

Estudio morfométrico *in vivo* con microscopía confocal en tiempo real de las alteraciones epidérmicas de la piel tras dosis bajas y repetitivas de radiación ultravioleta A (UVA)

Lara Ferrándiz y Salvador González

Wellman Laboratories of Photomedicine. Dermatology Department. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School. Boston. Massachusetts. EE.UU.

Resumen.—El histiocitoma fibroso aneurismático es una rara variante de dermatofibroma. Clínicamente es preciso hacer el

JOSÉ GREGORIO ÁLVAREZ FERNÁNDEZ
ANA PÉREZ CAMPOS

Resumen.—*Introducción:* es bien conocido que la exposición de la piel a dosis eritemogénicas de rayos ultravioleta B (UVB) y A (UVA) produce importantes alteraciones epidérmicas y dérmicas. El objetivo de este estudio es examinar *in vivo*, mediante microscopía confocal en tiempo real, los cambios producidos en el grosor de la epidermis y sus distintas capas tras la exposición de la piel no expuesta a dosis suberitemogénicas diarias de UVA.

Material, métodos y resultados: cuatro voluntarias fueron irradiadas con la mitad de la dosis mínima eritemogénica de UVA en un área de 1 cm² en la cara interna del antebrazo durante 5 días consecutivos por semana hasta alcanzar un total de 15 dosis acumuladas. Los cambios epidérmicos fueron evaluados *in vivo* una vez por semana con microscopía confocal midiendo en cada evaluación el grosor del estrato córneo, de la epidermis suprapapilar y de los procesos epidérmicos interpapilares. La epidermis mostró un aumento progresivo, tanto del grosor de la capa córnea como de la epidermis suprapapilar; a partir de la segunda evaluación (9 dosis) en el caso del estrato córneo y de la primera (4 dosis) en el caso de la epidermis suprapapilar. Este incremento fue significativo ya desde la tercera evaluación. Por el contrario, el grosor de los procesos interpapilares no mostró cambios significativos.

Conclusiones: el carácter no invasivo y la posibilidad de visualizar *in vivo* y en tiempo real secciones ópticas transversales de la piel con alta resolución y contraste convierte a la microscopía confocal en una técnica de gran utilidad para el estudio de procesos dinámicos como el fotoenvejecimiento. Los hallazgos del presente estudio demuestran que dosis pequeñas y repetitivas de UVA producen una serie de alteraciones epidérmicas, consistentes fundamentalmente en un aumento en el grosor de la epidermis, que probablemente representan una respuesta protectora de la piel contra la radiación ultravioleta y que deben ser consideradas como las alteraciones precoces del fotoenvejecimiento cutáneo.

Palabras clave: alteraciones epidérmicas, UVA, microscopía confocal, morfometría.

Ferrándiz Pulido L, González S. Estudio morfométrico *in vivo* con microscopía confocal en tiempo real de las alteraciones epidérmicas de la piel tras dosis bajas y repetitivas de radiación ultravioleta A (UVA). *Actas Dermosifiliogr* 2003;94(2):84-9.

A *IN VIVO*, REAL TIME CONFOCAL SCANNING LASER MICROSCOPY STUDY OF THE EPIDERMIS AFTER EXPOSITION OF THE SKIN TO LOW AND REPETITIVE DOSES OF ULTRAVIOLET A (UVA) RADIATION

Abstract.—*Introduction:* repetitive exposure of skin to erythemogenic doses of UVA and UVB is known to produce epidermal changes in human skin. The aim of the present study is the use of high resolution *in vivo* confocal imaging to assess the effects of repetitive low-dose UVA irradiation on human epidermis.

Methods and results: 1 cm² area on the inner aspect of the arm of 4 volunteers was exposed to a suberythemal dose (0.5 minimal erythema dose [MED]) of UVA once daily, 5 days a week, for 15 cumulative doses. *In vivo* epidermal changes were analyzed and quantified with a confocal microscope. In each imaging the thickness of the stratum corneum as well as the suprapapillary page (SPP) and rete page were evaluated. Both the stratum corneum and the suprapapillary epidermis showed a progressive increase in their thickness since the second (9 doses) and first (4 doses) evaluation, respectively. The increase was statistically significant since the third evaluation. On the other hand, the thickness of the rete page did not show significant changes.

Conclusion: real-time reflectance confocal microscopy is a novel imaging tool that allows to assess *in vivo* optical sectioning of skin with high resolution and contrast. Hence, confocal microscopy can be very useful for the study of dynamic processes as photodamage.

The results of this study demonstrate that low and repetitive doses of UVA include epidermal changes, mainly in the epidermal thickness, that probably represent a protective reaction of the skin against UVA radiation, and must be considered early changes of skin photodamage.

Key words: epidermal changes, UVA, confocal microscopy, morphometry.

INTRODUCCIÓN

La microscopía confocal es una técnica de exploración no invasiva de reciente aplicación en diversos campos de la medicina^{1,2}. Dada la fácil accesibilidad

Correspondencia:
Lara Ferrándiz Pulido. Muntaner, 432, 3.º 08006 Barcelona.
Aceptado el 31 de octubre de 2002

de la piel y el carácter incruento de la técnica, no cabe duda que abre un amplio abanico de posibilidades de aplicación en Dermatología para el estudio microscópico *in vivo* y en tiempo real de las alteraciones morfológicas y morfométricas de la piel normal y de diversos procesos patológicos con una resolución comparable a la obtenida con la microscopía convencional^{3,4}.

En el campo de la fotobiología es bien conocido que la exposición de la piel a dosis eritemogénicas de rayos ultravioleta A (UVA) y B (UVB) produce importantes alteraciones epidérmicas y dérmicas⁵⁻⁷. También, más recientemente, se ha demostrado en modelos animales y en humanos voluntarios sanos, a través del estudio de biopsias secuenciales, que tras la exposición repetitiva de la piel a dosis suberitemogénicas de UVA aparecen una serie de cambios en la epidermis y en la dermis que ayudan a comprender el efecto «crónico» que la exposición cotidiana a los UVA produce en la piel^{8,9}.

El objetivo de este estudio es examinar *in vivo* con microscopía confocal en tiempo real, los cambios producidos en el grosor de la epidermis y en sus distintas capas tras la exposición de la piel no expuesta de voluntarios sanos a dosis suberitemogénicas diarias de irradiación UVA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Voluntarios

En el estudio participaron 4 voluntarias sanas con edades comprendidas entre los 19 y 26 años, tres de ellas con fototipo 2 y una con 3, sin antecedentes de enfermedades cutáneas y que no estaban tomando fármacos que afectaran la respuesta cutánea a la exposición a radiación ultravioleta. Todas firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del *Massachusetts General Hospital*, en el que se detallaba la naturaleza, metodología y finalidad de la investigación.

La piel de todas las voluntarias fue cuidadosamente explorada, con especial énfasis en la cara interna del antebrazo, para confirmar la ausencia de alguna lesión que pudiera interferir en la investigación.

Asimismo se solicitó a las participantes la no administración de productos tópicos en el área en estudio. La irradiación se realizó sobre la superficie de flexión del antebrazo, zona no expuesta a la radiación solar en ninguna de las voluntarias.

Fuente de luz ultravioleta

Se utilizó una lámpara de arco de xenón de 150 W equipado con un filtro WG-320 de 1 mm y UG-5 de 1 mm (*Schott Glass Technologies Duryea*, Pa) que producía una irradiación ultravioleta similar a la del sol.

El espectro UVA (320-400 nm) se obtuvo mediante la filtración de esta radiación por un filtro *Schott WG-345* de 1 mm (*Schott Glass Technologies*). La dosimetría se realizó con un espectrorradiómetro (modelo 752 *Optronics Co.*, Orlando, Florida). La iluminación estaba enfocada a través de una fibra óptica en cuidadoso contacto con el área cutánea expuesta (diámetro = 8 mm).

Determinación de la dosis mínima eritemogénica

Se irradiaron en cada voluntaria 6 áreas de 8 mm de diámetro localizadas en la cara interna del antebrazo. En la primera se utilizó una dosis de 20 J/cm², que se fue incrementando un 30% en cada una de las otras áreas. A las 24 horas de la irradiación se procedió a su lectura. Se definió la dosis mínima eritemogénica (DME) como aquella que indujo en el área irradiada una mácula con un eritema perceptible, mínimo y uniforme 24 h después de la irradiación. Las DME así obtenidas de cada voluntaria fueron 39, 55, 55 y 75 J/cm², respectivamente.

Protocolo de irradiación

Todas las voluntarias fueron irradiadas sobre un área de 1 cm² localizada en la cara interna del antebrazo durante 5 días consecutivos por semana (de lunes a viernes), hasta alcanzar un total de 15 dosis acumuladas. La dosis de UVA empleada fue la mitad de la DME que para cada uno de los sujetos fue de 19, 27, 27 y 38 J/cm², respectivamente.

Microscopio confocal

Se utilizó el microscopio confocal de reflectancia (*Vivascope 1000*[®], Lucid, Inc), que utiliza como fuente de luz un láser diodo de 830 nm, cuyo poder de iluminación en piel es >20 mW (aprobado por la *Food and Drug Administration* [FDA]). Se usó un objetivo de inmersión en agua de 30 × y apertura numérica 0.85. Previamente se ha publicado información detallada del mismo³.

La resolución lateral es de 0,5-1 μm y la resolución axial (grosor del corte óptico) de 3-5 μm, con profundidad máxima de imagen de 200-250 μm. Cada imagen tiene un campo de visión de 1/4 mm de lado y un índice de grabación de imágenes de 10 imágenes por segundo.

Evaluación con el microscopio confocal

Se realizó una vez por semana en el momento previo a la irradiación de la quinta dosis semanal con objeto de evitar posibles alteraciones secundarias a la presión y el calor de la lámpara de irradiación que podrían producirse si el examen de la piel se realizase inmediatamente después de la irradiación. Dicho pro-

TABLA 1. MEDIDAS DEL GROSOR DEL ESTRATO CÓRNEO Y DE LA EPIDERMIS SUPRAPAPILAR EN DIFERENTES INTERVALOS TRAS LA IRRADIACIÓN DIARIA DE LA PIEL CON DOSIS SUBERITEMOGÉNICAS DE RAYOS ULTRAVIOLETA A (UVA)

	Control μm	Tras 4 dosis μm	Tras 9 dosis μm	Tras 14 dosis μm
Estrato córneo	8,43 ± 1,87	8,55 ± 2,43	11,15 ± 3,04	13,55 ± 1,93
Epidermis suprapapilar	44,4 ± 8,85	52,1 ± 1,16	54,65 ± 9,6	66,3 ± 8,02

cedimiento se realizó, pues, tras la cuarta, novena y decimocuarta dosis. Durante la visualización cutánea con el microscopio se midió el grosor del estrato córneo, de la epidermis suprapapilar desde la capa más superficial del estrato córneo hasta la unión dermoepidérmica y de los procesos interpapilares. A este respecto, en cada paciente se realizaron 6 medidas en distintos puntos de la misma área irradiada, calculando después la media de todas ellas y la desviación estándar a partir de la media. De forma paralela se midieron los mismos parámetros en la zona simétrica del otro brazo, no irradiado, para tener medidas de control. Una vez realizada la visualización con sus correspondientes mediciones irradiamos a la voluntaria con la dosis suberitemogénica correspondiente.

Análisis estadístico

Se realizó con un análisis de la varianza (*SAS Proc Mixed*, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

En la **tabla 1** se recogen las mediciones del grosor de la capa córnea (**fig. 1A**) y de la epidermis supra-

papilar (**fig. 1B**) tras la cuarta, novena y decimocuarta irradiaciones con dosis suberitemogénicas de UVA. En ella puede apreciarse cómo la epidermis de todas las voluntarias mostró un aumento progresivo tanto del grosor de la capa córnea como de la epidermis suprapapilar a partir de la segunda visualización (9 dosis) en caso del estrato córneo y de la primera (4 dosis) en caso de la epidermis suprapapilar. Este incremento fue estadísticamente significativo ya desde la tercera evaluación (tras 14 dosis) (**fig. 1**). Por el contrario, el grosor de los procesos interpapilares no mostró cambios significativos. Otro hallazgo, accidental, fue un aumento progresivo de los depósitos de melanina en la epidermis, siendo particularmente evidente en el estrato córneo (**fig. 2 [A2]**) tras 4 dosis de exposición. Asimismo se observa un aumento de la refractibilidad en el estrato basal. Otros hallazgos fueron paraqueratosis, espongiosis (**fig. 2 [B2], [C2]**) e infiltrado inflamatorio perivascular (**fig. 2 [D2]**), probablemente de naturaleza mastocitaria o histiocítica.

DISCUSIÓN

La microscopía confocal es una técnica con la que se puede ver la piel *in vivo* o en biopsias en fresco (*ex vivo*) sin fijación, sección, ni tinción alguna. Su carácter no invasivo y la posibilidad de visualizar *in vivo* y en tiempo real secciones ópticas transversales de la piel (paralelas a la superficie cutánea) con alta resolución y contraste le abre un amplio abanico de posibilidades de aplicación en diversas áreas de la Dermatología^{3, 10-15}. Sus aplicaciones son múltiples ya que permite la visualización *in vivo* de células, núcleos, capilares, folículos, etc., a la vez que permite el recuento de queratinocitos, del número de papilas y otras estructuras por unidad de superficie y la práctica de análisis morfométricos tales como la medición del grosor de la epidermis y de sus distintas capas hasta una profundidad de 200-300 μm con una resolución comparable a la obtenida mediante histología convencional¹⁶. Ha sido

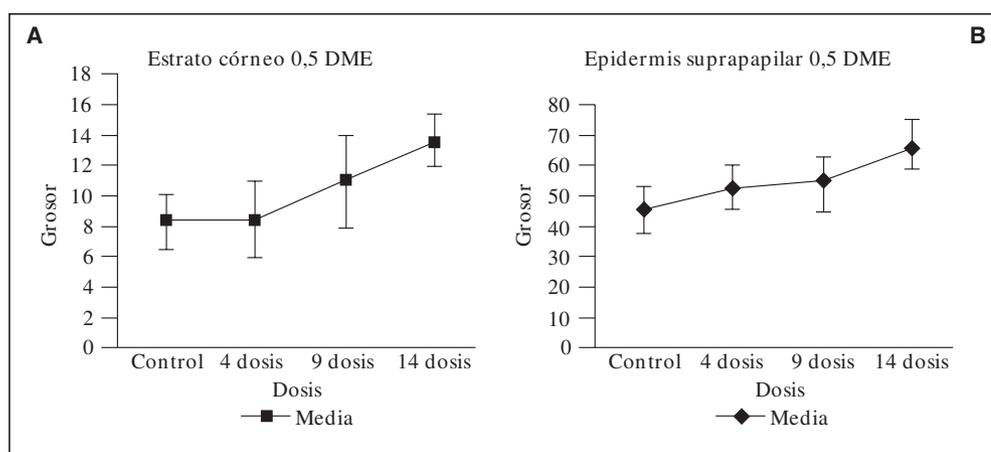


Fig. 1.—Representación esquemática del aumento progresivo del grosor (μm) de la capa córnea (A) y de la epidermis suprapapilar (B) tras la irradiación de la piel con dosis suberitemogénicas de rayos ultravioleta A (UVA).

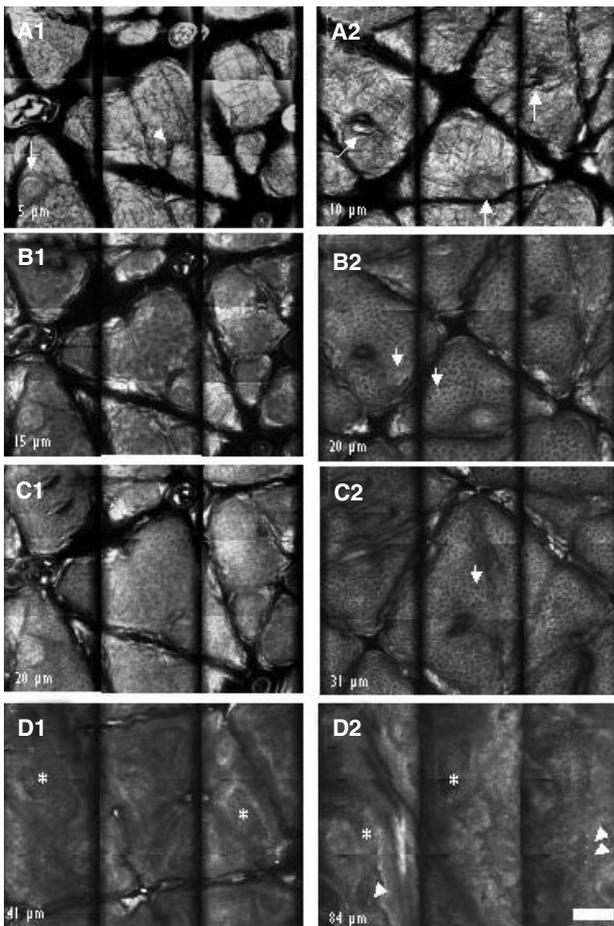


Fig. 2.—Imágenes ópticas obtenidas mediante microscopía confocal en piel no irradiada (A1, B1, C1, D1) y piel irradiada (A2, B2, C2, D2) de forma repetida (14 exposiciones) a dosis equivalentes a la mitad de la dosis mínima eritemogénica (DME). Cada una de las imágenes corresponde a un mosaico compuesto de 9 cortes de 250 µm de anchura, siendo el campo de visión total de cada mosaico de 1 mm. Las imágenes A1 y A2 corresponden a cortes del estrato córneo; véase la microtopografía del mismo con plegaduras y desembocaduras de glándulas sudoríparas ecricinas (flechas). Las imágenes B1 y B2 corresponden a cortes obtenidos del estrato granuloso; obsérvese que los queratinocitos de este estrato son de mayor tamaño y tienen menor contraste en la piel no irradiada que en la irradiada. Aquí el contraste parece ser consecuencia principalmente del edema intercelular. Este se pone también de manifiesto en el estrato espinoso (cortes C1 y C2). Las flechas apuntan queratinocitos en ambos estratos. D1 y D2 corresponden a cortes obtenidos de la unión dermoepidérmica que muestran un engrosamiento de la epidermis (de 41 µm a 84 µm) y presencia de dermis papilar*. En la piel irradiada se aprecia un infiltrado inflamatorio (flechas, D2). (Objetivo de inmersión en agua, 30x, 0,85 NA, escala 100 µm).

utilizada también en el estudio y diagnóstico de enfermedades inflamatorias^{11, 14, 15, 17}, proliferativas¹⁸ y tumorales^{12, 19}, así como para visualizar los márgenes microscópicos de los tumores cutáneos de forma previa a la microcirugía, por lo que constituye así un método potencialmente adyuvante a la cirugía micrográfica de Mohs¹⁸. Además permite observar los procesos dinámicos de forma no invasiva durante un extenso período de tiempo^{10, 20}.

El presente estudio demuestra el uso potencial de esta técnica en el diagnóstico y la evaluación de las

alteraciones epidérmicas inducidas por dosis suberitemogénicas de UVA.

Son numerosas las investigaciones que han descrito las alteraciones epidérmicas y dérmicas secundarias a la exposición de la piel a dosis altas de UVA y UVB. Estos dos tipos de radiaciones son consideradas como los factores más importantes en el fotoenvejecimiento de la piel y también, sobre todo los UVB, en la inducción del cáncer cutáneo²¹⁻²⁷. Gilcrest et al⁵ estudiaron los cambios histológicos inmediatos de la piel tras exponerla a dosis eritemogénicas de UVA y concluyeron que las alteraciones más importantes dentro de las primeras 48 horas postirradiación eran la depleción de células de Langerhans de la epidermis y el reclutamiento de neutrófilos en la dermis, siendo las alteraciones en la dermis más pronunciadas que las producidas por los UVB. Por el contrario, las alteraciones epidérmicas son mucho más manifiestas tras la irradiación de la piel con dosis eritemogénicas de UVB^{28, 29}.

Sin embargo, poco se sabe del efecto que dosis pequeñas y repetitivas de UVA, mucho menores a las empleadas en estudios experimentales^{23, 25, 30-33}, tienen sobre el fotoenvejecimiento. Ello sería de gran interés porque probablemente esta situación reproduce mucho más fielmente lo que ocurre a lo largo de la vida en un núcleo importante de población, representada por aquellas personas cuya actividad profesional se realiza bajo techo y que reciben pequeñas dosis de UVA ya sea a través de las ventanas o durante cortos períodos de actividad al aire libre (por ejemplo, paseos cortos o conduciendo un coche, etc.), a los que habría que añadir aquellos que trabajan al aire libre y utilizan filtros solares que protegen contra los UVB, pero no, o sólo parcialmente, contra los UVA. Evidentemente, la cantidad de UVA que recibe la piel de estos pacientes es muy inferior a las dosis empleadas en estudios con animales de experimentación. En nuestro estudio hemos tratado de reproducir esta situación exponiendo a las voluntarias a pequeñas dosis diarias de UVA.

En cuanto a las alteraciones epidérmicas encontradas, nuestros resultados han sido similares a los obtenidos en estudios semejantes, pero con microscopía convencional, realizados previamente^{8, 9}. En este sentido, Lowe et al⁸, tras un estudio morfométrico practicado sobre biopsias secuenciales realizadas a voluntarios irradiados repetitivamente con la DME de UVA y con UV de un simulador solar, encontraron un aumento en el grosor de la capa córnea y espinosa que se ponía de manifiesto a las pocas semanas, así como una disminución de la cantidad de tejido elástico de la dermis. Las alteraciones epidérmicas producidas por los UVA persistían más tiempo que las producidas por la radiación UV del simulador solar, siendo las producidas por dosis suberitemogénicas de UVA las más precoces. Las alteraciones en el tejido elástico fueron diferentes, pues mientras la irradiación con el

simulador solar producía un ligero aumento del tejido elástico, la radiación UVA produjo una marcada disminución que fue más persistente con la DME que con la dosis suberitemogénica. De esta forma se demuestra que dosis pequeñas y acumulativas de UVA contribuyen de forma importante al fotoenvejecimiento cutáneo como ya había sido sugerido previamente⁸.

También Lavker et al⁹, en una investigación de las mismas características en la que comparan las alteraciones epidérmicas producidas en la piel por los UVA y la irradiación UV de un simulador solar tras irradiarla con un protocolo semejante al utilizado por nosotros, encuentran un aumento del grosor de la capa córnea y una hiperplasia epidérmica que fueron más marcados en las áreas irradiadas con la mitad de la DME de UVA que en la zona irradiada con la mitad de la DME con el simulador solar. El método utilizado para comparar las alteraciones fue a través de la práctica de biopsias y su posterior estudio inmunohistoquímico con análisis de imágenes asistidas por ordenador. En estos estudios la necesidad de practicar biopsias de forma secuencial para estudiar las alteraciones de la piel es un factor limitante que impide o dificulta la comprensión de un proceso dinámico como es el fotoenvejecimiento.

Nuestros resultados son equiparables a las investigaciones previas, pero demostramos, al poder estudiarlas *in vivo* y en tiempo real, que se presentan más precozmente de lo señalado con anterioridad. El carácter no invasivo de la microscopía confocal nos ha permitido ir valorando día a día y en tiempo real las alteraciones secundarias a la irradiación de la piel con dosis suberitemogénicas de UVA y nos ha permitido asegurar que éstas aparecen incluso a los 4 días de irradiación y que van aumentando progresivamente en los días posteriores, siendo ya realmente significativas a partir de la novena dosis de irradiación. Este período, mucho más corto que el encontrado por Lowe et al⁸, puede deberse sin duda a que en el citado estudio⁸ las primeras biopsias no fueron tomadas hasta 12 semanas después de iniciar la irradiación. El uso de la microscopía confocal en nuestro estudio nos permitió realizar valoraciones continuas al no requerir la práctica de biopsias.

La presente investigación confirma que la irradiación repetida de la piel con dosis suberitemogénicas de UVA produce una serie de modificaciones epidérmicas consistentes en un aumento del grosor de la capa córnea y de la epidermis suprapapilar, que pueden ser consideradas como alteraciones precoces del fotoenvejecimiento cutáneo. Estas alteraciones probablemente representan una respuesta protectora de la piel contra la radiación UV. Por otra parte, su desencadenamiento tras dosis bajas y repetitivas de UVA resalta la necesidad de utilizar protectores solares de amplio espectro incluso para aquellos individuos que no trabajan al aire libre y que se exponen al sol durante cortos períodos de tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pawley JB, editor. Handbook of biological confocal microscopy. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1995.
2. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol* 1995;104:946-52.
3. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin (II): advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999;113:293-303.
4. White WN, Rajadhyaksha M, González S, Fabian RL, Anderson RR. Noninvasive imaging of human oral mucosa *in vivo* by confocal reflectance. *Laryngoscope* 1999;109:1709-17.
5. Gilchrist BA, Soter NA, Hawk JLM, Barr RM, Black AK, Hensby CN, et al. Histologic changes associated with ultraviolet A-induced erythema in normal human skin. *J Am Acad Dermatol* 1983;9:213-9.
6. Pearse AD, Gaskell SA, Marks R. Epidermal changes in human skin following irradiation with either UVB or UVA. *J Invest Dermatol* 1987;88:83-7.
7. Rosario R, Mark GL, Parrish JA, Mihm MC. Histological changes produced in skin by equally erythemogenic doses of UV-A, UV-B, UV-C and UV-A with psoralens. *Br J Dermatol* 1979;101:299-308.
8. Lowe NJ, Meyers DP, Wieder JM, Luftman D, Borget T, Lehman MD, et al. Low doses of repetitive ultraviolet A induce morphologic changes in human skin. *J Invest Dermatol* 1995;105:739-43.
9. Lavker RM, Gerberick GF, Veres D, Irwin CJ, Kaidbay KH. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:53-62.
10. González S, White WM, Rajadhyaksha M, Anderson RR, González E. Confocal imaging of sebaceous gland hyperplasia *in vivo* to assess efficacy and mechanism of pulsed dye laser treatment. *Lasers Surg Med* 1999;25:8-12.
11. González S, Rubinstein S, Mordovtseva V, Rajadhyaksha M, Anderson RR. *In vivo* abnormal keratinization in Darier-White's disease as viewed by real-time confocal imaging. *J Cut Pathol* 1999;26:504-8.
12. Aghassi D, González E, Anderson RR, Rajadhyaksha M, González S. Elucidating the pulsed-dye laser treatment of sebaceous hyperplasia *in vivo* with real-time confocal scanning laser microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:49-53.
13. Hongcharu W, Dwyer P, González S, Anderson RR. Confirmation of onychomycosis by *in vivo* confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:214-6.
14. González S, Rajadhyaksha M, González-Serva A, White WM, Anderson RR. Confocal reflectance imaging of folliculitis *in vivo* correlation with routine histology. *J Cut Pathol* 1999; 26:201-5.
15. González S, Rajadhyaksha M, Rubinstein G, Anderson RR. Characterization of psoriasis *in vivo* by reflectance confocal microscopy. *J Med* 1999;30:337-56.
16. González S, Alcázar-Martínez MV, Rajadhyaksha M. Visualización de la piel *in vivo* mediante microscopía de confocal. *Act Dermatol* 2000;7:591-8.
17. González S, González E, White WN, Rajadhyaksha M, Anderson RR. Allergic contact dermatitis: correlation of

- in vivo* confocal imaging to routine histology. J Am Acad Dermatol 1999;40:708-13.
18. González S, Rajadyaksha M, Anderson RR. Non-invasive (real time) imaging of histologic margin of a proliferative skin lesion *in vivo*. J Invest Dermatol 1998;111:538-9.
 19. Agassi D, Anderson RR, González S. Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses *in vivo*: a preliminary report. J Am Acad Dermatol 2000;43:42-8.
 20. Agassi D, Anderson RR, González S. Time-sequence histologic imaging of laser-treated cherry angiomas with *in vivo* confocal microscopy. J Am Acad Dermatol 2000;43:37-41.
 21. Kligman AM. Early destructive effects of sunlight on human skin. JAMA 1969;210:2377-80.
 22. Lavker RM. Structural laterations in exposed and unexposed aged skin. J Invest Dermatol 1979;73:59-66.
 23. Cole CA, Forbes D, Davies RE. An action spectrum for UV photocarcinogenesis. Photochem Photobiol 1986;43:275-84.
 24. Stevenborg HM, van der Leun JC. Action spectra for tumorigenesis by ultraviolet radiation. En: Passchier WF, Bosnjakovic BFM, editores. Human exposure to ultraviolet radiation: risks and regulations. Amsterdam: Elsevier; 1982. p. 173-90.
 25. Bisset DL, Hannon DP, Orr TV. Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. Photochem Photobiol 1989; 50:763-9.
 26. Kligman LH, Akin FJ, Klingman AM. The contributions of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice. J Invest Dermatol 1985;84:272-6.
 27. Van Weelden H, de Gruijl FR, van der Leun JC. Carcinogenesis by UVA, with attempt to assess the carcinogenic risks of tanning with UVA and UVB. En: Urbach F, Gange RW, editores. The biological effects of UVA radiation. New York: Praeger; 1986. p. 137-46.
 28. Gilchrest BA, Soter NA, Stoff JS, Mihm MC. The human sunburn reaction: histologic and biochemical studies. J Am Acad Dermatol 1981;5:411-22.
 29. Gilchrest BA, Stoff JS, Soter NA. Chorologic aging alters the reponse to UV-induced inflammation in human skin. J Invest Dermatol 1982;79:11-5.
 30. Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM. The contributions of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice. J Invest Dermatol 1985;94:272-6.
 31. Kligman LH. Intensification of ultraviolet-induced dermal damage by infrared radiation. Arch Dermatol Res 1982; 272:229-38.
 32. Stevenborg HJCM, De Gruijl FR, van der Leun JC. UV-induced epidermal hyperplasia in hairless mice. Photo-dermatology 1986;3:206-14.
 33. Stevenborg HJCM, van der Leun JC. Change in epidermal transmission due to UV-induced hyperplasia in hairless mice: a first approximation of the action spectrum. Photo-dermatology 1988;5:71-82.

Lara Ferrández Pulido, et al. Estudio morfométrico *in vivo* con microscopia confocal en tiempo real de las alteraciones epidérmicas de la piel tras dosis bajas y repetitivas de radiación ultravioleta A (UVA)