

VI Conferencia Internacional
Científico Pedagógica de Educación Física y Deportes
Pinar del Río '07

**Título: Efecto de extractos de *Cúrcuma longa* L. sobre el citoesqueleto de los queratinocitos humanos en el envejecimiento cutáneo. (Parte I)
Resultados en aplicaciones de una crema a pacientes con Psoriasis (Parte II)**

**Autores: Dr. Sc. Prof. tit. Juan de J. García Martín ⁽¹⁾
Dra. Sc. Prof. tit. María de Lourdes Rodríguez Pérez ⁽²⁾
Dr. Sc. Víctor González Canavaciolo ⁽¹⁾
Dr. Med. Jesús Rubio González ⁽³⁾**

**Instituciones: ⁽¹⁾ Centro de Productos Naturales del Centro Nac. de Investigaciones Científicas. CINC. La Habana, Cuba.
⁽²⁾ Facultad de Cultura Física "Nancy Uranga ". Pinar del Río, Cuba.
⁽³⁾ Médico General del Sanatorio Prov. SIDA del CPHE. MINSAP. Pinar del Río, Cuba.**

El envejecimiento cutáneo es el conjunto de alteraciones fisiológicas en la piel unidas a los procesos de envejecimiento en general.

Es importante distinguir entre el propio envejecimiento cutáneo intrínseco o fisiológico, cuyos factores desencadenantes son: la determinación genética, las alteraciones celulares, nucleares, mitocondriales, enzimáticas etc. y el extrínseco o actínico determinado por factores nutricionales, hormonales (menopausia) tóxicos y climáticos (radiaciones UV). En ambos casos las consecuencias son las mismas: alteraciones de las estructuras y de las funciones de la piel.

Las bases biológicas del envejecimiento, son debidas por una parte a los factores intrínsecos genéticos, en particular a los ácidos nucleicos, es conocido que la esperanza de vida varía según la especie, aunque por otra parte, intervienen los denominados errores moleculares en la transcripción del DNA afectando intensamente la síntesis de las proteínas. Los defectos de la reparación del DNA inducen a una pérdida de estructuras fisiológicas donde los errores

metabólicos participan de una manera específica en la desviación del programa biológico.

La Teoría celular del envejecimiento cutáneo se basa en la constatación «in vitro» de Hayflick y Moorhead: Los fibroblastos embrionarios humanos tienen en cultivo una vida limitada, ideas contrarias a las originales expuestas por Alexis Carrel. El modelo de fibroblastos humanos nos puede dar ciertas informaciones en cuanto al envejecimiento, ya que dependiendo de la duración del cultivo la proliferación celular disminuye, existen modificaciones en las matrices extracelulares, en la forma celular y en su estructura (citoesqueleto rígido, alteraciones en la reparación del DNA y anomalías cromosómicas).

Recientemente los cultivos de queratinocitos han permitido estudiar las modificaciones «in vitro», debido a factores de crecimiento en la piel procedente de donadores diferentes (recién nacido, adulto joven, y anciano).

La hipótesis actual, en mucho de los casos controvertida, está representada por la teoría de los radicales libres: Los superóxidos lipídicos y los productos de reducción del oxígeno principalmente en el anión O⁻². Estos peróxidos pueden tener un origen enzimático, o ser productos fisiológicos del metabolismo celular o enzimático (influencia de las radiaciones UV). La acumulación progresiva de estos radicales, en parte debidos a un defecto antioxidante (superóxido-dismutasa) tiene múltiples consecuencias: alteraciones de los lípidos o de las proteínas, de membranas (citoplasmáticas, liposomales, mitocondriales), afectación de ácidos nucleicos, despolimerización de proteínas de la dermis, agregados y cross-links moleculares.

Son conocidas las alteraciones que durante el periodo de vida se producen en la piel y que intentamos resumir en esta breve introducción:

-En el tejido epitelial, por la propia fisiología intrínseca se produce una atrofia epidérmica (sobre todo en el estrato de Malpigio), alteraciones de los corneocitos y de los espacios intercelulares, ocasionando modificaciones en el relieve cutáneo.

-Por el envejecimiento cutáneo actínico o extrínseco, nos encontramos con anisocitosis, alteraciones de las células basales y modificaciones en los estratos mucosos y de la capa granulosa. Estos hechos han sido expuestos en evidencia

por medio del estudio de descamación de los corneocitos «in vitro» y de la tasa del índice de proliferación de la epidermis.

Estos cambios en el tejido epitelial afectan directamente a las funciones específicas de la epidermis: a) Alteraciones de su función de hidratación; b) función barrera; c) susceptibilidad a los fenómenos de irritación y de sensibilización; d) disminución de la producción de Vitamina D, en parte debido a la disminución del contenido epidérmico en 7-dihidrocolesterol.

En el sistema pigmentario durante el envejecimiento cutáneo se observa una disminución del número de melanocitos con reducción natural de los efectos de las radiaciones UV, o una hiperpigmentación debida en parte a las alteraciones propias de los melanosomas

Las células de Langerhans, por el propio envejecimiento cutáneo intrínseco se encuentran disminuidas encargándose el envejecimiento extrínseco de originar las alteraciones adicionales, modificaciones en la expresión antigénica y en la producción de citoquinas (IL-1), hechos que influyen de manera muy importante en los procesos de fotocarcinogénesis y en la propia inmunidad local de la piel.

La unión dermo-epidérmica, estructura fundamental donde se establece el diálogo entre epidermis y dermis, muestra durante la vida un progresivo aplanamiento debido a la disminución de su espesor lo que se traduce con el aumento de la fragilidad cutánea.

Por la importancia que tiene el citoesqueleto dentro de la fisiología normal de la célula, nosotros en este trabajo hemos pretendido estudiar la proliferación celular, el citoesqueleto, la expresión de la fibronectina, y la desmoplaquina en cultivos de queratinocitos humanos de diferentes edades y en sucesivos pasajes añadiendo el extracto de una planta medicinal aclimatada en Cuba y que se conoce en su uso tradicional como yuquilla amarilla (*Curcuma longa L.*). Es interesante ver en los resultados no solo la capacidad de estos extractos de exhibir su poder antioxidante, sino su actividad antiinflamatoria en su uso en diferentes formas farmacéuticas, como las cremas, capsulas y extractos en diferentes menstros...Hoy se sabe que la *Curcuma longa L.* del noroeste de Pinar del Río, posee un elevado potencial ORAC (Oxygen Radicals Activity Capacity), de esta

planta se ha aislado una flavoproteína(Tyrfostinas) con acciones hepatoprotectoras (Anivirales) e hipolipemiantes (Colesterol y triglicéridos) (García Martín J).; (Journal of Natural Products Feb. 2002).

Resultados

-Cultivos de queratinocitos.

-Tiempo de confluencia y número de pasajes.

Edad	Cultivos	No. Pasajes	Signos de Dif.
Feto (4 semanas)	10 días	4 *	A partir del 3er p.
Neonato(30 días)	10 días	4 *	A partir 3er pasaje
4-9 años	13 días	3	A partir 3er pasaje
18-31 años	17 días	3	A partir 2do pasaje
45-60 años	19 días	2	A partir 2do pasaje
80 años	21 días	1 **	A partir 1er pasaje

* $p= 0,05$

** $p= 0,01$

Discusión:

Morfología

Los queratinocitos embrionarios, procedentes de recién nacidos de 30 días y los de edades comprendidas entre 4-9 años, muestran una morfología prácticamente idéntica. En cultivo primario estos queratinocitos forman colonias grandes llegando a la confluencia manteniendo la morfología intacta. Tras el primer pasaje, llegan a la confluencia sin formar colonias y manteniendo su morfología poligonal inicial. En el tercer pasaje las células forman colonias en cuyos centros observamos pequeñas células poligonales de queratinocitos con gran citoplasma y de distintos tamaños, característico de células que inician su diferenciación. No obstante no aparecen signos de estratificación. El número total de pasajes en estos queratinocitos fue significativo ($p=0,05$)

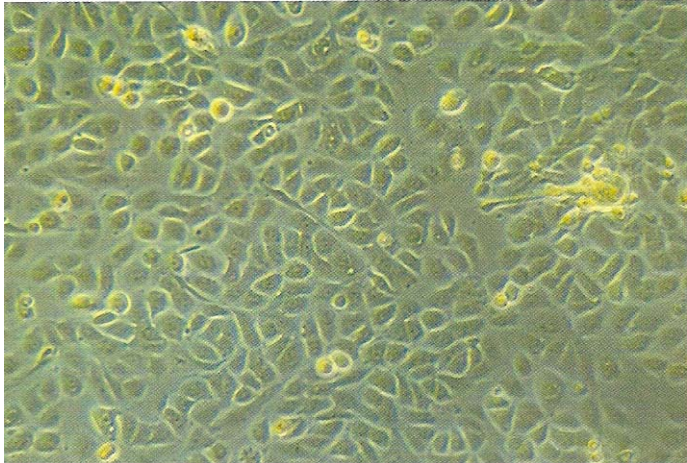
Los queratinocitos procedentes de donantes entre 18 y 60 años, muestran en cultivos primarios pequeñas colonias que confluyen manteniendo las células con un aspecto homogéneo. A partir del segundo pasaje, las células ya no llegan a la

confluencia y solo podemos observar colonias centradas por queratinocitos de gran tamaño rodeadas por células mas pequeñas.

Los queratinocitos procedentes de donantes de 80 años, presentaron en el cultivo primario una morfología diferente a los anteriores. Los queratinocitos no mantenían una forma ni un tamaño similar, existen colonias en las cuales observamos un crecimiento vertical es decir estratificación y poco desplazamiento lateral. Se llega a la confluencia con un cultivo de morfología no homogénea.

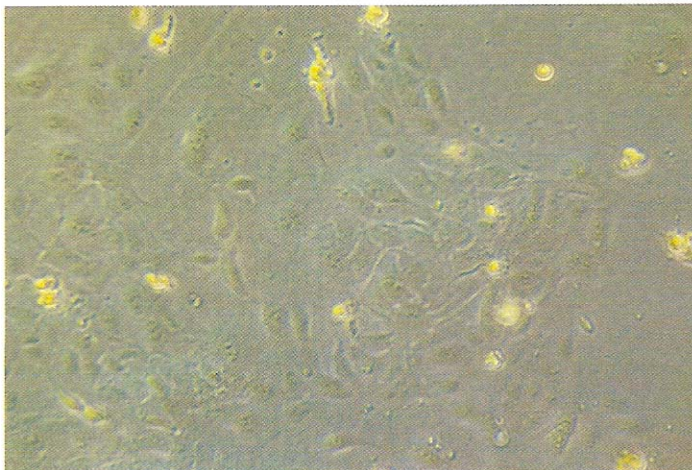
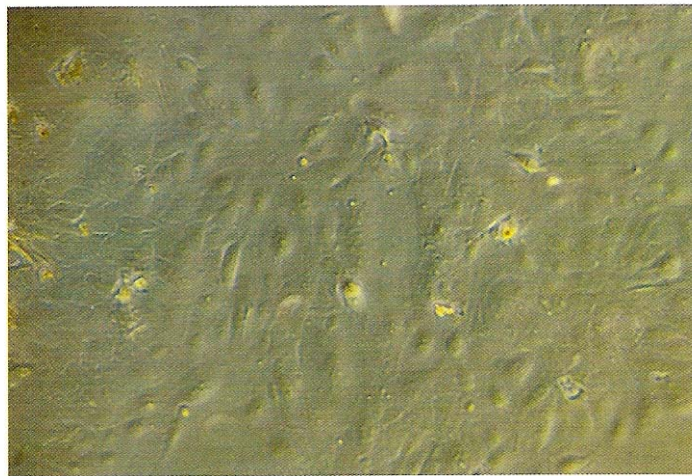
Tras el primer pasaje, los queratinocitos forman colonias que no llegan a confluir y que aumentan su crecimiento vertical observándose signos de diferenciación.

Fue altamente significativo ($p= 0,01$), el que en estos cultivos solo pudimos realizar un pasaje.(Ver fotos de cultivos de células Fig 1,2,3. cultivos de queratinocitos de piel de niño, adulta su morfología está perdida---La figura 3) despues de añadir el extracto de *Curcuma longa* L. recupera su morfología).



Cultivo de queratinocitos procedente de piel de niño. Se observa la forma poligonal y regular de las células.

Cultivo de queratinocitos procedente de piel adulta. Se pierde la morfología celular.



Cultivo anterior + extracto de *Curcuma Longa*. Las células recuperan su morfología.

Citoesqueleto. Estudio

Edad	Neonatos	60-70 años	60-70 + Cúrcuma
CP Actina UP	+++	+	+++
CP Tubulina UP	+++	++	+++
CP Quer bas. UP	++	++	+++
CP Q.Total UP	+	++	+
CP Q.Total UP	++	++	+++
CP Quer-1-10 UP	-	+++	+
CP Fibronectina UP	-	++	-
CP Fibronectina UP	+++	++	+++
CP Desmoplaqui UP	+	-	+
CP Desmoplaqui UP	+++	+	+++
CP Desmoplaqui UP	+++	-	++
BrdU	80%	20%	65%

Leyenda:

BrdU=Bromodeoxiuridina

+ = marcaje débil

++= marcaje moderado

+++=marcaje intenso

CP= Cultivo primario

U.P= Ultimo pasaje

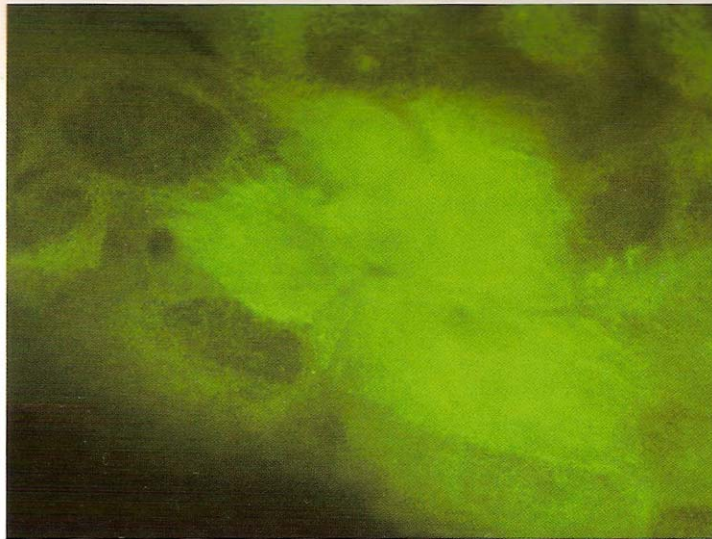
P*= 0,001

Los microfilamentos de actina están presentes en todos los cultivos realizados, si bien su expresión es menos intensa en los queratinocitos embrionarios y en los adultos (mayores de 80 años). El patrón de distribución no fue exactamente igual ya que en los queratinocitos embrionarios exhibían la actina con la morfología

típica de los filamentos de STRESS. Esta disposición de la actina fue constante y de marcaje más intenso en los queratinocitos hasta 31 años, posteriormente los queratinocitos mas adultos presentaban los microfilamentos justo debajo de la membrana citoplasmática perdiendo la estriación típica. Con el extracto de *Cúrcuma longa* L existía una expresión prácticamente igual a los neonatos.

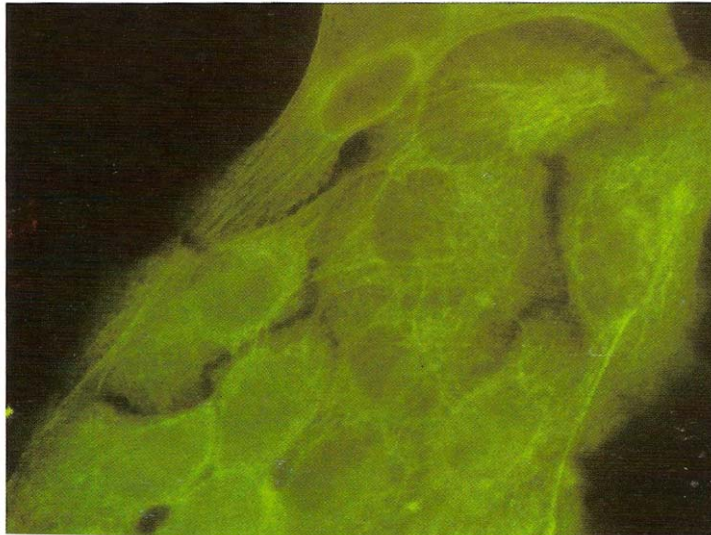
Los microtúbulos demostraron en los cultivos embrionarios y de adultos jóvenes un intenso marcaje de los mismos y fue típico observar múltiples formaciones de husos mitóticos en las células a veces de manera anormal ya que los husos se formaban por la unión de otras células. En los cultivos de adultos observamos una disposición correcta de los microtúbulos acumulándose especialmente debajo de la membrana citoplasmática igual que los filamentos de actina y encontrando pocas formaciones en huso que al añadir *Cúrcuma longa* volvían a aparecer.

La queratina de peso molecular 56,5 KD (Queratina basal, KL-1), solo estuvo presente en los cultivos primarios y con moderada intensidad en los queratinocitos embrionarios (Ver fotos de expresión de las queratinas en cultivo procedentes de piel adulta y foto después de añadir extracto de *Cúrcuma longa* L., estructura normal de los tonos filamentosos) y procedentes de piel de niño; ésta queratina mostró un patrón citoplasmático compacto.



Expresión de las queratinas en cultivos procedentes de piel adulta.

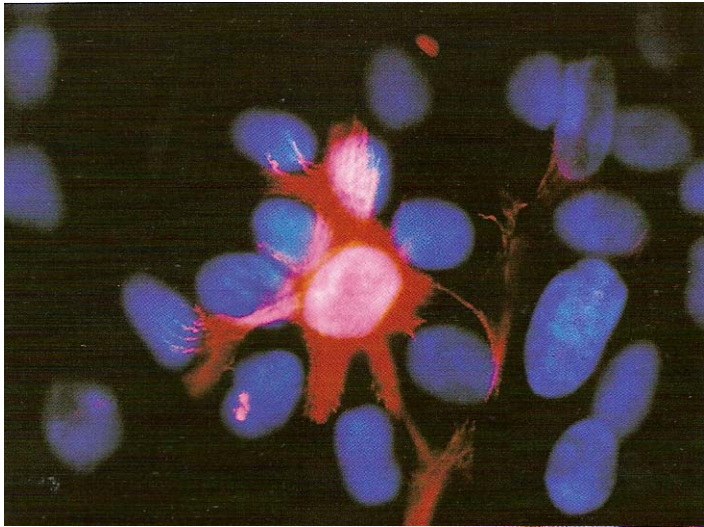
Expresión de las queratinas cuando se añade extracto de *Curcuma Longa*. Se observa una estructura normal de tonofilamentos.



En los últimos pasajes no observamos la presencia de queratina basal en los cultivos de queratinocitos adultos. Las queratinas totales siempre estuvieron presentes tanto en los cultivos primarios como en los últimos pasajes, el patrón de esta queratina no fue compacto, se distribuye de forma fibrilar por todo el citoplasma de la célula estableciendo conexiones con los dermosomas.

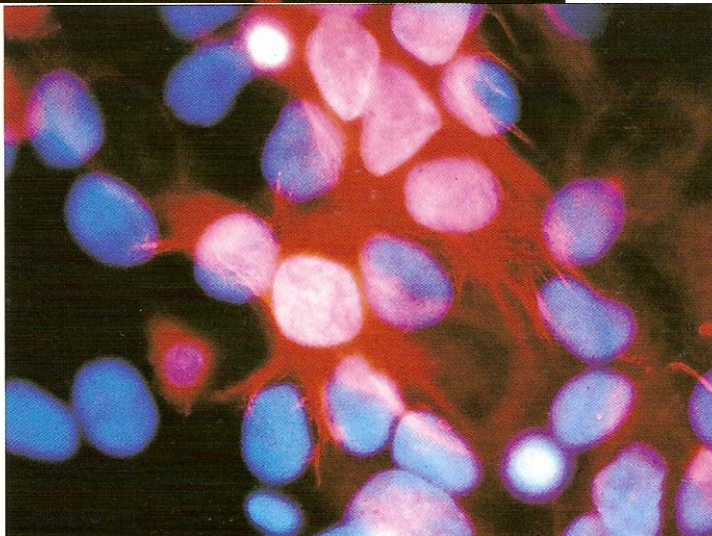
La queratina 1-10 representante de los filamentos intermedios diferenciados fue totalmente negativa en los cultivos primarios procedentes de piel de fetos y de niño, no obstante en los últimos pasajes se evidenció una manera débil, mientras que en los adultos el marcaje de esta queratina fue muy intenso, mostrando largos filamentos de disposición paralela en el citoplasma.(Ver fotos expresión de una

queratina fetal en cultivos de piel adulta y expresión de la misma después de añadir extracto de *Cúrcuma longa*).



Expresión de una queratina fetal en cultivos de piel adulta.

Expresión de la misma queratina cuando se añade extracto de *Curcuma Longa*. Nótese el aumento de expresión.



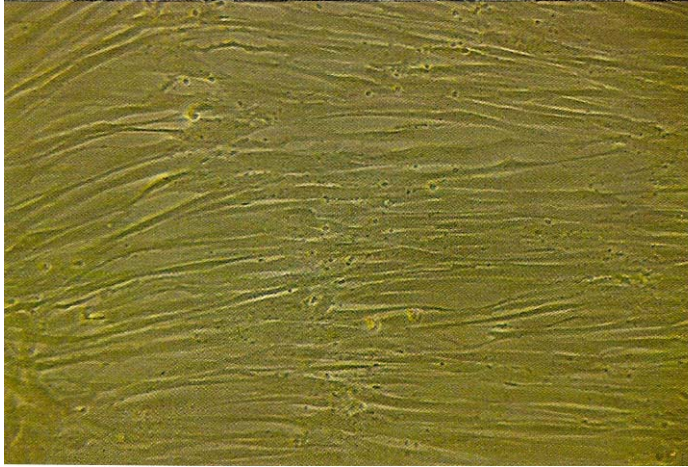
La fibronectina fue intensamente positiva en los cultivos primarios jóvenes formando paquetes de microfibrillas en la periferia del citoplasma, negativizándose prácticamente en los últimos pasajes y reapareciendo con el Extracto de *Cúrcuma longa* .

Con el estudio de la desmoplaquina, pudimos observar solo un marcaje intenso en los queratinocitos jóvenes. Tras los sucesivos pasajes los queratinocitos adultos mostraron solo un débil marcaje.

El estudio de la proliferación mediante la incorporación de la BrdU demostró que existe una diferencia significativa entre los cultivos de células embrionarias y las de adultos de 80 años, mientras que los demás mostraron cierta oscilación no siendo los estudios estadísticos significativos.

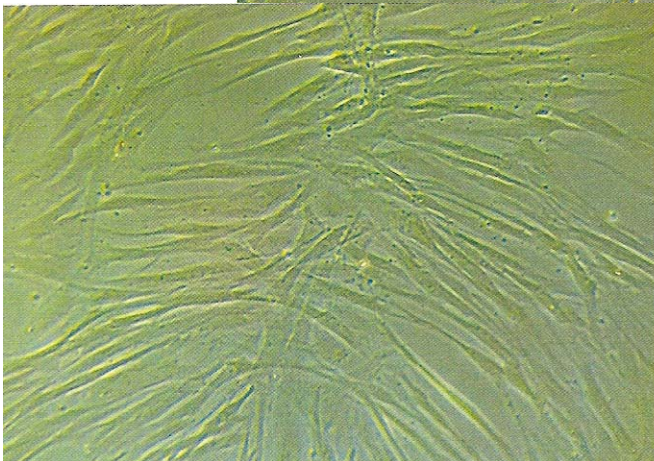
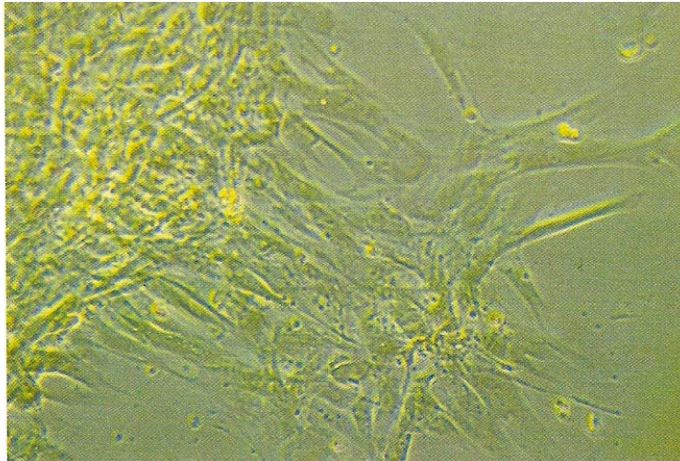
Los queratinocitos procedentes de donantes de 80 años, presentaron en el cultivo primario una morfología distinta a los anteriores. Los queratinocitos no mantenían una forma ni tamaño similar, existen colonias en las cuales observamos un crecimiento vertical, es decir estratificación y poco desplazamiento lateral. Se llega a la confluencia con un cultivo de morfología no homogénea. Tras el primer pasaje, los queratinocitos forman colonias que no llegan a confluir y que aumentan su crecimiento vertical observándose signos de diferenciación. Fue altamente significativo ($p= 0,01$), el que en estos cultivos solo pudimos realizar un pasaje.

Tras añadir el extracto de *Cúrcuma longa* L. en cultivos de edades entre 60-80 años nos encontramos con la morfología en empedrado simulando los cultivos de edades mas jóvenes. (Ver fotos cultivos de fibroblastos fetales, de fibroblastos adultos y después la de fibroblastos adultos después de añadir el extracto de *Cúrcuma longa* L. se ve una reestructuración celular).



Cultivo de fibroblastos fetales.

Cultivo de fibroblastos adultos. Se observa una falta de polaridad y morfología estrellada.



Cultivo de fibroblastos adultos + extracto de Curcuma Longa. Se observa una reestructuración celular.

Conclusiones:-

Cuando se añade el extracto de Cúrcuma longa L a los cultivos observamos lo siguiente:

-Existe una reestructuración del citoesqueleto que se evidencia por la aparición de imagen en mosaico o empedrado de los queratinocitos procedentes de piel de 60 años de edad cuando en realidad en nuestros controles esta morfología solo permanecía en cultivos hasta los 20 años.

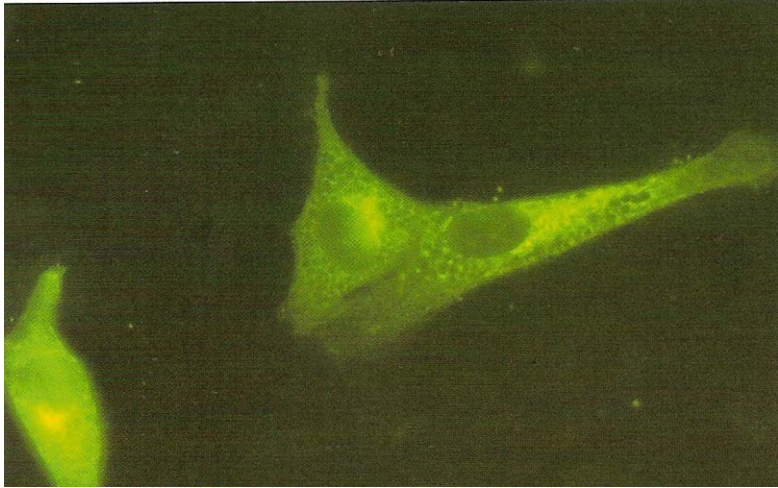
-En los cultivos de células procedentes de prepucio de 3 años existía una expresión intensa de las queratinas de proliferación, este hecho desaparece a medida que el cultivo procede de células adultas, al añadir el extracto de *Cúrcuma longa* la expresión de esta queratina reaparecía nuevamente en queratinocitos adultos, igual que ocurría con el anticuerpo antipanqueratina y anti-tubulina.

Con el anticuerpo antitubulina aparecían las imágenes claras de huso cromático que desaparecerán con la edad.

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1.- Reestructuración celular: | -Queratinas
-Morfología |
| 2.- Capacidad de reparación: | -Desmoplaquina
-Fibronectina |
| 3.-Movilidad fisiológica normal | -Tubulina
-Actina |

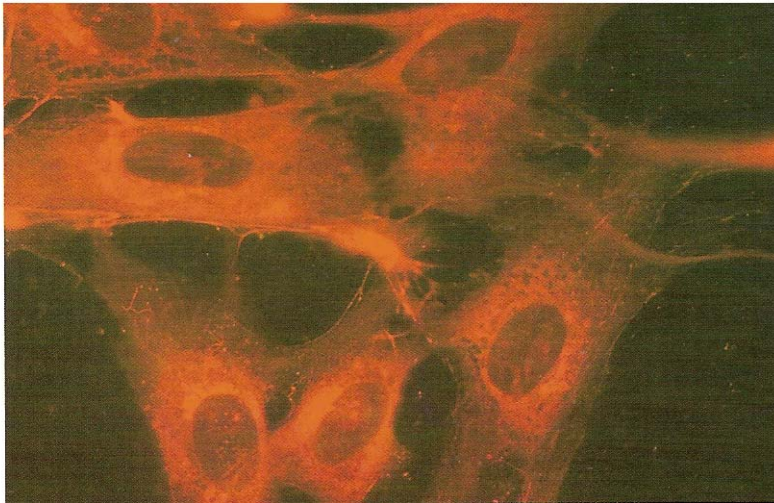
La expresión de la desmoplaquina y la fibronectina fue muy fuerte cuando en los cultivos procedentes de piel adulta se les añade el extracto de *Curcuma longa*.

La actina presentaba la imagen típica de filamentos de estrés en todos nuestros cultivos de células adultas adicionados con extracto de *Curcuma longa*.
L.(Ver foto Expresión de Colágeno y aumento de la expresión de colágeno al añadir extracto de *Cúrcuma longa* L.)



Expresión de Colágeno en cultivo de fibroblastos adultos.

Aumento de la expresión de Colágeno al añadir a los cultivos extracto de *Curcuma Longa*.



BIBLIOGRAFÍA

- García Martín J. Et al. "The isolation and Characterization of Tirfostines as antioxidants flavoproteins from *Curcuma longa* Extracts". *Journal of Natural Products*- Feb 2002-NPU-England
- Miquel, J y Flemming, J.: *Theoretical and Experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of cell aging. Free radicals, Aging and degenerative diseases.* Jhonson, J.E. Eds Alan R. Liss, New York 1986 pp 51-74
- Ramírez Boscá, A; *Antioxidant curcuma extracts decrease the blood lipids peroxide levels of human subjects Age 18* pp. 167-169, 1995
- Selvan, R et al: "The antioxidant of turmeric (Extracto de *Curcuma longa*) J". *Ethnopharmacology* 47: pp 59-67, 1995.