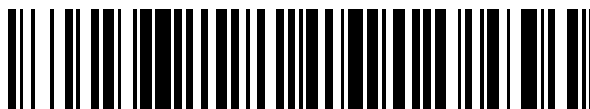


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 151**

51 Int. Cl.:

A61K 8/36	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 8/37	(2006.01)		
A61K 31/202	(2006.01)		
A61K 31/232	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 47/10	(2007.01)		
A61K 47/12	(2006.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		
A61K 47/44	(2007.01)		
A61P 17/16	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2014 PCT/IB2014/064223**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15033276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2014 E 14786305 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3041459**

54 Título: **Composiciones útiles en la prevención o tratamiento del cáncer de piel**

30 Prioridad:

06.09.2013 IT MI20131475

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.11.2019

73 Titular/es:

**GIULIANI S.P.A. (100.0%)
Via Palagi, 2
20129 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GIULIANI, GIAMMARIA;
BENEDUSI, ANNA;
MARZANI, BARBARA;
BARONI, SERGIO y
PICARDO, MAURO**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 732 151 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones útiles en la prevención o tratamiento del cáncer de piel

5 **Campo de la invención**

[0001] El objeto de la presente invención es un nuevo uso anticanceroso de compuestos conocidos y composiciones de los mismos que contienen dichos compuestos como principio activo.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] En cada célula, el ADN es el depósito de la información genética; su estabilidad e integridad son esenciales para la vida. El ADN está sujeto a agresiones ambientales y cualquier daño consiguiente, si no se repara, conduce a una mutación y, posiblemente, a la aparición de un estado de enfermedad.

[0003] El cáncer de piel producido por el daño causado por la exposición excesiva a la radiación ultravioleta es un ejemplo de la relación entre el daño ambiental inducido al ADN y la aparición de una enfermedad.

[0004] Otro ejemplo es el daño en el ADN causado por el humo del tabaco, que puede conducir a mutaciones en las células pulmonares y el cáncer de pulmón posterior.

[0005] Además del ataque de agentes ambientales, el ADN también está sujeto a daños causados por subproductos del metabolismo.

[0006] Cualquiera que sea el origen del ataque dañino, se estima que una sola célula puede sufrir hasta un millón de cambios en el ADN en un día. Además del daño causado por las agresiones ambientales o los metabolitos, el proceso de replicación del ADN durante la división celular está sujeto a errores. La velocidad a la que la ADN polimerasa añade nucleótidos no correctos durante la replicación del ADN es un factor importante para determinar la tasa de mutación espontánea en un organismo.

[0007] Aunque la célula está equipada con sistemas enzimáticos que normalmente reconocen y corrigen muchos de estos errores, algunas mutaciones permanecen. Para un gen dado, las estimaciones de la frecuencia con la que el ADN humano sufre errores que no se corrigen son aproximadamente entre 1×10^{-4} y 1×10^{-6} mutaciones por gameto. Una tasa de 1×10^6 expresa la posibilidad de hallar una mutación en un locus específico para un millón de gametos.

[0008] Los procesos de reparación del ADN están presentes tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas. Muchas proteínas involucradas en estos procesos están altamente conservadas durante la evolución debido a la importancia de esta función de reparación. Las células han desarrollado varios mecanismos para detectar y corregir los diversos tipos de daños que se pueden producir en el ADN, independientemente de la fuente del daño. Debido a que el ADN es una molécula que desempeña un papel activo y crítico en la división celular, la reparación del ADN está estrechamente relacionada con la regulación del ciclo celular.

[0009] Durante el ciclo celular, de hecho, los mecanismos de control (puntos de control) garantizan que el ADN de una célula esté intacto antes de permitir que se produzca la replicación del ADN y la división celular. Un defecto en los puntos de control puede conducir a una acumulación de daños, lo que a su vez da lugar a mutaciones.

[0010] Entre los factores ambientales dañinos, por ejemplo, es particularmente conocido que la radiación ultravioleta (UVA y UVB) es el principal agente etiológico en el desarrollo de muchos cánceres de piel. Produce daños en el ADN a través de la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y aductos de pirimidina (6-4) pirimidona o 6-4 fotoproductos (6-4 PP). Ambos compuestos son capaces de modificar la estructura del ADN, evitando así la transcripción y la replicación.

[0011] La forma fosforilada de la histona γ H2AX, la proteína p53 y la proteína GADD45a (gen de respuesta al daño en el ADN y detención del crecimiento), también se citan como marcadores conocidos del daño en el ADN inducido por radiación UV.

[0012] Además, la 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG u 8-OHdG), un derivado oxidado de la desoxiguanosina, es uno de los principales productos de la oxidación del ADN y, por lo tanto, otro marcador típico del daño contra la misma, particularmente bajo exposición a la radiación ultravioleta UVA.

[0013] La reparación del ADN es un proceso fisiológico que opera continuamente en las células para proteger el genoma de daños y mutaciones dañinas. El daño por los dímeros de CPD y los fotoproductos de 6-4 PP se contrarresta a través de un proceso conocido como reparación por escisión de nucleótidos (NER). En eucariotas, este complejo proceso puede reparar un daño que afecta hasta 30 nucleótidos.

[0014] Los defectos de algunos de estos genes, si no se reparan, pueden conducir, por ejemplo, a

genodermatosis, tales como xerodermia pigmentosa, así como a otros trastornos dermatológicos precancerosos graves, es decir, caracterizados por un riesgo muy alto de desarrollar cáncer de piel (aproximadamente mil veces mayor de lo normal).

5 **[0015]** Con referencia a otros problemas técnicos y, por lo tanto, en vista de los diferentes usos, el mismo solicitante ha estudiado en el pasado una clase de dienos caracterizados por una fórmula general $\text{CH}_3(\text{-CH=CH})_n\text{-R}$ (en la que $n = 2-7$) y, en este sentido, es titular de diversas publicaciones.

10 **[0016]** El documento WO2010/052328 sugiere estos compuestos, investigados con referencia al retinol como control positivo, un uso farmacéutico o cosmético para mejorar la actividad de reparación de células de la epidermis humana mediante la producción de queratina mediada por las citoqueratinas cK-19. El estudio transcripcional sobre la expresión de cK-19 mostró un aumento (regulación por aumento) de cK-19 en la diferenciación final de la epidermis humana reconstruida *in vitro*.

15 **[0017]** El documento WO2010/052329 describe para estos compuestos, a través de la definición de una acción inhibitoria de la enzima 5α -reductasa, un uso cosmético dirigido a estimular la integridad de la piel mediante el efecto de aumentar la fuerza del colágeno y la elastina.

20 **[0018]** El documento WO2011/132177 sugiere el uso de algunos de estos compuestos para contrarrestar la acción oxidante de los radicales libres ROS y preservar las condiciones fisiológicas de la epidermis humana.

25 **[0019]** El documento WO2012/007572 describe una actividad de tales compuestos en la inducción de la melanogénesis a través de una ruta no receptora. En particular, los experimentos realizados en cultivos de melanocitos primarios mostraron la capacidad de inducir la expresión y la actividad de la tirosinasa, la principal enzima melanogénica, y de aumentar el contenido intracelular de melanina.

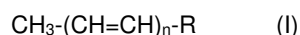
[0020] La solicitud de patente europea EP 2 407 163A1 desvela compuestos con una actividad de pigmentación de la piel y composiciones farmacéuticas o cosméticas que los contienen.

30 **[0021]** Ninguno de estos documentos de la técnica anterior se refiere al comportamiento de estos compuestos de dieno con referencia al problema del daño al ADN humano causado por agentes ambientales, tales como los causados por un exceso de radiación UV. De hecho, ninguno de los experimentos en los que se basan las pruebas de actividad en los usos descritos en estas técnicas anteriores contempla, por ejemplo, la radiación UV y, por lo tanto, ninguno de ellos mide los efectos de la radiación UV como un factor de daño para el ADN humano y, por lo tanto, como carcinógeno en el caso de los cánceres de piel que se desarrollan a través de una etapa inicial del daño al ADN causado por la radiación UV.

Sumario de la invención

40 **[0022]** Los estudios experimentales, que se tratan en los siguientes párrafos de la presente descripción, han demostrado ahora sorprendentemente que, para algunos de dichos compuestos, es posible obtener una actividad significativa de inhibición del daño al ADN producido por la radiación UV, previniendo así su uso como anticancerosos, tanto como prevención como en terapia, en el caso del cáncer de piel inducido por este tipo de daño en el ADN.

45 **[0023]** Por tanto, son objetos de la invención los compuestos de fórmula general (I):



50 en la que $n = 3, 5, 7$; R se selecciona entre $-\text{CO-OR}'$, $-\text{CO-O(-)}$, seleccionándose R' entre H, alquilo o alqueno C_{1-22} , arilo o aralquilo, o azúcares; y sus sales farmacéuticamente aceptables, preferentemente tales como sales de sodio, potasio, lisina, usándose cada compuesto de fórmula general (I) como tal o en mezcla con uno o más de los otros, para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer de piel como resultado del daño al ADN producido por la radiación UV, en el que los compuestos administrados tópicamente a la piel producen al menos los siguientes efectos combinados: preservación de la viabilidad celular, positividad a anexina V, inhibición de la apoptosis, inhibición de la expresión de la proteína caspasa-3, inhibición de CPD y 8-OHdG.

60 **[0024]** Entre los trastornos dermatológicos que se van a tratar de acuerdo con dicho uso, por ejemplo, se citan como ejemplos xerodermia pigmentosa y fotocarcinogénesis.

[0025] Un uso secundario, dependiente del anticanceroso, particularmente en el caso de la prevención del daño en el ADN causado por radiación UV, se considera un principio activo en las composiciones dirigidas a la fotoprotección de la piel contra los rayos UVA y UVB, específicamente para prevenir el daño en el ADN.

65 **[0026]** Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es dicho uso fotoprotector que depende del uso

descrito anteriormente.

[0027] La presente invención también se refiere a cualquier composición para los usos descritos anteriormente tanto en el campo terapéutico como en el de prevención, que comprende como principio activo un compuesto de fórmula general (I) como se ha identificado anteriormente, con cualquier excipiente adecuado, particularmente para la aplicación tópica en la piel, incluyendo el cuero cabelludo.

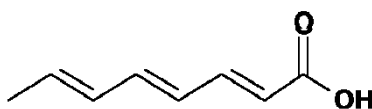
Descripción detallada de la invención

[0028] Algunos compuestos preferentes correspondientes a la fórmula (I) para el uso previsto en la presente invención son:

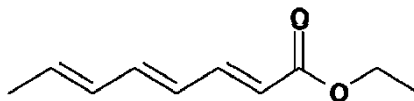
ácido 2,4,6-octatrienoico
sal de sodio o sal de potasio del ácido 2,4,6-octatrienoico
éster etílico del ácido 2,4,6-octatrienoico
sal de lisina del ácido 2,4,6-octatrienoico
acetato de 2,4,6-octatrien-1-ol

[0029] Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

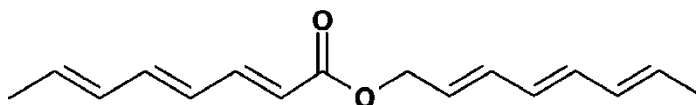
[0030] La fórmula y el peso molecular para algunos de los compuestos de fórmula general (I) se muestran a continuación.



$C_8H_{10}O_2$ P.M. 138,17
ácido 2,4,6-octatrienoico
sal de sodio: $C_8H_9O_2Na$
sal de lisina: $C_8H_9O_2.C_6H_{15}N_2O_2$,

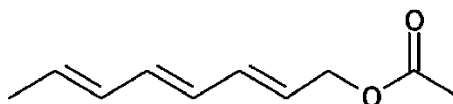


$C_{10}H_{14}O_2$ P.M. 166,22
éster etílico del ácido 2,4,6-octatrienoico



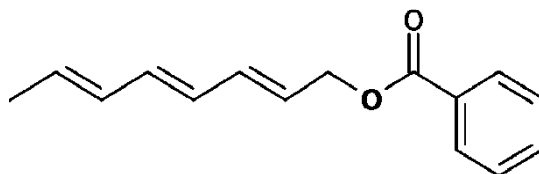
$C_{16}H_{20}O_2$ P.M. 244,34

Éster 2,4,6 octatrienílico del ácido 2,4,6 octatrienoico



$C_{10}H_{14}O_2$ P.M. 166,22

acetato de 2,4,6-octatrien-1-ol



$C_{15}H_{16}O_2$ P.M. 228,29

- 5 Éster 2,4,6-octatrienílico del ácido bencílico; 2,4,6-octatrien-1-ol, benzoato. En una composición de acuerdo con la invención, dicho compuesto está presente como principio activo en una cantidad preferentemente en el intervalo de 10^{-6} a 3×10^{-2} mol/100 g. Los ejemplos de composiciones particularmente adecuadas para el uso mencionado anteriormente se dan a continuación.

- 10 **[0031]** Las cantidades de los componentes se expresan como porcentajes en peso:

Ejemplo 1

[0032]

15

PREPARACIÓN DERMATOLÓGICA ANTICANCEROSA

Componente	Cantidad (% p/p)
2-octildodecanol	5-20
Alcohol cetoestearílico	5-15
Cera de ésteres cetílicos	1-5
Monoestearato de sorbitano	1-5
Polisorbato 60	1-5
Alcohol bencílico	0,1-1
Ácido 2,4,6-octatrienoico	0,1-0,5
Agua purificada	c.s. hasta 100 ml

Ejemplo 2

[0033]

20

PREPARACIÓN DERMATOLÓGICA DE ALTA PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO UV

Componente	Cantidad (% p/p)
alquifosfato C_{20} - C_{22}	0,50-5,00
alcoholes C_{20} - C_{22}	0,50-5,00
Cetearil glucósido	0,10-2,00
Trometamina	0,10-0,80
Adipato de dibutilo	1,00-7,00
Metoxicinnamato de etilhexilo	1,00-10,00
Isoestearato de isoestearilo	2,00-8,00
Salicilato de etilhexilo	1,00-5,00
Cocoato de butilenglicol	1,00-5,00
Butilmetoxidibenzoilmetano	1,00-5,00
Benzoato de dietilaminohidroxibenzoilhexilo	1,00-5,00
Octocrileno	1,00-5,00
Bis-etilhexiloxifenol Metoxifeniltriazina	1,00-4,00
Malonato de dietilhexilsiringilideno	0,10-1,00
Ácido 2,4,6-octatrienoico	0,05-0,50
Octatrienoato de lisina	0,05-0,50
Fenoxietanol	0,80-1,00
Glicerina	1,00-5,00
EDTA disódico	0,01-0,09
Acetato de tocoferilo	0,05-1,00
Sorbato de potasio	0,005-0,10
Ácido cítrico	c.s. a pH 5,5
Agua purificada	c.s. hasta 100 g

Ejemplo 3

25 **[0034]**

PREPARACIÓN DERMATOLÓGICA PARA LA PROTECCIÓN FACIAL

Componente	Cantidad (% p/p)
Goma xantana	0,10-0,20
Hialuronato sódico	0,05-1,00
Inositol	0,05-1,00
Xilitol	0,05-1,00
Taurina	0,05-1,00
Betaína	0,05-1,00
Alcoholes C ₁₄ -C ₂₂	0,05-2,00
Alquilglucósido C ₁₂ -C ₂₀	0,05-1,00
Octildodecanol	1,00-3,00
Metoxicinnamato de etilhexilo	0,50-3,00
Octocrileno	0,10-3,00
Butilenglicol	0,10-5,00
Glicerina	1,00-4,00
Ácido 2,4,6-octatrienoico	0,05-0,50
Fenoxietanol	0,80-1,00
Hidróxido sódico	0,001-0,20
Ácido cítrico	0,001-0,30
Copolímero de acrilato de hidroxietilo/Taurato de acriloldimetilo de sodio	0,01-2,00
Poliisobuteno	0,01-1,50
PEG-7 Éter de trimetilolpropano de coco	0,01-1,00
Agua purificada	c.s. hasta 100

Ejemplo 4

5 [0035]

PREPARACIÓN DERMATOLÓGICA PROTECTORA Y ANTICANCEROSA PARA EL CUERO CABELLUDO

Componente	Cantidad (% p/p)
Etanol	10,00-30,00
Pentilenglicol	0,025-0,20
Octatrienoato de potasio	0,05-0,50
Glicéridos caprílico/cáprico PEG-6	0,10-1,00
Agua purificada	c.s. hasta 100,00

Ejemplo 5

10

[0036]

PREPARACIÓN DERMATOLÓGICA CON PROTECTOR SOLAR PARA LA PROTECCIÓN DE LA PIEL

Componente	Cantidad (% p/p)
Bis-etilhexiloxifenol Metoxifeniltriazina	1,00-4,00
Octildodecanol	1,00-6,00
Denat. Alcohol de tipo D	1,00-15,00
Benzoato de alquilo C ₁₂ -C ₁₅	1,00-15,00
Benzoato de dietilaminohidroxibenzoilhexilo	1,00-5,00
Triglicérido caprílico/cáprico	1,00-60,00
Metoxicinnamato de etilhexilo	0,50-10,00
Octocrileno	0,10-5,00
Aceite de semilla de <i>Simmondsia chinensis</i>	0,10-10,00
Ácido 2,4,6-octatrienoico	0,01-1,00

15 **Ejemplo 6**

[0037]

PREPARACIÓN DERMATOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA CARA

Componente	Cantidad (% p/p)
Propanodiol	1,00-7,00
Xilitol	0,30-1,00

(continuación)

Componente	Cantidad (% p/p)
Glucósido cetearílico	0,10-2,00
Poligliceril-3 Branato de arroz	0,10-3,00
Alcohol cetearílico	0,05-1,00
EDTA disódico	0,01-0,10
Sal de potasio del ácido 2,4,6-octatrienoico	0,05-0,50
Benzoato de alquilo C ₁₂ -C ₁₅	1,00-5,00
Metoxicinnamato de etilhexilo	0,50-10,00
Octocrileno	0,50-5,00
Manteca de karité	0,50-3,00
Ácido cítrico	0,001-0,30
Aceite de semilla de <i>Simmondsia chinensis</i>	0,10-0,30
Aceite de onagra hidrogenado	0,50-3,00
Octildodecanol	0,50-3,00
Triglicérido caprílico/cáprico	1,00-5,00
Isoestearato de isoestearilo	0,10-5,00
Beta-sitosterol	0,10-0,50
Delta-tocoferol	0,05-0,20
Caprililglicol	0,05-0,50
1,2-hexanodiol	0,10-0,70
Hidróxido sódico	0,001-0,20
Fenoxietanol	0,50-0,99
Perfume	0,05-0,50
Agua purificada	c.s. hasta 100,00

Ejemplo 7

5 [0038]

PREPARACIÓN DERMATOLÓGICA PARA LA PIEL DEL CUERO CABELLUDO

Componente	Cantidad (% p/p)
Ciclopentasiloxano	1,00-50,00
Alcohol Denat. de Tipo C	1,00-15,00
Benzoato de alquilo C ₁₂ -C ₁₅	1,00-10,00
Metoxicinnamato de etilhexilo	1,00-5,00
Octocrileno	0,10-0,50
Disiloxano	1,00-49,00
Perfume	0,05-0,30
Erucato de oleílo	0,50-3,00
Dimeticonol	0,10-10,00
Ácido 2,4,6-octatrienoico	0,01-1,00
Octildodecanol	0,01-1,00

Ejemplo 8

10

[0039]

CREMA DE TRATAMIENTO PROTECTOR

Componente	Cantidad (% p/p)
Propilenglicol	0,50-7,00
Pentilenglicol	1,00-3,00
Steareth-21	0,10-3,00
Steareth-2	0,10-3,00
Triglicérido caprílico/cáprico	1,00-10,00
Ciclopentasiloxano	0,50-20,00
Alcohol cetearílico	0,01-2,00
Octildodecanol	0,10-5,00
EDTA disódico	0,01-0,10
Sal de lisina de ácido 2,4,6-octatrienoico	0,05-1,00
Fenoxietanol	0,80-1,00
Hidróxido sódico	0,001-0,20
Ácido cítrico	0,001-0,30

[0040] Se realizó un estudio experimental sobre cultivos celulares como se describe a continuación, con referencia a las figuras en los dibujos adjuntos, para demostrar la actividad de los compuestos de la presente invención.

Descripción de las figuras

[0041]

Las figuras 1, 3, 6 muestran los patrones de inmunofijación de la transferencia de tipo Western Blot, como se describe con más detalle a continuación.

Las figuras 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 muestran diagramas relacionados con las pruebas de actividad, como se describe con más detalle a continuación.

[0042] En las figuras, deben entenderse los siguientes significados:

Ctr = control

UVA o UVB = tratamiento únicamente con radiación

G01 = tratamiento únicamente con el compuesto de la invención

G01/UVA = pretratamiento con el compuesto de la invención y posterior radiación UVA

G01/UVB = pretratamiento con el compuesto de la invención y posterior radiación UVB

UVA/G01 post = radiación UVA y posterior tratamiento con el compuesto de la invención

UVB/G01 post = radiación UVB y posterior tratamiento con el compuesto de la invención

ESTUDIO EXPERIMENTAL

[0043] El objetivo del estudio es evaluar la actividad de reparación del daño al ADN inducido por UV ejercida por un compuesto de acuerdo con dicha fórmula general (I), a saber, ácido 2,4,6-trans-octatrienoico, identificado en la descripción del estudio que aparece en adelante con las iniciales G01.

[0044] El estudio se realiza en cultivos primarios de queratinocitos humanos, NHK.

[0045] Esta actividad se ha evaluado en varios aspectos, del siguiente modo.

Viabilidad celular después del tratamiento con G01

[0046] Las células (tres cultivos diferentes de queratinocitos NHK) se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 h para permitir la adherencia a la placa. Las células se trataron con ocho concentraciones diferentes del compuesto de la invención G01 en evaluación, diluidas en el medio de cultivo, durante 48 ± 2 horas. Los valores de la viabilidad celular para cada concentración probada, resultantes de la lectura espectrofotométrica, se compararon con el valor obtenido del control. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de toxicidad celular en las ocho concentraciones diferentes.

1) Evaluación de la actividad en el tratamiento previo con el compuesto de la invención

Viabilidad celular después del tratamiento previo con G01 y posterior irradiación con UV

[0047] Las células se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Las células se trataron durante 24 ± 2 horas con las concentraciones del compuesto G01 en evaluación, seleccionadas según los resultados previos. Posteriormente, las células en las placas identificadas como +UVA y +UVB se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a dosis de UVA de 10 J/cm^2 y de UVB de 25 mJ/cm^2 , mientras que la placa de control se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo. La viabilidad celular se midió (incorporación de NR) 24 ± 2 h y 48 ± 2 h tras la irradiación, tras el examen de la morfología de las células bajo un microscopio, en ausencia y presencia de tratamiento con G01 y/o irradiación UVA/UVB. Los valores de viabilidad celular para cada condición probada se compararon con el valor obtenido del control y se representaron en un gráfico para destacar las diferencias entre las diversas condiciones experimentales.

[0048] Los resultados obtenidos mostraron una reducción en la viabilidad celular después de la irradiación con UVA y UVB, y un efecto protector general de la viabilidad celular, particularmente 48 horas después de la irradiación, si estaba presente un tratamiento previo con un compuesto de la invención G01, particularmente significativo a la máxima concentración probada ($90 \mu\text{M}$).

Evaluación de transferencia de tipo Western Blot de la capacidad para reparar un daño en el ADN después del tratamiento previo con G01 y la posterior radiación UV

[0049] Las células NHK se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. A continuación, los queratinocitos se trataron durante 24 ± 2 horas con el compuesto de la invención G01, a concentraciones de $60 \mu\text{M}$ y $90 \mu\text{M}$. Posteriormente, las placas identificadas como +UVA, +G01/UVA, +UVB y +G01/UVB se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a dosis de UVA de 10 J/cm^2 y de UVB de 25 mJ/cm^2 , mientras que las placas de control (Ctr) y las tratadas solo con G01 se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. El medio de irradiación se sustituyó después con el medio de cultivo. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio se seleccionó un tiempo postratamiento de 6 horas tras el cual se procesaron las placas para la determinación de proteínas mediante transferencia de tipo Western Blot.

[0050] Para cada condición probada (tratamiento con G01 y/o irradiación UVA/UVB), la expresión de proteínas de la histona fosforilada γH2AX , p53 y GADD45a (gen de respuesta al daño al ADN y detención del crecimiento), conocidos marcadores de daño en el ADN inducido por radiación UV, se comparó con la expresión en las células control (Ctr).

[0051] Los resultados obtenidos al promediar las respuestas de tres cultivos de queratinocitos diferentes han mostrado la actividad protectora del compuesto G01 en evaluación, especialmente a la dosis más alta, ya que las células pretratadas con G01 indujeron la expresión proteica de p53 y GADD45a en menor medida. En confirmación de estos resultados, los queratinocitos pretratados muestran, después de la irradiación con UVB, una fracción reducida de histona fosforilada γH2AX (fosfo γH2AX), cuya expresión también está asociada con la cantidad de daño en el ADN.

[0052] La figura 1 muestra los patrones de transferencia de tipo Western Blot extraídos de los experimentos realizados en uno (NHK2) de los tres cultivos de queratinocitos diferentes descritos anteriormente, en los que GAPDH es el mantenimiento expresado de forma constitutiva, utilizado para normalizar los valores de las muestras.

Evaluación por citometría de flujo de la apoptosis inducida por UV después de un tratamiento previo con G01 y posterior irradiación con UV

[0053] Las células NHK se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Cada condición experimental se sembró por duplicado. Las células se trataron durante 24 ± 2 horas con G01, a una concentración de $90 \mu\text{M}$. Posteriormente, las placas identificadas como +UVA, +G01/UVA, +UVB y +G01/UVB se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a dosis de UVA de 25 J/cm^2 y UVB de 80 mJ/cm^2 , mientras que las placas control (Ctr) y las tratadas solo con el compuesto en evaluación (G01) se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionó un tiempo postratamiento de 24 horas, tras el cual se procesaron las placas de acuerdo con el procedimiento indicado en el manual de usuario del kit específico para el análisis de citometría de flujo con anexina V (Anexina V), un ensayo típico para detectar los estadios tempranos de apoptosis. La positividad para anexina V en cada condición probada (tratamiento con G01 y/o irradiación UVA/UVB) se comparó con la positividad en las células control.

[0054] Los resultados obtenidos han demostrado la capacidad de G01 para reducir la apoptosis inducida por la radiación UVA y UVB.

[0055] La figura 2 muestra los diagramas correspondientes extraídos de los experimentos realizados en tres cultivos de queratinocitos diferentes, NHK1, NHK2 y NHK3.

Evaluación mediante transferencia de tipo Western Blot de la apoptosis inducida por UV después de un tratamiento previo con G01 y posterior irradiación con UV

[0056] Las células NHK se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Cada condición experimental se sembró por duplicado. Las células se trataron durante 24 ± 2 horas con el compuesto G01, a una concentración de $90 \mu\text{M}$. Posteriormente, las células identificadas como +UVA, +G01/UVA, +UVB y +G01/UVB se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a dosis de UVA de 25 J/cm^2 y UVB de 80 mJ/cm^2 , mientras que las placas control y las tratadas solo con G01 se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionó un tiempo postratamiento de 24 horas, tras el cual se procesaron las placas para la determinación de proteínas por transferencia de tipo Western Blot. La expresión proteica de la caspasa 3 no escindida en cada condición probada (tratamiento con G01 y/o irradiación UVA/UVB) se comparó con la expresión en las células control (Ctr).

[0057] Los resultados obtenidos han mostrado la capacidad de G01 para reducir la activación de la caspasa 3 (correspondiente a una reducción de la expresión proteica de la forma de zimógeno de la proteína), uno de los mediadores clave del proceso de apoptosis inducido por UVA y UVB.

[0058] La figura 3 muestra los patrones de transferencia de tipo Western Blot extraídos de los experimentos realizados en tres cultivos de queratinocitos diferentes, NHK1, NHK2 y NHK3.

Evaluación ELISA del daño al ADN tras el tratamiento previo con G01 y posterior irradiación con UVB: determinación de CPD

[0059] Las células NHK se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. A continuación, los queratinocitos se trataron durante 24 ± 2 horas con el compuesto G01, a una concentración de $90 \mu\text{M}$. Posteriormente, las placas identificadas como +UVB y +G01/UVB, se expusieron, en el medio de irradiación, a una dosis de UVB de 80 mJ/cm^2 , mientras que las placas control (Ctr) y las tratadas solo con el compuesto en evaluación (G01) se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionaron tiempos de postratamiento de 6 horas y 24 horas, tras los cuales se procesaron las placas de acuerdo con el procedimiento descrito en la instrucción de trabajo específica para la extracción de ADN. La determinación de los dímeros de pirimidina ciclobutano, CPD, se realizó usando un kit de ELISA específico siguiendo el procedimiento descrito en el manual de usuario. Los resultados obtenidos han mostrado la capacidad del compuesto G01 para estimular la eliminación de los aductos de CPD, señal conocida de daño al ADN inducido por UVB.

[0060] La figura 4 muestra los diagramas correspondientes extraídos de los experimentos realizados en tres cultivos de queratinocitos diferentes, NHK1, NHK2 y NHK3.

2) Evaluación de la actividad en el postratamiento con el compuesto de la invención

[0061] Los siguientes experimentos se realizaron para evaluar la eficacia del compuesto G01 aplicado a los cultivos celulares de NHK después de la irradiación con UVA y UVB.

Viabilidad celular tras la irradiación UV y posterior tratamiento con G01

[0062] Las células se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Las células en las placas identificadas como +UVA y +UVB se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a dosis de UVA de 10 J/cm^2 y UVB de 25 mJ/cm^2 , mientras que las placas control (Ctr) se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo, que contenía el compuesto G01 a concentraciones seleccionadas según los resultados de viabilidad celular obtenidos tras el tratamiento con el mismo compuesto (véase anteriormente). La viabilidad celular se midió (incorporación de NR) a un tiempo de 24 ± 2 horas y 48 ± 2 horas tras la irradiación, en ausencia y presencia de irradiación con UVA/UVB y/o tratamiento con el compuesto de la invención G01. Los valores de viabilidad celular para cada condición probada se compararon con el valor obtenido del control y se representaron en un gráfico para destacar cualquier diferencia entre las diversas condiciones experimentales.

[0063] Los resultados obtenidos mostraron una reducción en la viabilidad celular después de la irradiación con UVA y UVB, y una acción protectora significativa, particularmente 48 horas después de la irradiación, de la concentración más alta probada ($90 \mu\text{M}$) del compuesto G01.

Evaluación por citometría de flujo de la apoptosis inducida por la radiación UV y tratamiento posterior con G01

[0064] Las células NHK se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Cada condición experimental se sembró por duplicado. Posteriormente, las placas identificadas como +UVA, +G01/UVA, +UVB y +G01/UVB se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a dosis de UVA de 25 J/cm^2 y UVB de 80 mJ/cm^2 , mientras que las placas control (Ctr) y las tratadas solo con el compuesto en evaluación (G01) se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo que contenía el compuesto G01 a una concentración de $90 \mu\text{M}$. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionó un tiempo postratamiento de 24 horas, tras el cual se procesaron las placas de acuerdo con el procedimiento indicado en el manual de usuario del kit específico para el análisis de citometría de flujo con anexina V. La positividad para anexina V en cada condición probada (tratamiento con el compuesto de la invención en evaluación y/o irradiación UVA/UVB) se comparó con la positividad en las células control.

[0065] Los resultados obtenidos han demostrado la capacidad del compuesto G01 para reducir la apoptosis inducida por la irradiación con UVA y UVB.

[0066] La figura 5 muestra los diagramas correspondientes extraídos de los experimentos realizados en dos cultivos de queratinocitos diferentes, NHK1 y NHK2.

Evaluación de transferencia de tipo Western Blot de la apoptosis inducida por irradiación UV y tratamiento posterior con G01

[0067] Las células NHK se sembraron en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Posteriormente, las placas identificadas como +UVA, +G01/UVA, +UVB y +G01/UVB se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a dosis de UVA de 25 J/cm^2 y UVB de 80 mJ/cm^2 , mientras que las placas control (Ctr) y las tratadas solo con el compuesto en evaluación (G01) se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo que contenía el compuesto G01 a una concentración de $90 \mu\text{M}$. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionó un tiempo postratamiento de 24 horas, tras el cual se procesaron las placas para la determinación de proteínas mediante transferencia de tipo Western Blot. La expresión proteica de caspasa 3 no escindida en cada condición probada (tratamiento con el compuesto G01 en evaluación y/o irradiación UVA/UVB) se comparó con la expresión en las células control.

[0068] Los resultados obtenidos han demostrado la capacidad del compuesto de la invención para reducir la activación de la caspasa 3 (correspondiente a una reducción de la expresión proteica de la forma de zimógeno de la proteína), uno de los mediadores clave del proceso de apoptosis inducido por UVA y UVB.

[0069] La figura 6 muestra los patrones de transferencia de tipo Western Blot extraídos de los experimentos realizados en dos cultivos de queratinocitos diferentes, NHK1 y NHK3.

Evaluación ELISA del daño inducido por la irradiación UVB y tratamiento posterior con G01: determinación de CPD

[0070] Las células NHK se sembraron en placas en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adhesión a la placa. A continuación, las placas identificadas como + UVB y + G01/UVB se expusieron respectivamente, en el medio de irradiación, a una dosis de UVB de 25 mJ/cm^2 , mientras que las placas control (Ctr) y las tratadas solo con el compuesto en evaluación (G01) se mantuvieron en la oscuridad y a temperatura ambiente durante un período de tiempo igual al tiempo de irradiación. A continuación, el medio de irradiación se reemplazó con el medio de cultivo que contenía el compuesto G01, a una concentración de $90 \mu\text{M}$. Sobre la base de los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionaron tiempos de postratamiento de 6 horas y 24 horas, después de lo cual las placas se procesaron de acuerdo con el procedimiento descrito en las instrucciones de trabajo específicas para la extracción de ADN. La determinación de CPD se realizó utilizando un kit ELISA específico siguiendo el procedimiento descrito en el manual del usuario.

[0071] Los resultados obtenidos han demostrado la capacidad del compuesto G01 en evaluación para promover la eliminación de productos CPD, señal conocida de daño en el ADN inducido por UVB.

[0072] La figura 7 muestra los diagramas correspondientes extraídos de los experimentos realizados en dos cultivos de queratinocitos diferentes, NHK1 y NHK3.

Evaluación ELISA del daño inducido por la irradiación UVA y tratamiento posterior con G01: determinación de 8-OHdG

[0073] Las células NHK se sembraron en placas en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. A continuación, las placas identificadas como +UVA y +UVA/G01 se expusieron, respectivamente, en el medio de irradiación, a una dosis de UVA de 10 J/cm^2 . A continuación, el medio de irradiación se sustituyó por el medio de cultivo que contenía el compuesto de la invención G01, a una concentración de $90 \mu\text{M}$. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio se seleccionaron tiempos de postratamiento de 6 horas y 24 horas, tras los cuales se procesaron las placas de acuerdo con el procedimiento descrito en la instrucción de trabajo específica para la extracción de ADN. La determinación de 8-OHdG, marcador de daño oxidativo en el ADN inducido por UVA se realizó usando un kit de ELISA específico siguiendo el procedimiento descrito en el manual de usuario.

[0074] Los resultados obtenidos se resumen en el gráfico de la figura 8. Muestran, en las células irradiadas y postratadas con el compuesto de la invención, una reducción significativa en la cantidad de 8-OHdG producida por la radiación UVA en los dos tiempos posteriores al tratamiento en comparación con las células solo irradiadas y no tratadas con el compuesto.

Evaluación mediante inmunofluorescencia de la capacidad de reparar un daño en el ADN después de la radiación UVA o UVB y el tratamiento posterior con G01

[0075] Las células NHK se sembraron en placas en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Posteriormente, las placas identificadas como +UVA, +UVA/G01 post, UVB y +UVB/G01 post se expusieron, respectivamente, en medio de irradiación, a dosis de UVA de 10 J/cm^2 o UVB de 25 mJ/cm^2 . A continuación, el medio de irradiación se reemplazó por el medio de cultivo que

contenía el compuesto de la invención G01, en una concentración de 90 μ M. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionó un tiempo de postratamiento de 24 horas, después de lo cual las placas se procesaron para la determinación por inmunofluorescencia de la expresión proteica de la histona fosforilada γ H2AX, cuya expresión está asociada a la cantidad de daño en el ADN (roturas en la doble hebra). La expresión proteica de la histona fosforilada γ H2AX después del tratamiento con el compuesto de la invención G01, o solo después de la irradiación con UVA/UVB, se comparó con la expresión en las células control.

[0076] Los resultados obtenidos se resumen en el gráfico de la figura 9. Muestran, en las células irradiadas y postratadas con el compuesto de la invención, una reducción significativa en la fracción de la histona fosforilada γ H2AX en comparación con las células solo irradiadas y no tratadas con el compuesto.

Evaluación mediante transferencia de tipo Western Blot de la capacidad de reparar un daño en el ADN después de la radiación UVB y el tratamiento posterior con G01

[0077] Las células NHK se sembraron en placas en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adherencia a la placa. Posteriormente, las células identificadas como +UVB y G01/UVB post se expusieron en el medio de irradiación, a una dosis de UVB de 25 J/cm². A continuación, el medio de irradiación se reemplazó por el medio de cultivo que contenía el compuesto de la invención G01, en una concentración de 90 μ M. Según los resultados preliminares obtenidos en un intervalo de tiempo más amplio, se seleccionó un tiempo de postratamiento de 24 horas, después de lo cual las placas se procesaron para la determinación proteica por transferencia de tipo Western Blot. La expresión proteica de p53, fosfo-p53, GADD45a y la histona fosforilada γ H2AX se midió en la condición de irradiación UVB.

Análisis de transferencia de tipo Western Blot a tiempos postratamiento preestablecidos "curso de tiempo" de los niveles de expresión de p53, fosfo-p53 y GADD45a después de la irradiación con UVB y el tratamiento posterior con G01

[0078] Las células NHK se sembraron en placas en el medio de cultivo específico y se mantuvieron en cultivo durante 24 ± 2 horas para permitir la adhesión a la placa. Posteriormente, las placas identificadas como +UVB y +G01/UVB post se expusieron, en el medio de irradiación, a una dosis de UVB de 25 mJ/cm². A continuación, el medio de irradiación se reemplazó luego con el medio de cultivo que contenía el compuesto de la invención G01, en una concentración de 90 μ M. Se seleccionaron tiempos de postratamiento de 1-3-6-24 horas, después de lo cual las placas se procesaron para la determinación proteica mediante transferencia de tipo Western Blot. La expresión proteica de p53, fosfo-p53 y GADD45a después de la irradiación con UVB y el postratamiento con el compuesto de la invención G01 se comparó con la expresión en las células control (Ctr).

[0079] Los resultados obtenidos se resumen en los diagramas de las Figuras 10 a 12, que representan las densitometrías de los patrones electroforéticos de inmunofijación por transferencia de tipo Western Blot obtenidos en los tiempos especificados anteriormente. Demuestran que el tratamiento posterior con el compuesto de la invención de células expuestas a UVB provoca una aceleración del aumento en los niveles de p53, fosfo-p53, y GADD45a en los tiempos más cortos, lo que da como resultado una rápida activación de los mecanismos de reparación de daños en el ADN. Como resultado general final, esta acción provoca una disminución en la expresión de los marcadores de daño en el ADN 24 horas después de la irradiación con UVB y, por lo tanto, un efecto citoprotector.

[0080] En general, los resultados experimentales obtenidos en el postratamiento de la irradiación UV muestran, para el compuesto de la invención, una actividad eficaz contra el daño en el ADN, similar a la demostrada anteriormente en el pretratamiento antes de la irradiación UV, particularmente en lo que concierne a los parámetros clave como la preservación de la viabilidad celular, la positividad para anexina V, la inhibición de la expresión proteica de la caspasa 3, los CPD y la inhibición de 8-OHdG, marcadores de daño en el ADN.

[0081] Además, en las células expuestas a la radiación UVB, el tratamiento posterior con los compuestos de la invención da como resultado una activación oportuna de los mecanismos de reparación del daño del ADN. Esto da como resultado una disminución de la expresión de los marcadores de daño a las 24 horas después de la irradiación, y un efecto citoprotector.

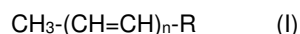
[0082] En conjunto, los datos experimentales prevén un uso contra el cáncer de los compuestos de fórmula general (I), tanto en la prevención de un cáncer que puede desarrollarse como en el tratamiento de un cáncer ya desarrollado, como resultado de un ADN humano dañado inducido por radiación UV.

[0083] Como uso secundario, dependiendo del anticanceroso, particularmente en el caso de la prevención del daño en el ADN causado por la radiación UV, se contempla un uso como principio activo en composiciones dirigidas a la fotoprotección de la piel, incluida la piel del cuero cabelludo, de los rayos UVA y UVB, para prevenir daños en el ADN potencialmente desarrollables en un cáncer.

[0084] Por esta razón, un objeto adicional de la presente invención es también dicho uso fotoprotector dependiente del descrito anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula general (I):



en la que $n = 3, 5, 7$; R se selecciona de $-\text{CO}-\text{OR}'$, $-\text{CO}-\text{O}(\cdot)$, seleccionándose R' de H, alquilo o alquénilo, arilo o aralquilo C_1-C_{22} , o azúcares; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, preferentemente tales como sales de sodio, potasio, lisina, usándose cada compuesto de fórmula general (I) como tal o en mezcla con uno o más de los otros, para su uso en la prevención o tratamiento del cáncer de piel como resultado del daño en el ADN producido por la radiación UV en los queratinocitos humanos, en el que los compuestos administrados por vía tópica a la piel producen al menos los siguientes efectos combinados: preservación de la viabilidad celular, positividad de la anexina V, inhibición de la apoptosis, inhibición de la expresión proteica de la caspasa-3, inhibición de CPD y 8-OHdG.

2. Compuestos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, destinados al uso adicional de obtener, juntos, fotoprotección de la piel, incluido el cuero cabelludo, del daño en el ADN producido por la radiación UV.

3. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en la que el principio activo es un compuesto de fórmula general (I) usado como tal o en mezcla con uno o más de los otros compuestos.

4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es ácido 2,4,6-octatrienoico.

5. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es sal de ácido 2,4,6-octatrienoico.

6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es sal de sodio de ácido 2,4,6-octatrienoico.

7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es sal de potasio de ácido 2,4,6-octatrienoico.

8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es sal de L-lisina de ácido 2,4,6-octatrienoico.

9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es éster etílico de ácido 2,4,6-octatrienoico.

10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es éster 2,4,6-octatrienílico del ácido 2,4,6-octatrienoico.

11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es acetato de 2,4,6-octatrien-1-ol.

12. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es benzoato de 2,4,6-octatrien-1-ol.

13. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho principio activo es una mezcla de dos o más de los compuestos de fórmula (I).

14. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, que comprende dicho principio activo en una cantidad de 10^{-6} a 3×10^{-2} mol/100 g.

15. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 5, que comprende dicho principio activo en una cantidad de 90 μM .

16. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15, que comprende dicho principio activo formulado con cualquier excipiente adecuado para la administración tópica en la piel o cuero cabelludo humano.

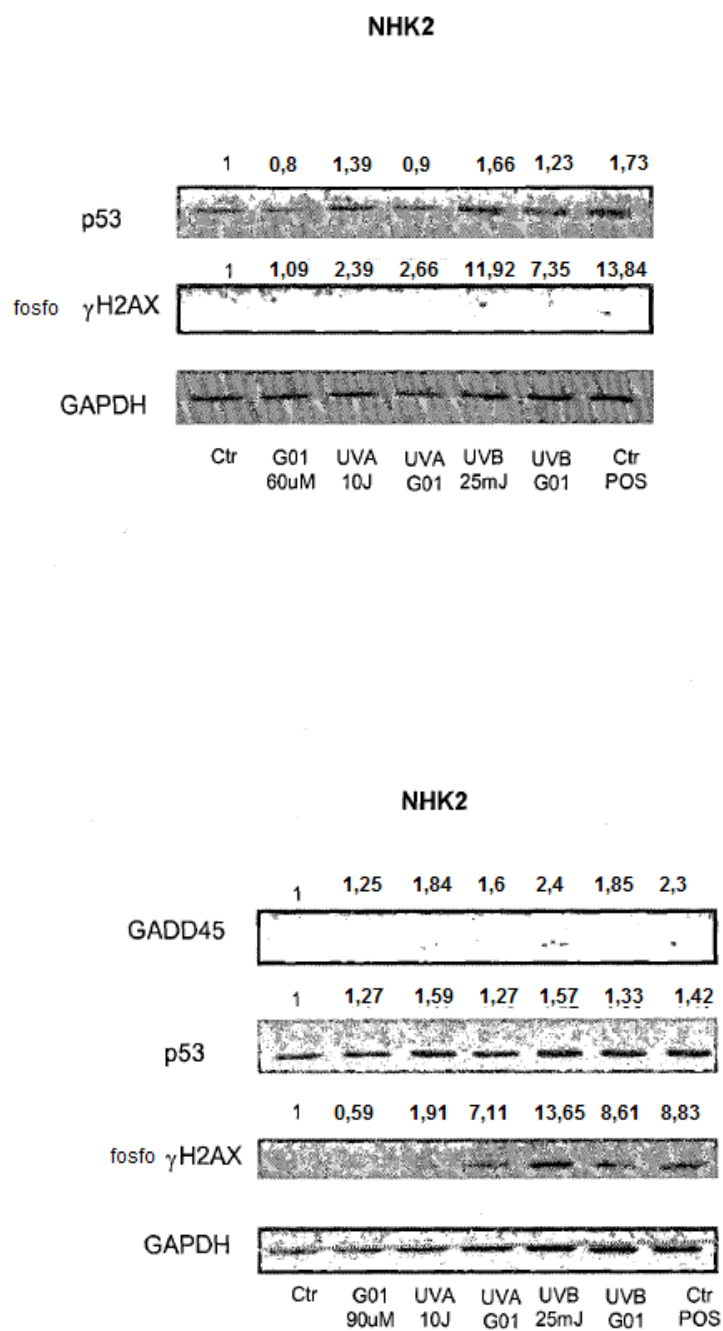
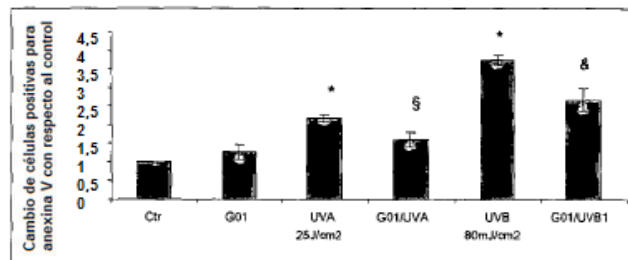


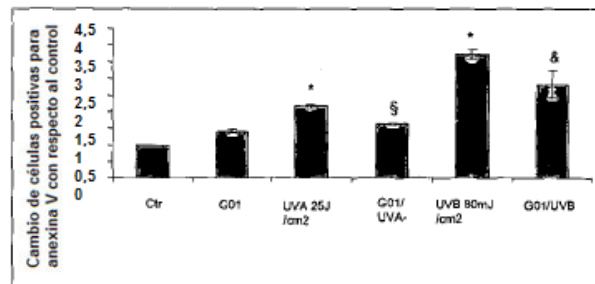
Fig. 1

NHK1



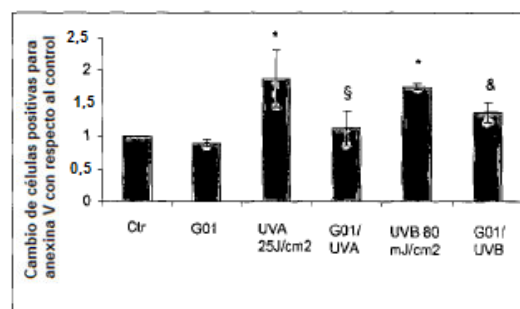
* = $p < 0.01$, respecto a Ctr
 § = $p < 0.05$, respecto a UVA 25 J/cm²
 & = $p < 0.05$, respecto a UVB 80 mJ/cm²

NHK2



* = $p < 0.01$ respecto a Ctr
 § = $p < 0.05$ respecto a UVA 25 J/cm²
 & = $p < 0.05$ respecto a UVB 80 mJ/cm²

NHK3



* = $p < 0.01$ respecto a Ctr
 § = $p < 0.05$ respecto a UVA 25 J/cm²
 & = $p < 0.05$ respecto a UVB 80 mJ/cm²

Fig.2

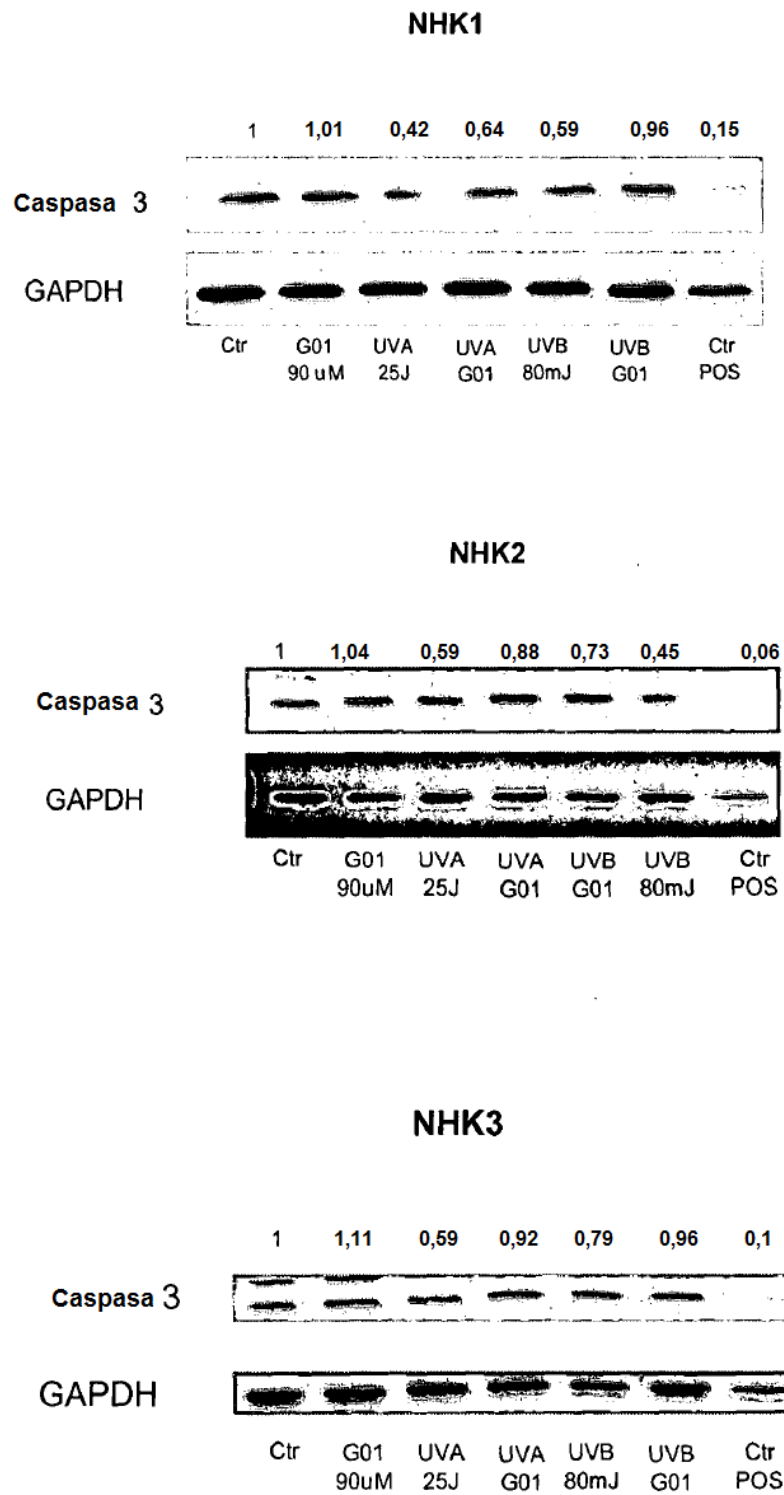
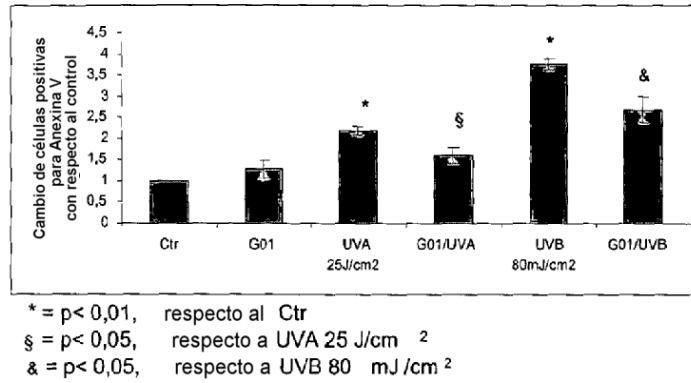
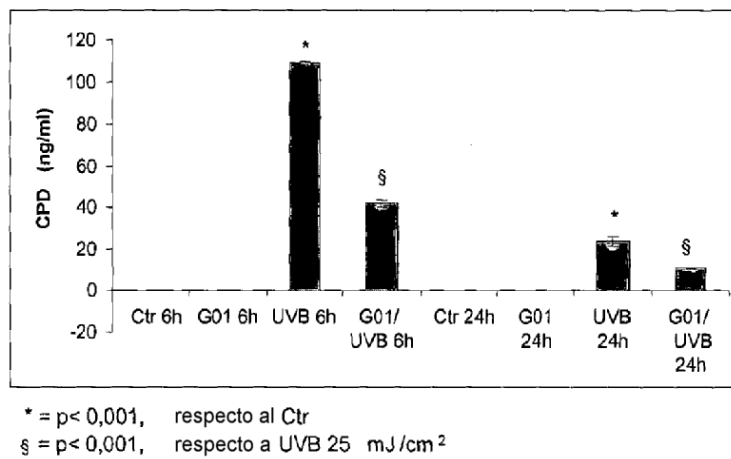


Fig. 3

NHK1



NHK2



NHK3

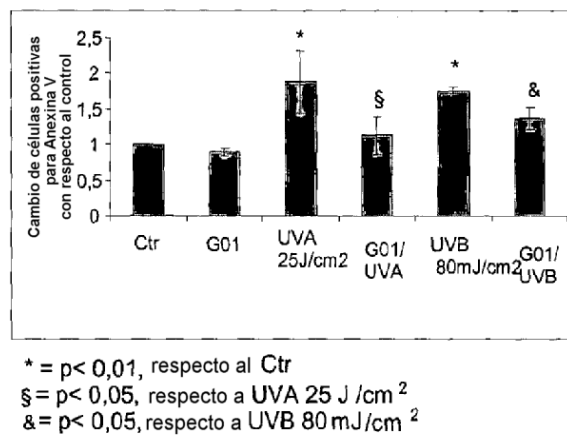
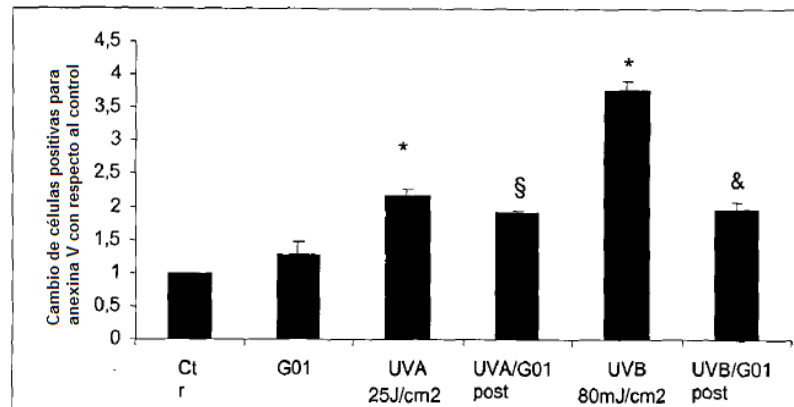


Fig. 4

NHK1

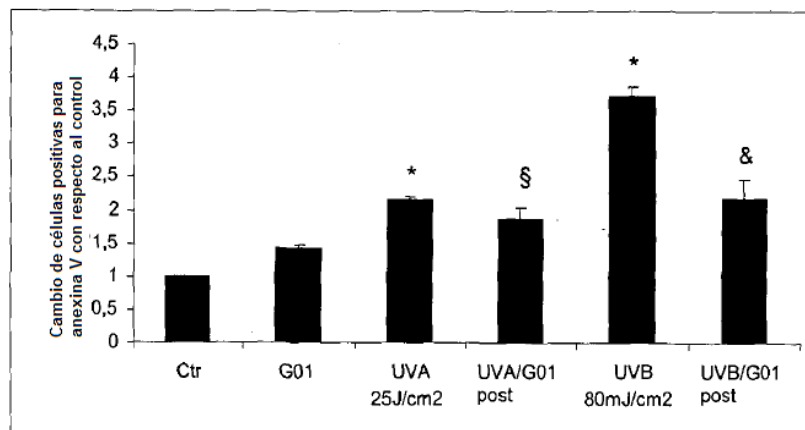


* = $p < 0,01$, respecto a Ctr

§ = $p < 0,05$, respecto a UVA 25 J/cm²

& = $p < 0,01$, respecto a UVB 80 mJ/cm²

NHK2



* = $p < 0,01$, respecto a Ctr

§ = $p < 0,05$, respecto a UVA 25 J/cm²

& = $p < 0,01$, respecto a UVB 80 mJ/cm²

Fig. 5

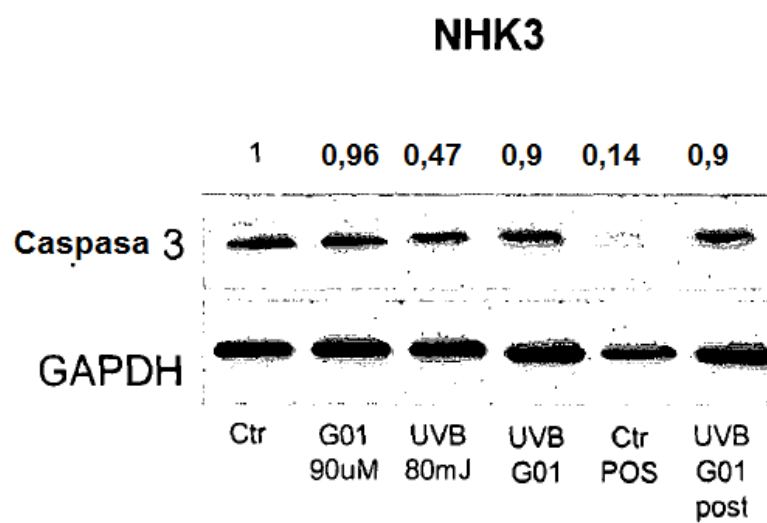
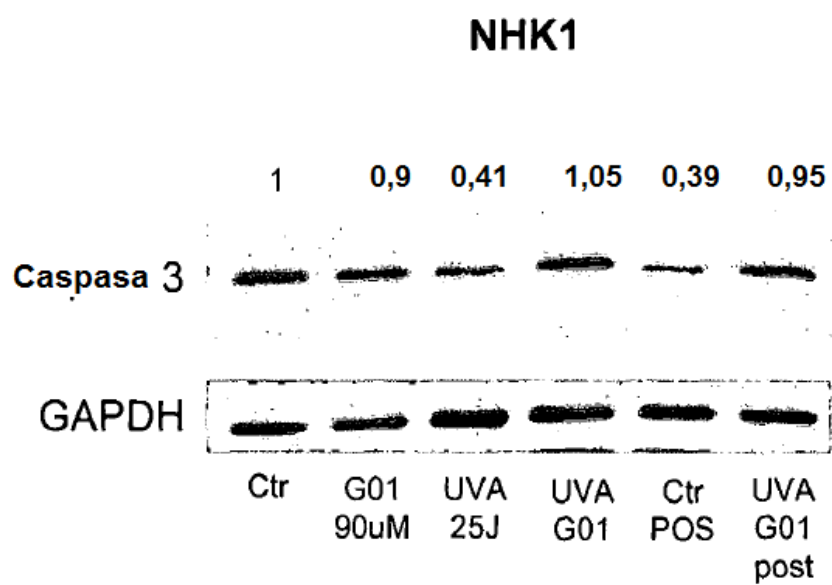
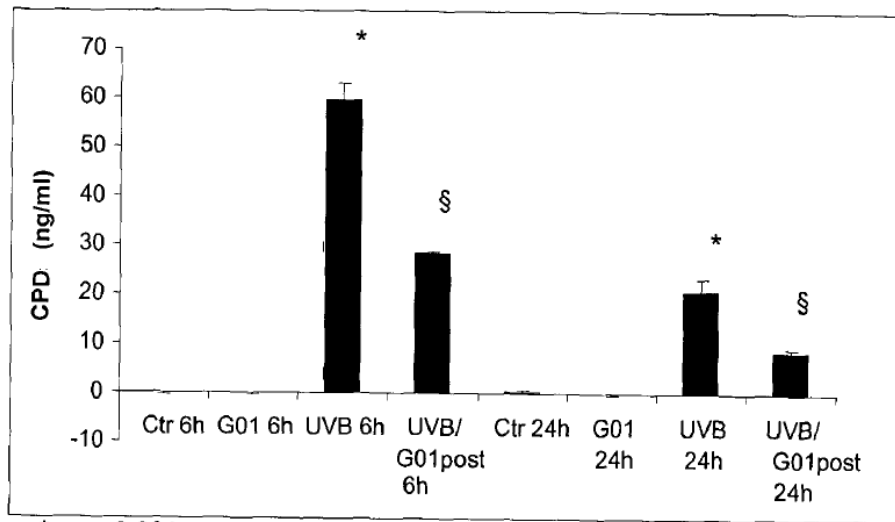


Fig. 6

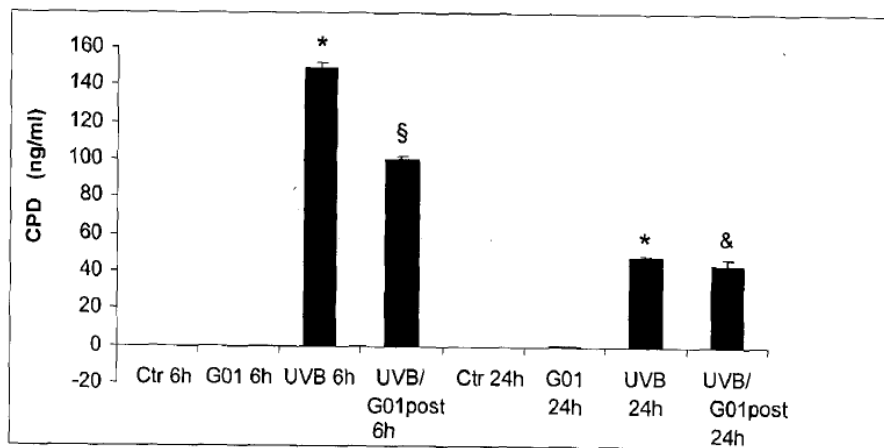
NHK1



* = $p < 0,001$, respecto a Ctr

§ = $p < 0,001$, respecto a UVB 25 mJ/cm^2

NHK3



* = $p < 0,001$, respecto a Ctr

§ = $p < 0,005$, respecto a UVB 25 mJ/cm^2 6h

& = $p < 0,05$, respecto a UVB 25 mJ/cm^2 24h

Fig. 7

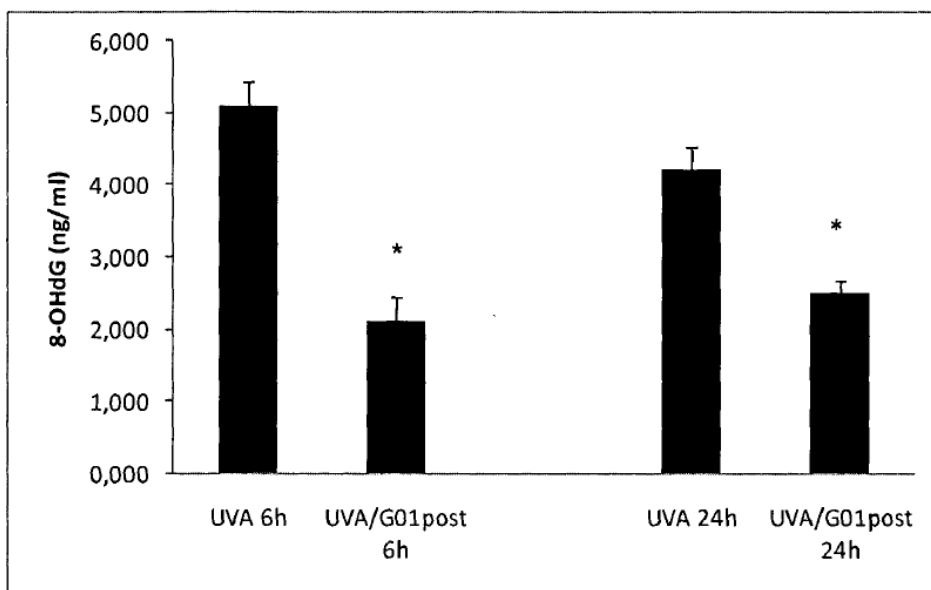


Fig. 8

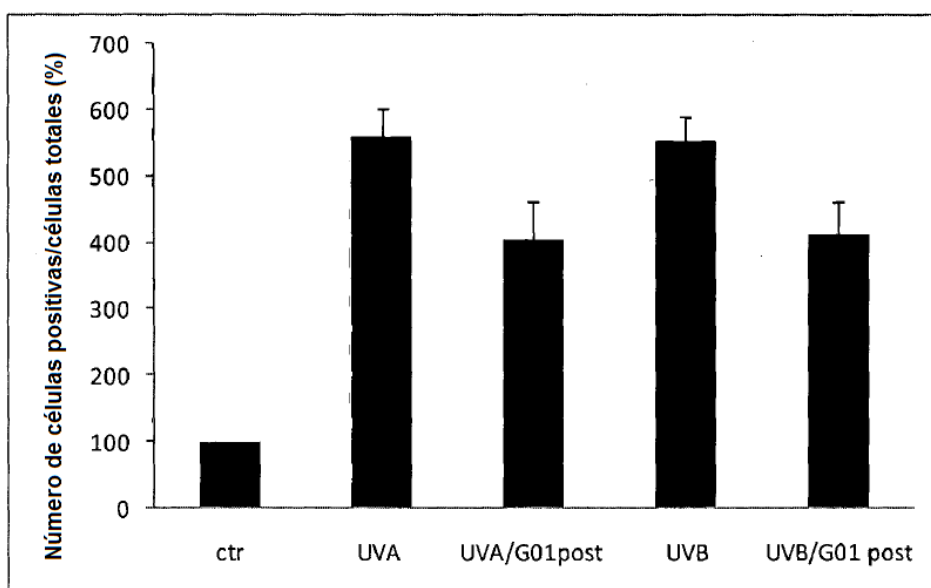


Fig. 9

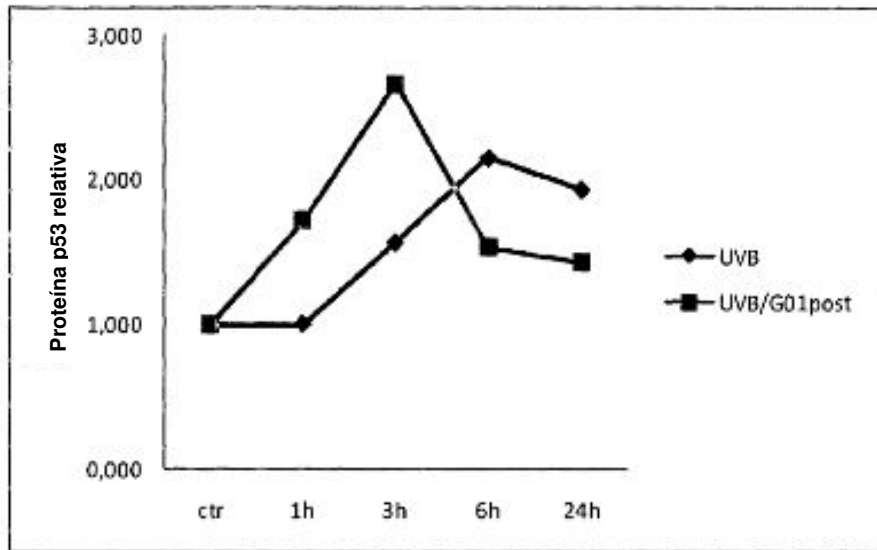


Fig. 10

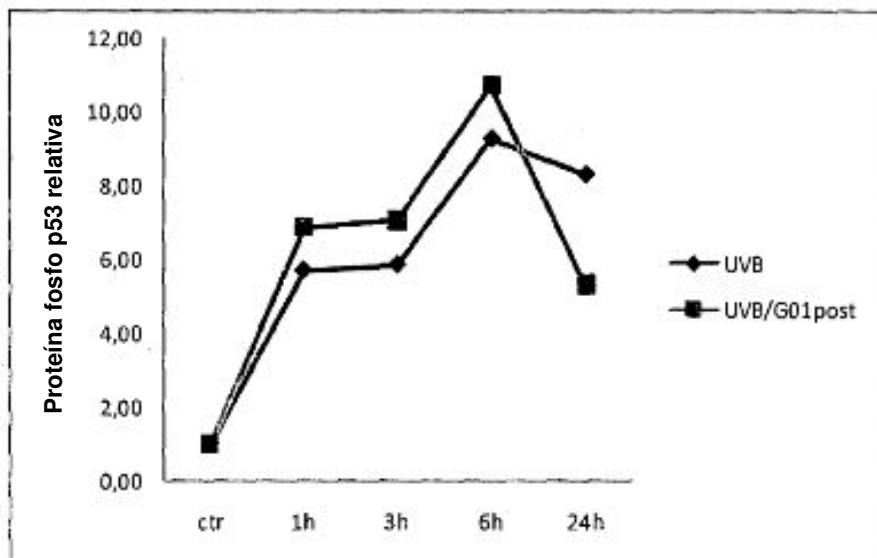


Fig. 11

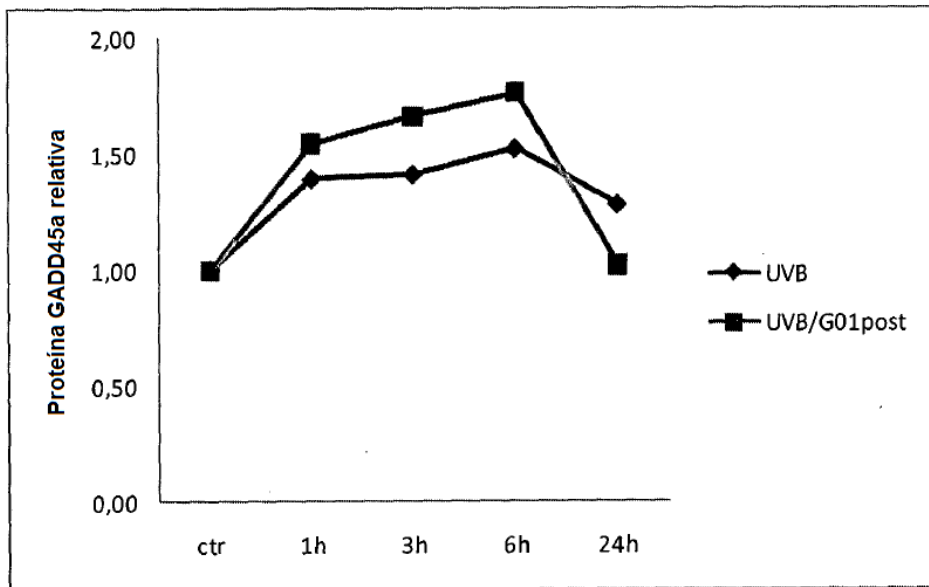


Fig. 12