un potencial conocido; esta variable se ve reflejada en las frecuencias cercanas a cero en la parte real de la impedancia. Por otro lado, se estudió la capacitancia efectiva que corresponde a los dominios lipídicos que se asemejan a un dieléctrico y que es obtenida tras un análisis matemático de los valores de impedancia de la parte imaginaria mediante los elementos de fase constante. Un ejemplo de esta evaluación se muestra en la figura 2-9, que corresponde a una representación típica de la medición de impedancia mediante la gráfica de Nyquist o de semicírculos y que representa el patrón característico para un circuito en paralelo de resistencia y capacitancia; en este tipo de gráficos se representa la parte imaginaria en el eje de las ordenadas y la parte real en el eje de las abscisas. Como se ha mencionado, de la parte real se puede obtener directamente el valor de  $R_{mem}$  como variable respuesta para observar el efecto.

**Figura 2-9:** Representación de Nyquist en la evaluación de la impedancia de las muestras de piel de cerdo *ex vivo* sometidas a condiciones de estrés oxidativo y radiación UVB.

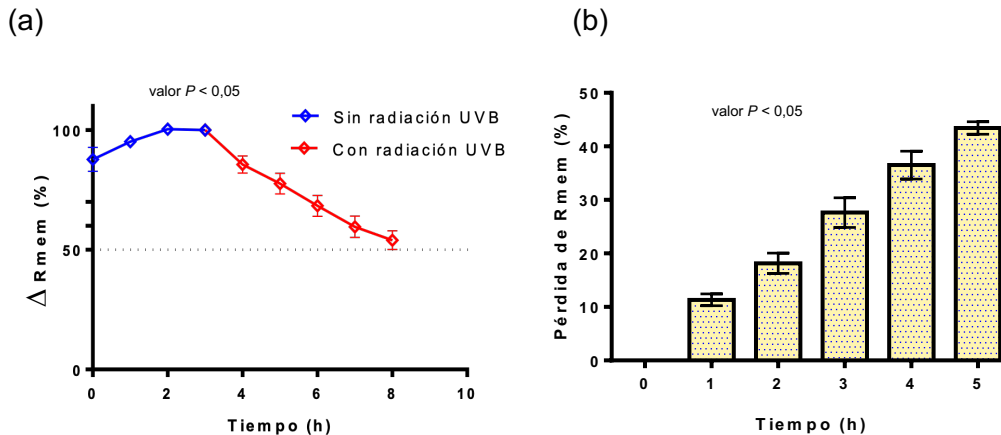


Al analizar una gráfica de Nyquist, es importante recordar que ésta representa valores de resistencia en función de la frecuencia y que el semicírculo incluye todo el rango de frecuencias utilizado; la parte izquierda del semicírculo corresponde a frecuencias altas y la derecha a las bajas frecuencias. De acuerdo con esa distribución, la impedancia de la parte izquierda del semicírculo refleja la resistencia de la solución y en la parte derecha la respuesta corresponde a la resistencia de la membrana sumada a la de la solución ( $R_{mem} + R_{sol}$ ). Como se observa, la resistencia de la solución se mantuvo constante alrededor de 200  $\Omega$ , es decir que la radiación UVB no afectó dicho componente. Por el contrario, es evidente el cambio en la parte derecha del semicírculo, iniciando en un valor alto de  $Z_1$  (en unidades de resistencia) y disminuyendo a medida que aumentaba el tiempo de exposición; esto significa que la resistencia afectada corresponde a la de la membrana de piel. En este resultado particular se observa que inicialmente, la muestra de piel utilizada presentó valores alrededor de 3500  $\Omega$  durante el tiempo establecido para alcanzar el estado estable (3 horas iniciales), tras 1 hora de exposición a la radiación UVB se presenta una caída de la resistencia al rededor de 2500  $\Omega$  y progresivamente va disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de exposición llegando a alrededor de 1200  $\Omega$  luego de 5

horas de exposición lo cual significa una pérdida de la  $R_{mem}$  aproximada del 43% en este caso.

Todas las muestras de piel fueron evaluadas de la misma manera y una vez obtenidos los resultados para la variable  $R_{mem}$  en unidades de ohmios ( $\Omega$ ), se calculó la resistencia por unidad de área en las muestras ( $\Omega \cdot cm^2$ ) y se determinó el porcentaje de cambio respecto al estado basal (sin irradiación UVB),  $\Delta R_{mem}$  en todos los casos. Como se muestra en la figura 2-10(a), la disminución de  $R_{mem}$  (línea roja) en función del tiempo de exposición a la radiación UVB es proporcional y estadísticamente significativa (valor  $P < 0,05$ ) respecto al tiempo de evaluación donde no hubo exposición (línea azul). Así mismo, el porcentaje de pérdida de la resistencia es reproducible y muestra diferencias significativas en cada hora evaluada durante la exposición a la radiación como se observa en la figura 2-10(b).

**Figura 2-10:** Efecto de la radiación UVB sobre la variable  $R_{mem}$  de las muestras de piel *ex vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo inducido en función del tiempo. (a) porcentaje de cambio de  $\Delta R_{mem}$ ; (b) porcentaje de pérdida de  $R_{mem}$  durante el tiempo de exposición evaluado.



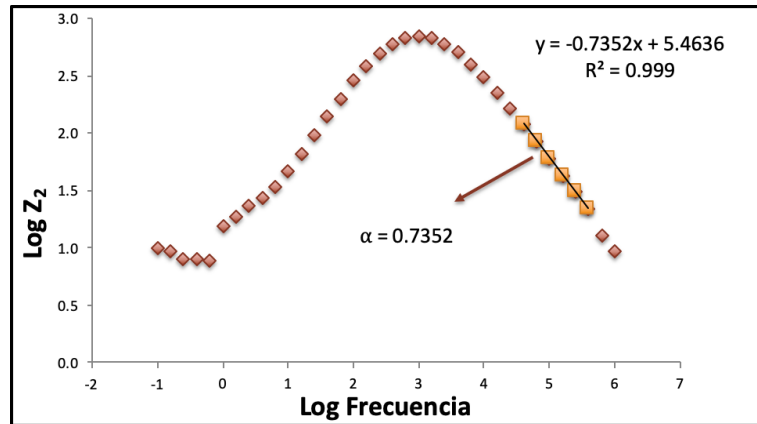
La gráficas corresponden al valor promedio de  $n=3$  y las barras de error muestran la desviación estándar ( $\pm DE$ ).

Como se observa en la gráfica (a) sobre el porcentaje de cambio de la variable durante el experimento con y sin radiación UVB, es evidente que solo bajo condiciones de estrés oxidativo inducido (línea azul) no se presentan cambios significativos en los valores de la variable estudiada  $R_{mem}$ . Por el contrario, cuando se incluye la radiación UVB (línea roja) es el momento en el que empiezan a ocurrir cambios decrecientes y progresivos en esta

característica eléctrica, hasta el tiempo fijado como final que correspondió a 5 horas de exposición y una dosis de  $180 \text{ J/cm}^2$ , que como se discutió previamente representa una cantidad de radiación muy alta respecto a las condiciones de exposición real de los seres humanos. En ese momento el efecto de la radiación representó un porcentaje de cambio de  $48 \pm 9\%$  y de acuerdo con el comportamiento presentado durante esas 5 horas de monitoreo, se esperaba que al aumentar el tiempo de exposición, continúe aumentando el cambio presentado, es decir la disminución de los valores de  $R_{\text{mem}}$ . Ya demostrado que el efecto sobre la variable respuesta ocurre únicamente por causa de la radiación UVB, la gráfica (b) representa el porcentaje de pérdida de la variable  $R_{\text{mem}}$  en función del tiempo de exposición y consecuentemente evidencia el porcentaje máximo de pérdida alcanzado cercano al 50% mostrando que, las mediciones de EIS fueron lo suficientemente sensibles para detectar cambios en esta característica eléctrica de la piel debido a la dosis de radiación UVB suministrada y bajo las condiciones establecidas.

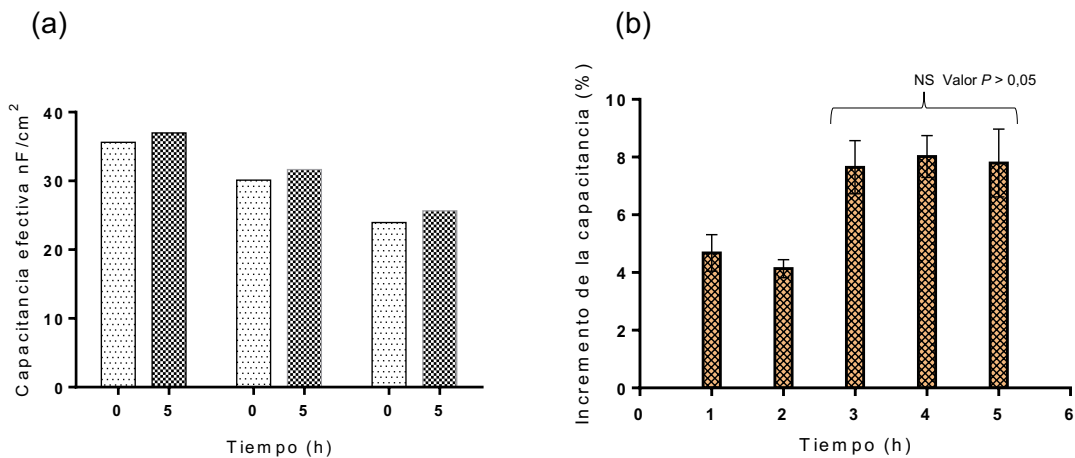
Para el análisis de la capacitancia efectiva, como fue mencionado previamente, se partió de los resultados de la parte imaginaria de la impedancia y se utilizó el **método gráfico** para la determinación de los elementos de fase constante. Como se muestra en la figura 2-11, el procedimiento consistió en graficar en función logarítmica la parte imaginaria ( $Z_2$ ) de la impedancia medida y su correspondiente frecuencia aplicada; de esta manera se obtiene una función similar a una campana gaussiana, pero de la cual solo se toman alrededor de 6 datos en la porción donde la frecuencia es más alta y que particularmente presenta un comportamiento lineal. A partir de estos datos se obtiene la ecuación de la recta y la pendiente corresponde al parámetro  $\alpha$  que nos permite calcular  $C_{\text{eff}}$  posteriormente.

**Figura 2-11:** Demostración del método gráfico para determinar los parámetros de fase constante a partir de EIS.



Los resultados para esta variable mostraron que bajo las condiciones de estudio no fue posible establecer un comportamiento definido en función del tiempo de exposición a la radiación UVB pues como se muestra en la figura 2-12, la capacitancia incrementó ligeramente durante las primeras 2 horas de exposición cerca del 5% respecto al valor obtenido para la muestra en el estado estable sin diferencias significativas entre estas, posteriormente alcanza un incremento cercano al 9% que se mantiene hasta el tiempo máximo de exposición sin encontrar diferencias significativas entre estas últimas 3 horas de radiación con un valor  $P > 0,05$ .

**Figura 2-12:** Efecto de la radiación UVB sobre la variable  $C_{\text{eff}}$  de las muestras de piel *ex vivo* (a) Comparación de la  $C_{\text{eff}}$  de tres muestras distintas en su estado inicial y luego de 5 horas de exposición. (b) Aumento de la capacitancia durante el tiempo de exposición evaluado.



Las gráficas corresponden al valor promedio de  $n=3$  y las barras de error muestran la desviación estándar ( $\pm \text{DE}$ ).

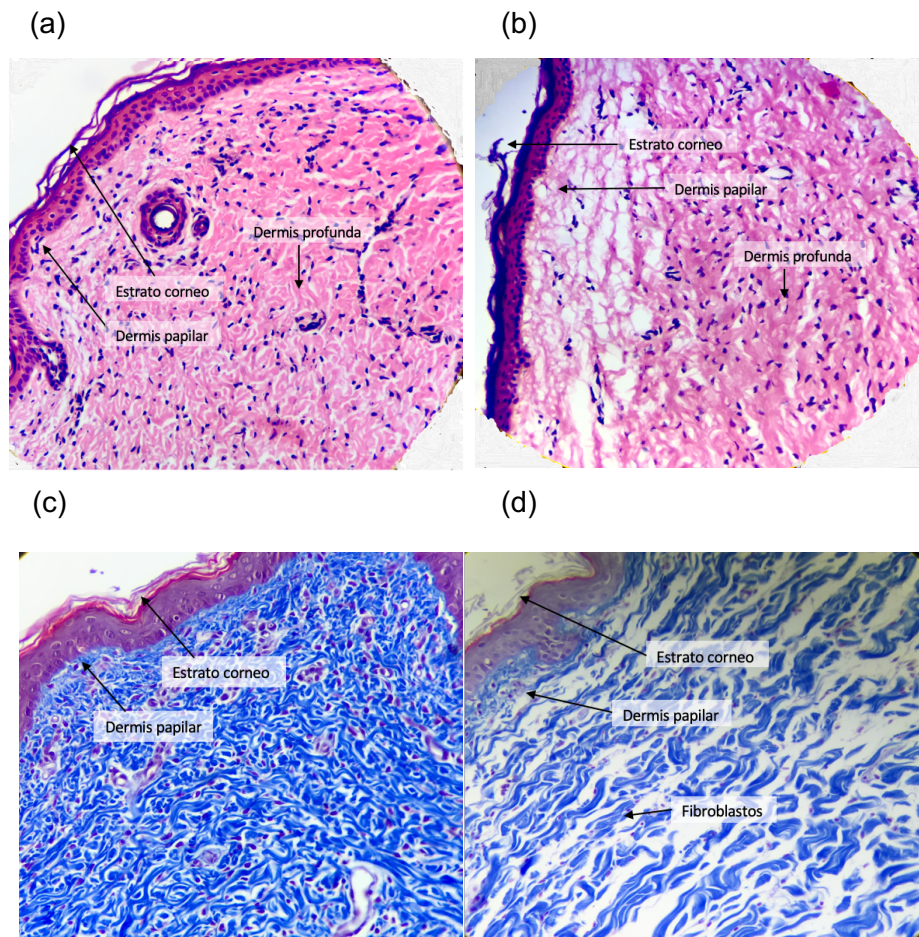


De acuerdo con lo anterior, es posible inferir que la capacitancia efectiva no es una variable adecuada para estudiar el efecto de la radiación UVB sobre muestras de piel de cerdo *ex vivo*, pues no responde al estímulo dado en función del tiempo. Una razón podría ser que, debido al elemento del circuito que representa es decir un capacitor, su comportamiento es el de almacenar energía dependiendo de la capacidad que tenga para hacerlo, en este caso luego de 3 horas de radiación,  $C_{eff}$  aumentó ligeramente y posteriormente se mantiene constante, indicando que la radiación UVB no ejerce ningún efecto sobre dicho almacenamiento. Cabe recordar que este elemento del circuito descrito para la piel representa los dominios lipídicos que la conforman y como se ha reportado, corresponde principal y mayoritariamente al aporte del estrato córneo de estas características, para el cual se ha demostrado que dicha capacidad dieléctrica se asocia únicamente al contenido de agua (Björklund et al., 2016; Darlenski et al., 2009; Hamed et al., 2012). En ese sentido, el hecho de que el experimento se realizara siempre en completa hidratación, es decir que las condiciones de humedad eran del 100% durante la exposición a la radiación UVB, puede explicar por qué dicha capacidad no se altera realmente, ya que no hay variaciones en el contenido de agua de estos dominios luego de alcanzar el estado estable (sin radiación).

Respecto al parámetro  $\alpha$  que determinamos en el análisis de los elementos de fase constante, es un número adimensional que varía entre 0 y 1 y para el cual aún no hay acuerdos sobre su interpretación en cuanto al significado biológico; algunos autores han sugerido que está estrechamente relacionado con la morfología de los espacios extracelulares en la interfase membrana – electrolito donde por un lado las cargas se acumulan y por el otro se da la conducción iónica a través de la membrana (Clemente et al., 2013; Ivorra et al., 2005; Ivorra and Rubinsky, 2007; Rigaud et al., 1996). En este trabajo, asociado al aumento de los espacios extracelulares, el parámetro  $\alpha$  presentó valores iniciales, es decir, sin exposición a la radiación de  $0,7422 \pm 0,0192$  y posterior a 5 horas de exposición su valor promedio fue  $0,6921 \pm 0,0469$  lo que indica que ocurrió una disminución después de la exposición a la radiación UVB, que puede estar relacionado con el deterioro del tejido. Esto en concordancia con lo encontrado por otros autores que estudiaron las características eléctricas de la piel humana y establecieron que parámetros como el mencionado, puede ser un biomarcador de envejecimiento tras la evidencia de que en la piel, el valor del parámetro  $\alpha$  disminuye con la edad (Simić-Krstić et al., 2014).

Como complemento al estudio eléctrico se llevó a cabo la evaluación histológica de las muestras de piel de cerdo expuestas a las condiciones de estrés oxidativo inducido ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM y  $\text{NaN}_3$  10 mM) y con exposición a la radiación UVB, con el fin de observar el efecto físico sobre las estructuras que se consideraba estaban asociadas con la pérdida de  $R_{\text{mem}}$  evaluada mediante EIS. Para esto, se mantuvieron los tiempos del experimento: 3 horas en proceso de estabilización e hidratación completa de la muestra, seguido de 5 horas de exposición a la radiación UVB momento en el que se realizó la fijación del tejido para el estudio histológico. La muestra blanco o de referencia permaneció en las mismas condiciones ambientales controladas y por el mismo tiempo, excepto porque no fue sometida a la radiación. Estos resultados se observan en la figura 2-13.

**Figura 2-13:** Microfotografía de piel de cerdo *ex vivo* en condiciones de estrés oxidativo inducido (a) y (c) sin exposición a la radiación UVB (b) y (d) con exposición a radiación UVB.



Corte trasversal de las muestras bajo el aumento de 40X. las muestras a y b con tinción hematoxilina / eosina y las muestras c y d con tinción tricrómica de Masson.

Al comparar las imágenes histológicas de la figura 2-13, queda claro que la combinación de la radiación UVB y el estrés oxidativo propiciado con  $\text{NaN}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , da como resultado un daño significativo en los tejidos y la pérdida de la integridad de la membrana de la piel (b) y (d). En particular, la piel de cerdo en condiciones iniciales (a) refleja una buena apariencia de estructura, una capa córnea delgada y en proceso de maduración; la dermis papilar se encuentra claramente definida y en la dermis profunda todas las fibras se ven organizadas horizontalmente y de apariencia laxa, lo que se corroboró con la tinción de Masson especial para colágeno (c), que evidencia las fibras de colágeno bien definidas, alargadas y continuas. Después de la exposición a la radiación UVB, las estructuras se ven afectadas en su organización y definición, la dermis papilar desaparece completamente, lo que nos lleva a pensar que es una estructura especialmente sensible al efecto de la radiación. Aparecen espacios muy pronunciados en el tejido conjuntivo y pérdida de la continuidad de las fibras de colágeno y elásticas que además se ven menos coloreadas en (b) que para la muestra (a) a pesar de haber sido procesadas al mismo tiempo, lo que sugiere una pérdida de citoplasma en los fibroblastos y que se confirmó en la imagen (d) donde se observa fragmentación en las fibras de colágeno, pérdida del patrón de continuidad observado en las muestras sin irradiación y mayores espacios intercelulares como se observa también en (b). Cabe resaltar que estos mismos efectos de la radiación UVB sobre las fibras de colágeno han sido reportados previamente en un estudio *in vivo* con ratones que fueron expuestos a una dosis mucho más baja que la utilizada en este estudio, correspondiente a  $4,14 \text{ J/cm}^2$  (Cezar et al., 2019), lo cual valida y respalda nuestro hallazgo.

Asociando estos resultados con lo encontrado eléctricamente, es posible afirmar que la muestra expuesta a la radiación bajo las condiciones fijadas, sufre un deterioro significativo respecto al transporte molecular (en este caso de electrones) es decir a su función barrera, traducido en una pérdida significativa de la  $R_{\text{mem}}$ . Por otro lado, los componentes de estrés oxidativo no generan ningún cambio sobre las propiedades estructurales de la piel de acuerdo con la figura 2-13(a) es decir, mantienen una piel estructuralmente intacta con una función de barrera adecuada hacia el transporte molecular.

Para empezar a entender los fenómenos encontrados, hay que establecer el origen de las propiedades eléctricas de la piel, principalmente de la resistencia. Varios estudios han propuesto que los iones, que representan los portadores de carga de una corriente eléctrica, son principalmente transportados y por tanto, distribuidos en los dominios

lipídicos extracelulares del estrato córneo a través de defectos interfaciales presentes en los sitios de separación de fase lipídica (Boddé et al., 1991; Potts et al., 1992). Esta matriz extracelular consiste principalmente en estructuras lamelares lipídicas apiladas y representa el único elemento continuo a través de la membrana de la piel y por lo tanto, tiene que ser permeada por los iones para favorecer el flujo de la corriente eléctrica (Madison, 2003). Además de las estructuras lamelares, se encuentran las uniones estrechas que son estructuras multiproteicas que sellan las intersecciones de los queratinocitos adyacentes en el estrato granuloso que recordando, se encuentra justo debajo del estrato córneo y existe evidencia de que estas uniones del tejido representan una barrera significativa hacia la difusión de iones y moléculas de bajo peso molecular (Brandner et al., 2015). Estas características se convierten en una razón considerable para que la resistencia de un tejido no sea fácilmente alterada, como ocurrió en el presente caso, en el que a pesar de una alta dosis de radiación UVB de  $180 \text{ J/cm}^2$ , sin condiciones adicionales, la  $R_{\text{mem}}$  se mantuvo inalterada. De hecho, esta dosis es aproximadamente 100–1000 veces mayor que los valores típicos de dosis eritemal mínima (MED) utilizada en seres humanos para distintos tratamientos como psoriasis o vitiligo en dosis que varían entre  $0,4\text{--}1,2 \text{ J/cm}^2$  (Jeon et al., 2014) o para tratamiento de dermatitis atópica en niños con dosis entre  $0,1\text{--}0,8 \text{ J/cm}^2$  (Clayton et al., 2006).

Del mismo modo, un estudio anterior mostró que la rigidez del estrato córneo que está controlada principalmente por los filamentos de queratina de los corneocitos, permaneció prácticamente constante después de la exposición a una dosis extrema de UVB de  $800 \text{ J/cm}^2$ , aunque otros daños más profundos fueron hallados como la resistencia intercelular, la tensión y la cohesión que disminuyeron notablemente (Biniek et al., 2012). Adicionalmente, es importante tener en cuenta que existe un espacio de tiempo entre la exposición a una dosis aguda de radiación UVB y la respuesta biológica que conduce a la inflamación y al daño sobre la integridad de la piel, lo cual ha sido reportado en los estudios anteriormente mencionados. En estudios con animales se ha demostrado también que el estrato córneo pierde sus características de barrera tres días después de una dosis aguda de radiación UVB ( $0,15 \text{ J/cm}^2$ ), evaluado mediante la técnica de pérdida de agua transepidermal (TEWL) pero que en mediciones previas el día 1 y 2, los valores de TEWL no fueron estadísticamente diferentes después de la dosis UVB, en comparación con el control no tratado (Jiang et al., 2006). Por lo tanto, es de esperarse que la respuesta de la  $R_{\text{mem}}$  no sea apreciable inmediatamente y es razonable sugerir que una dosis aguda y

extrema de radiación UVB no presente como resultado un deterioro inmediato de la integridad de la membrana de piel, lo que explica por qué no se observó una reducción significativa de  $R_{mem}$  después de la radiación UVB en condiciones normales de exposición es decir sin inducir condiciones de estrés oxidativo.

Ahora bien, cuando introducimos los componentes de estrés oxidativo en el sistema, encontramos que  $R_{mem}$  se reduce significativamente después de la exposición a la radiación UVB, lo que implica que la integridad de la barrera cutánea se ve comprometida. En particular, la inclusión de  $H_2O_2$  genera radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Bickers and Athar, 2006) y como hemos revisado, estos radicales causan daño oxidativo de las proteínas y lípidos que comprenden la piel (Briganti and Picardo, 2003). En otras palabras, es probable que  $R_{mem}$  se reduzca debido a alteraciones de los lípidos de la matriz lamelar del estrato córneo y las proteínas de las uniones estrechas con el estrato granuloso, que efectivamente pueden introducir regiones defectuosas donde los iones pueden ser transportados con baja resistencia a través de la barrera cutánea. Esto es congruente con los signos de daño en el tejido observados microscópicamente después de la exposición a la radiación UVB en condiciones de estrés oxidativo (Figura 2-13).

Sin embargo, al encontrar que no hay una respuesta dependiente de la concentración creciente de  $H_2O_2$ , no es posible atribuir los defectos cutáneos generados proporcionalmente en función de dicha concentración de  $H_2O_2$ . Especulativamente, se podría inferir que el daño puede recaer sobre un elemento estructural de la barrera cutánea, que es finito y, por lo tanto, solo conduce a una disminución finita de  $R_{mem}$ , independientemente de la concentración de  $H_2O_2$  (0,5 y 50,0 mM).

Otros estudios han demostrado que en ratones, la radiación UVB por si sola induce estrés oxidativo, sustentado en una inhibición significativa de la actividad de catalasa con dosis de radiación UVB de  $4,14 J/cm^2$ , en comparación con el control no irradiado y que además, favorece la producción de ROS como el  $H_2O_2$  que alteran la homeóstasis y desencadenan la respuesta inflamatoria así como otros daños a largo plazo que se convierten en irreversibles (Cezar et al., 2019). Por lo tanto, se encontró acertado el hecho de haber planteado la hipótesis de que al inducir estas condiciones de estrés oxidativo y utilizar una dosis aguda de radiación UVB, se podría obtener una respuesta significativa del efecto de la radiación que reflejara lo que podría ser producto de años de exposición de forma

progresiva y acumulativa. Es por esta razón que, con el simple hecho de inhibir la catalasa mediante  $\text{NaN}_3$  fue posible observar una disminución en la variable  $R_{\text{mem}}$ , pues inmediatamente se generó un desbalance entre las ROS producidas por la radiación y la capacidad antioxidante de la piel mediante su sistema de defensa.

El mismo razonamiento conduce a entender lo que ocurrió con el cambio de  $R_{\text{mem}}$  por la presencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sin incluir el agente inhibidor de la catalasa, debido a que el desbalance ahora, era provocado por el exceso de ROS que no podían ser depuradas eficientemente pues la actividad de la enzima ya se veía comprometida por la radiación UVB como lo reportó recientemente Cezar y colaboradores (Cezar et al., 2019). Sin embargo, se encontró que la reducción de  $R_{\text{mem}}$  es significativamente mayor con la inhibición de la enzima a través de  $\text{NaN}_3$  (sólo) que con la inclusión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (sólo), (experimento B y C), lo que puede deberse a que la inhibición de la catalasa por  $\text{NaN}_3$  es mucho más drástica que la inhibición que es causada por la radiación UVB misma, en el tiempo de estudio y con la dosis utilizada. Incluso se podría pensar que la radiación UVB potencializa el daño sobre la barrera cutánea en presencia de  $\text{NaN}_3$ , mientras que ese efecto no se genera con la presencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En cualquier caso, el objetivo de inducir el estrés oxidativo tras la combinación de dos fuentes promotoras diferentes, fue alcanzado satisfactoriamente pues se logró ver el efecto sobre la variable  $R_{\text{mem}}$  en un tiempo relativamente corto (5 horas), simulando algunos efectos acumulativos de la radiación como niveles reducidos de los mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos naturales, reportados previamente (Rhie et al., 2001b).

De otra parte, el análisis estadístico mostró que durante el tiempo estudiado, el cambio detectado en la variable respuesta  $R_{\text{mem}}$  se comportó como una función exponencial con mejor correlación para la bondad de ajuste. La tabla 2-2 resume los resultados del test de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov, la corrección de Lilliefors, del test de autocorrelación de Durbin-Watson y del test Breusch-Pagan de homocedasticidad y se compara el contraste para una función lineal y una exponencial. En ella encontramos que se cumple con la normalidad de los residuos con valores  $P$  superiores a 0,05. El contraste de autocorrelación también se cumple, indicando que la variable dependiente si responde en función de la variable independiente (tiempo de exposición) en un 96 % y 97% respectivamente ( $r^2 = 0,96$  y  $r^2 = 0,97$ ); para el caso de la homocedasticidad, que indica que la varianza asociada al error del modelo es constante en todas las observaciones, se

acepta con valores de  $P > 0,05$ , y por tanto cumple para ambas funciones. En el caso de la función exponencial, la ecuación 2-6 describiría el fenómeno estudiado como:

**Ecuación 2-6:** Ecuación exponencial para el comportamiento de la variable respuesta en función del tiempo de exposición.

$$Y = 99,309 e^{-0,12096x}$$

Donde,

Y= porcentaje de cambio de la variable ( $\Delta R_{\text{mem}}$ )

X= tiempo de exposición a la radiación UVB

**Tabla 2-2:** Resumen de la evaluación estadística de regresión simple para los datos de  $\Delta R_{\text{mem}}$  en función del tiempo de exposición a la radiación UVB.

Función	Normalidad	Autocorrelación	Homocedasticidad
Lineal: $y = a + bx$	Valor $P = 0,2809$	Valor $P = 0,5134$	Valor $P = 0,3765$
Exponencial: $y = ae^{bx}$	Valor $P = 0,3468$	Valor $P = 0,9065$	Valor $P = 0,5204$

Como resultado de este análisis fue posible confirmar que la variable  $R_{\text{mem}}$  permitió estudiar el efecto de la radiación UVB en el modelo *ex vivo* de piel de cerdo, siendo su cambio un indicador de daño, similar a otros estudios donde esta variable ha sido escogida como criterio de integridad de muestras de piel *in vitro* de origen tanto humano como animal (ratas) (Fasano et al., 2002; Fasano and Hinderliter, 2004; White et al., 2011). También confirmamos que el efecto combinado entre la radiación UVB y el estrés oxidativo inducido, provoca daños estructurales sobre el tejido conjuntivo de manera progresiva e irreversible, fibras elásticas anormales distróficas y amorfas en la dermis y disminución considerable de distintos tipos de colágeno, lo que resulta en una pérdida de la capacidad de las propiedades biofísicas de la piel como se ha reportado previamente (Pillai et al., 2005).

## 2.4 Conclusiones

Basados en los resultados podemos concluir que:

La introducción de la evaluación amperométrica mediante electrodo de oxígeno con muestras *ex vivo* de piel de cerdo SCOE, nos permitió determinar la actividad enzimática de la catalasa tanto en piel completa (epidermis y dermis) como en estrato córneo donde no se había reportado su presencia, demostrando que hay una significativa actividad en ambos, incluso tiempo después de su almacenamiento, lo que nos permitió comprender fenómenos de defensa natural de la piel frente a la radiación en condiciones *in vitro*. Se corroboró que el modelo *ex vivo* de piel de cerdo representa un modelo válido y adecuado para simular fenómenos asociados a la piel humana.

Se determinó que la respuesta natural de la piel frente a agente agresores como la radiación UVB no permite evidenciar cambios inmediatos sobre las variables eléctricas estudiadas y por el contrario, se requieren elementos adicionales que favorezcan su efecto y permitan cuantificarlo.

En ese sentido, se desarrolló una metodología *in vitro* combinada para estudiar el efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel a través de Espectroscopía de Impedancia Eléctrica, que consistió en la inducción de estrés oxidativo mediante el incremento de especies reactivas de oxígeno en el sistema a través de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,0 mM) y la inhibición de la actividad antioxidante de catalasa con  $\text{NaN}_3$  (10,0 mM), al mismo tiempo que se producía la exposición a la radiación.

Se determinó que las condiciones de estrés oxidativo incluidas en el estudio no generan cambios en las variables eléctricas del modelo de piel de cerdo por si solas, lo que permitió estudiar el efecto de la radiación directamente sobre la piel encontrando una respuesta significativa en la variable  $R_{\text{mem}}$ .

Se estableció que la respuesta eléctrica de la piel en función del tiempo de exposición a la radiación UVB es significativa en términos de la resistencia de la membrana ( $R_{\text{mem}}$ ), alcanzando una reducción de hasta  $48 \pm 9\%$  y una correlación significativa con el tiempo de exposición (y por tanto la dosis de radiación), lo que permitió adoptarla como una variable respuesta adecuada y asociarla al daño observado histológicamente. Respecto a la capacitancia efectiva ( $C_{\text{eff}}$ ), no se demostró un efecto relevante de la radiación UVB sobre ella, es decir, no presentó variación bajo las condiciones estudiadas.



# 3. Desafío de la variable respuesta frente al estímulo de la radiación UVB: Comprobación de la hipótesis

## 3.1 Aspectos teóricos

Una de las estrategias que se ha utilizado para contrarrestar los efectos deletéreos de la radiación solar, es el uso de productos de aplicación tópica que contienen sustancias capaces de evitar que los rayos UVB/UVA provenientes del sol alcancen la piel o al menos, que disminuya la cantidad de fotones que pueden alcanzar las estructuras del tejido. En este capítulo, inicialmente se abordan conceptos como el Factor de Protección Solar (FPS), la manera de determinarlo y las metodologías alternativas *in vitro* que se han desarrollado para tal fin.

A continuación, se estudia el comportamiento de la variable respuesta  $R_{mem}$  definida en el capítulo anterior frente a la protección que ofrecen los productos *protectores solares* de distinto valor de FPS, con el fin de establecer si ésta variable es lo suficientemente sensible para responder al estímulo de la radiación recibido por la piel en diferentes proporciones dependiendo la protección utilizada, es decir si existe una respuesta asociada a los valores de FPS y como se planteó inicialmente, determinar que mediante una variable de tipo eléctrica si es posible identificar el efecto de la radiación UVB sobre la piel y tras la inclusión de varios niveles de protección solar, es posible correlacionarlos con tal respuesta eléctrica.

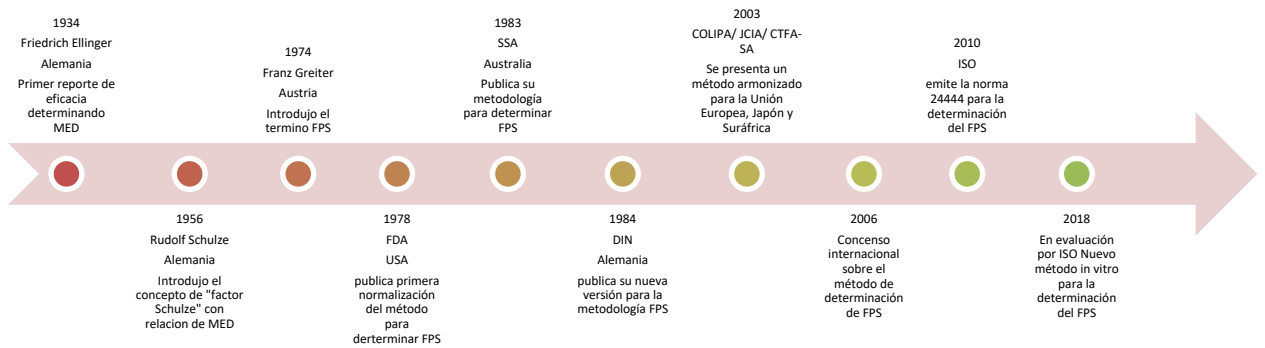
Finalmente, se propone un modelo matemático que describe el comportamiento del tejido a través del análisis de la variable respuesta  $R_{mem}$ , luego de una exposición a la radiación UVB definida y cuando la piel está siendo protegida bajo diferentes niveles de protección que ofrecen los distintos valores de FPS, en comparación con la ausencia de protección,

proyectando la frontera del conocimiento hacia la explicación de los cambios eléctricos en un tejido como un potencial desencadenante de efectos a largo plazo.

### **3.1.1 El Factor de Protección Solar FPS y la metodología para su determinación**

El factor de protección solar es un valor mundialmente aceptado que califica la eficacia de un producto fotoprotector para evitar las quemaduras solares, aclarando que está relacionado únicamente con la radiación UVB (290-320nm), principal responsable del eritema solar y en general de los efectos más nocivos atribuidos a la exposición solar. Históricamente, la aparición de este concepto como se observa en la figura 3-1, ocurre hacia 1934 donde se empieza a hablar de las posibles metodologías para evaluarlo a nivel biológico en humanos, mediante la determinación de dosis eritemal mínima (MED por sus siglas en inglés) o cantidad mínima de energía necesaria para generar un eritema o enrojecimiento de la piel perceptible inequívocamente, con bordes definidos que aparecen en la mayor parte del campo de exposición 16 a 24 horas después de la misma (Farr and Diffey, 1985). Posteriormente, en 1956 Rudolf Schulze publicó sus estudios sobre evaluación de la protección solar de productos comerciales mediante el factor Schulze que relacionaba el valor de MED para la piel protegida con el valor MED para la piel sin proteger, lo cual corresponde con la actual definición de FPS y cuyo término definitivo fue introducido por Greiter en 1974. A partir de este último aporte, las agencias regulatorias de países de referencia como los resaltados en la figura 3-1, acogieron estas investigaciones para normalizar la metodología de determinación del FPS que a la fecha es la única válida para asignar un valor de dicha eficacia a los productos del mercado y corresponde a la norma ISO 24444: 2010 (Lim et al., 2007; Schalka and Reis, 2011). Sin embargo, existe una metodología *in vitro* para la determinación del FPS (Pissavini et al., 2018), aceptada por el comité técnico de la organización ISO y que se encuentra en estudio para ser aplicada como un posible nuevo método de referencia internacional.

**Figura 3-1:** Línea del tiempo sobre la introducción del concepto de FPS para la evaluación de eficacia de productos de protección solar.



\*MED: Dosis mínima eritemal; \*FDA: Food and drug administration; \*SSA: Standards Association of Australia; \*DIN: Deutsches Institut für Normung; \*COLIPA: European Cosmetic and Perfumery Association, \*JCIA: Japanese Cosmetic Industry Association; CTFA-SA: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association of the South Africa; \*ISO: International Organization for Standardization.

El factor de protección solar está definido como el número de veces que un fotoprotector aumenta la capacidad de defensa natural de la piel frente al eritema o enrojecimiento previo a la quemadura (Batlle, 2005). De acuerdo con la manera de calcularlo, el FPS corresponde a la dosis de energía UVB mínima requerida para producir eritema, (MED) en la piel protegida, dividido por la dosis de energía UV mínima requerida (MED) de la piel sin protección como se muestra en la ecuación 3-1. Esta Dosis Mínima Eritemal se define a su vez como el intervalo más bajo de radiación UVB suficiente para producir un mínimo eritema perceptible sobre la piel (Khan, 2014).

**Ecuación 3-1:** Estimación de FPS para el método *in vivo*.

$$FPS = \frac{MED \text{ piel protegida}}{MED \text{ piel sin protección}}$$

Esta metodología aceptada internacionalmente presenta algunas variaciones entre las agencias de referencia, pero tienen en común la utilización de seres humanos como voluntarios sanos para la evaluación de la eficacia frente a la radiación UVB de los productos de protección solar. Otras alternativas *in vitro* e *in silico* han sido de gran interés científico con miras al reemplazo, sin embargo, aun no existe ninguna variación que sustituya en ensayo *in vivo* a pesar de ser costoso, demorado y éticamente cuestionado.

A continuación, se presenta en la tabla 3-1 una comparación entre las regulaciones FDA y COLIPA en cuanto a metodología de evaluación y lo armonizado por ISO 24444 de 2010 (COLIPA et al., 2006; Coll et al., 2006; ISO 24444, 2010).

**Tabla 3-1:** Comparación entre las regulaciones FDA y COLIPA en cuanto a metodología de evaluación y lo armonizado por ISO 24444 de 2010 para el ensayo evaluación de FPS.

MÉTODOS	FDA	COLIPA	ISO 24444
Número de individuos valorados	20 a 25	10 a 20	10 a 20
Superficie irradiada y localización	50 cm <sup>2</sup> de espalda	35 cm <sup>2</sup> de espalda	30 a 60 cm <sup>2</sup> de espalda
Tipos de piel	I, II Y III	I, II Y III	I, II Y III
Cantidad aplicada	2,00 mg/ cm <sup>2</sup>	2,00 ± 0,04 mg/ cm <sup>2</sup>	2,00 ± 0,05 mg/cm <sup>2</sup>
Método de aplicación	Jeringa volumétrica	Micro pipeta	Según el tipo de producto
Periodo de irradiación activa	15 minutos	15 minutos	15 minutos
Inspección al cabo de...	16 a 24 horas	20 ± 4 horas	16 a 24 horas
Estándares SPF	Filtro de Homosalato al 8%	P1: estándar bajo (SPF 4,0-4,4). P2: estándar alto (SPF 11,5-13,9). P3: estándar alto (SPF 14,0-17,0).	P2: estándar alto (SPF 13,7-18,5). P3: estándar medio (SPF 13,7-17,7). P7: estándar bajo (SPF 4,0-4,8).
Espectro del simulador solar	Continuo de tipo solar de 290 a 400 nm	Continuo de tipo solar de 290 a 400 nm	Continuo de tipo solar de 290 a 400 nm
Umbral MED (duración de la irradiación)	NR	20-180 s	NR
Recomendación para el etiquetado del producto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-4 mínimo</li> <li>• 5-7 moderado</li> <li>• 8-11 elevado</li> <li>• 12-20 muy elevado</li> <li>• ≥ 20 ultra elevado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajo 2-4-6</li> <li>• Medio 8-10-12</li> <li>• Alto 15-20-25</li> <li>• Muy alto 30-40-50</li> <li>• Ultra 50+</li> </ul>	NR

Además, es importante mencionar que de acuerdo con la definición de FPS, lo que se determina es la cantidad de energía que se puede recibir hasta alcanzar la quemadura y no el tiempo de protección en condiciones de uso ya que, dependiendo del lugar y la hora del día, la energía recibida puede ser mayor o menor y por tanto la protección durará menos o más. Adicionalmente, también hay filtros solares destinados a la protección frente a los rayos UVA por lo que una adecuada combinación de filtros puede generar protección de amplio espectro que es lo que actualmente se espera de estos productos.

En términos energéticos se interpreta que el valor de FPS está relacionado con la cantidad de energía en fotones que es absorbida o en general, filtrada por los diferentes protectores y por diferencia, se obtiene la cantidad de fotones que llegan a la piel. Por ejemplo, un

producto con FPS 10 indica que, de 100 fotones recibidos 10 pueden llegar hasta la piel, entonces el 90% de la radiación es filtrada por el protector solar y el 10% restante llega a la piel; para un producto con FPS 50 se tendría que de 100 fotones recibidos 2 pueden llegar hasta la piel es decir que el 98% de la radiación es filtrada y el restante 2% alcanza la piel, esto significa que respecto a lo que puede llegar a la piel, el protector FPS 50 es 5 veces más protector que el anterior caso, pues en lugar de que pasen 10 fotones por cada 100, pasarán sólo 2. Una comparación clásica que realizan algunos autores sobre esta diferencia es la protección que ofrece un producto FPS 30 respecto a uno FPS 60, el primero absorbe el 96.7% de los rayos UV eritemogénicos, mientras que el segundo absorbe el 98.3%, es decir, solo 1.6% más. Sin embargo, lo que importa no es la cantidad filtrada sino la cantidad de radiación UV que llega a la piel; para esta comparación, con el protector solar FPS 30 el 3.3% de la radiación llega la piel mientras que para el protector FPS 60 llega el 1.7% es decir la mitad de la radiación, por esta razón, el protector solar SPF 60 si protege el doble de lo que lo hace el protector solar FPS 30 (Osterwalder and Herzog, 2010, 2009).

### **3.1.2 Alternativas de evaluación *in vitro*, para la determinación del FPS**

Las alternativas de evaluación *in vitro* que han sido desarrolladas para la determinación del FPS presentan diferencias en los valores obtenidos respecto al método *in vivo*, lo cual no ha permitido establecer una correlación adecuada para reemplazar el uso de seres humanos en la determinación (Couteau et al., 2018; Pelizzo et al., 2012). Entre los principales aspectos que generan la alta variabilidad, se ha encontrado que debe ampliarse la investigación en la selección del sustrato adecuado que simule la superficie de la piel humana en cuanto a la rugosidad y las propiedades de superficie, bien sea de origen biológico o sintético y por otro lado, la técnica en el procedimiento de aplicación del producto sobre el sustrato (Bendová et al., 2007; Sohn et al., 2017).

En este campo se han trabajado dos enfoques principalmente: métodos que involucran la medida de absorción o transmisión de radiación UV, a través de un producto aplicado sobre placas de materiales como cuarzo, polimetilmetacrilato o biomembranas; y métodos en los cuales las características de absorción de los agentes protectores solares son

determinadas en análisis espectrofotométricos de soluciones diluidas de los mismos (Dutra et al., 2004).

En el primer caso, el método de transmitancia difusa a través de sustratos fue descrito por Diffey y Robson en la década de los 80; consiste en la utilización de un equipo de radiación entre 200 y 400nm es decir dentro del espectro ultravioleta, una cinta transpore® como sustrato biológico, sobre la cual se realiza la aplicación del producto de manera homogénea y mediante la utilización de un guante de caucho; la cantidad de producto a utilizar varía entre 1,5 y 2,0 mg/cm<sup>2</sup>. Así, la evaluación se realiza poniendo la cinta a la salida de la luz del espectro-radiómetro, se hacen mediciones cada 5 nm y el cálculo se realiza mediante la ecuación 3-2, como sigue:

**Ecuación 3-2:** Estimación de SPF mediante la metodología *in vitro* de transmitancia difusa.

$$SPF = \frac{\sum_{290}^{400} E(\lambda)\epsilon(\lambda) \text{ protegido}}{\sum_{290}^{400} \frac{E(\lambda)\epsilon(\lambda)}{PF(\lambda)} \text{ sin proteger}}$$

Donde  $E(\lambda)$  corresponde a la irradianza espectral de la luz solar terrestre bajo condiciones definidas;  $\epsilon(\lambda)$  es el espectro de acción eritemal a cada longitud de onda y  $PF(\lambda)$  el factor de protección monocromática, el cual está dado como la relación de la fotocorriente registrada a una longitud ( $\lambda$ ) sin aplicar el protector solar a la cinta entre la correspondiente fotocorriente con el protector aplicado (Diffey and Robson, 1989).

Este método representó una buena aproximación a los resultados de FPS bajos (FPS < 30) respecto a la determinación *in vivo*. Sin embargo, no concluyentes en valores de FPS altos (FPS > 30) por su baja reproducibilidad. A pesar de eso, ha sido ampliamente utilizado por otros autores que, en búsqueda de una mejor correlación, han generado varias modificaciones especialmente en el sustrato donde se realiza la aplicación del producto (Pissavini et al., 2003; Sarruf et al., 2013).

Para el segundo caso, el método de evaluación mediante espectrofotometría UV de transmisión simple, fue descrito por Mansur y colaboradores en 1986 y consiste en la determinación del espectro de absorción de soluciones alcohólicas de los productos protectores solares, estas son puestas en celdas de cuarzo de 1cm y no sobre un sustrato; para la evaluación, se toman datos de absorción de las diluciones en el rango de 290 a

320 nm es decir el rango UVB, cada 5 nm y 3 determinaciones en cada punto, el valor de FPS se obtiene mediante la ecuación 3-3 así:

**Ecuación 3-3:** Estimación de FPS mediante la técnica *in vitro* de espectrofotometría.

$$FPS = CF * \sum_{290}^{320} EE(\lambda) * I(\lambda) * Abs(\lambda)$$

Donde EE corresponde al espectro de eficiencia eritemal a cada ( $\lambda$ ), I al espectro de intensidad solar; estos valores son constantes y se encuentran reportados; Abs ( $\lambda$ ) es la absorbancia del producto a cada longitud de onda y CF es un factor de corrección determinado con una formulación estándar (Baccarin et al., 2015; Mansur et al., 1986).

De los métodos anteriormente expuestos, el que mejor resultados ha arrojado es el de transmitancia difusa, al encontrar una buena reproducibilidad y correlación con los resultados de FPS obtenidos por el método *in vivo* como lo reportó Pissavinni y colaboradores, quienes además lograron definir unas condiciones de ensayo con mejores resultados. Ellos establecieron el uso del sustrato polimérico Polimetilmetacrilato (PMMA) por ser un material de buenas características ópticas como la transparencia frente a la luz UV; además le imprimieron características de rugosidad de 5  $\mu m$  y definieron que la cantidad de producto a aplicar sobre ese sustrato debía ser 1,2  $mg/cm^2$  para obtener mejores resultados. Frente a este último aspecto, consideraron que, aunque lo establecido por COLIPA para el método *in vivo* sea 2,0  $mg/cm^2$ , las diferencias entre PMMA y la piel hacen que una menor cantidad sobre la placa genere una mejor correlación en el resultado de FPS. Sin embargo, reconocen que a pesar de acercarse considerablemente a los resultados *in vivo*, la variabilidad encontrada hace que aún no sea lo suficientemente contundente para reemplazar el método *in vivo* (Pissavini et al., 2003).

Estudios posteriores realizados con este método de transmitancia difusa con sustratos como transpore®, papel mikelanta y papel calcante, demostraron que hay una tendencia a sobrestimar el valor de FPS para productos de baja protección solar y subestimar el FPS para los protectores solares con media y alta protección, es decir, para los productos con FPS superior a 30, por lo que se concluye que es de vital importancia tener un sustrato idóneo para la determinación (Bendová et al., 2007).

Entonces, los investigadores continuaron estudiando las posibles variantes de este método con miras a obtener el mejor nivel de correlación con el método *in vivo*, reportando que un sustrato de PMMA con una rugosidad de  $4,5 \mu m$  es lo más adecuado; también un segundo paso de esparcimiento del producto sobre el sustrato una vez se ha secado el primero por 20 minutos, presentó mejores resultados; de igual manera se mejora la reproducibilidad de los resultados cuando a la placa de PMMA se le realiza un tratamiento previo con 10 mg de parafina líquida antes de colocar el producto a evaluar. Así, se redujeron los problemas de sobreestimación del FPS y mejoró considerablemente la correlación (Fageon et al., 2009). Por su parte, Miksa y colaboradores, encontraron que es importante controlar la uniformidad del haz de luz (menos del 20% de variabilidad), la temperatura en la superficie del sustrato, especialmente durante la exposición a la radiación UVB que sea constante en 25 °C preferiblemente y que no haya flujo de aire sobre la muestra durante el ensayo (Miksa et al., 2014). Sin embargo, a la fecha la conclusión es la misma y es que estos resultados *in vitro* no son lo suficientemente satisfactorios para reemplazar la metodología *in vivo* aceptada.

Algunas agencias regulatorias de referencia como FDA y Reino Unido han acogido el método de transmitancia difusa como propuesta para la determinación del FPS *in vitro* con algunas variaciones entre si, pero ninguna como alternativa al método *in vivo* para la determinación definitiva. Australia tiene como opción *in vitro* la evaluación espectrofotométrica de los productos de protección solar. COLIPA por su parte, ha adoptado una metodología *in vitro* de características similares al método de la transmitancia difusa para la determinación de la protección frente a la radiación UVA, el cual han denominado UVAPF. En este sentido, la organización ISO ha normalizado la ISO 24443:2012 como procedimiento *in vitro* para determinar la protección frente a la radiación UVA de los protectores solares y consiste en el uso de resultados SPF *in vivo* para hacer un escalamiento en la curva de absorbancia UV. Dicha norma es complementaria entonces a la determinación *in vivo* de la protección UVA que ya había sido normalizada previamente mediante la ISO 24442:2011 y que junto con la 24444:2010 para UVB, son las únicas tres metodologías válidas actualmente para la determinación y etiquetado de la protección UVA y del FPS respectivamente (Donglikar and Deore, 2016).

Recientemente se ha conocido una nueva propuesta por parte de COLIPA, ahora designada como *Cosmetic Europe*, para la determinación *in vitro* del FPS basada en el método de transmitancia difusa y específicamente en el método UVAPF estandarizado por



ISO, con algunas modificaciones como la combinación de dos placas de PMMA con diferentes variaciones en su superficie, la utilización de un robot para esparcir el producto y favorecer la homogeneidad en la distribución de la película y un reajuste en el cálculo de los valores obtenidos mediante la ecuación 3-2, adaptada a las nuevas condiciones de ensayo. Esta metodología demostró una buena correlación *in vitro* / *in vivo*, así como una buena reproducibilidad inter-laboratorio, por lo que se encuentra en estudio por parte de la ISO para ser acogida y estandarizada internacionalmente (Pissavini et al., 2018).

Otro enfoque alternativo investigado ha sido el de los modelos *in silico* con el desarrollo de algoritmos que trabajan mediante la ecuación de transmitancia difusa (Ecuación 3-2). Bajo este enfoque que usa la ley de Lambert – Beer se calcula la transmitancia UV utilizando los coeficientes de absorción molar (coeficiente de extinción) y la concentración molar para la mezcla de filtros en las formulaciones, así como la proporción de filtros y las características de la película formada (Herzog, 2002). En este sentido, se han desarrollado otras investigaciones donde se han propuesto algunos modelos que describen la distribución del espesor de la película formada como el “modelo de película de 2 pasos” donde se demostró que la forma física del producto no es relevante en la predicción, es decir que puede ser una solución simple o una emulsión gruesa, siempre y cuando el residuo después de la aplicación sea una sola fase continua en la que los filtros estén en una solución verdadera, que además permanezca bien extendido en las mesetas de la piel y que no se acumule en los surcos (O’Neill, 1984). También se desarrolló el “modelo de película de 4 pasos” que utiliza formulaciones basadas en filtros orgánicos y que son aplicadas sobre sustratos artificiales con lo cual se encontró una importancia significativa del grosor de la película aplicada en la predicción del FPS (Tunstall, 2000); Posteriormente se mejoró el “modelo de película de 2 pasos” haciendo una calibración de los parámetros de la película aplicada a través de datos *in vivo* de FPS obteniendo una buena predicción para 36 productos evaluados (Herzog, 2002); al utilizar este mismo método para evaluar la predicción en la protección contra UVA, se encontró que tiende a sobreestimar la protección UVA (Herzog et al., 2004b). De este mismo tipo de correcciones, se ha descrito el “modelo de película escalonada cuasi-continua calibrado”, para describir la irregularidad de la película aplicada en la piel con un enfoque exponencial en dos dimensiones para la predicción del FPS y de protección UVA con buenas aproximaciones (Herzog, 2008, 2005). A pesar de todos estos avances en el modelamiento, sigue siendo controversial y

cuestionable el hecho de que este tipo de modelos puedan reemplazar el experimento *in vivo* pues la reproducibilidad en la predicción es aún incierta.

En otros casos, se utilizan modelos tipo Monte Carlo para la simulación computacional de los filtros sobre la piel, por ejemplo el tamaño de partícula de filtros inorgánicos y su relación con la protección brindada (Popov et al., 2005); también se han desarrollado modelos de correlación *in vivo* / *in vitro* para la estimación del FPS asociados a la geometría de la película de producto que se distribuye de manera irregular sobre películas de PMMA de diferente rugosidad utilizando la función gamma como distribución estadística y que demostraron que el valor de FPS *in vitro* cambia de manera no lineal al aumentar la cantidad de producto aplicado y que además, la correlación se ve influenciada por la rugosidad de las placas (Ferrero et al., 2010). Adicionalmente se ha diseñado un modelo con cálculos electromagnéticos que además de lo anterior, tienen en cuenta dispersión múltiple tanto en las interfases (producto-aire, sustrato-producto) como entre las partículas del mismo producto. Sin embargo, es un método que consume mucho tiempo y no tiene en cuenta dimensiones de profundidad en la aplicación (Lécureux et al., 2014).

Finalmente, dentro de los modelos *in silico*, se encuentra el simulador de la empresa alemana BASF disponible en internet ([www.basf.com/sunscreen-simulator](http://www.basf.com/sunscreen-simulator)) que permite calcular el FPS y protección UVA a partir de la escogencia de los filtros para la formulación; mediante su algoritmo, este software considera los coeficientes de extinción, la concentración, la inestabilidad de los filtros individualmente y las incompatibilidades que se presentan en combinación, así como el sinergismo que se pueda dar entre ellos. Sin embargo, su predicción frente al valor *in vivo* no es realmente acertada, pues aún deja variables sin controlar y que influyen en el desempeño del producto al momento del uso como, por ejemplo el tipo de emulsión que conforma el sistema de filtros (o/w o w/o), los excipientes que conforman la emulsión y que sin ser activos a la radiación pueden interferir en la actividad de los filtros, como ya algunos estudios previos lo han demostrado, afectando considerablemente el valor obtenido de FPS (Chatelain et al., 2003; Sohn et al., 2016b).

Algunas alternativas adicionales a lo mencionado han surgido con el fin de buscar otra manera de medir el daño asociado a la radiación UV. Para esto se han enfocado en uno de los blancos más importantes, el daño ocasionado al ADN por exposición a la radiación UV mediante diferentes metodologías como: cuantificación de fotoproductos por

cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a masas (Su et al., 2010), cambios en enlaces de las bases mediante electroforesis en gel de célula única (Sastre et al., 2001) e incluso mediante biosensores electroquímicos con ADN adsorbido en la superficie que permiten medir el cambio en las bases de purina a través de cambios en el voltaje (Ferancová et al., 2010; Hlavata et al., 2015, 2012; Svitkova et al., 2017). Se han encontrado estudios que han intentado correlacionar los valores de FPS de productos fotoprotectores con la mitigación del daño sobre el ADN, encontrando una respuesta significativa de la protección genómica con valores bajos y altos de FPS proporcionalmente (Cayrol et al., 1999; Mouret et al., 2011). Uno de ellos utilizó productos fotoprotectores de referencia en las guías COLIPA, estimando un “factor de protección de ADN” mediante la cuantificación cromatográfica del dímero timidina ciclobutano (mayoritariamente producido por la radiación UV), obtenido de muestras biológicas a través de un modelo *ex vivo* de piel humana de donde provenía el ADN. Este trabajo mostró resultados promisorios en la estimación de la protección y en su correlación con los valores de FPS, aunque con alta variabilidad y dentro de las desventajas se encuentra la robustez de la metodología analítica que resulta costosa (Mouret et al., 2011). Sin embargo, es una buena aproximación para explorar otras formas de estimación de protección del daño causado por la radiación de una manera cuantitativa, como alternativa para establecer la medida de protección necesaria para evitar el daño observado y así proponer un remplazo a la determinación actual del FPS.

Cabe resaltar que, dentro del grupo de investigación en procesos de transformación de materiales para la industria farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia, se han realizado investigaciones similares con el objetivo de conocer el efecto de la radiación UVB sobre material biológico explorando diferentes modelos. Recientemente, el grupo de investigación ha estudiado un biomaterial del tipo glicosaminoglicano encontrado en la piel y que resulta afectado con el envejecimiento tanto natural como prematuro causado por la radiación UV. Los estudios conducidos en el grupo de investigación han permitido desarrollar y estandarizar técnicas de cuantificación del efecto de la radiación UV sobre este biomaterial y determinar su cinética de degradación. Así mismo, se ha propuesto y validado una metodología alternativa *in vitro* para la determinación del FPS mediante el uso de este material como sustrato de prueba (Vitola, 2016).

### 3.1.3 Los filtros solares

Los filtros solares son los ingredientes activos de los protectores solares pues son capaces de reducir la intensidad de la radiación cuando alcanza la piel. Estos se clasifican en filtros UV orgánicos e inorgánicos; los orgánicos se subdividen en compuestos solubles y particulados. Los filtros UV orgánicos solubles actúan por absorción, mientras que el mecanismo de acción de los filtros UV particulados incluye absorción, dispersión y reflexión (Egerton and Tooley, 2012; Manaia et al., 2013). Estos últimos pueden además, aumentar las rutas de paso de la radiación haciendo que interactúe con muchas más moléculas del mismo filtro antes de alcanzar la piel, de esta manera se absorben más fotones y por lo tanto aumenta el FPS (Lademann et al., 2005). En general, los filtros solares se caracterizan por presentar un perfil de absorbancia único y un perfil de fotoestabilidad particular en la región UV: UVB, UVA o ambos (amplio espectro). Estos perfiles pueden verse afectados por los demás componentes de la formulación y, dependiendo de las combinaciones realizadas, se podrá mejorar su desempeño en la formulación final para una protección adecuada.

Los filtros orgánicos se caracterizan por presentar grupos cromóforos, es decir, un grupo de átomos capaces de absorber longitudes de onda superiores a 200 *nm* gracias a sus sistemas de electrones  $\pi$  conjugados y pueden actuar de tres maneras: (i) experimentan cambios moleculares conformacionales, (ii) emiten radiación a una longitud de onda más alta o (iii) liberan energía incidente como calor (Antoniou et al., 2008).

En cuanto a los filtros inorgánicos, en la actualidad las agencias regulatorias sólo permiten el uso de dos opciones que corresponden al dióxido de titanio  $\text{TiO}_2$  y al óxido de zinc  $\text{ZnO}$ . El  $\text{TiO}_2$  presenta un rango de protección más amplio en el espectro UV, brindando protección frente a la radiación UVA y UVB mientras que el  $\text{ZnO}$  es activo sólo la región UVA, por lo que su uso es complementario a otros filtros (Serpone et al., 2007). Estos óxidos utilizados en protección solar son preparados en partículas nanométricas con tamaños que varían de 10 a 30 *nm*, aunque forma agregados en dispersión, dando como resultado un tamaño de hasta 100 *nm* en las formulaciones. Resulta importante señalar que aunque son tamaños de partícula muy pequeños, se ha demostrado que la absorción transdérmica no es significativa, en algunos casos penetra el estrato córneo en baja proporción y en ningún caso alcanzan la circulación sistémica y por lo tanto, se han

considerado como seguros (Monteiro-Riviere et al., 2011; Smijs and Pavel, 2011). Además, ese pequeño tamaño de partícula, resulta ser transparente en la piel, mejorando la apariencia del producto, eliminando el “efecto mimo” indeseado y por lo tanto, favoreciendo la aceptabilidad del producto en los consumidores sin sacrificar la protección. La parte de la luz atenuada a través del fenómeno de absorción frente al de dispersión, depende en gran medida del tamaño de la partícula; en los tamaños utilizados para estos filtros, la absorción es el principal mecanismo de acción, además ambos se caracterizan por presentar actividad fotocatalítica (Manaia et al., 2013; Serpone et al., 2007).

Las moléculas que absorben energía de la radiación UV se mueven de un estado fundamental ( $S_0$ ) a un estado singlete excitado ( $S_1$ ) mediante la deslocalización de un electrón. Como este estado excitado es inestable, existen varios procesos para disipar la energía absorbida, ya sea a través de emisiones o a través de vías sin radiación como cruces entre sistemas desde el estado de salida singlete al estado excitado de triplete, este último muestra una vida útil más larga y, por lo tanto, promueve la fotodegradación de la molécula (Kikuchi and Yagi, 2011). Ahora, para prevenir esa degradación de la molécula es posible estabilizarla extinguiendo el estado singlete excitado evitando que se forme el estado triplete excitado, o extinguiendo el estado triplete excitado formado. Este último mecanismo de transferencia de energía de extinguir el estado triplete excitado es el proceso de fotoestabilización más común y para que se favorezca, la molécula extinta debe mostrar un nivel de energía igual o ligeramente inferior al que tenía en el estado excitado de tal manera que absorba la energía de excitación. Para los filtros UV fotoestables, la disipación de la energía absorbida se produce a través de la conversión interna, que luego se absorbe en calor inofensivo a través de la transferencia de energía por colisión con la molécula circundante (Herzog et al., 2004a).

Una vez revisado todos los aspectos teóricos relacionados con la protección solar y los avances en las investigaciones sobre metodologías alternativas al modelo *in vivo* para la determinación del FPS, es importante mencionar la aplicabilidad de los modelos matemáticos en sistemas biológicos complejos como una herramienta útil y complementaria a la experimentación, para comprender validar y describir el comportamiento de los fenómenos estudiados bajo la aplicabilidad deseada. Particularmente, en este trabajo se usará un modelo matemático para describir el comportamiento de la variable eléctrica  $R_{mem}$  de un tejido *ex vivo* de piel de cerdo cuando es estimulado por la radiación UVB y cómo este se puede aplicar en la correlación de

valores de FPS. A continuación se presenta la metodología seguida en esta etapa para el desarrollo propuesto.

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Materiales

Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$  al 30% o 9,8 M), solución amortiguadora de fosfato salino (PBS, pH 7,4) en tabletas y azida de sodio ( $NaN_3$ ) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Todas las soluciones se prepararon usando agua ultrapura con una resistividad de  $18,2 \Omega \cdot cm$ . Celdas de Franz con diámetro de 0,90 cm y volumen de 6,0 mL, fabricadas por PermeGear Inc. (Hellertown, PA, USA).

Productos de protección solar comerciales con valores de FPS de 10, 20, 30, 50 y 70 que bajo la información declarada en la etiqueta, no incluían en su formulación ningún antioxidante, lo que permite una comparación consistente de la capacidad protectora de cada formulación en las condiciones experimentales definidas. Estos productos correspondieron a emulsiones tipo aceite en agua (o/w), en la tabla 3-1 se describen los ingredientes activos frente a la radiación UV aunque se desconoce la proporción en la que se encuentran. Adicionalmente se utilizó alcohol cetílico (8% p/p), aceite mineral (6% p/p), dodecil sulfato de sodio (2% p/p) y agua ultrapura (84% p/p) para preparar una formulación tipo emulsión o/w de referencia a la que se denominó crema (FPS 0).

**Tabla 3-2:** Componentes activos frente a la radiación de los productos comerciales utilizados en el experimento.

Factor de protección solar	Nombre INCI	
	Filtros orgánicos	Filtros inorgánicos
FPS 10	Octocrylene	--
	Homosalate	
	Butyl Methoxydibenzoylmethane	
FPS 20	Homosalate	Titanium dioxide (nano)
	Butyl Methoxydibenzoylmethane	
	Octocrylene	

FPS 30	Octocrylene	Titanium dioxide (nano)
	Homosalate	
	Butyl Methoxydibenzoylmethane	
FPS 50	Ethylhexyl methoxycinnamate	Titanium dioxide (nano)
	Methylene-bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	
	Bisethylhexyloxyfenol methoxyphenyltriazine	
	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	
FPS 70	Ethylhexyl methoxycinnamate	Titanium dioxide (nano) Zinc oxide (nano)
	Methylene-bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	
	Bisethylhexyloxyfenol methoxyphenyltriazine	

### 3.2.2 Equipos

Potenciostato CompactStat de IVIUM Technologies (Eindhoven, Países Bajos), Para el montaje de 4 electrodos, los electrodos de trabajo y contraelectrodo son de alambre de platino, mientras que para los electrodos sensor y de referencia se usaron electrodos de Ag/AgCl/KCl fabricados por World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA). Los datos fueron obtenidos del software “*Ivium equivalent circuit evaluator*”.

Para la irradiación de las muestras se utilizó una lámpara UVB modelo Philips PL-9 9W / 01 / 2P que emite fotones con longitudes de onda entre 306 y 316 nm, con un pico a 312 nm (sin ninguna radiación significativa en otras longitudes de onda), las características fueron descritas en el capítulo 2. El control de la radiación emitida por la lámpara se realizó mediante un Medidor UV: UV-340A, (Lutron Electronic Company, Taipei, Taiwán).

Las muestras de piel fueron cortadas con un Dermatomo TCM 3000 BL (Nouvag, Konstanz, Alemania). Para el control histológico se utilizó un microscopio óptico Leica DM500 CH-9435 (Heerbrugg, Suiza).

El software utilizado para el modelamiento matemático fue Sigmaplot 12.0, Systat Software INC, California, USA.

### 3.2.3 Preparación de las muestras de piel

La preparación de las muestras de la piel se realizó de la misma manera como se describió en el capítulo 2. Brevemente, las muestras obtenidas del animal se descongelaron y se limpiaron con agua. Posteriormente, fueron divididas en tiras con un bisturí y se eliminó cuidadosamente el vello. De estas tiras se obtuvieron cortes con el dermatomo de aproximadamente 0,5 mm de grosor que finalmente eran divididas en cortes circulares de 16,0 mm de diámetro. Estos cortes se mantuvieron congelados a -20 °C no más de cuatro semanas mientras su uso. Previo a su utilización, las muestras fueron descongeladas colocándolas en un papel de filtro empapado con PBS y mantenidas durante 1–2 horas a temperatura ambiente (22 °C).

### 3.2.4 Mediciones de espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS) de las muestras de piel

Para la evaluación de EIS en esta etapa del estudio, se utilizaron las condiciones definidas en el capítulo anterior respecto al estrés oxidativo necesario para obtener respuesta en la variable eléctrica seleccionada ( $R_{mem}$ ). En este sentido, la solución de trabajo donde se evaluaron las muestras corresponde al sistema compuesto por PBS que contenía  $\text{NaN}_3$  10,0 mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0 mM; esta solución fue incluida en todos los casos tanto en el compartimento donador como en el receptor, con el fin de mantener las muestras de piel siempre sumergidas y expuestas. Vale la pena aclarar que en este punto de la investigación, se busca una confirmación de la idoneidad de la variable  $R_{mem}$  de las muestras de piel como indicador de daño causado por la radiación y un desafío para su capacidad de respuesta, ahora con la inclusión de formulaciones de protección solar que evitan el paso de la mayoría de la radiación y dependiendo su valor de FPS, permiten el paso de otro tanto de radiación que alcanza la piel y que se espera sea reconocido por la variable  $R_{mem}$ .

Una vez ajustado el montaje para la evaluación de impedancia eléctrica de las muestras de piel de cerdo *ex vivo* en las celdas de Franz descrito en el capítulo 2, en esta parte de la investigación fueron incluidas algunas variaciones. La primera de ellas fue el tiempo de medición, pues una vez se estableció el estado estable de las muestras (cuando el valor



de impedancia se estabilizó) que se definió a las 3 horas de realizado el montaje, se tomó este momento como el tiempo inicial o tiempo cero previo a la exposición a la radiación UVB, la siguiente medición se realizó a las 5 horas posteriores, es decir como punto final del ensayo a una máxima exposición. La segunda modificación consistió en la inclusión del producto protector a evaluar en cada experimento una vez se alcanzó el estado estable, este producto permaneció en la piel durante el tiempo de exposición a la radiación UVB (5 horas) y previo a la medición se enjuagó la superficie de las muestras cuidadosamente con PBS. Como se señaló previamente, los productos aplicados sobre la piel variaban en el FPS declarado en su etiqueta y corresponden a valores determinados mediante el ensayo *in vivo* de acuerdo con lo establecido en la regulación vigente. Asimismo, se utilizó una formulación que sólo contenía los excipientes tradicionales para un tipo de emulsión aceite en agua con el fin de evaluar la influencia de estos en el efecto de la radiación UVB sobre la piel y específicamente sobre la variable respuesta.

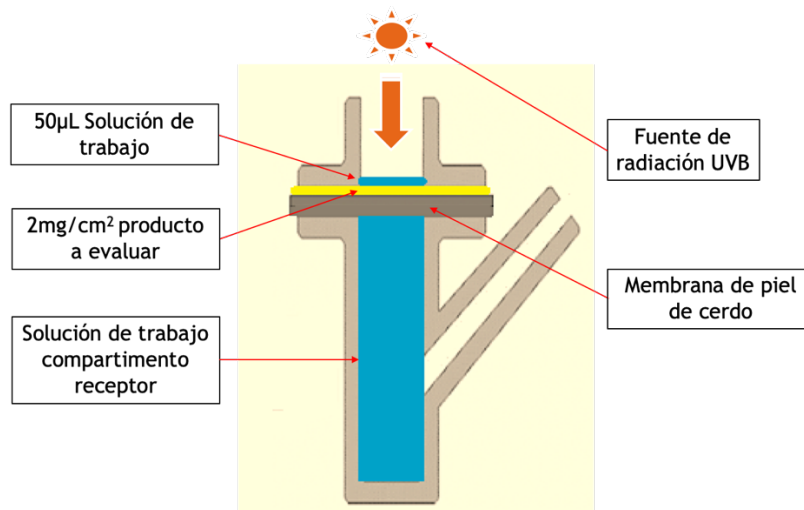
Todas las mediciones se realizaron en condiciones controladas de temperatura a 22 °C. El rango de frecuencia fue de 0,1 Hz a 1,0 MHz con seis frecuencias por década (36 en total) y la amplitud del voltaje sinusoidal alterno aplicado fue de 100 mV entre los electrodos de trabajo y contraelectrodo, de modo que la diferencia de potencial entre los electrodos sensor y de referencia fuera igual al valor establecido del potencióstato. La diferencia de potencial aplicada genera una corriente de respuesta entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo, que es medida en el potencióstato. Los datos se analizaron de acuerdo con un circuito equivalente que consiste en una resistencia correspondiente a la solución de trabajo llamada  $R_{sol}$ , en serie con una combinación paralela de una resistencia correspondiente a la de membrana de la piel, llamada  $R_{mem}$  y un elemento de fase constante (CPE) del mismo modo como se describió en el capítulo 2;  $R_{sol}$  se mantuvo constante en 200  $\Omega$  y siempre fue al menos un orden de magnitud inferior a  $R_{mem}$ ; todos los datos se normalizaron con el área de la membrana de la piel (0,64 cm<sup>2</sup>) para obtener unidades en  $Ohm \cdot cm^2$ . En cuanto a los elementos de fase constante, la capacitancia efectiva  $C_{eff}$  se derivó de la región de alta frecuencia de los datos de impedancia de la parte imaginaria. Vale la pena recordar que la metodología de medición aquí descrita fue exactamente igual a las condiciones definidas previamente (capítulo 2) y mediante las cuales se logró establecer la respuesta eléctrica de la piel al estímulo provocado con la radiación.

### 3.2.5 Inclusión de productos de protección solar comerciales sobre las muestras de piel

Como consecuencia de haber demostrado que una variable eléctrica en la piel responde al efecto de la radiación UVB y que ésta puede relacionarse como un indicador de daño al tejido de manera cuantitativa, el siguiente planteamiento fue utilizar el mismo desarrollo metodológico para confirmar que la variable respuesta sigue siendo sensible a la alteración causada por la radiación, ahora con la incorporación de productos de protección solar de los cuales se esperaba que evitaran el cambio en la variable  $R_{mem}$  proporcionalmente a medida que aumenta su valor de FPS es decir, que mediante sus ingredientes activos, se evitara que la radiación alcanzara el tejido y por lo tanto la variable respuesta se mantuviera inalterada. De esta manera, poder asociar la respuesta de  $R_{mem}$  a la capacidad de protección ofrecida por los protectores solares frente a la radiación UVB. Por lo tanto, la variable  $R_{mem}$  podría denominarse como el primer elemento indicador sensible a la radiación que potencialmente brinda información sobre los efectos a largo plazo, o la no ocurrencia de estos cuando existe protección.

Para esto, se utilizaron los productos comerciales descritos en la tabla 3-2, con protección solar declarada mediante diferentes valores de FPS: 10, 20, 30, 50 y 70. De estos se aplicó una cantidad definida en todos los casos de  $2 \text{ mg/cm}^2$  que corresponde a lo descrito por la normatividad vigente para evaluación *in vivo* del FPS. Para este procedimiento, se retiró cuidadosamente del montaje estandarizado, la solución de trabajo ubicada en el compartimento donador de la celda de Franz y se aplicó el respectivo producto mediante una microespátula acondicionada para evitar afectar la muestra de piel y el montaje mismo. A continuación, se añadieron  $50 \mu\text{L}$  de la misma solución de trabajo con el objetivo de evitar la posibilidad de secado de la membrana de piel, y mantener las condiciones de exposición definidas previamente; para mayor claridad, la figura 3-2 muestra una representación de este montaje. Es importante señalar que el diseño de este estudio incluye experimentos de control tales como, el experimento sin ningún producto de protección (es decir solo la solución de trabajo) que se tomó como referencia y se llamó "PBS"; otro experimento fue con una formulación sin ingredientes activos a la radiación UVB que se denominó "FPS 0" y finalmente, esta misma formulación sin ingredientes activos se incluyó como control del efecto de los excipientes de la formulación, pues no fue expuesta a la radiación UVB pero se mantuvo en condiciones controladas de temperatura durante las mismas 5 horas.

**Figura 3-2:** Representación esquemática del montaje realizado para el estudio con productos de protección solar.



### 3.2.6 Condiciones de radiación de las muestras de piel

La exposición a la radiación en esta etapa fue establecida a un tiempo fijo de 5 horas que equivalen a una energía suministrada de  $180 \text{ J/cm}^2$  (Tiempo final utilizado en los experimentos anteriores). Se realizaron controles de radiación de la misma y se determinó una irradiancia de  $0,01 \text{ W/cm}^2$  a una distancia de  $2 \text{ cm}$ , que corresponde a la distancia utilizada constantemente entre la membrana de la piel y la fuente de luz.

En cuanto a la experimentación, una vez aplicado el producto a evaluar sobre la membrana de la piel y los  $50 \mu\text{L}$  de solución de trabajo, se realizó la exposición en las celdas de Franz directamente, es decir que sólo se desconectaban los electrodos del potencióstato al momento de introducirlas a la cámara de exposición del mismo modo que en la etapa anterior (capítulo 2).

### 3.2.7 Evaluación microscópica de las muestras de piel

En esta etapa también fue utilizada la microscopía óptica como complemento al estudio de las características eléctricas para observar a nivel de su organización estructural, la protección ofrecida por los productos comerciales utilizados, para cada valor de FPS. Las

muestras observadas fueron obtenidas al finalizar la medida eléctrica y se compararon los diferentes tratamientos frente a la referencia (muestra expuesta a la radiación sin ningún producto adicionado). A continuación, a las muestras de piel se les realizó el procedimiento estándar para microscopía, descrito en el capítulo I con tinción hematoxilina y eosina. Adicionalmente, se realizó una coloración adicional con la tinción tricrómica de Masson para visualizar las fibras de colágeno tipo I y IV y poder observar el efecto sobre ellas.

### 3.2.8 Análisis estadístico

Los resultados del estudio de impedancia se expresaron como la media aritmética de los valores obtenidos, junto con la desviación estándar respectiva y correspondían a valores de  $\Delta R_{\text{mem}}$  o  $\Delta C_{\text{eff}}$ . Entre los grupos se analizaron mediante una prueba t de dos colas, suponiendo una varianza igual, y los valores de  $P$  inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Adicionalmente, se realizó una prueba de comparación múltiple (prueba de Tuckey) para establecer entre cuales grupos se encontraban las diferencias estadísticamente significativas. Para esto se utilizó el software RWizard® cuyos algoritmos involucran las pruebas de hipótesis para la verificación de la bondad del ajuste.

### 3.2.9 Modelamiento matemático

Una vez realizado el desarrollo experimental planteado y evaluada la validez de los resultados mediante el análisis estadístico, la etapa final del trabajo de investigación consistió en proponer un modelo para describir el comportamiento de la variable respuesta debido al efecto de la radiación UVB y asociarlo con los valores de FPS utilizados. Esto se llevó a cabo a través de una aproximación matemática trigonométrica basada en la construcción de rectas con dos puntos para cada caso estudiado que corresponden al valor de  $R_{\text{mem}}$  en el tiempo inicial y el final; a partir de estas, las pendientes obtenidas para cada valor de FPS utilizado variaban respecto a un vértice de origen que se compara con la pendiente de la referencia (sin producto) construyendo la tangente de las rectas conformando un triángulo. Para esto se tomaron los datos de  $R_{\text{mem}}$  y se procesaron mediante el paquete de software Sigmaplot 12.0, Systat Software INC, California, USA.

### 3.3 Resultados y Discusión

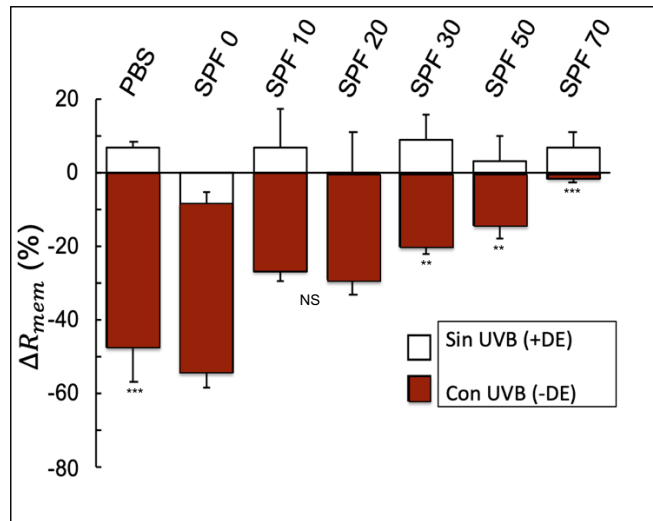
Con los resultados obtenidos de la etapa presentada en el capítulo 2, fue posible establecer las condiciones experimentales que conducen a una reducción evidente y drástica de  $R_{mem}$ , a causa de la exposición a la radiación UVB, induciendo condiciones de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  1,0 mM y  $NaN_3$  10,0 mM. A partir de esto, se corroboró la sensibilidad de la variable respuesta frente al estímulo de la radiación, ahora con la incorporación de productos de protección solar de diferente valor etiquetado de FPS para los cuales se esperaba que la variable  $R_{mem}$  respondiera acorde con el nivel de protección ofrecido, bajo las mismas condiciones de exposición a la radiación UVB. En consecuencia, establecer a esta variable  $R_{mem}$  como un elemento determinante en la detección de alteraciones en el tejido *ex vivo* a causa de la radiación y que a su vez, permitiera distinguir cuando la radiación se ve atenuada antes de alcanzar el sustrato biológico como en el caso de la acción de los filtros incluidos en los productos comerciales utilizados.

Particularmente, mediante EIS se evaluó la idoneidad de la variable eléctrica seleccionada  $R_{mem}$ , como indicador cuantitativo del efecto de la radiación UVB desafiada bajo la misma dosis de radiación pero con diferentes niveles de protección solar que se incluyeron en la experimentación a través de los productos comerciales mencionados en la metodología. Adicionalmente fue evaluada la respuesta eléctrica de la piel en cuanto a su  $C_{eff}$  con la inclusión de estos productos y se complementó con la observación microscópica de las características estructurales de las muestras de piel. Las formulaciones utilizadas presentaban diferentes valores de FPS etiquetado y era de nuestro interés establecer, si con la metodología desarrollada, la variable eléctrica tenía la sensibilidad necesaria para discriminar entre estos valores y en ese mismo sentido, confirmar que es una variable que responde selectivamente al efecto de la radiación UVB, para así proponer esta alternativa de estudio como una proyección futura del entendimiento del efecto de la radiación a partir de los cambios eléctricos presentados en un tejido y que posiblemente sea un desencadenante de los demás efectos deletéreos a largo plazo.

Los resultados de esta evaluación mostraron una vez más, que la combinación de radiación UVB y estrés oxidativo provocado por  $NaN_3$  y  $H_2O_2$  resulta en una disminución significativa de  $R_{mem}$  (Valor  $P$  0,0001), es decir que el cambio respecto al valor inicial es definitivo como se observa en la figura 3-3 y que solo se presenta cuando se incluye la

exposición a la radiación. Además, esta figura muestra que en el caso del sistema de referencia asignado como “PBS” es decir que no contenía ninguna formulación adicional, bajo las condiciones establecidas mantiene un porcentaje de cambio de la variable respuesta de  $48 \pm 9\%$ , como se presentó en el capítulo 2, es decir, que luego de 5 horas de exposición a la radiación UVB (equivalente a  $180 J/cm^2$ ) este cambio es el máximo alcanzado.

**Figura 3-3:** Evaluación de la respuesta eléctrica mediante  $\Delta R_{mem}$  cuando se incluyen productos fotoprotectores de diferente valor de FPS bajo una dosis de radiación UVB fija.



Los datos corresponden al valor promedio de  $n=3$  y las barras de error muestran la desviación estándar (DE).

Continuando con el análisis, para el siguiente grupo de muestras se encontró que, utilizando el producto denominado crema FPS 0 y exponiendo las muestras a la dosis de radiación UVB fijada, se incrementa la pérdida de resistencia comparado con el caso donde no se utilizó ningún producto, es decir generó un daño mayor que se vio reflejado en una mayor pérdida de la resistencia ( $54 \pm 4\%$ ). Esto concuerda con evaluaciones realizadas por otros autores, donde la aplicación de emulsiones o/w sobre la piel de humanos voluntarios sin ningún filtro condujo a un incremento en la transmisión de la luz UV a través de la epidermis cercano a un 20% es decir, cambiaron las propiedades ópticas de la piel (Lademann et al., 2004). Analizando dicho efecto encontramos que, esta crema con su composición oleosa brinda una humectación al estrato córneo, haciendo que esta capa no homogénea de células aplanadas se hinche y se haga un poco más uniforme, entonces la

dispersión de la luz a través de ellos se disminuye y la radiación pasa más directamente hacia la epidermis.

En el caso de las cremas con filtros, aunque se espera que ocurra también el efecto de humectación, los componentes activos interaccionan con la radiación y evitan en mayor o menor medida (dependiendo su FPS) que la radiación alcance la piel y, por tanto, evitan el cambio en la variable respuesta  $R_{mem}$ , que demuestra ser significativamente sensible al estímulo de la radiación UVB. Como se observa en la figura 3-3, hay una tendencia de disminución del cambio sobre la variable respuesta a medida que aumenta el valor de FPS, por ejemplo, se encuentra que con el FPS 20 el porcentaje de cambio en la variable respuesta fue de  $29 \pm 4\%$ , para el caso del FPS 30, el cambio en la variable fue del  $20 \pm 2\%$ , para el protector FPS 50 correspondió a  $14 \pm 3\%$  y finalmente para el FPS 70 fue de  $2 \pm 1\%$ . Esto demuestra en primera medida que la variable eléctrica seleccionada responde selectivamente a la radiación que alcanza la piel pues como se revisó al inicio de este capítulo a medida que aumenta el FPS menos cantidad de radiación llega a la piel (Osterwalder and Herzog, 2010, 2009). Entonces, cuando el valor de FPS fue más alto, menor fue el cambio para  $R_{mem}$ , es decir, bajo las mismas condiciones de exposición a la radiación, una mayor protección hizo que se mantuviera menos alterada en el tiempo de observación. En ese mismo sentido, estos resultados demuestran que la metodología desarrollada es adecuada para que la variable respuesta permitiera distinguir entre diferentes valores de protección solar, mediante una medida directa y cuantitativa.

En cuanto a la significancia estadística, se encontró que, bajo las condiciones metodológicas establecidas, la variable  $R_{mem}$  no mostró una respuesta significativamente diferente para la protección ofrecida por los productos con FPS 10 y 20 (valor  $P > 0,05$ ) por lo que se podría establecer que en estos casos, donde la protección ofrecida es la más baja dentro de lo evaluado, la radiación que alcanza la piel genera los mismos efectos sobre la variable respuesta encontrando limitaciones a la hora de discriminar entre ellos. En el resto de los casos si fue posible establecer diferencias significativas (valor  $P < 0,05$ ) de la respuesta de  $R_{mem}$  para cada valor de FPS, lo que redunda en la idoneidad de la variable encontrada para responder a diferentes niveles de radiación alcanzada en la piel.

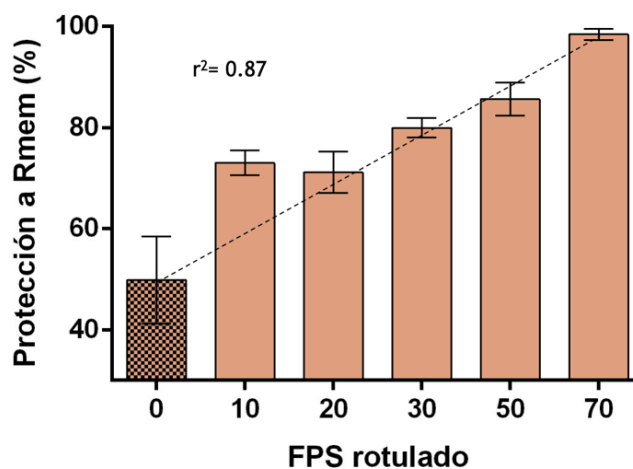
Este resultado demuestra además que, desafiando la sensibilidad de la variable  $R_{mem}$  mediante la inclusión de productos que modifican la hidratación de las membranas de piel,

continúa respondiendo efectivamente a variaciones en el estímulo recibido, lo que indica que la transferencia de iones a través de la piel sólo se ve afectada si se producen cambios estructurales como los que se ha demostrado que se producen con la exposición a la radiación UVB. Como consecuencia de este entendimiento, es posible direccionar el estudio del efecto de la radiación sobre la piel como un desequilibrio de las características eléctricas del tejido que, al provocarse, hacen que probablemente, la radiación se encuentre más disponible a nivel celular para desencadenar todos los efectos nocivos ya descritos previamente. Otra consecuencia asociada al estudio a nivel eléctrico es que eventualmente, esta metodología podría ser aplicada en la determinación *in vitro* de la protección solar de manera alternativa, ya que permite establecer de manera cuantitativa el efecto de la radiación UVB cuando se asocia a la cantidad de energía que alcanza la piel teniendo como valores estimados de protección los encontrados en este trabajo a través del cambio encontrado en la variable  $R_{mem}$ , siendo posible incluir en la evaluación productos cuya composición involucra filtros inorgánicos con resultados consistentes y reproducibles, lo cual no ha sido posible alcanzar con las otras metodologías *in vitro* conocidas hasta la fecha.

Haciendo una extrapolación de lo que significaría el menor cambio observado en la variable  $R_{mem}$  a medida que aumenta el valor de FPS de los productos utilizados, es decir, el porcentaje que se mantuvo inalterada la variable respuesta en función del valor de FPS utilizado como se representa en la figura 3-4, se encontró que si existe una relación consistente, pues como se observa, a medida que aumenta el valor de FPS da como resultado una mayor conservación de la condición inicial de  $R_{mem}$  que se traduce en menores cambios (un  $\Delta R_{mem}$  menor) y esto a su vez, en que se mantiene en mayor medida la integridad de la membrana, a partir de la misma dosis de radiación y bajo el mismo tiempo de observación evaluado. Esta conclusión está respaldada por el análisis de regresión realizado para las muestras que fueron expuestas a la radiación UVB ( $r^2 = 0,87$ ), resaltando que la variable  $R_{mem}$  responde proporcionalmente al cambio de la radiación UVB recibida que se modificó a través de los diferentes valores de FPS de los protectores solares. Por consiguiente, los resultados ilustran claramente que la variable  $R_{mem}$  bajo las condiciones experimentales propuestas, responde eficiente y selectivamente a diferentes niveles de radiación UVB que alcanzan la piel y es un indicativo de que es un parámetro efectivo para estudiar el fenómeno que desencadena el desequilibrio estructural y a partir de este, los demás efectos ya descritos a largo plazo.



**Figura 3-4:** Efecto de inclusión de productos de protección frente a la radiación UVB con diferente FPS sobre la respuesta de la variable eléctrica  $R_{mem}$  como indicador de protección.

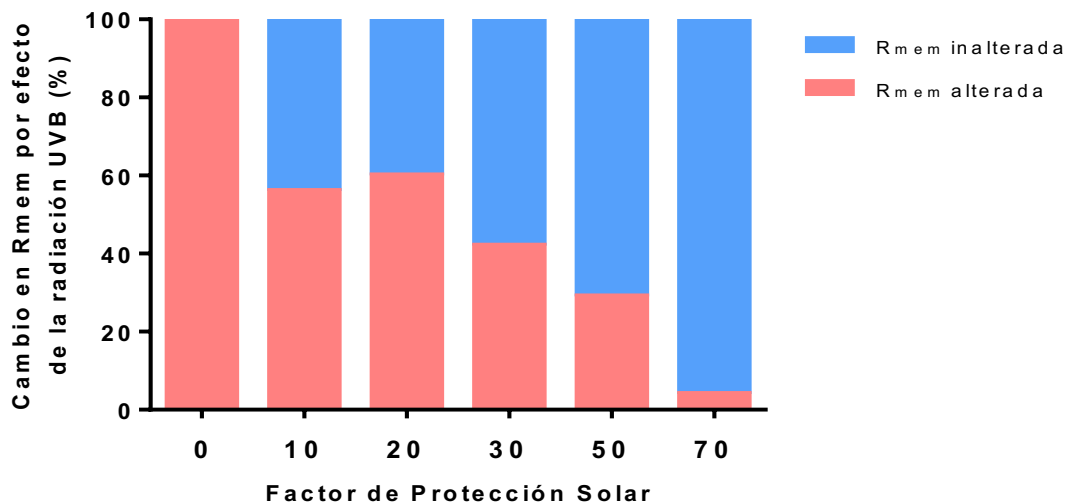


Los datos corresponden al valor promedio de  $n=3$  y las barras de error muestran la desviación estándar (DE).

Considerando ahora un escenario en el que el máximo daño alcanzado después de 5 horas de radiación UVB es el encontrado en el ensayo de la referencia en PBS donde el cambio en la variable  $\Delta R_{mem}$  fue de 48%, sería posible establecer una escala que represente la protección real frente al cambio en la variable, que brindaron los diferentes productos a partir de este 100% de daño posible. En este sentido, se proyectó una ampliación en el rango de respuesta evaluado con el fin corroborar la sensibilidad que muestra la variable  $R_{mem}$  para detectar cualquier cambio en la cantidad de radiación recibida en la piel. Entonces, para el caso del producto con FPS 10, cuyo  $\Delta R_{mem}$  fue alrededor de 27% comparado con el máximo daño posible (48% como el 100%), resulta una protección del 44% para esa exposición respecto a si no se usara ninguna protección. Para el caso del producto con FPS 20 esta protección sería del 40%, para el de FPS 30 sería del 58%, para el de FPS 50 sería del 71% y para el de FPS 70 sería del 96%. En estos términos de protección, resulta interesante notar como a medida que aumenta el valor de FPS, el cambio en la variable es más pequeño, pues se reduce la posibilidad de afectar la respuesta de  $R_{mem}$  y esta se mantiene cercana al valor registrado inicialmente, lo que significa que la radiación que alcanzó a llegar a la piel fue menor y la integridad fue menos

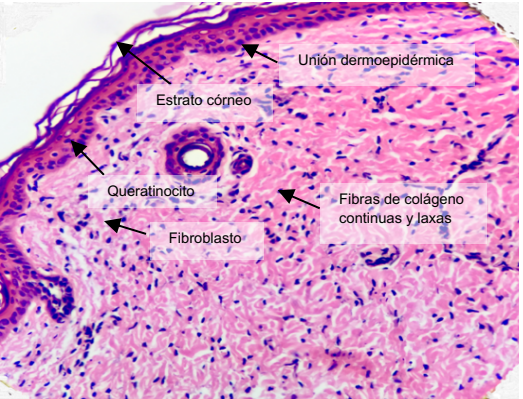
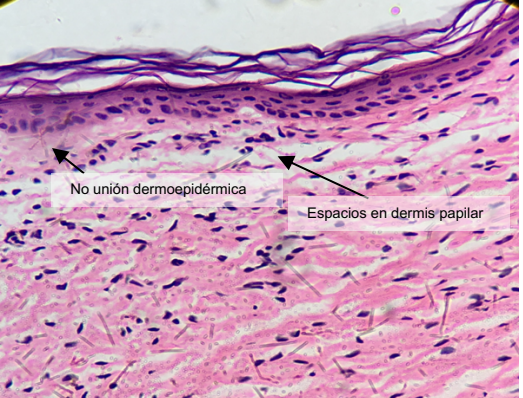
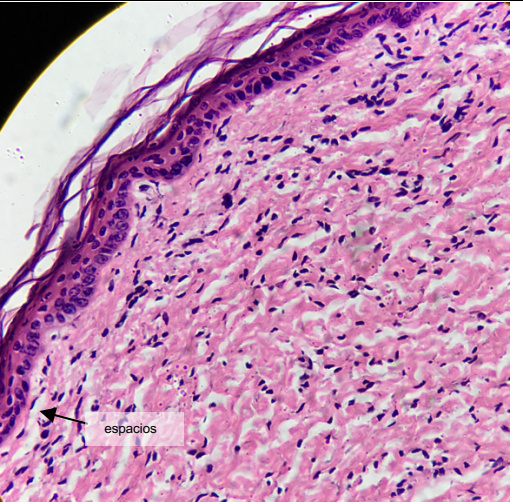
afectada. Sin embargo, es de resaltar que en todos los casos ocurren cambios sobre la variable respuesta asociados a la radiación (dosis de  $180 \text{ J/cm}^2$ ) como se representa en la figura 3-5, lo que ratifica la sensibilidad de la variable para detectar pequeñas cantidades de radiación sobre el tejido incluso en casos donde se presume una protección solar alta, detectando que esa energía que puede alcanzar la piel interactúa con las estructuras generando afectación incluso mínima. Esta afirmación estaría en concordancia con lo que se ha reportado para la evaluación del FPS *in vivo* donde han encontrado también, que a pesar de tener productos con FPS mayores a 50, considerados como protección alta, hay energía en forma de fotones que si alcanzan la piel y no pueden ser filtradas del todo por los productos fotoprotectores (Osterwalder and Herzog, 2010).

**Figura 3-5:** Ilustración de la respuesta de la variable  $R_{\text{mem}}$  frente a una dosis fija de radiación UVB al usar protectores solares con diferente valor de FPS.



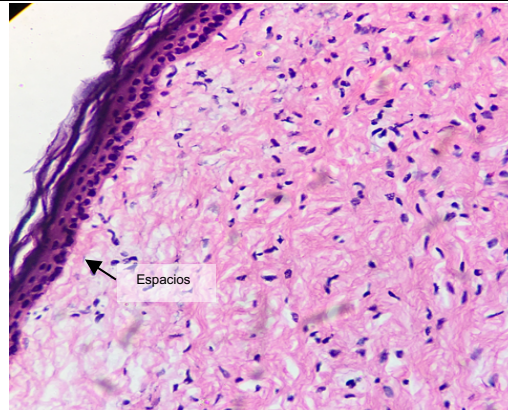
Dando continuidad al análisis complementario de los resultados obtenidos mediante EIS, en la tabla 3-3, se presentan las microfotografías tomadas del control histológico realizado que permitieron corroborar que si existe una correspondencia entre la integridad estructural observada y la respuesta de la variable  $R_{\text{mem}}$  frente a la energía que recibe el tejido, la cual fue modificada por los protectores solares utilizados, de acuerdo con los diferentes valores de FPS a pesar de que las muestras estuvieron expuestas a la misma dosis de radiación ( $180 \text{ J/cm}^2$ ). En el caso de la muestra con crema FPS 0 es evidente el daño sobre algunas estructuras que refleja el mayor efecto sobre la variable  $R_{\text{mem}}$  encontrado.

**Tabla 3-3:** Microfotografías de piel de cerdo *ex vivo* expuestas a la radiación UVB durante 5 horas y tratadas con cremas de diferente FPS.

<p><b>Muestra de piel en estado inicial</b></p> <p>Se observan los estratos de la piel bien diferenciados, el estrato córneo es continuo y los queratinocitos son redondos, con núcleo definido y eucromáticos. La unión dermoepidérmica es clara y continúa así como el tejido conjuntivo de la dermis, es laxo y con alta presencia de fibroblastos.</p>	 <p>Unión dermoepidérmica</p> <p>Estrato córneo</p> <p>Queratinocito</p> <p>Fibroblasto</p> <p>Fibras de colágeno continuas y laxas</p>
<p><b>Muestra de piel con crema FPS 0</b></p> <p>En este caso, las estructuras se ven afectadas en su organización y definición, la dermis papilar no se distingue y aparecen espacios muy pronunciados en el tejido conjuntivo, así como la pérdida de continuidad de las fibras.</p>	 <p>No unión dermoepidérmica</p> <p>Espacios en dermis papilar</p>
<p><b>Muestra de piel con crema FPS 10</b></p> <p>Se observa una buena apariencia de estructura, definición de los estratos y queratinocitos redondeados y eucromáticos, algunos en etapa de diferenciación. La unión dermoepidérmica es constante y en la dermis todas las fibras se ven organizadas horizontalmente y de apariencia laxa, aunque se presentan algunos espacios que podrían sugerir daños debidos a la radiación UVB, teniendo en cuenta que es el nivel de protección más bajo.</p>	 <p>espacios</p>

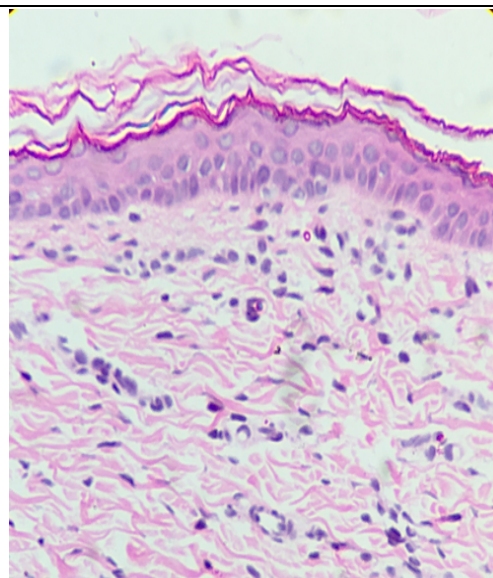
#### Muestra de piel con crema FPS 20

Este caso es similar al anterior pues se observan en general las estructuras bien definidas en toda la epidermis y dermis, así como algunos espacios en el tejido laxo que podrían sugerir algunos daños debidos a la radiación UVB. Es importante recordar que no vimos diferencias significativas entre este y el anterior a nivel de la variable respuesta eléctrica.



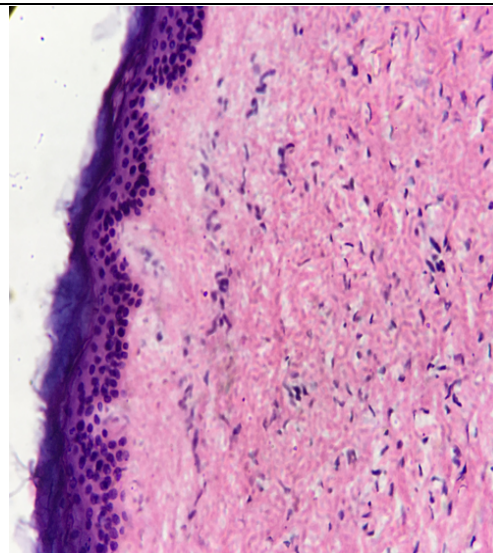
#### Muestra de piel con crema FPS 30

Aquí se observan las estructuras de la piel en buen estado, estratos bien diferenciados, el estrato córneo es continuo y las células de la epidermis se ven redondeadas, aunque se sugiere una falla en la tinción que no permite ver con claridad cada uno de los componentes. El tejido conjuntivo de la dermis, es laxo, de fibras continuas y definidas, también con alta presencia de fibroblastos. Por lo anterior, esta microfotografía sugiere un buen estado en general pese a la exposición a la radiación.

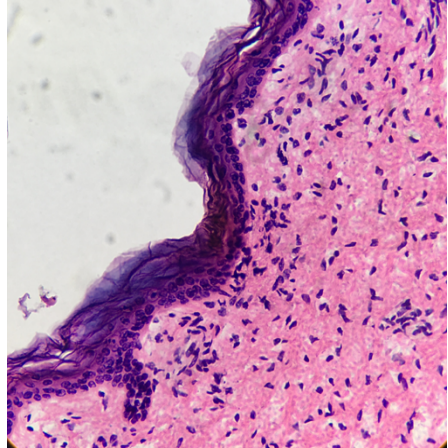
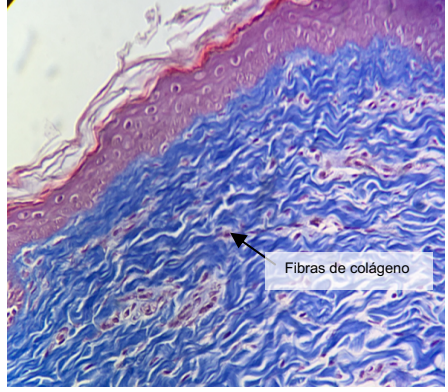


#### Muestra de piel con crema FPS 50

Para este nivel de protección es evidente que se mantienen definidas las características descritas en la muestra inicial, en cuanto a forma y organización, la unión dermoepidérmica está bien definida y en la dermis, se observa una estructura ordenada y definida de las fibras de colágeno y elásticas que la conforman. Se puede afirmar que histológicamente no hay indicativos de daño y que se mantiene en mayor medida la integridad de las estructuras de la piel.





<p>Muestra de piel con crema FPS 70</p> <p>Del mismo modo que en el caso anterior se observa una adecuada protección frente a la radiación UVB suministrada a las muestras. Estructuras definidas y organizadas, así como continuidad en las fibras de colágeno y elásticas de la dermis. Se puede afirmar que histológicamente no hay indicativos de daño y por el contrario, se conservan muy bien las estructuras de la piel.</p>	
<p>Muestra de piel con crema FPS 70 con tinción tricrómica de Masson.</p> <p>Para corroborar lo observado en la tinción H/E se incluyó esta muestra para realizar una tinción de Masson especial para colágeno, que evidencia las fibras de colágeno bien definidas, alargadas y continuas soportando la alta protección de este producto sobre el tejido, frente a la radiación UVB.</p>	

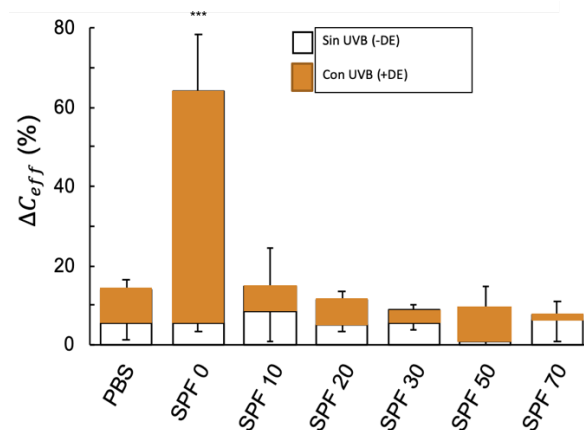
Corte transversal de las muestras con tinción hematoxilina/eosina (H/E) bajo el aumento de 40X. La muestra FPS 70 incluye además una tinción tricrómica de Masson.

En general, para las muestras evaluadas con los productos de protección solar, se pudo observar histológicamente que si hay un control de la energía suministrada que hace que no toda llega a la piel durante el tiempo de exposición evaluado y que por lo tanto no afecta ninguna de las estructuras susceptibles al daño como lo son principalmente, queratinocitos del estrato basal y granuloso, la unión dermoepidérmica y el tejido conjuntivo (fibras de colágeno y elastina) de la dermis papilar. Se podría pensar que esos productos de protección solar con valores de FPS superiores a 30 permiten una adecuada protección entre otras cosas porque como se observó en la tabla 3-2, presentan una amplia composición de filtros tanto orgánicos como inorgánicos que amplían el espectro de absorción y por tanto de protección. Estos resultados fueron consecuentes con lo encontrado a través de la variable respuesta  $R_{mem}$  pues a medida que aumentó el valor de

FPS los cambios encontrados eran menores, es decir se mantenía la resistencia asociada a la integridad de las estructuras.

Respecto a las características eléctricas de la piel, aun cuando se seleccionó la  $R_{mem}$  como variable respuesta sensible al estímulo provocado por la radiación UVB a partir de los resultados del capítulo 2, se decidió evaluar también el efecto de los productos de protección solar incluidos en esta etapa sobre la capacitancia de las muestras de piel ( $C_{eff}$ ), con el fin de evaluar si dicha inclusión generaba algún efecto sobre la acumulación de la carga típica de un dieléctrico. Los resultados de esa parte se presentan en la figura 3-6 a continuación.

**Figura 3-6:** Evaluación de la respuesta eléctrica mediante  $\Delta C_{eff}$  cuando se incluyen productos fotoprotectores de diferente valor de FPS bajo una dosis de radiación UVB fija.



Los datos corresponden al valor promedio de  $n=3$  y las barras de error muestran la desviación estándar (DE).

Como era esperado de acuerdo con los resultados del desarrollo metodológico, la capacitancia de las muestras de piel se mantuvo prácticamente inalterada luego de la exposición a la radiación UVB en condiciones de estrés oxidativo, ahora con la inclusión de productos fotoprotectores. Posterior a la exposición, dicha variable no aumentó más del 10% comparada con el valor inicial en ninguno de los casos con productos protectores de FPS entre 10 y 70, del mismo modo que en el caso de la referencia denominada PBS sin diferencias significativas al compararlas contra ésta (todos los valores  $P$  fueron  $> 0,05$ ). Al comparar el incremento inicial (sin UVB) que se presenta en todos los casos, con los

cambios presentados tras la exposición a la radiación UVB se determinó que no hay diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), recordando que este cambio inicial es atribuido principalmente a los procesos de hidratación y estabilización de las membranas de piel como ya ha sido reportado previamente (Björklund et al., 2013c). Por lo tanto, se confirmó que esta variable no se ve influenciada ni por la radiación ni por la inclusión de productos fotoprotectores. En el único caso en el que se encontró un aumento significativo de  $C_{\text{eff}}$  fue en el grupo de muestras a las que se les aplicó la “crema” sin filtros es decir la que se denominó FPS0, donde los valores  $P$  estuvieron entre 0,002 y 0,008 para las comparaciones con cada uno de los otros tratamientos. Una de las consideraciones planteadas para este resultado es que la crema produce un efecto hidratante considerable asociado a la fase oleosa que hace que las propiedades de la piel cambien, sus estructuras se hagan más homogéneas como se discutía anteriormente respecto a la variable  $R_{\text{mem}}$  y por lo tanto, pueda comportarse como un sistema de almacenamiento de carga que no presenta variaciones a pesar de ser expuesto a la radiación. Retomando la discusión a este respecto en el capítulo anterior, es relevante comprender la fuente de las corrientes capacitivas de la membrana de la piel, que generalmente se atribuye a la naturaleza dieléctrica de las estructuras lamelares lipídicas que pueden acumular corrientes capacitivas al bloquear el transporte de iones (Björklund et al., 2013c; Kalia and Guy, 1995). Por lo tanto, si los valores de  $C_{\text{eff}}$  presentan cambios, estos reflejan alteraciones de la matriz lamelar lipídica del estrato córneo (principalmente) y, por lo tanto, estos dominios se ven afectados como ocurrió en el caso del tratamiento con la crema FPS 0, después de la radiación UVB bajo estrés oxidativo inducido, que particularmente, fue también el caso donde se observó el cambio más grande en la variable  $R_{\text{mem}}$ . Es importante destacar que este efecto solo ocurrió en presencia de la radiación UVB, pues en el caso del control donde se aplicó la crema sin exposición a la radiación, no se presentaron cambios significativos, lo cual implica que el aumento de  $\Delta C_{\text{eff}}$  probablemente esté relacionado con la combinación de radiación UVB y algún componente de esa emulsión de tipo aceite en agua. Bajo esta premisa se ha encontrado un estudio que utiliza la radiación UVB en el tratamiento de enfermedades de la piel, específicamente en casos de psoriasis severa y que reporta haber mejorado significativamente la eficacia del tratamiento al utilizar aceite mineral sobre la piel previo al tratamiento, reduciendo las placas blancas, lo cual es asociado a que el aceite penetra los espacios intercelulares permitiendo una adaptación óptica que aumenta la transmisión de la luz (Penven et al., 2005). Por lo tanto, es posible

que el aumento significativo de  $\Delta C_{\text{eff}}$  observado en la Figura 3-6 esté relacionado con la composición oleosa de la crema utilizada, en combinación con el tratamiento UVB.

Al analizar los datos de impedancia en términos de resistencia ( $\Delta R_{\text{mem}}$ ) y capacitancia ( $\Delta C_{\text{eff}}$ ) es pertinente mencionar que como se definió inicialmente para el circuito que describe la piel, son variables independientes la una de la otra y para el caso particular, estas son variables que responden completamente diferente frente al estímulo de la radiación UVB y en este mismo sentido, la sensibilidad que presenta cada una no es comparable, como se demostró tras la inclusión de los productos evaluados activos frente a la radiación. La resistencia de las membranas de piel es definitivamente una variable que responde a la radiación UVB en condiciones de estrés oxidativo, respuesta caracterizada por una pérdida progresiva de la resistencia de la membrana en función del tiempo de exposición y particularmente de la cantidad de radiación recibida. Por esta razón, permite responder a pequeños estímulos provocados por la cantidad de radiación que alcanza a la piel como en el caso de utilizar productos de diferentes valores de FPS, para interferir con la radiación total suministrada y cuyo efecto protector se refleja en la conservación de dicha resistencia, es decir en evitar el cambio de la variable. La capacitancia por su parte no responde de manera consistente a la dosis de radiación UVB y por lo mismo, no permite diferenciar entre distintos estímulos de radiación alcanzada.

En síntesis, la metodología desarrollada es una propuesta innovadora para entender el fenómeno de la radiación UVB sobre la piel, utilizando por primera vez como variable respuesta al estímulo de la radiación, una característica biofísica de la piel que hace parte del conjunto biológico que resulta afectado, como lo es su resistencia eléctrica ( $R_{\text{mem}}$ ) y la cual, puede considerarse un indicador selectivo del daño causado. Mediante condiciones inducidas de estrés oxidativo, ésta variable responde consistentemente al estímulo de la exposición a UVB y a las atenuaciones de esta, generadas por la utilización de los protectores solares con diferentes valores de FPS. Este hallazgo confirma además, que si existe una diferencia entre los valores de FPS y la cantidad de radiación que alcanza a la piel y que puede ser determinada cuantitativamente mediante esta variable respuesta pues en todos los casos evaluados respondió a la presencia de la radiación, a mayor valor de FPS menores fueron los cambios encontrados en la variable  $R_{\text{mem}}$  y consecuentemente, es porque menor cantidad de radiación alcanza la piel, lo que se traduciría en que a partir de ese FPS mayor, disminuye la probabilidad de que la radiación recibida llegue a la piel, generando una protección por más tiempo que es lo que se esperaría teniendo en cuenta



que el efecto de la radiación es acumulativo y que entre menos radiación alcance la piel, menores serán los efectos nocivos, reduciendo la posibilidad de presentar problemas de salud asociados a la radiación.

Como se discutió en el capítulo 2, la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIS) ha mostrado ser una herramienta útil en el estudio de diferentes fenómenos que involucran transferencia de electrones y en especial reacciones electroquímicas. Por ejemplo, en el campo de la protección solar se ha empleado EIS para determinar el efecto protector de agentes activos frente a la radiación como  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  mediante un sensor electroquímico, demostrando con sus resultados cuantitativos la pertinencia de la herramienta para este tipo de determinaciones. Particularmente, el estudio realizado por Mousavisani y colaboradores, evaluó mediante un sensor electroquímico de ADN, el daño producido sobre el gen supresor tumoral P53 que es el más afectado por la radiación UV, a través de los cambios observados en la resistencia a la transferencia de carga causada por una reacción de óxido - reducción. Al incluir los agentes de protección sobre una membrana de piel de cerdo y ésta a su vez sobre el sensor electroquímico, se evidenció un significativo aumento de la resistencia a la transferencia de carga que representa una protección al daño sobre el ADN (Mousavisani et al., 2019). Esto se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo pues a través de la EIS, se logró demostrar que, con una evaluación directa de las características eléctricas de la piel, existe una respuesta sensible al estímulo de la radiación UVB cuantificable mediante la  $R_{\text{mem}}$  que, además, discrimina entre diferentes niveles de radiación que alcanzan la piel, provocados por la inclusión de agentes protectores solares que filtran en diferente medida la radiación recibida. Esta aplicación de EIS ofrece ventajas como experimentación sencilla, procesamiento rápido y económico.

En consecuencia, haber desarrollado una metodología adecuada que permitiera detectar cambios a nivel eléctrico en el modelo de piel de cerdo causados por la radiación UVB y que la variable respuesta desafiada con la inclusión de los protectores solares haya demostrado su alta sensibilidad y selectividad frente al efecto de la radiación, eventualmente podría considerarse como una alternativa en la evaluación de productos de protección solar. Esto pensando en que es posible obtener una medida cuantitativa del efecto de la radiación sobre la respuesta eléctrica de la piel a través de la variable  $R_{\text{mem}}$  y que por tal razón, pueden dejar de considerarse algunas variables que se han reportado como relevantes en las metodologías *in vitro* alternativas que han sido propuestas hasta

la fecha y que afectan la reproducibilidad en la determinación del FPS, tales como los excipientes que contiene el producto y la afinidad que éstos le proporcionan al producto por la superficie de la piel, es decir, el tipo de emulsión (Sohn et al., 2014), la distribución del espesor de la película de producto formada sobre la piel (Sohn et al., 2016b) e incluso el coeficiente de reparto de los filtros en cada fase de la emulsión dependiendo el tipo de formulación (Sohn et al., 2016a). Esto nos lleva a pensar que el haber descubierto como variable respuesta una característica biofísica de la piel en condiciones de estrés oxidativo, extiende la frontera del conocimiento en este campo ya que se evalúa el efecto de la radiación UVB sobre el sustrato directamente y además, puede ser aplicada en la evaluación de la protección ofrecida por los protectores solares no solo de manera cuantitativa, sino que resulta ser una metodología sensible y robusta para este tipo de determinaciones.

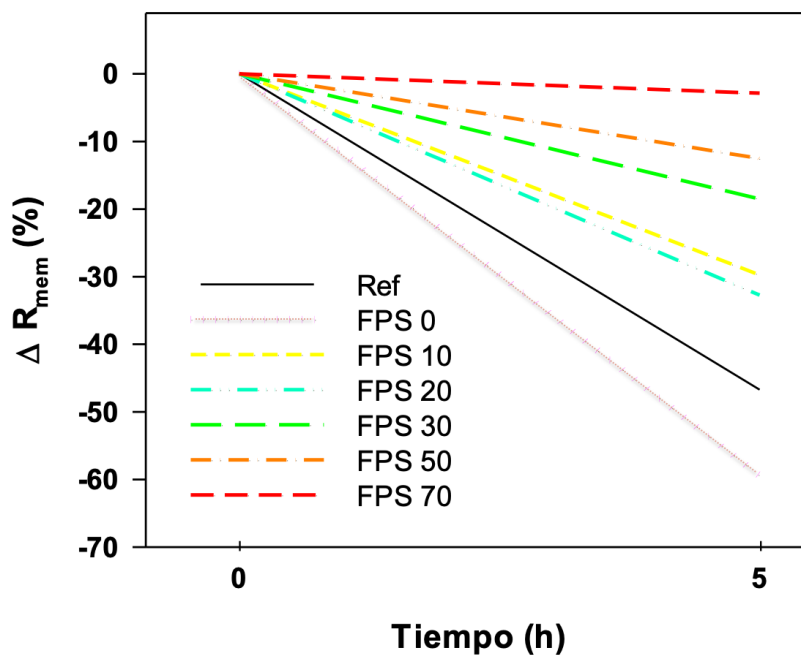
Continuando con el planteamiento de la investigación, una vez demostrado que la variable responde a variaciones en la radiación recibida por la piel bajo la influencia de productos de protección solar, se propuso la construcción de un modelo matemático de correlación que mostrara la asociación entre la respuesta de la variable  $R_{mem}$  y los diferentes niveles de protección utilizados en el estudio.

Para tal fin, se tomaron los datos del cambio en la variable respuesta asociados a cada producto de protección utilizado y con base en los resultados del análisis estadístico, donde se demostraron las diferencias entre cada grupo de tratamiento, se propuso describir el comportamiento de la variable eléctrica como el resultado de un cambio entre el tiempo cero y el tiempo final del ensayo (5 horas de exposición) mediante un sistema de rectas que varían su posición respecto a un vértice de origen, es decir mediante el cambio en sus pendientes.

Como se demostró previamente, mediante una dosis de radiación UVB fija fue posible establecer la respuesta de la variable  $R_{mem}$  bajo diferentes condiciones. A partir de los resultados obtenidos en las muestras sin ningún tipo de protección (en la figura 3-3 llamada PBS), se construye una recta de referencia con los valores medios de  $\Delta R_{mem}$ , que como se estableció previamente, corresponde a una pérdida de la resistencia del 48%; con esta referencia, se realizó una comparación de los cambios encontrados para cada valor de FPS evaluado. En este sentido, para relacionar dos pendientes se utilizó una construcción matemática con la tangente de las rectas, creando así, una correlación entre los valores

de cambio de  $R_{mem}$  y valores etiquetados de FPS de productos comerciales que se entiende, fueron determinados mediante el método *in vivo*. Como se observa en la figura 3-7, sobre el plano cartesiano se representó una recta para cada nivel de protección, donde todas parten del origen cuando el tiempo de exposición es cero y dependiendo del cambio detectado a las 5 horas de exposición (punto final del ensayo), varían su ángulo de apertura.

**Figura 3-7:** Representación cartesiana de los cambios presentados en la variable respuesta  $\Delta R_{mem}$  mediante las pendientes obtenidas por el uso de diferentes niveles de protección solar.



En esta gráfica se puede observar que a medida que aumenta el valor de FPS, las rectas obtenidas para cada  $\Delta R_{mem}$  en las muestras de piel tienen un ángulo de apertura mayor con respecto a la línea de referencia, por ejemplo en el caso del FPS 10, el ángulo de apertura es evidentemente menor que el obtenido para el FPS 70 desde la referencia. Aquí también se puede observar lo obtenido con la crema sin protección ó de FPS 0 que como se discutió previamente, presentó un  $\Delta R_{mem}$  mayor superando la recta de referencia.

Ahora bien, teniendo en cuenta la inclinación de estas rectas debido al  $\Delta R_{mem}$ , se construyó un modelo matemático basado en las pendientes obtenidas, que relacionan el valor de cambio de la variable respuesta con los diferentes niveles de protección estudiados. De esta manera, mediante la ecuación 3-4 se obtiene el ángulo entre dos rectas sobre un mismo plano y que relaciona los valores de sus pendientes:

**Ecuación 3-4:** Determinación de la tangente del ángulo entre 2 rectas en el mismo plano

$$\text{Tan } \theta = \frac{m_2 - m_1}{1 + m_2 m_1}$$

Donde  $m_1$  y  $m_2$  son las pendientes de las rectas referencia y la de interés respectivamente:

$$m_1 = \frac{\Delta R_{mem}(ref)}{\Delta t} \quad \text{y} \quad m_2 = \frac{\Delta R_{mem}(FPSx)}{\Delta t}$$

Y para las cuales,

$\Delta R_{mem}(ref)$  = cambio de la variable respuesta en el ensayo de referencia PBS.

$\Delta R_{mem}(FPSx)$  = cambio de la variable respuesta en el ensayo con protector solar para cada valor de FPS utilizado.

$\Delta t$  = cambio en el tiempo de duración del ensayo (5h).

Remplazando en la ecuación 3-4 los valores de  $m_2$  y  $m_1$  se tiene que:

$$\text{Tan } \theta = \frac{\frac{\Delta R_{mem}(FPSx)}{\Delta t} - \frac{\Delta R_{mem}(ref)}{\Delta t}}{1 + \left(\frac{\Delta R_{mem}(FPSx)}{\Delta t}\right)\left(\frac{\Delta R_{mem}(ref)}{\Delta t}\right)}$$

Operando matemáticamente:

$$\text{Tan } \theta = \frac{\frac{\Delta R_{mem}(FPSx) - \Delta R_{mem}(ref)}{\Delta t}}{1 + \left(\frac{(\Delta R_{mem}(ref))(\Delta R_{mem}(FPSx))}{\Delta t^2}\right)}$$

$$\text{Tan } \theta = \frac{(\Delta R_{mem}(FPSx) - \Delta R_{mem}(ref))\Delta t}{\Delta t^2 + (\Delta R_{mem}(FPSx) - \Delta R_{mem}(ref))(\Delta R_{mem}(FPSx))}$$

Con el desarrollo anterior, se llega finalmente a la ecuación 3-5 para el cálculo del valor del ángulo entre las rectas obtenidas:

**Ecuación 3-5:** Cálculo del ángulo de apertura entre 2 rectas en el mismo plano

$$\theta = \text{Tan}^{-1} \left[ \frac{(\Delta R_{mem}(\text{FPSx}) - \Delta R_{mem}(\text{ref}))\Delta t}{\Delta t^2 + (\Delta R_{mem}(\text{ref}))(\Delta R_{mem}(\text{FPSx}))} \right]$$

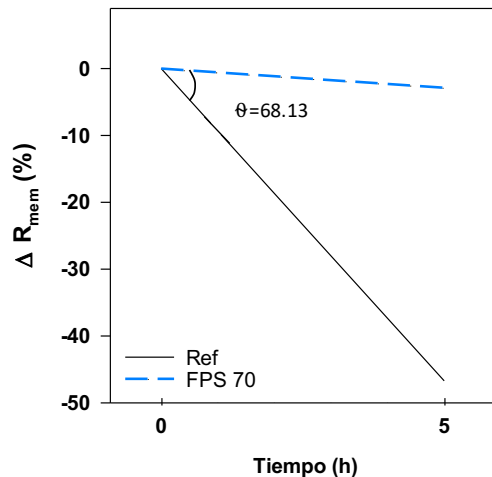
Teniendo en cuenta que los valores de la recta de referencia se conocen  $\Delta R_{mem}(\text{ref}) = 48$  y de  $\Delta t = 5 \text{ h} - 0 \text{ h} = 5 \text{ h}$ , es posible establecer un modelo matemático que describe el comportamiento experimental de los cambios en la variable respuesta  $R_{mem}$  en el modelo de piel de cerdo bajo una dosis fija de radiación UVB, para evaluar la protección de cada formulación con y sin FPS, es el que describe la ecuación 3-6 a continuación:

**Ecuación 3-6:** Cálculo del ángulo de apertura para la protección solar basado en los valores de  $\Delta R_{mem}$  entre la referencia y los productos evaluados

$$\theta = \text{Tan}^{-1} \left( \frac{5\Delta R_{mem}(\text{SPFx}) - 240}{25 + 48\Delta R_{mem}(x)} \right)$$

Aplicando esta ecuación para los casos estudiados, se encuentra por ejemplo que, para el protector solar FPS 70 tras la exposición a la radiación UVB establecida, se obtuvo un ángulo de apertura con respecto a la línea de referencia de  $63.15^\circ$  como se aprecia en la figura 3-8 a continuación:

**Figura 3-8:** Ángulo de apertura obtenido para el mayor nivel de protección evaluado FPS 70.



En ese mismo sentido, se utilizaron los valores experimentales de  $\Delta R_{mem}$  para cada nivel de protección estudiado y junto con el análisis estadístico desarrollado, se calcularon los rangos del ángulo de apertura en los que se podían incluir los diferentes niveles de protección utilizados y para los que el modelo puede establecer un valor de FPS a partir del valor experimental de  $\Delta R_{mem}$ . El resultado de estos cálculos se puede observar en la tabla 3-4 y tabla 3-5.

**Tabla 3-4:** Ángulos de apertura calculados en radianes  $\theta$  (Rad) y grados  $\theta$  ( $^{\circ}$ ) para cada valor experimental de  $\Delta R_{mem}$  en cada nivel de protección FPS.

FPS	$\Delta R_{mem}$ %	$\theta$ (Rad)	$\theta$ ( $^{\circ}$ )	Etiqueta
FPS 0 (1)	59,46	0,19	10,88	FPS 0
FPS 0 (2)	50,85	0,20	11,69	
FPS 0 (3)	50,02	0,21	11,78	
FPS 10 (1)	29,76	0,27	15,61	FPS 10
FPS 10 (2)	26,03	0,30	16,95	
FPS 10 (3)	25,15	0,30	17,32	
FPS 20 (1)	32,73	0,26	14,76	FPS 20
FPS 20 (2)	29,23	0,28	15,78	
FPS 20 (3)	24,53	0,31	17,59	
FPS 30 (1)	22,16	0,33	18,79	FPS 30
FPS 30 (2)	19,41	0,36	20,52	
FPS 30 (3)	18,51	0,37	21,19	
FPS 50 (1)	18,18	0,37	21,45	FPS 50
FPS 50 (2)	12,52	0,49	27,83	
FPS 50 (3)	12,37	0,49	28,09	
FPS 70 (1)	2,88	1,15	66,14	FPS 70
FPS 70 (2)	1,10	1,46	83,65	
FPS 70 (3)	0,72	1,53	87,85	

Con base en estos resultados, se estableció el rango en el cual se encontraría el ángulo de apertura obtenido dependiendo la variación en el  $\Delta R_{mem}$ , es decir, lo que representa cada nivel de protección de acuerdo con lo encontrado experimentalmente para cada valor de FPS y que se resume en la tabla 3-5.

**Tabla 3-5:** Rangos del ángulo de apertura establecidos de acuerdo con los valores experimentales de  $\Delta R_{\text{mem}}$  para determinado valor de FPS

<b>FPS</b>	<b><math>\theta</math> (°)</b>
<b>FPS 0</b>	10,88 – 11,78
<b>FPS 10</b>	15,61 – 17,32
<b>FPS 20</b>	14,76 – 17,59
<b>FPS 30</b>	18,79 – 21,19
<b>FPS 50</b>	21,45 – 28,09
<b>FPS 70</b>	66,14 – 87,85

Este tipo de modelamiento resulta adecuado cuando se tienen datos puntuales del cambio de una variable antes y después de un tratamiento, que para el caso particular, consistió en la exposición a una dosis fija de radiación UVB, sumado a la inclusión de productos de protección solar de diferente valor de FPS que modificaban directamente la cantidad de radiación que llegaba a la piel, es decir que era posible correlacionar la respuesta de la variable con los valores de FPS utilizados mediante la variación en las pendientes obtenidas para cada caso. Otros modelos más complejos como los computacionales, podrían construirse tras la obtención de más datos experimentales que demuestren el comportamiento de la variable a diferentes tiempos de exposición, otras dosis de radiación, otros productos de protección en cuanto a cantidad y composición, entre otras variaciones.

Finalmente, se podría resumir que mediante este modelamiento matemático se estableció la correlación entre la variable respuesta definida y los diferentes valores de FPS. En este sentido, se podría establecer además que con base en el cambio en la variable, es posible extrapolar en términos de tiempo, a cuantas horas de radiación UVB adicionales habría que exponer las muestras con la protección de cada producto utilizado pues la variable fue sensible y reproducible en todos los casos. Por ejemplo, con el cambio obtenido para la protección del FPS 10 se requerirían el doble de horas para generar un cambio como el de las muestras de referencia y en el caso del FPS 70 se requerirían alrededor de 7 veces más las horas utilizadas en la referencia para causar un daño a ese nivel. Esto significa que bajo esas condiciones de exposición, la protección del FPS 70 es 7 veces superior al de FPS 10 siendo coherentes con lo que se ha discutido a lo largo del documento en cuanto a la radiación que alcanza la piel y que es la responsable de los cambios en la variable respuesta.

## 3.4 Conclusiones

Basados en los resultados podemos concluir que:

La variable eléctrica escogida  $R_{mem}$  demostró su idoneidad para evaluar el efecto de la radiación UVB sobre muestras *ex vivo* de piel de cerdo, siendo sensible a cambios en los niveles de radiación recibida, provocados por los diferentes valores de FPS de los productos fotoprotectores utilizados, validando la hipótesis planteada.

La metodología de estrés oxidativo inducido permitió observar el efecto de la radiación UVB sobre la característica eléctrica escogida del sustrato biológico, incluso con la adición de formulaciones cosméticas fotoprotectoras, demostrando ser adecuada, robusta y reproducible.

La variable eléctrica capacitancia no presentó cambios significativos cuando las muestras de piel de cerdo fueron sometidas a una dosis definida de radiación UVB y por lo tanto, no respondió a cambios en la radiación recibida provocados por los diferentes niveles de protección solar utilizados.

Fue posible utilizar la variable eléctrica de respuesta  $R_{mem}$  como indicativo de protección al tejido frente a la radiación UVB, asociado a los fotoprotectores y establecer una correlación con los diferentes niveles evaluados, como el descrito por el modelo matemático desarrollado, que eventualmente podría utilizarse como una evaluación cuantificable en la determinación del FPS.



## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

Los resultados originales obtenidos en esta tesis doctoral permiten concluir que:

Se demostró mediante el seguimiento histológico y la técnica de TEWL que las muestras *ex vivo* de piel de cerdo pueden ser almacenadas hasta 6 meses, bajo las condiciones establecidas de temperatura y medio de conservación manteniendo su integridad para ser utilizadas en investigaciones posteriores.

Se validó la idoneidad del modelo *ex vivo* de piel de cerdo para simular fenómenos asociados a la piel humana mediante la determinación de la actividad enzimática de la catalasa tanto en piel completa (epidermis y dermis) como en estrato córneo, mostrando actividad incluso después del almacenamiento del tejido.

Se desarrolló una metodología *in vitro* novedosa, basada en condiciones de estrés oxidativo inducido, que permitió evaluar el efecto de la radiación UVB sobre las propiedades eléctricas de la piel a través de la Espectroscopía de Impedancia Eléctrica, encontrando esta alternativa metodológica robusta, sensible y reproducible.

Se estableció como variable respuesta al estímulo de la radiación UVB, la resistencia de la membrana ( $R_{mem}$ ) con una correlación significativa en función del tiempo de exposición, y una respuesta sensible a cambios en los niveles de radiación recibida, relacionados con la utilización de productos con diferentes valores de FPS.

Se propuso un modelo matemático que correlaciona los diferentes niveles de protección solar evaluados con la respuesta de la variable  $R_{mem}$ , definiendo una escala de predicción de acuerdo con los valores de FPS utilizados en una evaluación cuantitativa y que podría ser implementada como metodología alternativa en la determinación del FPS.

## 4.2 Recomendaciones

Con el fin de profundizar más en los aspectos desarrollados en el presente trabajo se proponen las siguientes recomendaciones:

Evaluar el efecto de la radiación UVA sobre las características eléctricas e incluso sobre la actividad de catalasa, teniendo en cuenta su importante contribución en la generación de radicales libres y en el envejecimiento acelerado.

Evaluar otros componentes de defensa de la piel frente a la radiación UVB como otras enzimas presentes, agentes no enzimáticos, así como la producción de melanina en respuesta al estímulo generado, que mejore el entendimiento sobre los desequilibrios químicos y energéticos que conllevan a los efectos más nocivos.

Incluir evaluaciones en diferentes tiempos, del comportamiento de la variable respuesta con el uso de protectores solares de diferente valor de FPS con el fin de obtener más información que permita alcanzar un modelo predictivo en un rango amplio.

Desafiar la metodología desarrollada con otros tipos de formas cosméticas que incluyan protección solar, con el fin de determinar futuras aplicaciones, sus ventajas y limitaciones en la asociación de la protección con la respuesta eléctrica del modelo biológico.

# Anexo A: Productividad

## Artículos publicados:

1. Hernández A., Boutonnet M., Svensson B., Butler E., Lood R., Blom K., Vallejo B., Anderson C., Engblom J., Ruzgas T., Björklund S. 2019. New Concepts for Transdermal Delivery of Oxygen Based on Catalase Biochemical Reactions Studied by Oxygen Electrode Amperometry. *Journal of Controlled Release* 306:121–29. Doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.001.
2. Hernández A., Vallejo B., Ruzgas T., Björklund S. 2019. The Effect of UVB Irradiation and Oxidative Stress on the Skin Barrier—A New Method to Evaluate Sun Protection Factor Based on Electrical Impedance Spectroscopy. *Sensors* 19, 2376; doi:10.3390/s19102376.
3. Mousavisani S., Raoof J., Cheung K., Hernández A., Ruzgas T., Turner A. and Mak W. 2019. Integrating an Ex-Vivo Skin Biointerface with Electrochemical DNA Biosensor for Direct Measurement of the Protective Effect of UV Blocking Agents. *Biosensors and Bioelectronics* 128:159–65. Doi: 10.1016/j.bios.2018.12.025.
4. Garay, F., Hernández, A., López, H., Barbosa, H., Vallejo, B. 2018. Design of a Device for Recording Bioelectric Signals with Surface Electrodes, in the Evaluation of the Effect of Ultraviolet Radiation on a Tissue. *Applied Computer Sciences in Engineering*, 428–441. doi:10.1007/978-3-030-00353-1\_38.

## Solicitud de patente:

“Método para determinar el Factor de Protección solar *in vitro*”



## Presentación en congresos:

Poster: Electrical properties from an *ex vivo* tissue pigskin: A new approach to study the effect of UV radiation. Hernández A., Ruzgas T., Björklund S., Vallejo B. 2nd Pan American Conference for Alternative Methods. Agosto 2018, Rio de Janeiro Brasil.



Article

# The Effect of UVB Irradiation and Oxidative Stress on the Skin Barrier—A New Method to Evaluate Sun Protection Factor Based on Electrical Impedance Spectroscopy

Aura Rocio Hernández<sup>1,2,3</sup> , Bibiana Vallejo<sup>1</sup>, Tautgirdas Ruzgas<sup>2,3</sup> and Sebastian Björklund<sup>2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Universidad Nacional de Colombia, Bogota 1101, Colombia; arhernandezc@unal.edu.co (A.R.H.); bmvallejod@unal.edu.co (B.V.)

<sup>2</sup> Department of Biomedical Science, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden; tautgirdas.ruzgas@mau.se

<sup>3</sup> Biofilms—Research Center for Biointerfaces, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden

\* Correspondence: sebastian.bjorklund@mau.se

Received: 17 April 2019; Accepted: 21 May 2019; Published: 23 May 2019



Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)



## Integrating an *ex-vivo* skin biointerface with electrochemical DNA biosensor for direct measurement of the protective effect of UV blocking agents



Seyedeh Zeinab Mousavisani<sup>a,b</sup>, Jahan-Bakhsh Raouf<sup>b</sup>, Kwan Yee Cheung<sup>a</sup>, Aura Rocio Hernández Camargo<sup>c,d,e</sup>, Tautgirdas Ruzgas<sup>c,e</sup>, Anthony P.F. Turner<sup>a,1</sup>, Wing Cheung Mak<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biosensors and Bioelectronics Centre, Department of Physics, Chemistry and Biology (IFM), Linköping University, 58183 Linköping, Sweden

<sup>b</sup> Electroanalytical Chemistry Research Laboratory, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

<sup>c</sup> Department of Biomedical Science, Faculty of Health and Society, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden

<sup>d</sup> Investigación en procesos de transformación de materiales para la industria farmacéutica, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia

<sup>e</sup> Biofilms - Research Center for Biointerfaces, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jconrel](http://www.elsevier.com/locate/jconrel)



## New concepts for transdermal delivery of oxygen based on catalase biochemical reactions studied by oxygen electrode amperometry



Aura Rocio Hernández<sup>a,b,c</sup>, Marine Boutonnet<sup>a,b</sup>, Birgitta Svensson<sup>d</sup>, Eile Butler<sup>e</sup>, Rolf Lood<sup>f</sup>, Kristina Blom<sup>g</sup>, Bibiana Vallejo<sup>c</sup>, Chris Anderson<sup>h</sup>, Johan Engblom<sup>a,b</sup>, Tautgirdas Ruzgas<sup>a,b</sup>, Sebastian Björklund<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biomedical Science, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden

<sup>b</sup> Biofilms - Research Center for Biointerfaces, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden

<sup>c</sup> Department of Pharmacy, Universidad Nacional de Colombia, Bogota 1101, Colombia

<sup>d</sup> Bioglan AB, SE-202 13 Malmö, Sweden




<sup>e</sup> Biogaia AB, SE-223 62 Lund, Sweden

<sup>f</sup> Department of Clinical Science, Lund University, SE-221 84 Lund, Sweden

<sup>g</sup> Medibiome AB, SE-435 43 Pixbo, Sweden

<sup>h</sup> Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, SE-581 83 Linköping, Sweden


## Design of a Device for Recording Bioelectric Signals with Surface Electrodes, in the Evaluation of the Effect of Ultraviolet Radiation on a Tissue

Fabian Garay<sup>1,2</sup> , Aura Hernández<sup>1</sup>, Hans López<sup>2</sup>, Helber Barbosa<sup>1</sup>, and Bibiana Vallejo<sup>1</sup>  

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Procesos de Transformación de Materiales para la Industria Farmacéutica (PTM), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

{fsgarayr, arhernandezc, hdbarbosab, bmvallejod}@unal.edu.co

<sup>2</sup> Grupo de Investigación, Desarrollo y Aplicaciones en Señales (IDEAS), Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia  
hilopezc@udistrital.edu.co

		Superintendencia de Industria y Comercio Radicado: NC2017/0007374 Folios: 16 Dependencia: 2020 Fecha: 2017-07-25 16:0:8 Tipo aplicación: Solicitud de Patente	
<b>DIF SOLICITUD DE PATENTE - NACIONAL</b>			
1	TIPO DE SOLICITUD	<input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención	<input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad
2	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
MÉTODO PARA DETERMINAR EL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR IN VITRO			
3	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
4	SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
1 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
5 DATOS DEL SOLICITANTE		NUPI (Número Único de Propiedad Industrial)	
DIRECCIÓN Cra 45 # 26-85. Edif. Uriel Gutiérrez		No. TELÉFONO	3165068
CIUDAD Bogotá		CORREO ELECTRÓNICO	gestionpi_bog@unal.edu.co
DEPARTAMENTO/ESTADO Bogotá D.C.		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Colombia
PAÍS DE RESIDENCIA Colombia			
6	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
1. Vallejo Díaz		NACIONALIDAD	
2. Barbosa Barbosa		Colombiana	
3. Plazas Bonilla		Colombiano	
4. Torres Salcedo		Colombiana	
5. Vitola Dominguez		Colombiano	
6. Hernández Camargo		Colombiana	



## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certificate is awarded to

### AURA ROCÍO HERNÁNDEZ

for participation in Poster Presentation Section at the 2nd Pan American Conference for Alternative Methods in Rio de Janeiro from August 23<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>, 2018.

  
 José Mauro Grajales  
 NMETRO

  
 Vanessa de Sá Rocha  
 Natura

  
 Thomas Hartung  
 CAAT, John Hopkins

  
 Charu Chandrasekera  
 CCAAM, University of Windsor

Steering Committee



Sponsors









## Bibliografía

- Abd, E., Yousef, S., Pastore, M., Telaprolu, K., Mohammed, Y.H., Namjoshi, S., Grice, J.E., Roberts, M.S., 2016. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 8, 163–176.
- Aberg, P., Nicander, I., Hansson, J., Geladi, P., Holmgren, U., Ollmar, S., 2004. Skin Cancer Identification Using Multifrequency Electrical Impedance—A Potential Screening Tool. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51, 2097–2102.  
<https://doi.org/10.1109/TBME.2004.836523>
- Alexander, H., Brown, S., Danby, S., Flohr, C., 2018. Research Techniques Made Simple: Transepidermal Water Loss Measurement as a Research Tool. *J. Invest. Dermatol.* 138, 2295–2300. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.09.001>
- Alves, L.M., Aegerter, M.A., Hata, K., 1991. In vitro determination of sun protection factor (SPF) of solar moderators. *An. Bras. Dermatol.* 66, 313–319.
- Antoniou, C., Kosmadaki, M., Stratigos, A., Katsambas, A., 2008. Sunscreens - what's important to know. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 22, 1110–1119.  
<https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02580.x>
- Azevedo Tosta, T.A., de Faria, P.R., Neves, L.A., do Nascimento, M.Z., 2018. Computational normalization of H&E-stained histological images: Progress, challenges and future potential. *Artif. Intell. Med.*  
<https://doi.org/10.1016/j.artmed.2018.10.004>
- Baccarin, T., Mitjans, M., Ramos, D., Lemos-Senna, E., Vinardell, M.P., 2015. Photoprotection by Punica granatum seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 153, 127–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.005>
- Balasubramani, L., Brown, B.H., Healey, J., Tidy, J.A., 2009. The detection of cervical

- intraepithelial neoplasia by electrical impedance spectroscopy: The effects of acetic acid and tissue homogeneity. *Gynecol. Oncol.* 115, 267–271.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.08.010>
- Barba, C., Alonso, C., Martí, M., Carrer, V., Yousef, I., Coderch, L., 2019. Selective modification of skin barrier lipids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172, 94–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.040>
- Barbero, A.M., Frasch, H.F., 2009. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicol. Vitro.* 23, 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.008>
- Batlle, C., 2005. Factor de protección solar: Criterios de elección de un fotoprotector. Offarm, Offarm. Doyma.
- Bendová, H., Akrman, J., Krejčí, A., Kubáč, L., Jírová, D., Kejlová, K., Kolářová, H., Brabec, M., Malý, M., 2007. In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicol. Vitro.* 21, 1268–1275. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.022>
- Bernerd, F., Asselineau, D., 2008. An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58, 155–159.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.08.050>
- Bethesda (MD), National Cancer Institute (US), 2008. PDQ Cancer Information Summaries. Health Professional Version. 2018 Jul 19. In [WWW Document]. [Figure, Schematic Represent. Norm. Ski. from  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/figure/CDR0000062917\\_\\_343/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/figure/CDR0000062917__343/).
- Bhattacharya, S., 2018. Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process, in: Bozkurt, Y. (Ed.), *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. IntechOpen, p. 15. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80477>
- Bickers, D.R., Athar, M., 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2565–2575. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700340>
- Biniek, K., Levi, K., Dauskardt, R.H., 2012. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17111–17116.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1206851109>
- Birgersson, U., Birgersson, E., Åberg, P., Nicander, I., Ollmar, S., 2011. Non-invasive bioimpedance of intact skin: mathematical modeling and experiments. *Physiol. Meas.* 32, 1–18. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/32/1/001>
- Björklund, S., Engblom, J., Thuresson, K., Sparr, E., 2013a. Glycerol and urea can be

- used to increase skin permeability in reduced hydration conditions. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.04.022>
- Björklund, S., Engblom, J., Thuresson, K., Sparr, E., 2010. A water gradient can be used to regulate drug transport across skin. *J. Control. Release* 143, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.005>
- Björklund, S., Nowacka, A., Bouwstra, J.A., Sparr, E., Topgaard, D., 2013b. Characterization of stratum corneum molecular dynamics by natural-abundance <sup>13</sup>C solid-state NMR. *PLoS One* 8, e61889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061889>
- Björklund, S., Pham, Q.D., Jensen, L.B., Knudsen, N.Ø., Nielsen, L.D., Ekelund, K., Ruzgas, T., Engblom, J., Sparr, E., 2016. The effects of polar excipients transcutol and dexpanthenol on molecular mobility, permeability, and electrical impedance of the skin barrier. *J. Colloid Interface Sci.* 479, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.06.054>
- Björklund, S., Ruzgas, T., Nowacka, A., Dahi, I., Topgaard, D., Sparr, E., Engblom, J., 2013c. Skin membrane electrical impedance properties under the influence of a varying water gradient. *Biophys. J.* 104, 2639–2650. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.008>
- Bladier, C., Wolvetang, E.J., Hutchinson, P., de Haan, J.B., Ismail, K., 1997. Response of a primary human fibroblast cell line to H2O2 : senescence-like growth arrest or apoptosis ? *Cell Growth Differ.* 8, 589–598.
- Boddé, H.E., van den Brink, I., Koerten, H.K., de Haan, F.H.N., 1991. Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride; transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes. *J. Control. Release* 15, 227–236. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90114-S](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90114-S)
- Bouwstra, J., 2003. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog. Lipid Res.* 42, 1–36. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00028-0)
- Brandner, J., Zorn-Kruppa, M., Yoshida, T., Moll, I., Beck, L., De Benedetto, A., 2015. Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers* 3, e974451. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.974451>
- Bravo, D., Rigley, T.H., Gibran, N., Strong, D.M., Newman-Gage, H., 2000. Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. *Burns* 26, 367–378. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00169-2)

- Briganti, S., Picardo, M., 2003. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 17, 663–669.  
<https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2003.00751.x>
- Cáceres, F., Herrera, G., Fernández, A., Fernández, J., Martínez, R., Carvajal, D., Haidar, Z.S., 2017. Utilidad de Tinción de Tricrómico de Masson en la Cuantificación de Densidad Media Vascular en Mucosa Oral Normal , Displasia Epitelial y Carcinoma Oral de Células Escamosas. *Int. J. Morphol.*  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000401576>
- Cayrol, Sarraute, Tarroux, Redoules, Charveron, Gall, 1999. A mineral sunscreen affords genomic protection against ultraviolet (UV) B and UVA radiation: in vitro and in situ assays. *Br. J. Dermatol.* 141, 250–258. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02973.x>
- Celis, R., Romero, E., 2015. Unsupervised color normalisation for H and E stained histopathology image analysis. 11th Int. Symp. Med. Inf. Process. Anal. 9681, 968104. <https://doi.org/10.1117/12.2211536>
- Cezar, T.L.C., Martinez, R.M., Rocha, C. da, Melo, C.P.B., Vale, D.L., Borghi, S.M., Fattori, V., Vignoli, J.A., Camilios-Neto, D., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2019. Treatment with maresin 1, a docosaehaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. *Sci. Rep.* 9, 3062. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>
- Chatelain, E., Gabard, B., Surber, C., 2003. Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: Effect of the vehicle. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16, 28–35.  
<https://doi.org/10.1159/000068291>
- Chizmadzhev, Y.A., Indenbom, A. V., Kuzmin, P.I., Galichenko, S. V., Weaver, J.C., Potts, R.O., 1998. Electrical properties of skin at moderate voltages. *Biophys. J.* 74, 843–856. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)74008-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74008-1)
- Cilurzo, F., Minghetti, P., Sinico, C., 2007. Newborn pig skin as model membrane in *in vitro* drug permeation studies: a technical note. *AAPS PharmSciTech* 8, E94.  
<https://doi.org/10.1208/pt0804094>
- Clark, L.C., Lyons, C., 2006. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29–45.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

- Clayton, T.H., Clark, S.M., Turner, D., Goulden, V., 2006. The treatment of severe atopic dermatitis in childhood with narrowband ultraviolet B phototherapy. *Clin. Exp. Dermatol.* 32, 28–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2006.02292.x>
- Clemente, F., Arpaia, P., Manna, C., 2013. Characterization of human skin impedance after electrical treatment for transdermal drug delivery. *Measurement* 46, 3494–3501. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2013.06.033>
- Cole, K.S., Cole, R.H., 1941. Dispersion and absorption in dielectrics I. alternating current characteristics. *J. Chem. Phys.* 9, 341–351. <https://doi.org/10.1063/1.1750906>
- COLIPA, CTFA-SA, CTFA-US, JCIA, 2006. Standardisation mandate assigned to CEN concerning: Methods for testing efficacy of sunscreen products. Brussels.
- Coll, L., Chinchilla, D., Pellerano, G., Coll, C., Stengel, F., 2006. ¿Pueden compararse los valores de protectores solares efectuados con normas diferentes (FDA y COLIPA)? *Acta Ter. dermatologica* 29, 330–334.
- Córdoba-Torres, P., 2017. Relationship between constant-phase element (CPE) parameters and physical properties of films with a distributed resistivity. *Electrochim. Acta* 225, 592–604. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.12.087>
- Couteau, C., Philippe, A., Vibet, M.-A., Papis, E., Coiffard, L., 2018. Study of the influence of substrate and spectrophotometer characteristics on the in vitro measurement of sunscreens efficiency. *Eur. J. Pharm. Sci.* 121, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.010>
- Crovara Pescia, A., Astolfi, P., Puglia, C., Bonina, F., Perrotta, R., Herzog, B., Damiani, E., 2012. On the assessment of photostability of sunscreens exposed to UVA irradiation: From glass plates to pig/human skin, which is best? *Int. J. Pharm.* 427, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.001>
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T., 2013. UV radiation and the skin. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Darlenski, R., Sassning, S., Tsankov, N., Fluhr, J.W., 2009. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.11.013>
- Davies, D.J., Heylings, J.R., McCarthy, T.J., Correa, C.M., 2015. Development of an in vitro model for studying the penetration of chemicals through compromised skin. *Toxicol. Vitro.* 29, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.012>
- Davies, D.J., Ward, R.J., Heylings, J.R., 2004. Multi-species assessment of electrical

- resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicol. Vitro*. 18, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.10.004>
- Diffey, B.L., Robson, J., 1989. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40, 127–133.
- Döge, N., Avetisyan, A., Hadam, S., Pfannes, E.K.B., Rancan, F., Blume-Peytavi, U., Vogt, A., 2017. Assessment of skin barrier function and biochemical changes of ex vivo human skin in response to physical and chemical barrier disruption. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 116, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.012>
- Donglikar, M.M., Deore, S.L., 2016. Sunscreens: A review. *Pharmacogn. J.* 8, 171–179. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.3.1>
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Dutra, E.A., Oliveira, D.A.G. da C., Kedor-Hackmann, E.R.M., Santoro, M.I.R.M., 2004. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Rev. Bras. Ciências Farm.* 40, 381–385. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000300014>
- Edelberg, R., 1977. Relation of electrical properties of skin to structure and physiologic state. *J. Invest. Dermatol.* 69, 324–327.
- Egerton, T.A., Tooley, I.R., 2012. UV absorption and scattering properties of inorganic-based sunscreens. *Int. J. Cosmet. Sci.* 34, 117–122. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00689.x>
- Fageon, L., Moyal, D., Coutet, J., Candau, D., 2009. Importance of sunscreen products spreading protocol and substrate roughness for in vitro sun protection factor assessment. *Int. J. Cosmet. Sci.* 31, 405–418. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00524.x>
- Farr, P.M., Diffey, B.L., 1985. The erythematous response of human skin to ultraviolet radiation. *Br. J. Dermatol.* 113, 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1985.tb02045.x>
- Fasano, W., Hinderliter, P., 2004. The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro. *Toxicol. Vitro*. 18, 725–729. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.01.003>
- Fasano, W., Manning, L., Green, J., 2002. Rapid integrity assessment of rat and human epidermal membranes for in vitro dermal regulatory testing: correlation of electrical

- resistance with tritiated water permeability. *Toxicol. Vitro.* 16, 731–740.  
[https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(02\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(02)00084-X)
- Ferancová, A., Rengaraj, S., Kim, Y., Labuda, J., Sillanpää, M., 2010. Electrochemical determination of guanine and adenine by CdS microspheres modified electrode and evaluation of damage to DNA purine bases by UV radiation. *Biosens. Bioelectron.* 26, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.026>
- Ferrero, L., Pissavini, M., Doucet, O., 2010. How a calculated model of sunscreen film geometry can explain in vitro and in vivo SPF variation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 540. <https://doi.org/10.1039/b9pp00183b>
- Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15. <https://doi.org/10.1083/JCB.201102095>
- Firooz, A., Sadr, B., Babakoochi, S., Sarraf-Yazdy, M., Fanian, F., Kazerouni-Timsar, A., Nassiri-Kashani, M., Naghizadeh, M.M., Dowlati, Y., 2012. Variation of biophysical parameters of the skin with age, gender, and body region. *Sci. World J.* 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1100/2012/386936>
- Flaten, G.E., Palac, Z., Engesland, A., Filipovic-Grcic, J., Vanic, Z., Škalko-Basnet, N., 2015. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 75, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.018>
- Fokuhl, J., Müller-Goymann, C.C., 2013. Modified TEWL in vitro measurements on transdermal patches with different additives with regard to water vapour permeability kinetics. *Int. J. Pharm.* 444, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.035>
- Garay, F., Hernández, A., López, H., Barbosa, H., Vallejo, B., 2018. Design of a device for recording bioelectric signals with surface electrodes, in the evaluation of the effect of ultraviolet radiation on a tissue, in: *Communications in Computer and Information Science*. pp. 428–441. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00353-1\\_38](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00353-1_38)
- Gari, H., Rembiesa, J., Masilionis, I., Vreva, N., Svensson, B., Sund, T., Hansson, H., Morén, A.K., Sjöö, M., Wahlgren, M., Engblom, J., Ruzgas, T., 2015. Amperometric In Vitro Monitoring of Penetration through Skin Membrane. *Electroanalysis* 27, 111–117. <https://doi.org/10.1002/elan.201400426>
- Garoli, D., Pelizzo, M.G., Nicolosi, P., Peserico, A., Tonin, E., Alaibac, M., 2009. Effectiveness of different substrate materials for in vitro sunscreen tests. *J. Dermatol. Sci.* 56, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.07.015>
- Geerligs, M., 2010. Skin layers mechanics. Technische Universiteit Eindhoven.

- <https://doi.org/10.6100/IR657803>
- Geneser, F., 2000. *Histología*, 3ª edición. ed. Buenos Aires Argentina.
- Giacomoni, P.U., Declercq, L., Hellemans, L., Maes, D., 2000. Aging of Human Skin: Review of a Mechanistic Model and First Experimental Data. *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)* 49, 259–263. <https://doi.org/10.1080/15216540050033104>
- Glorieux, C., Calderon, P.B., 2017. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.* 398, 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J., Calderon, P.B., 2015. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic. Biol. Med.* 87, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>
- Guth, K., Schäfer-Korting, M., Fabian, E., Landsiedel, R., van Ravenzwaay, B., 2015. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicol. Vitro.* 29, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.007>
- Hamed, S.H., Altrabsheh, B., Assa'd, T., Jaradat, S., Alshra'ah, M., Aljamal, A., Alkhatib, H.S., Almalty, A.-M.M., Assa'd, T., Jaradat, S., Alshra'ah, M., Aljamal, A., Alkhatib, H.S., Almalty, A.-M.M., 2012. Construction, in vitro and in vivo evaluation of an in-house conductance meter for measurement of skin hydration. *Med. Eng. Phys.* 34, 1471–1476. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2012.02.008>
- Haque, T., Crowther, J.M., Lane, M.E., Moore, D.J., 2016. Chemical ultraviolet absorbers topically applied in a skin barrier mimetic formulation remain in the outer stratum corneum of porcine skin. *Int. J. Pharm.* 510, 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.041>
- Heck, D.E., Vetrano, A.M., Mariano, T.M., Laskin, J.D., 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: Unexpected role for catalase. *J. Biol. Chem.* 278, 22432–22436. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300048200>
- Hellemans, L., Corstjens, H., Neven, A., Declercq, L., Maes, D., 2003. Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. *J. Invest. Dermatol.* 120, 434–439. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12056.x>
- Herzog, B., 2008. Models for the calculation of Sun Protection Factors and parameters characterizing the UVA protection ability of cosmetic sunscreens, in: Tadros, T.F.



- (Ed.), *Colloids in Cosmetics and Personal Care*. Wiley VCH, Weinheim, pp. 275–308.
- Herzog, B., 2005. Prediction of Sun Protection Factors and UV-A parameters by calculation of UV transmissions through sunscreen films of inhomogenous surface structure, in: Shaath, N. (Ed.), *Sunscreens Regulations and Commercial Development*. Grenzach-Wyhlen, pp. 891–900.
- Herzog, B., 2002. Prediction of sun protection factors by calculation of transmissions with a calibrated step film model. *J. Cosmet. Sci.* 53, 11–26.
- Herzog, B., Hüglin, D., Borsos, E., Stehlin, A., Luther, H., 2004a. New UV absorbers for cosmetic sunscreens - A breakthrough for the photoprotection of human skin. *Chimia (Aarau)*. 58, 554–559. <https://doi.org/10.2533/000942904777677632>
- Herzog, B., Mongiat, S., Quass, K., Deshayes, C., 2004b. Prediction of sun protection factors and UVA parameters of sunscreens by using a calibrated step film model. *J. Pharm. Sci.* 93, 1780–1795. <https://doi.org/10.1002/jps.20089>
- Hirschorn, B., Orazem, M.E., Tribollet, B., Vivier, V., Frateur, I., Musiani, M., 2010. Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters. *Electrochim. Acta* 55, 6218–6227. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.10.065>
- Hlavata, L., Benikova, K., Vyskocil, V., Labuda, J., 2012. Evaluation of damage to DNA induced by UV-C radiation and chemical agents using electrochemical biosensor based on low molecular weight DNA and screen-printed carbon electrode. *Electrochim. Acta* 71, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.119>
- Hlavata, L., Striesova, I., Ignat, T., Blaskovisova, J., Ruttkay-Nedecky, B., Kopel, P., Adam, V., Kizek, R., Labuda, J., 2015. An electrochemical DNA-based biosensor to study the effects of CdTe quantum dots on UV-induced damage of DNA. *Microchim. Acta* 182, 1715–1722. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1502-z>
- Horch, R.E., Jeschke, M.G., Spilker, G., Herndon, D.N., Kopp, J., 2005. Treatment of second degree facial burns with allografts—preliminary results. *Burns* 31, 597–602. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2005.01.011>
- IARC, 2010. Solar and ultraviolet radiation 1992, 35–101.
- IARC, 1992. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans—Solar and Ultraviolet Radiation, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

- IDEAM, 2005. Atlas de Radiación Solar de Colombia. Bogotá: UPME - IDEAM. Bogotá, Colombia.
- Imhof, R.E., De Jesus, M.E.P., Xiao, P., Ciorte, L.I., Berg, E.P., 2009. Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance. *Int. J. Cosmet. Sci.* 31, 97–118. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00476.x>
- ISO 24444, 2010. Cosmetics — Sun Protection Test Methods — In Vivo Determination of the Sun Protection Factor (SPF).
- Ivorra, A., 2002. Bioimpedance monitoring for physicians : an overview. *Med. non physicians* 2002, 131–178.
- Ivorra, A., Genescà, M., Sola, A., Palacios, L., Villa, R., Hotter, G., Aguiló, J., 2005. Bioimpedance dispersion width as a parameter to monitor living tissues. *Physiol. Meas.* 26, S165–S173. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/26/2/016>
- Ivorra, A., Rubinsky, B., 2007. In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. *Bioelectrochemistry* 70, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.10.005>
- Jacobi, U., Kaiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Sterry, W., Lademann, J., 2007. Porcine ear skin: An in vitro model for human skin. *Ski. Res. Technol.* 13, 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x>
- Jacobi, U., Taube, H., Schäfer, U.F., Sterry, W., Lademann, J., 2005. Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *J. Control. Release* 103, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.013>
- Jeon, S.-Y., Lee, C.-Y., Song, K.-H., Kim, K.-H., 2014. Spectrophotometric measurement of minimal erythema dose sites after narrowband ultraviolet B phototesting: clinical implication of spectrophotometric values in phototherapy. *Ann. Dermatol.* 26, 17. <https://doi.org/10.5021/ad.2014.26.1.17>
- Jiang, S.J., Chen, J.Y., Lu, Z.F., Yao, J., Che, D.F., Zhou, X.J., 2006. Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 44, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.05.012>
- Kalia, Y.N., Guy, R.H., 1995. The electrical characteristics of human skin in vivo. *Pharm. Res.* 12, 1605–1613. <https://doi.org/10.1023/A:1016228730522>
- Kankala, R.K., Kuthati, Y., Liu, C.-L., Mou, C.-Y., Lee, C.-H., 2015. Killing cancer cells by delivering a nanoreactor for inhibition of catalase and catalytically enhancing intracellular levels of ROS. *RSC Adv.* 5, 86072–86081.

- <https://doi.org/10.1039/C5RA16023E>
- Karacolak, T., Cooper, R., Unlu, E.S., Topsakal, E., 2012. Dielectric Properties of Porcine Skin Tissue and In Vivo Testing of Implantable Antennas Using Pigs as Model Animals. *IEEE Antennas Wirel. Propag. Lett.* 11, 1686–1689.  
<https://doi.org/10.1109/LAWP.2013.2241722>
- Khan, M.A., 2014. Sun protection factor determination studies of sunscreen formulations for their selection and use in cosmetics. *J. Pharm. Biol.* 4, 9–11.
- Kikuchi, A., Yagi, M., 2011. Direct observation of the intermolecular triplet–triplet energy transfer from UV-A absorber 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane to UV-B absorber octyl methoxycinnamate. *Chem. Phys. Lett.* 513, 63–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.07.067>
- Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* 32, 44–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>
- Klimová, Z., Hojerová, J., Beránková, M., 2015. Skin absorption and human exposure estimation of three widely discussed UV filters in sunscreens – In vitro study mimicking real-life consumer habits. *Food Chem. Toxicol.* 83, 237–250.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.025>
- Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., Goodwin, C., 2011. Anatomy and Physiology of the Skin. *J. Dermatol. Nurses. Assoc.* 3, 203–213.  
<https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Kovacic, P., Jacintho, J., 2001. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr. Pharm. Des.* 8, 773–796.  
<https://doi.org/10.2174/1381612003401046>
- Kullavanijaya, P., Lim, H.W., 2005. Photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52, 937–958.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.063>
- Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C., 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 211–222.  
<https://doi.org/10.1038/nri1310>
- Lademann, J., Jacobi, U., Richter, H., Otberg, N., Weigmann, H.-J., Meffert, H., Schaefer, H., Blume-peytavi, U., Sterry, W., 2004. In vivo Determination of UV - Photons Entering into Human Skin. *Laser Phys.* 14, 234–237.
- Lademann, J., Schanzer, S., Jacobi, U., Schaefer, H., Pflücker, F., Driller, H., Beck, J.,

- Meinke, M., Roggan, A., Sterry, W., 2005. Synergy effects between organic and inorganic UV filters in sunscreens. *J. Biomed. Opt.* 10, 014008-1–7.  
<https://doi.org/10.1117/1.1854112>
- Laffleur, F., Bernkop-Schnürch, A., 2017. Evaluation of peptide drug delivery via skin barrier-impact of permeation enhancers. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 41, 191–196.  
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.007>
- Lambert, G., Reid, C., Kaye, D., Jennings, G., Esler, M., 2002. Effect of sunlight and season on serotonin turnover in the brain. *Lancet* 360, 1840–1842.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11737-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11737-5)
- Lawler, J.C., Davis, M.J., Griffith, E.C., 1960. Electrical Characteristics of the Skin. *J. Invest. Dermatol.* 34, 301–308. <https://doi.org/10.1038/jid.1960.52>
- Lécureux, M., Enoch, S., Deumié, C., Tayeb, G., 2014. Electromagnetic sunscreen model: implementation and comparison between several methods: step-film model, differential method, Mie scattering, and scattering by a set of parallel cylinders. *Appl. Opt.* 53, 6537–45. <https://doi.org/10.1364/AO.53.006537>
- Lee, H.-C., Wei, Y.-H., 2000. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J. Biomed. Sci.* 112, 2–15.
- Levin, J., Maibach, H., 2005. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *J. Control. Release* 103, 291–299.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.035>
- Lim, H.W., Honigsmann, H., Hawk, J.L.M., 2007. *Photodermatology*, 1st ed. Informa Healthcare USA, Inc, New York.
- Liou, G.Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 44, 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Lisanti, M.P., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Pestell, R.G., Howell, A., Sotgia, F., 2011. Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis. *Cell Cycle* 10, 2440–2449.  
<https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16870>
- Mackie, D.P., 2002. The euro skin bank and glycerol-preserved allografts. *Burns* 28, 1.  
[https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00083-9)
- Madison, K.C., 2003. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 121, 231–241. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x>
- Manaia, E.B., Kaminski, R.C.K., Corrêa, M.A., Chiavacci, L.A., 2013. Inorganic UV filters.

- Brazilian J. Pharm. Sci. 49, 201–209. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000200002>
- Mansur, J., Breder, M., Mansur, M., Azulay, R., 1986. Correlação entre a determinação do fator de protecção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 61, 167–172.
- Mascini, M., Iannello, M., Palleschi, G., 1982. A liver tissue-based electrochemical sensor for hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta* 138, 65–69. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)85287-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)85287-9)
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H.N., 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.019>
- Miksa, S., Lutz, D., Guy, C., 2014. Improving the UV Exposure of Sunscreen During In vitro Testing. *Cosmet. Toilet.* 34–38.
- Miura, Y., Hirao, T., Hatao, M., 2012. Influence of Application Amount on Sunscreen Photodegradation in in vitro Sun Protection Factor Evaluation: Proposal of A Skin-Mimicking Substrate. *Photochem. Photobiol.* 88, 475–482. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01042.x>
- Moncada, M.E., Saldarriaga, M. del P., Bravo, A.F., Pinedo, C.R., 2010. Medición de impedancia eléctrica en tejido biológico – revisión. *TecnoLógicas* 51. <https://doi.org/10.22430/22565337.113>
- Monteiro-Riviere, N.A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A.O., Riviere, J.E., 2011. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: An In vitro and in vivo study. *Toxicol. Sci.* 123, 264–280. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr148>
- Mouret, S., Bogdanowicz, P., Haure, M.J., Castex-Rizzi, N., Cadet, J., Favier, A., Douki, T., 2011. Assessment of the photoprotection properties of sunscreens by chromatographic measurement of DNA damage in skin explants. *Photochem. Photobiol.* 87, 109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00834.x>
- Mousavisani, S.Z., Raouf, J.-B., Cheung, K.Y., Hernández, A.R., Ruzgas, T., Turner, A.P.F., Mak, W.C., 2019. Integrating an ex-vivo skin biointerface with electrochemical DNA biosensor for direct measurement of the protective effect of UV blocking agents. *Biosens. Bioelectron.* 128, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.025>

- Mura, S., Manconi, M., Sinico, C., Valenti, D., Fadda, A.M., 2009. Penetration enhancer-containing vesicles (PEVs) as carriers for cutaneous delivery of minoxidil. *Int. J. Pharm.* 380, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.06.040>
- Nilsson, G.E., 1977. Measurement of water exchange through skin. *Med. Biol. Eng. Comput.* 15, 209–218. <https://doi.org/10.1007/BF02441040>
- Nocchi, S., Björklund, S., Svensson, B., Engblom, J., Ruzgas, T., 2017. Electrochemical monitoring of native catalase activity in skin using skin covered oxygen electrode. *Biosens. Bioelectron.* 93, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.001>
- O'Neill, J.J., 1984. Effect of film irregularities on sunscreen efficacy. *J. Pharm. Sci.* 73, 888–891. <https://doi.org/10.1002/jps.2600730707>
- O'Neill, R.D., Rocchitta, G., McMahon, C.P., Serra, P.A., Lowry, J.P., 2008. Designing sensitive and selective polymer/enzyme composite biosensors for brain monitoring in vivo. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.11.008>
- Olivier, E., Dutot, M., Regazzetti, A., Laprèvote, O., Rat, P., 2017. 25-Hydroxycholesterol induces both P2X7-dependent pyroptosis and caspase-dependent apoptosis in human skin model: New insights into degenerative pathways. *Chem. Phys. Lipids* 207, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.001>
- Orazem, M.E., Pébère, N., Tribollet, B., 2006. Enhanced graphical representation of electrochemical impedance data. *J. Electrochem. Soc.* 153, B129-136. <https://doi.org/10.1149/1.2168377>
- Osterwalder, U., Herzog, B., 2010. The long way towards the ideal sunscreen—where we stand and what still needs to be done. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 470. <https://doi.org/10.1039/b9pp00178f>
- Osterwalder, U., Herzog, B., 2009. Sun protection factors: world wide confusion. *Br. J. Dermatol.* 161, 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09506.x>
- Pearse, A.D., Edwards, C., 1993. Human stratum corneum as a substrate for in vitro sunscreen testing. *Int. J. Cosmet. Sci.* 15, 234–244.
- Pelizzo, M., Zattra, E., Nicolosi, P., Peserico, A., Garoli, D., Alaibac, M., 2012. In vitro evaluation of sunscreens: An update for the clinicians. *ISRN Dermatol.* 2012, 1–4. <https://doi.org/10.5402/2012/352135>
- Penven, K., Leroy, D., Verneuil, L., Faguer, K., Domp martin, A., 2005. Evaluation of vaseline oil applied prior to UVB TL01 phototherapy in the treatment of psoriasis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 21, 138–141.

- <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2005.00157.x>
- Pillai, S., Oresajo, C., Hayward, J., 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 17–34. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x>
- Pissavini, M., Ferrero, L., Alard, V., Heinrich, U., Tronnier, H., Kockott, D., Lutz, D., Tournier, V., Zambonin, M., Meloni, M., 2003. Determination of the In Vitro SPF. *Cosmet. Toilet.* 118, 65–70.
- Pissavini, M., Marguerie, S., Dehais, A., Ferrero, L., Zastrow, L., 2009. Characterizing Roughness : A New Substrate to Measure SPF. *Cosmet. Toilet.* 124, 56–64.
- Pissavini, M., Tricaud, C., Wiener, G., Lauer, A., Contier, M., Kolbe, L., Trullás Cabanas, C., Boyer, F., Nollent, V., Meredith, E., Dietrich, E., Matts, P.J., 2018. Validation of an in vitro sun protection factor (SPF) method in blinded ring-testing. *Int. J. Cosmet. Sci.* 40, 263–268. <https://doi.org/10.1111/ics.12459>
- Planz, V., Lehr, C.-M., Windbergs, M., 2016. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. *J. Control. Release* 242, 89–104. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.002>
- Podda, M., Grundmann-Kollmann, M., 2001. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin. Exp. Dermatol.* 26, 578–582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2001.00902.x>
- Podda, M., Traber, M.G., Weber, C., Yan, L.-J., Packer, L., 1998. UV-Irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00142-1)
- Popov, A.P., Lademann, J., Priezzhev, A. V., Myllylä, R., 2007. Reconstruction of stratum corneum profile of porcine ear skin after tape stripping using UV/VIS spectroscopy, in: Schweitzer, D., Fitzmaurice, M. (Eds.), *Optics InfoBase Conference Papers*. p. 66281S. <https://doi.org/10.1117/12.729525>
- Popov, A.P., Lademann, J., Priezzhev, A. V., Myllylä, R., 2005. Effect of size of TiO<sub>2</sub> nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin. *J. Biomed. Opt.* 10, 064037. <https://doi.org/10.1117/1.2138017>
- Potts, R., Guy, R.H., Francoeur, M.L., 1992. Routes of ionic permeability through mammalian skin. *Solid State Ionics* 53–56, 165–169.

2738(92)90378-3

- Prasad, A., Pospíšil, P., 2012. Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: in vivo charge coupled device imaging. *J. Biomed. Opt.* 17, 085004 1–8.  
<https://doi.org/10.1117/1.jbo.17.8.085004>
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A., 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296, 295–309. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1999.3458>
- Rembiesa, J., Gari, H., Engblom, J., Ruzgas, T., 2015. Amperometric monitoring of quercetin permeation through skin membranes. *Int. J. Pharm.* 496, 636–643.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.073>
- Rhie, G., Seo, J.Y., Chung, J.H., 2001a. Modulation of Catalase in Human Skin In Vivo by Acute and Chronic UV Radiation Gi-eun. *Mol. Cells* 11, 399–404.
- Rhie, G., Shin, M.H., Seo, J.Y., Choi, W.W., Cho, K.H., Kim, K.H., Park, K.C., Eun, H.C., Chung, J.H., 2001b. Aging- and Photoaging-Dependent Changes of Enzymic and Nonenzymic Antioxidants in the Epidermis and Dermis of Human Skin In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1212–1217. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01469.x>
- Richters, C.D., Hoekstra, M.J., Baare, J. Van, Dupont, J.S., Kamperdijk, E.W.A., 1996. Morphology skin of glycerol-preserved human cadaver 22, 113–116.
- Rigaud, B., Morucci, J.P., Chauveau, N., 1996. Bioelectrical impedance techniques in medicine. Part I: Bioimpedance measurement. Second section: impedance spectrometry. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 24, 257–351.
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M.K., Trost, A., Richter, K., 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 5, 545–589. <https://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Robb, E.C., Bechmann, N., Plessinger, R.T., Boyce, S.T., Warden, G.D., Kagan, R.J., 2001. Storage media and temperature maintain normal anatomy of cadaveric human skin for transplantation to full-thickness skin wounds. *J. Burn Care Rehabil.* 22, 393–396. <https://doi.org/10.1097/00004630-200111000-00008>
- Sarruf, F.D., Peres, D.D.A., de Oliveira, N.D., Consiglieri, V.O., Kaneko, T.M., Velasco, M.V.R., Baby, A.R., 2013. Assessment of in vitro sun protection factor (SPF) and rheological profile of commercial infant sunscreens. *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* 34, 33–36.
- Sastre, M.P., Vernet, M., Steinert, S., 2001. Single-cell Gel/Comet assay applied to the



- analysis of UV radiation–induced DNA damage in *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta)¶. *Photochem. Photobiol.* 74, 55. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0055:SCGCAA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0055:SCGCAA>2.0.CO;2)
- Sayre, R., Agin, P.P., LeVee, G.J., Edward, M., 1979. A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens. *Photochem. Photobiol.* 29, 559–566.
- Schalka, S., Reis, V.M.S. Dos, 2011. Sun protection factor: meaning and controversies. *An. Bras. Dermatol.* 86, 507–15. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962011000300013>
- Scibior, D., Czczot, H., 2006. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 60, 170–80.
- Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and skincare products. *Inorganica Chim. Acta* 360, 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
- Sies, H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2016.12.035>
- Simic-Krstic, J., Kalauzi, A., Ribar, S., Lazovic, G., Radojicic, R., 2012. Electrical characteristics of female and male human skin. *Arch. Biol. Sci.* 64, 1165–1171. <https://doi.org/10.2298/ABS1203165S>
- Simić-Krstić, J.B., Kalauzi, A.J., Ribar, S.N., Matija, L.R., Misevic, G.N., 2014. Electrical properties of human skin as aging biomarkers. *Exp. Gerontol.* 57, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.06.001>
- Simon, G.A., Maibach, H.I., 2000. The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man : Qualitative and Quantitative Observations – An Overview. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 229–234.
- Smijs, T.G., Pavel, S., 2011. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 4, 95–112. <https://doi.org/10.2147/nsa.s19419>
- Soehnge, H., Ouhtit, A., Ananthaswamy, H.N., 1997. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation 2, 538–551.
- Sohn, M., Buehler, T., Imanidis, G., 2016a. Repartition of oil miscible and water soluble UV filters in an applied sunscreen film determined by confocal Raman microspectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 15, 861–871. <https://doi.org/10.1039/c6pp00024j>

- Sohn, M., Hêche, A., Herzog, B., Imanidis, G., 2014. Film thickness frequency distribution of different vehicles determines sunscreen efficacy. *J. Biomed. Opt.* 19, 115005. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.11.115005>
- Sohn, M., Herzog, B., Osterwalder, U., Imanidis, G., 2016b. Calculation of the sun protection factor of sunscreens with different vehicles using measured film thickness distribution — Comparison with the SPF in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 159, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.038>
- Sohn, M., Korn, V., Imanidis, G., 2015. Porcine Ear Skin as a Biological Substrate for in vitro Testing of Sunscreen Performance. *Skin Pharmacol. Physiol.* 28, 31–41. <https://doi.org/10.1159/000358273>
- Sohn, M., Malburet, C., Baptiste, L., Prigl, Y., 2017. Development of a synthetic substrate for the in vitro performance testing of sunscreens. *Skin Pharmacol. Physiol.* 30, 159–170. <https://doi.org/10.1159/000464471>
- Springsteen, A., Yurek, R., Frazier, M., Carr, K.F., 1999. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal. Chim. Acta* 380, 155–164.
- Stanley, R., Cotran, R., Kumar, V., 2015. *Patología estructural y funcional*, 9th ed.
- Su, D.G.T., Taylor, J.-S.A., Gross, M.L., 2010. A new photoproduct of 5-methylcytosine and adenine characterized by High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 474–479. <https://doi.org/10.1021/tx9003962>
- Sukumar, S., Kar, S.P., 2019. Numerical analysis of an enhanced cooling rate cryopreservation process in a biological tissue. *J. Therm. Biol.* 81, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.03.001>
- Sullivan, T.P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C., Mertz, P., 2001. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* 9, 66–76. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2001.00066.x>
- Summerfield, A., Meurens, F., Ricklin, M.E., 2015. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol. Immunol.* 66, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.10.023>
- Sundaram, H., Mackiewicz, N., Burton, E., Peno-Mazzarino, L., Lati, E., Meunier, S., 2016. Pilot Comparative Study of the Topical Action of a Novel, Crosslinked Resilient Hyaluronic Acid on Skin Hydration and Barrier Function in a Dynamic, Three-Dimensional Human Explant Model. *J. drugs dermatology* 15, 434–441.

- Svitkova, V., Blaskovicova, J., Tekelova, M., Kallai, B.M., Ignat, T., Horackova, V., Skladal, P., Kopel, P., Adam, V., Farkasova, D., Labuda, J., 2017. Assessment of CdS quantum dots effect on UV damage to DNA using a DNA/quantum dots structured electrochemical biosensor and DNA biosensing in solution. *Sensors Actuators B Chem.* 243, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.160>
- Szatrowski, T.P., Nathan, C.F., 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51, 794–798.
- Tunstall, D.F., 2000. A mathematical approach for the analysis of in vitro sun protection factor measurements. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 51, 303–315.
- Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S., Worsfold, P.J., 1987. Biosensors: fundamentals and applications, *Analytica Chimica Acta.* [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)85361-1](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)85361-1)
- Ullah, S., Hamade, F., Bubniene, U., Engblom, J., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A., Ruzgas, T., 2018. In-vitro model for assessing glucose diffusion through skin. *Biosens. Bioelectron.* 110, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.039>
- Vargas Luna, J.L., Krenn, M., Cortés Ramírez, J.A., Mayr, W., 2015. Dynamic impedance model of the skin-electrode interface for transcutaneous electrical stimulation. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125609>
- Vitola, A., 2016. Propuesta de una metodología “in vitro” para la determinación del factor de protección solar (FPS). Universidad Nacional de Colombia.
- Wagener, F., Carels, C., Lundvig, D., 2013. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9126–9167. <https://doi.org/10.3390/ijms14059126>
- White, E.A., Orazem, M.E., Bunge, A.L., 2011. A critical analysis of single-frequency LCR databridge impedance measurements of human skin. *Toxicol. Vitro.* 25, 774–784. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.013>
- WHO, 2003. Índice UV solar mundial: guía práctica. Ginebra, Suiza.
- Wilkinson, J., Moore, R.J., 1990. *Cosmetología de Harry.*, Ediciones. ed.
- Xu, H., Zheng, Y.-W., Liu, Q., Liu, L., Luo, F., Zhou, H.-C., Isoda, H., Ohkohchi, N., Li, Y., 2018. Reactive Oxygen Species in Skin Repair, Regeneration, Aging, and Inflammation, in: *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells.* InTech, pp. 69–88. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72747>
- Yamamoto, T., Yamamoto, Y., 1976. Electrical properties of the epidermal stratum

- corneum. *Med. Biol. Eng.* 14, 151–158. <https://doi.org/10.1007/BF02478741>
- Yoon, J., Lee, T., Bapurao G., B., Jo, J., Oh, B.-K., Choi, J.-W., 2017. Electrochemical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor composed of myoglobin on MoS<sub>2</sub> nanoparticle-graphene oxide hybrid structure. *Biosens. Bioelectron.* 93, 14–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.064>
- Zhang, F., Jin, T., Hu, Q., He, P., 2018. Distinguishing skin cancer cells and normal cells using electrical impedance spectroscopy. *J. Electroanal. Chem.* 823, 531–536.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.06.021>
- Zhang, Q., Murawsky, M., LaCount, T., Kasting, G.B., Li, S.K., 2018. Transepidermal water loss and skin conductance as barrier integrity tests. *Toxicol. Vitr.* 51, 129–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.04.009>