



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA Y ANTIOXIDANTE DE *Yucca periculosa* Baker

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. ANA MARÍA GARCÍA BORES

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO**

**COMITÉ TUTOR:
DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO
DRA. DIANA BARRERA OVIEDO**

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

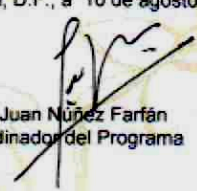
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de junio del 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **GARCÍA BORES ANA MARIA** con número de cuenta **93635297** con la tesis titulada "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA Y ANTIOXIDANTE DE *Yucca Periculosa Baker***", realizada bajo la dirección del (la) **DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO**:

Presidente: DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO
Vocal: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO
Vocal: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
Secretario: DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
Suplente: DRA. CLAUDIA TZASNÁ HERNÁNDEZ DELGADO
Suplente: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de agosto de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por ser mi casa y brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente y encontrar en sus aulas y laboratorios una gran familia de universitarios.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por aceptarme en el programa y por todo el apoyo recibido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca recibida para realizar los estudios de Doctorado, CVU 91884.

A los proyectos PAPCA-FES IZTACALA, PAPIIT IN213309, CONACYT

A los miembros del Comité Tutor por sus invaluable aportaciones a este trabajo, su paciencia y por compartir conmigo una parte de su sabiduría:

Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo

Dra. Diana Barrera Oviedo

Al Dr. Guillermo Avila Acevedo por ser además de mi tutor, mi mejor amigo.

Al laboratorio de Microscopía de la FES-Iztacala por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A todos mis profesores, muchos de los cuales se convirtieron en amigos y que de una u otra forma contribuyeron en mi formación.

A todos los miembros del laboratorio de Fitoquímica de la FES-Iztacala por acompañarme y apoyarme en este proceso.

DEDICATORIAS

A Juan Antonio

Por ser el milagro más grande que me ha ocurrido, por ser el motor y el ejemplo que me impulsa a seguir cada día

A mis padres, Carmen y Juan

Por su amor incondicional, por darme de la oportunidad de vivir, crecer y desarrollarme en todos los ámbitos

A mis hermanas, Rocío, Mari Carmen y Anabel

Por tener la confianza de ser una familia y apoyarnos en todo momento

A mi hermano, Rodrigo

Por ser una gran inspiración en mi vida y enseñarme que nunca debemos dejar de luchar y disfrutar la vida, sin importar lo adverso de las circunstancias

Al Sol

Por iluminar y sustentar cada día de nuestra vida

Índice General

	Página
Índice de cuadros.....	IV
Índice de esquemas.....	V
Índice de figuras.....	VI
Índice de espectros.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	IX
1 Resumen.....	1
1 Abstract.....	2
2 Introducción.....	3
3 Antecedentes.....	4
3.1 La piel.....	4
3.1.1 Estructura de la piel.....	4
3.1.2 Función de la piel: protección hacia la radiación solar.....	9
3.2 La radiación solar.....	11
3.2.1 La radiación ultravioleta (RUV).....	13
3.2.2 Efectos de la radiación ultravioleta en los organismos.....	17
3.2.3 Interacción de la RUV con la piel.....	22
3.2.3.1 Efectos agudos de la exposición a la RUV en la piel.....	24
3.2.3.2 Efectos crónicos de la exposición a la RUV en la piel.....	36
3.3 Fotoprotección.....	42
3.3.1 Filtros solares.....	43
3.3.2 Los productos naturales en la fotoquimioprevención.....	43
3.4 Las plantas y la RUV.....	51
3.5 El género <i>Yucca</i>	51
3.5.1 Compuestos fenólicos estudiados de plantas del género <i>Yucca</i>	53
3.5.2 <i>Yucca periculosa</i> Baker.....	54
4 Justificación.....	57
5 Hipótesis.....	58
6 Objetivos.....	58
6.1 Objetivos generales.....	58
6.2 Objetivos particulares.....	58
7 Estrategia metodológica.....	59

8	Primera etapa	
8.1	Metodología	61
8.1.1	Recolecta del material vegetal.....	61
8.1.2	Extracción.....	61
8.1.3	Separación de los componentes del extracto metanólico.....	61
8.1.3.1	Métodos cromatográficos.....	61
8.1.3.2	Equipo usado para la determinación de las constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.....	62
8.1.3.3	Fraccionamiento del extracto metanólico.....	62
8.1.4	Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ).....	67
8.2	Resultados y discusión.....	69
8.2.1	Datos de herbario de la planta <i>Y. periculosa</i>	69
8.2.2	Rendimiento de los extractos.....	69
8.2.3	Compuestos aislados de la peridermis de <i>Y. periculosa</i>	70
8.2.4	Absorción en la región del espectro electromagnético: Coeficiente de extinción molar (ϵ).....	81
8.3	Resumen de resultados y conclusiones.....	83
9	Segunda etapa	
9.1	Metodología.....	84
9.1.1	Actividad antioxidante.....	84
9.1.2	Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región UV-B del extracto y los compuestos aislados: Fotoprotección empleando un modelo bacteriano.....	85
9.2	Resultados y discusión.....	87
9.2.1	Actividad antioxidante.....	87
9.2.2	Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región UV-B del extracto y los compuestos aislados: Fotoprotección empleando un modelo bacteriano.....	89
9.2.3	Isomerización de los estilbenos de <i>Y. periculosa</i> por efecto de la RUV.....	94
9.3	Resumen de resultados y conclusiones.....	97
10	Tercera etapa	
10.1	Metodología.....	98

10.1.1	Modelo agudo en cuyos de la cepa Hartley para la evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto y los compuestos aislados de <i>Y. periculosa</i>	98
10.1.1.1	Determinación del factor de protección solar (FPS).....	98
10.1.1.2	Estudio histopatológico.....	101
10.1.2	Modelo sub-crónico en ratones SKH-1 para la evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto y los compuestos aislados de <i>Y. periculosa</i>	102
10.1.2.1	Estudio histopatológico.....	102
10.1.2.2	Protección contra la disminución de los antioxidantes endógenos de la piel de ratones SKH-1.....	105
10.2	Resultados y discusión.....	108
10.2.1	Modelo agudo en cuyos de la cepa Hartley para la evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto y los compuestos aislados de <i>Y. periculosa</i>	108
10.2.1.1	Determinación del factor de protección solar (FPS).....	108
10.2.1.2	Estudio histopatológico.....	110
10.2.2	Evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto y los compuestos aislados de <i>Y. periculosa</i> : Modelo sub-crónico en ratones SKH-1.....	115
10.2.2.1	Estudio histopatológico.....	115
10.2.2.2	Efecto protector de los compuestos aislados en los sistemas antioxidantes de la piel de ratones SKH-1.....	127
10.3	Resumen de resultados y conclusiones.....	132
11	Conclusiones generales.....	134
12	Bibliografía.....	135
13	Apéndices	
13.1	Espectros.....	156
13.2	Artículos publicados.....	166

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Clasificación de la piel de acuerdo a su sensibilidad a la radiación ultravioleta.....	11
Cuadro 2. Aspectos a considerar para la detección temprana del cáncer de piel.....	42
Cuadro 3. Mecanismos moleculares de algunos compuestos de origen vegetal en la fotoquimiopreención.....	47
Cuadro 4. Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Y. periculosa</i>	63
Cuadro 5. Separación cromatográfica de la fracción B del extracto metanólico de <i>Y. periculosa</i>	64
Cuadro 6. Separación cromatográfica de la fracción E del extracto metanólico de <i>Y. periculosa</i>	65
Cuadro 7. Separación cromatográfica de la fracción F del extracto metanólico de <i>Y. periculosa</i>	66
Cuadro 8. Separación cromatográfica de la fracción G del extracto metanólico de <i>Y. periculosa</i>	67
Cuadro 9. Datos de herbario de la planta <i>Y. periculosa</i>	69
Cuadro 10. Rendimiento de los extractos de <i>Y. periculosa</i>	69
Cuadro 11. Asignación de las señales en el espectro de RMN ¹ H de la naringenina.....	71
Cuadro 12. Asignación de las señales en el espectro de RMN ¹³ C de la naringenina.....	72
Cuadro 13. Asignación de las señales en el espectro de RMN ¹ H del resveratrol.....	74
Cuadro 14. Asignación de las señales en el espectro de RMN ¹³ C del resveratrol.....	75
Cuadro 15. Asignación de las señales en el espectro de RMN ¹ H del <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.....	78
Cuadro 16. Asignación de las señales en el espectro de RMN ¹³ C del <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.....	79

Cuadro 17.	Diversas actividades biológicas del resveratrol y el <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.....	80
Cuadro 18.	Absorción en la región UV-B y coeficiente de extinción molar del extracto metanólico, los compuestos aislados de <i>Y. periculosa</i> y varios filtros solares comerciales.....	81
Cuadro 19.	Capacidad antioxidante media (CA ₅₀) de acuerdo con la decoloración del DPPH• extracto metanólico, y los compuestos aislados de <i>Y. periculosa</i>	88
Cuadro 20.	Coeficientes de determinación (R ²) y constantes de mortalidad (K) de los experimentos de irradiación bacteriana con y sin protección.....	92
Cuadro 21.	Descripción de los principales daños en la piel por efecto de la RUV.....	102
Cuadro 22.	Tratamientos para la evaluación del efecto fotoprotector en ratones SKH-1.....	103
Cuadro 23.	Factor de protección solar (FPS) de las sustancias evaluadas en cuyos.....	108

Índice de esquemas

	Página	
Esquema 1.	Estructura de la piel.....	4
Esquema 2.	Estratos celulares de la epidermis.....	5
Esquema 3.	La piel como mecanismo de protección.....	10
Esquema 4.	Espectro electromagnético emitido por el sol.....	12
Esquema 5.	Energía solar aprovechable en la República Mexicana.....	13
Esquema 6.	La radiación ultravioleta que incide en la Tierra.....	15
Esquema 7.	Procesos inducidos en una molécula por la absorción de la RUV.....	17
Esquema 8.	Algunos compuestos capaces de absorber a la RUV presentes en los organismos	19
Esquema 9.	Interacción de la RUV con la piel.....	23

Esquema 10.	Efecto de la RUV en el bronceado.....	25
Esquema 11.	Algunos blancos moleculares implicados en la alteración de las funciones celulares inducidos por la RUV.....	32
Esquema 12.	Mecanismos implicados en la quemadura solar.....	33
Esquema 13.	Mecanismos moleculares involucrados en el fotoenvejecimiento.....	38
Esquema 14.	Mecanismos moleculares donde intervienen algunos compuestos de origen vegetal en la fotoquimioprevención.....	45
Esquema 15.	<i>Yucca periculosa</i> Baker.....	56
Esquema 16.	Estrategia metodológica.....	60
Esquema 17.	Posibles sustituyentes del enlace vinílico.....	76
Esquema 18.	Reducción del radical difenil-picril-hidracilo.....	84
Esquema 19.	Modelo de muerte celular de <i>E. coli</i> inducida por la RUV-B.....	86

Índice de figuras

	Página	
Figura 1.	Estructura de la naringenina.....	72
Figura 2.	Estructura del resveratrol.....	75
Figura 3.	Estructura del <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.....	79
Figura 4.	Porcentaje de decoloración del DPPH• de cada una de las sustancias evaluadas.....	87
Figura 5.	Muerte celular inducida por la RUV en <i>E.coli</i> : experimento sin protección.....	90
Figura 6.	Muerte celular inducida por la RUV en <i>E.coli</i> : experimentos con protección.....	91
Figura 7.	Isómeros <i>trans</i> y <i>cis</i> del parsol.....	93
Figura 8.	Espectros de absorción del extracto metanólico de <i>Y. periculosa</i> irradiados diferentes tiempos con RUV.....	95
Figura 9.	Espectros de absorción del resveratrol irradiados diferentes tiempos con RUV.....	95

Figura 10.	Espectros de absorción del estilbeno metoxilado irradiados diferentes tiempos con RUV.....	96
Figura 11.	Modelo agudo de irradiación en cuyos.....	100
Figura 12.	Modelo sub-crónico de irradiación en ratones SKH-1.....	104
Figura 13.	Procedimiento para la obtención de la epidermis de ratón.....	105
Figura 14.	Piel normal de la zona dorsal de cuyo.....	110
Figura 15.	Piel de cuyo expuesta a un DEM (20 min) de RUV sin protección.....	111
Figura 16.	Piel de cuyo protegida con parsol: a) expuesta a una dosis S-DEM (20 min) b) Exposición a un DEM (40 min).....	111
Figura 17.	Piel de cuyo protegida con el extracto metanólico: a) expuesta a una dosis S-DEM (40 min) b) Exposición a un DEM (≈70 min).....	112
Figura 18.	Piel de cuyo protegida con la naringenina: a) expuesta a una dosis S-DEM (40 min) b) Exposición a un DEM (≈70 min).....	113
Figura 19.	Piel de cuyo protegida con el resvetratrol: a) expuesta a una dosis S-DEM (80 min) b) Exposición a un DEM (100 min).....	114
Figura 20.	Piel de cuyo protegida con el estilbeno metoxilado: a) expuesta a una dosis S-DEM (80 min) b) Exposición a un DEM (≈120 min).....	114
Figura 21.	Piel de ratón SKH-1 sin ningún tratamiento.....	116
Figura 22.	Piel de ratón SKH-1 con aplicación tópica de etanol.....	117
Figura 23.	Piel de ratón SKH-1 expuesta a dosis sub-crónicas de RUV.....	118
Figura 24.	Piel de ratón SKH-1 con aplicación tópica de naringenina sin irradiación y expuesta a dosis sub-crónicas de RUV.....	120
Figura 25.	Piel de ratón SKH-1 con aplicación tópica de resvetratrol: sin irradiación y expuesta a dosis sub-crónicas de RUV.....	123
Figura 26.	Piel de ratón SKH-1 con aplicación tópica del estilbeno metoxilado: sin irradiación y expuesta a dosis sub-crónicas de RUV.....	125
Figura 27.	Actividad de la catalasa en la epidermis de ratón SKH-1.....	129

Figura 28.	Actividad de la glutatión peroxidasa en la epidermis de ratón SKH-1.....	130
Figura 29.	Actividad de la superóxido dismutasa en la epidermis de ratón SKH-1.....	131

Índice de espectros

	Página
Espectro 1. Espectro de UV de la naringenina.....	157
Espectro 2. Espectro de RMN ¹ H de la naringenina.....	158
Espectro 3. Espectro de RMN ¹³ C de la naringenina.....	159
Espectro 4. Espectro de UV del resveratrol.....	160
Espectro 5. Espectro de RMN ¹ H del resveratrol.....	161
Espectro 6. Espectro de RMN ¹³ C del resveratrol.....	162
Espectro 7. Espectro de UV del <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4- metoxiestilbeno.....	163
Espectro 8. Espectro de RMN ¹ H del <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4- metoxiestilbeno.....	164
Espectro 9. Espectro de RMN ¹³ C del <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4- metoxiestilbeno.....	165

Lista de abreviaturas

~	Modulación
↑	Incremento
↓	Disminución
⊥	Inhibición
25(OH)D	1 α -25-dihidroxitamina D
6-4PP	Pirimidin-pirimidona 6-4
8-OHdG	8-hidroxi-2-deoxi-guanosina
AP-1	Proteína activadora 1
ATCC	American type culture collection
ax	Axial
BHA	Butil-hidroxi-anisol
CA₅₀	Capacidad antioxidante media
CAT	Catalasa
cc	Cromatografía en columna
CCB	Carcinoma de células basales
CCE	Carcinoma de células escamosas
ccf	Cromatografía en capa fina
CIE	Comisión internacional de alumbrado (siglas en inglés)
COX	Ciclooxygenasa
CPA	Célula presentadora de antígeno
CPD	Dímeros cíclicos de pirimidinas (siglas en inglés)
d	Doble
DCT	DOPA cromatografía tautomerasa
dd	Doble de doble
DEM	Dosis mínima eritematogénica
DHT	Dihidrotestosterona
DOPA	Dihidroxifenilalanina (siglas en inglés)
DPPH	Difenil-picril-hidracilo
eq	Ecuatorial
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares (siglas en inglés)
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FDA	Administración de alimentos y drogas (siglas en inglés)
FPS	Factor de protección solar
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H y E	Hematoxilina y eosina
HaCat	Queratinocitos humanos (siglas en inglés)
HEC	Carcinoma epidermoide humano (siglas en inglés)
Hex	Hexanos
HO[•]	Radical hidroxilo
Hz	Hertz
IKK	Cinasa del inhibidor del factor nuclear kappa B (siglas en inglés)
IL	Interleucina
INI	Instituto Nacional Indigenista
iNOS	Oxido nitrico sintetasa inducible (siglas en inglés)
IκB	Inhibidor del factor nuclear kappa B (siglas en inglés)
J	Constante de acoplamiento
J/cm²	Joules/centímetro cuadrado

JNKs	Cinasas N-terminal de c-Jun (siglas en inglés)
K	Constante de mortalidad
LPO	Lipoperoxidación
MAA's	Micosporinas (siglas en inglés)
MAPK	Proteín cinasas activadas por mitógeno (siglas en inglés)
MeOH	Metanol
MDA	Malonaldehido
MHz	Mega Hertz
MITF	Factor de trasncripción de microftalmia (siglas en inglés)
MMP	Mieloperoxidasas (siglas en inglés)
NCI	Centro Nacional del Cáncer (siglas en inglés)
NER	Reparación por esición de nucleótidos (siglas en inglés)
NF-κB	Factor nuclear kappa (siglas en inglés)
NHEK	Queratinocitos epidérmicos humanos normales (siglas en inglés)
nm	nanómetros
NO	Oxido nitrico (siglas en inglés)
O₂⁻	Superóxido
¹O₂	Oxígeno singulete
ODC	Ornitindescarboxilasa (siglas en inglés)
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular (siglas en inglés)
PG	Prostaglandinas
ppm y/o δ	Partes por millón
PTV	Polifenoles del té verde
rf	Factor de retención
RHNM	Registro histopatológico de neoplasias malignas
RMN¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
RUV	Radiación ultravioleta
s	Simple
S-DEM	Dosis sub-eritematogénica
SOD	Superóxido dismutasa
t	Triple
TCR	Reparación acoplado a la transcripción (siglas en inglés)
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral β (siglas en inglés)
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
W/m²	Watt/metro cuadrado
α-MSH	Hormona estimulante de melanocitos (siglas en inglés)
α-TNF	Factor de necrosis tumoral (siglas en inglés)
ε	Coeficiente de extinción molar
λ_{max}	Longitud de onda máxima

1. Resumen

En los últimos años se ha incrementado la incidencia de la radiación ultravioleta (RUV) en la superficie terrestre lo que ha producido un aumento de los efectos agudos y crónicos por la exposición a ésta. Para reducir dichos riesgos es necesario tomar medidas fotoprotectoras, dentro de este concepto, se encuentra el uso de sustancias que actúen en la quimioprevención, es decir que eviten, retarden o reviertan los daños producidos por la exposición a la RUV. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker.

Se preparó el extracto metanólico de la peridermis de la planta y mediante métodos cromatográficos se aislaron sus principales metabolitos. Las estructuras de los compuestos obtenidos se establecieron mediante técnicas espectroscópicas (ultravioleta, resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13), además se determinó su coeficiente de extinción molar en la región ultravioleta. Del extracto metanólico de *Y. periculosa* se aislaron e identificaron: naringenina, resveratrol y *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado) como sustancias cromóforas a la RUV, las cuales tienen coeficientes de extinción molar superiores a los filtros solares comerciales.

La actividad antioxidante de los compuestos y el extracto se evaluó mediante la determinación de la concentración antioxidante media (CA₅₀) a través de la decoloración del radical difenil-picrilhidracilo, siendo el extracto metanólico (28.09 ppm) y el resveratrol (29.12 ppm) las sustancias con mayor actividad antioxidante, seguidas del estilbeno metoxilado (193 ppm).

La actividad fotoprotectora se evaluó en experimentos de desafío donde se induce la muerte celular en poblaciones de la bacteria *E.coli* expuestas a la RUV con y sin protección. Los experimentos mostraron que la muerte de toda la población por la exposición a la RUV ocurre a los 10 minutos, mientras que en los experimentos con protección requiere de 30 minutos con la naringenina, y de 60 minutos con el extracto metanólico y el resveratrol. Finalmente, con el estilbeno metoxilado la muerte ocurrió hasta los 90 minutos de exposición a la RUV.

La actividad fotoprotectora se evaluó en dos modelos animales. En el primer caso, con cuyos, se determinó el factor de protección solar (FPS) de cada sustancia y sí su aplicación tópica previene del daño histológico inducido por la RUV. Por último, en los experimentos sub-crónicos se irradiaron ratones sin pelo (SKH-1) para realizar una evaluación histológica de la piel de estos animales expuesta a la RUV con y sin protección, también se determinó si las sustancias aisladas de *Y. periculosa* evitan el estrés oxidativo causado por la exposición sub-crónica de RUV en la piel de ratón. De esta forma se encontró que el factor de protección solar del extracto metanólico y la naringenina es similar (≈ 3), al igual que entre los dos estilbenos (≈ 5). Gracias al estudio histopatológico, en ambos modelos, se determinó que todas las sustancias aisladas de *Y. periculosa* pueden intervenir en la modulación de procesos celulares pues la protección es diferencial. Al respecto, se determinó que la aplicación tópica del estilbeno metoxilado protege a la piel de los ratones SKH-1 de la disminución de la actividad de la catalasa provocada por la RUV.

1. Abstract

In recent years the planet has suffered an increase in the incidence of ultraviolet radiation (UVR) which has resulted in an increase in acute and chronic damage caused by exposure to UVR. Photoprotective measures that should be taken include chemoprevention, which is defined as the use of agents capable of ameliorating the adverse effects of UV-B on the skin. The aim of this study was to evaluate the photoprotective and antioxidant activity of *Yucca periculosa* Baker.

The methanol extract was obtained from the periderm, and its main compounds were isolated by chromatographic methods. The structures of the isolated compounds were established by their spectral data. The molar extinction coefficient of each substance was also determined. The methanolic extract contains naringenin, resveratrol and *trans*-3, 3',5,5'-tetrahydroxy-4-methoxystilbene (methoxylated stilbene). The isolated compounds exhibited molar extinction coefficients higher than commercial sunscreens.

The antioxidant activity of compounds and the extract was determined by bleaching radical diphenyl-picryl-hydrazyl radical. The methanol extract (28.09 ppm) and resveratrol (29.12 ppm) had the best antioxidant capacity followed by the methoxylated stilbene (193 ppm).

The protective effect against UV-B induced cell death was evaluated using *E. coli* as a cell model. The results showed the bacteria population ($\cong 10^7$) without protection was dead after 10 min. All substances have photoprotective effect against UV-B induced cell death, naringenin (cell death at 30 min), the methanol extract and resveratrol (until 60 min). The methoxylated stilbene protected the bacteria more efficiently, the bacteria population did not reach cell death until 90 min of irradiation with UV-B.

Photoprotective activity was also evaluated in two animal models. First, the sun protection factor (SPF) of the substances was evaluated by a guinea pig bioassay and a histopathological skin study. Subchronic bioassays were carried out in hairless mice (SKH-1) with and without protection for histological study and to evaluate if the *Yucca*'s substances prevent oxidative stress caused by sub-chronic exposure to UVR in mouse skin. The SPF values obtained for the MeOH extract and for naringenin were 3. Resveratrol and methoxylated stilbene showed the highest photoprotective activity with SPF values of 5. The histopathological study revealed that all substances isolated from *Y. periculosa* are involved in modulating cellular processes, since the protection is differential. Finally, it was found that topical application of methoxylated stilbene protects the skin of SKH-1 mice and decreased catalase activity caused by UVR.

2. Introducción

La piel es el órgano más grande del cuerpo y delimita el medio interno del organismo al actuar como una barrera que brinda protección ante de diversos factores ambientales entre los que se encuentra la radiación ultravioleta (RUV) que abarca las longitudes de onda comprendidas entre los 200 y 400 nm del espectro electromagnético emitido por el sol (Ross y Pawlina, 2007).

Los seres vivos estamos expuestos a la RUV la cual causa diversos efectos agudos en los organismos, entre los que destacan: la formación de los dímeros cíclicos de pirimidinas, la generación de un estado de estrés oxidativo, la modificación de diversos procesos celulares que alteran la expresión genética y a nivel tisular lo anterior se refleja en la generación de la quemadura solar. Aunado a lo anterior, la exposición crónica a la RUV produce el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel (Diffey y Kochevar, 2007). El cáncer de piel es una de las neoplasias que se encuentran entre los primeros lugares de incidencia en nuestro país de acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias de la Secretaría de Salud (RHNM, 2001).

Para evitar los efectos adversos de la RUV, históricamente el hombre a tomado diversas medidas fotoprotectoras entre las que destacan el evitar exponerse al sol, el uso de ropa, lentes de sol, sombreros, etc., y la aplicación tópica de filtros solares. Los filtros solares son sustancias químicas capaces de absorber la RUV, cuando éstos son aplicados tópicamente disminuyen la cantidad de luz que penetra hacia la piel evitando así el daño causado por la luz. Sin embargo, los filtros solares pueden interactuar con los componentes celulares generando reacciones de fotosensibilidad y fotoalergias (Pathak, 1992). Debido a lo anterior, es necesaria la búsqueda de productos naturales que puedan actuar como sustancias que inhiban, retarden o reviertan los diferentes daños producidos en la piel por la exposición a la RUV, es decir que actúen en la fotoquimiopreención (Afaq et al., 2005a). Las plantas que viven en zonas de intensa radiación solar son ideales para la búsqueda de este tipo de sustancias como es el caso de la especie *Yucca periculosa*.

El propósito del presente trabajo fue aislar los metabolitos secundarios presentes en *Y. periculosa* capaces de absorber la RUV para posteriormente evaluar su actividad antioxidante y fotoprotectora.

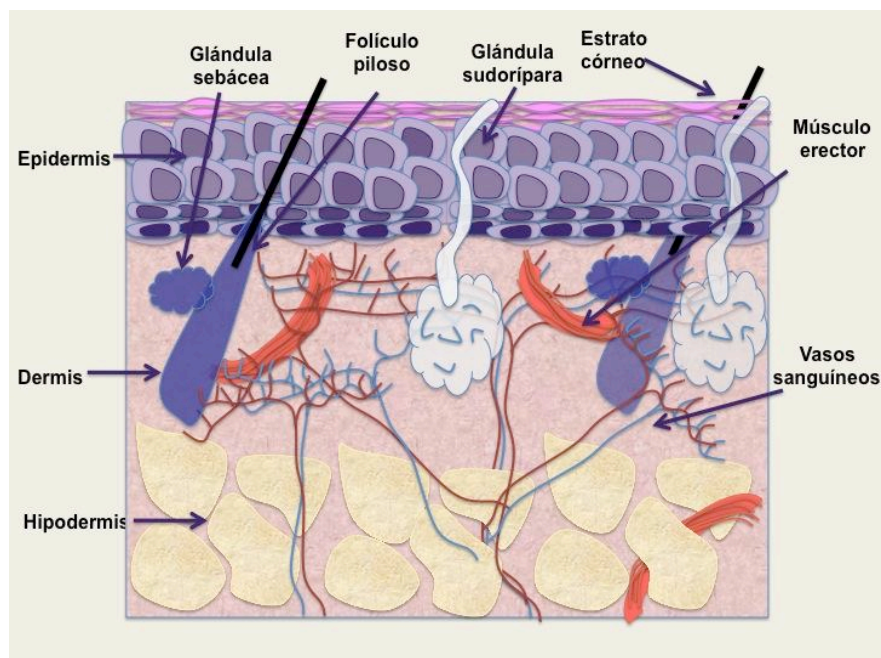
3. Antecedentes

3.1. La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo compuesta por una gran variedad de tipos celulares. Su principal función es delimitar el medio interno de un organismo, protegerlo y traducir señales del ambiente externo (Russell, 1992; Afaq y Mukhtar, 2001). Además, se le considera una barrera contra el ataque de diversos factores ambientales como pueden ser: microorganismos, así como agentes físicos y químicos (Fuchs et al., 1992).

3.1.1. Estructura de la piel

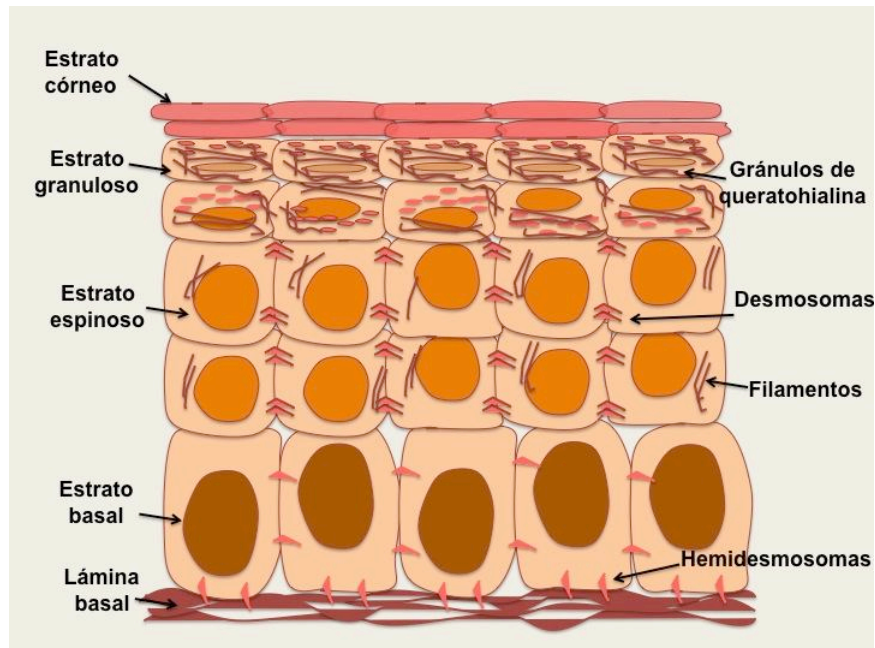
La piel es un órgano complejo desde el aspecto anatómico hasta el funcional, está ligado a la fisiología y patología de todo el organismo (Amado, 2001). En el adulto humano tiene una extensión de alrededor de 2m^2 , con un grosor promedio de 3mm (Magaña y Magaña, 2003). Desempeña funciones específicas y representa aproximadamente cerca del 16% del peso total de un humano (Villaverde, 2004). La piel está formada por diferentes tejidos que son: epidermis, dermis e hipodermis como se muestra en el esquema 1 (Russell, 1992; Ross y Pawlina, 2007).



Esquema1. Estructura de la piel. Modificado de Ross y Pawlina, 2007.

La epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel. Está formada por un epitelio plano estratificado queratinizado de origen ectodérmico (Amado, 2001; Magaña y Magaña, 2003; Villaverde, 2004). Las células que dominan se llaman queratinocitos. Este tejido está constituido por diversos estratos de células epiteliales (Esquema 2):



Esquema 2. Estratos celulares de la epidermis. Modificado de Villaverde, 2004.

a) Estrato basal o germinativo

Está formado por células cúbicas y germinales en continua división que migran a la superficie adquiriendo forma aplanada, y en dirección a la dermis formando las glándulas sudoríparas, sebáceas y los folículos pilosos. Las células se encuentran unidas entre sí por desmosomas y a la membrana basal con hemidesmosomas. Tienen un sólo núcleo y su cromatina es dispersa (Magaña y Magaña, 2003). También en este estrato se encuentran los melanocitos, los corpúsculos mecanorreceptores de Merkel, así como las terminaciones nerviosas libres (Villaverde, 2004; Ross y Pawlina, 2007).

b) Estrato espinoso

Formado por células cúbicas con apariencia espinosa debido a la presencia de un mayor número de desmosomas. También hay melanocitos (Villaverde, 2004). Los contornos celulares parecen tener pequeñas espinas, las cuales son tonofibrilares formadas en el citoplasma. La función de este estrato, al parecer, es dar consistencia a la base de la epidermis y en éste se inicia la formación de la queratina (Magaña y Magaña, 2003).

c) Estrato granular

El estrato granular está formado por células planas productoras de gránulos basófilos de queratohialina, un precursor de la queratina, generalmente localizados cerca del núcleo. Los gránulos van envolviendo a las tonofibrillas hasta cubrirlas totalmente. A medida que los gránulos crecen, los núcleos se vuelven más pálidos hasta que se desintegran, así como también los demás organelos citoplasmáticos. Las células se vuelven planas y luego mueren, sin embargo permanecen estrechamente unidas (Magaña y Magaña, 2003).

d) Estrato lúcido

Estrato presente solo en las zonas del cuerpo donde la epidermis es muy gruesa como las palmas de las manos o los pies. Contiene células planas y muertas con citoplasma claro de apariencia homogénea (Amado, 2001).

e) Estrato córneo

Esta capa esta constituida por células planas muertas sin núcleo que contienen queratina llamadas corneocitos, se descaman continuamente siendo sustituidas por células de capas más profundas. Este estrato es una barrera para la luz, calor, bacterias y a la pérdida de agua (Villaverde, 2004). El espesor varía de 0.02 a 5mm; en las plantas de los pies, se distinguen dos partes: la más profunda o compacta conserva aún los desmosomas y la más superficial es donde las uniones se rompen y las células se desprenden o descaman (Amado, 2001).

Tipos celulares de la epidermis

La epidermis está constituida principalmente por cuatro tipos celulares, los queratinocitos, los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel (Villaverde, 2004).

Los queratinocitos forman una proteína fibrilar denominada queratina que forma la capa córnea. Los queratinocitos son exfoliados y sustituidos de forma continua por células procedentes de las capas inferiores de la epidermis. La queratina se acumula en el citoplasma hasta desplazar al núcleo y a todos los componentes celulares, y así la diferenciación celular culmina en la muerte celular en los ahora llamados corneocitos. Finalmente, éstos por desplazamiento se desprenden y se descaman. Este proceso general dura entre 15 y 30 días dependiendo de la zona del cuerpo (Villaverde, 2004).

Los melanocitos representan aproximadamente el 10% de todas las células de este órgano y constituyen el sistema pigmentario de la piel, pues producen melanina, que es el pigmento responsable de la coloración cutánea y es capaz de absorber la luz UV. Los

melanocitos se localizan en el estrato basal o germinativo (Villaverde, 2004). Se identifican como una célula clara y mayor entre las células eosinófilas basales, también se le denomina célula clara de Masson (Amado, 2001). Con la reacción de DOPA (dihidroxifenil-alanina por sus siglas en inglés) se pueden observar como una estructura con múltiples prolongaciones citoplásmicas que se sitúan entre los queratinocitos por donde les transfieren los melanosomas. Los melanosomas son estructuras intracelulares que contienen melanina, varían cuantitativamente entre personas originarias de regiones con diferente incidencia de RUV y en el individuo según la región del cuerpo (Amado, 2001; Magaña y Magaña, 2003).

Las células de Langerhans proceden de la médula ósea y se distribuyen en toda la epidermis. Presentan prolongaciones dendríticas que se introducen en los espacios intercelulares y parecen formar una red continua. Participan en la respuesta inmune ya que se les atribuye la función de presentar antígenos a los linfocitos y activar la respuesta inmune específica por lo que se consideran células presentadoras de antígeno (CPA) (Villaverde, 2004). Su núcleo es lobulado y el citoplasma es claro, presentan un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollado, pero lo característico de esta célula es la presencia de los gránulos de Birbeck (formaciones en forma de raqueta) (Amado, 2001).

Las células de Merkel son células epidérmicas modificadas que están en la capa basal de la epidermis unidas a los queratinocitos por desmosomas. Su citoplasma es claro, su núcleo es lobulado y presenta gránulos de neurosecreción. Las células de Merkel están asociadas con los bulbos terminales de fibras mielínicas aferentes. La terminación nerviosa pierde su cobertura por células de Schwann y penetra la lámina basal para expandirse en forma de placa o disco que se ubica en contacto con la base de las células de Merkel. La combinación de la fibra nerviosa con la célula epidérmica se llama corpúsculo o disco de Merkel y se asocia con funciones sensoriales mecanorreceptoras (Amado, 2001; Ross y Pawlina, 2007).

La unión dermoepidérmica

Con tinciones especiales y con microscopía electrónica se observa que la unión entre la epidermis y la dermis es muy compleja. La lámina basal muestra una parte electrodensa (lámina densa) y zonas transparentes (lámina lúcida). Este complejo basal puede ser atravesado por diversos tipos celulares y le da la cohesión necesaria a la piel, cuando se

altera, se presentan problemas graves de separación entre la dermis y la epidermis que van desde ampollas hasta necrosis (Amado, 2001).

La conexión dermoepitelial es desigual. Está formada por las papilas dérmicas o prolongaciones digitiformes que aumentan la superficie de contacto entre ambas. En ellas se encuentran los corpúsculos receptores y numerosos capilares, mientras que en la parte más profunda o región reticular de tejido denso abundan las fibras elásticas entrelazadas con el colágeno, así como los folículos pilosos y las glándulas (Villaverde, 2004).

La dermis

La dermis es mucho más gruesa que la epidermis (de 10 a 30 veces). Está formada por una densa red de tejido conjuntivo constituido principalmente por colágena. Ésta también presenta una sustancia fundamental (constituida por mucopolisacáridos), las fibras reticulares y las fibras elásticas que son de naturaleza proteínica, pero que se distinguen con tinciones especiales (Magaña y Magaña, 2003). Las fibras le confieren a la piel la elasticidad y fuerza. Esta capa tiene pocas células, las principales son los fibroblastos, aunque también hay macrófagos. La dermis es rica en vasos sanguíneos, nervios, terminaciones nerviosas encapsuladas, como los corpúsculos de Pacini, Meissner y Ruffini, glándulas sudoríparas y sebáceas, así como de folículos pilosos asociados a sus músculos erectores (Magaña y Magaña, 2003; Villaverde, 2004, Ross y Pawlina, 2007).

Se reconocen dos porciones de la dermis, la parte superior es denominada papilar, llamada así, porque forma papilas con la epidermis. La colágena es más fibrilar en esta zona y contiene las asas capilares que requieren las células epiteliales para sobrevivir. La parte inferior y de mayor tamaño es la dermis reticular. Los haces de colágena son más gruesos y adoptan una disposición en red que le confiere a la piel la elasticidad. De la dermis reticular se desprenden prolongaciones a la hipodermis en forma de tabiques que llevan los vasos sanguíneos hacia las zonas más profundas y dividen el tejido adiposo en lóbulos (Magaña y Magaña, 2003).

La célula principal de la dermis es el fibroblasto que se origina de las células mesenquimatosas, tiene forma estrellada o de huso, con núcleo fusiforme, es la encargada de sintetizar las fibras de colágena y tal vez también las elásticas (Amado, 2001) cuando ha cesado su fase de actividad adopta un tamaño menor y se denomina fibrocito (Magaña y Magaña, 2003). También están presentes histiocitos, que son monocitos tisulares derivados del sistema reticuloendotelial; células cebadas o mastocitos muy basófilas con gránulos en su interior y productoras de histamina, heparina y otros

mediadores de la inflamación; en bajo número se pueden observar polimorfonucleares, eosinófilos y plasmocitos (Amado, 2001).

La hipodermis

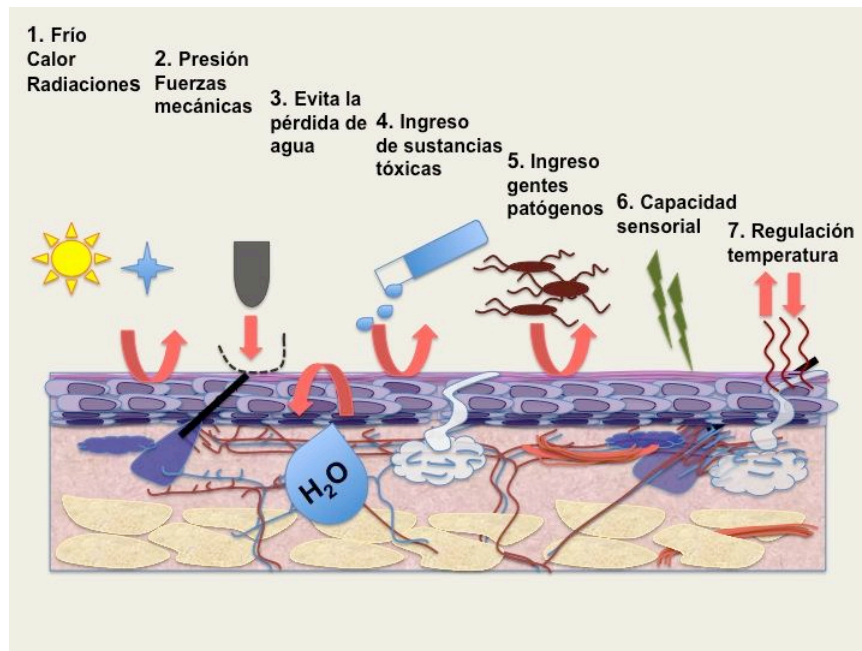
La hipodermis es el tejido celular subcutáneo formado por adipocitos que son generalmente de forma redonda con el núcleo desplazado a la periferia y con el citoplasma lleno de lípidos, tiene origen mesenquimatoso (Amado, 2001). La hipodermis está constituida por lóbulos delimitados por el tejido conectivo de la dermis reticular y en ellos están situados los vasos y los nervios (Amado, 2001; Magaña y Magaña, 2003).

El grosor de esta capa varía de acuerdo a la zona del cuerpo, es gruesa en el tronco y muy delgada en párpado. Sus funciones incluyen: participar en la termoregulación, contribuir al desplazamiento de la piel, constituir una reserva energética y proteger contra golpes o contusiones (Magaña y Magaña, 2003).

3.1.2 Función de la piel: protección hacia la radiación solar

El organismo necesita un sistema especial de protección o sistema tegumentario que lo proteja de la agresión constante de los factores ambientales que pueden ser químicos, físicos y biológicos. Además, la piel no es simplemente una envoltura o un órgano inerte, de hecho tiene muchas funciones indispensables para el organismo y está relacionada con otros aparatos y sistemas. Cuando alguna de las funciones de ésta se ve alterada, se producen grandes cambios a nivel sistémico que pueden conducir a la muerte, ya que no se puede vivir con más del 60% de la piel dañada (Amado, 2001; Arenas, 2005).

La piel es una barrera que protege al individuo de las agresiones externas debido a sus características de integridad, cohesión y elasticidad antes descritas en la estructura de la epidermis y la dermis (Amado, 2001). Como es la interfase entre el organismo y el ambiente, la piel debe servir como primera línea de defensa contra múltiples y variables tipos de factores que pueden producir daño (Esquema 3). La protección es la función principal de este órgano y debe proteger principalmente de: la pérdida de líquidos corporales, el ingreso de agentes tóxicos y microorganismos, la incidencia de la radiación ultravioleta (RUV) y las fuerzas mecánicas (Jackson y Elias, 1997; Ross y Pawlina, 2007).



Esquema 3. La piel como mecanismo de protección.

La piel posee dos barreras primarias contra la RUV, la queratina presente en el estrato córneo que refleja la luz y la melanina sintetizada por los melanocitos. Este último quizás sea el mecanismo más importante en relación con la protección hacia los efectos adversos de la RUV y se encuentra íntimamente relacionado con los tipos de piel (Cuadro 1) (Jackson y Elias, 1997).

El color de la piel se debe a varios factores como la presencia de carotenos, el flujo sanguíneo, el contenido de melanina y la distribución de los melanosomas. Aunque la cantidad de melanocitos es en esencia la misma en todas las razas, el tipo de melanina que se produce es diferente. La eumelanina es pigmento pardo negrozco mientras que la feomelanina es de color rojo amarillento. La relación en la producción de estos pigmentos está determinada genéticamente. Aunado a lo anterior, en las personas de piel clara la melanina se degrada con mayor rapidez que en los de tez oscura debido a una mayor actividad lisosómica de los queratinocitos. Debido a lo anterior, en las primeras los melanosomas se localizan principalmente en las células cercanas a la capa basal. En cambio en la piel oscura se pueden localizar melanosomas en todas las capas de la epidermis, incluso el estrato córneo (Ross y Pawlina, 2007).

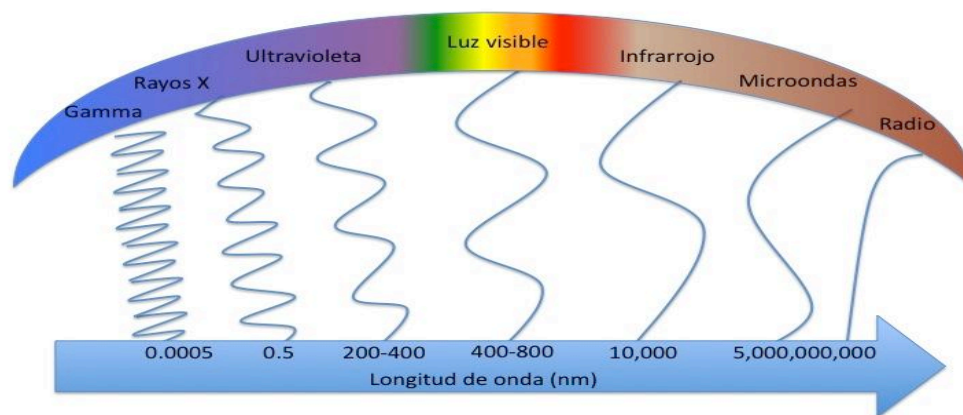
Cuadro 1. Clasificación de la piel de acuerdo a su sensibilidad a la radiación ultravioleta.

Tipo de piel	Color sin exponerse al sol	Sensibilidad a la RUV	Bronceado
I	Blanco	Muy sensible	Siempre enrojece, pero nunca se broncea
II	Blanco	Muy sensible	Siempre enrojece, rara vez se broncea
III	Blanco	Sensible	Enrojece moderadamente, bronceado uniforme
IV	Café claro	Moderadamente sensible	Enrojece poco, bronceado marrón
V	Café	Mínimamente sensible	Enrojece rara vez, bronceado oscuro
VI	Negro	Insensible	Nunca enrojece

Tres enzimas son claves para iniciar la síntesis de melanina, la fenilalanina hidroxilasa, la tirosina hidroxilasa y la tirosinasa. La fenilalanina hidroxilasa intracelular cataliza la conversión de la fenilalanina a tirosina. Posteriormente la tirosinasa induce la hidroxilación de este último aminoácido, así como la producción de o-quinonas. La tirosina hidroxilasa utiliza la tirosina para formar la L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en los melanosomas (Baldea et al., 2009).

3.2 La radiación solar

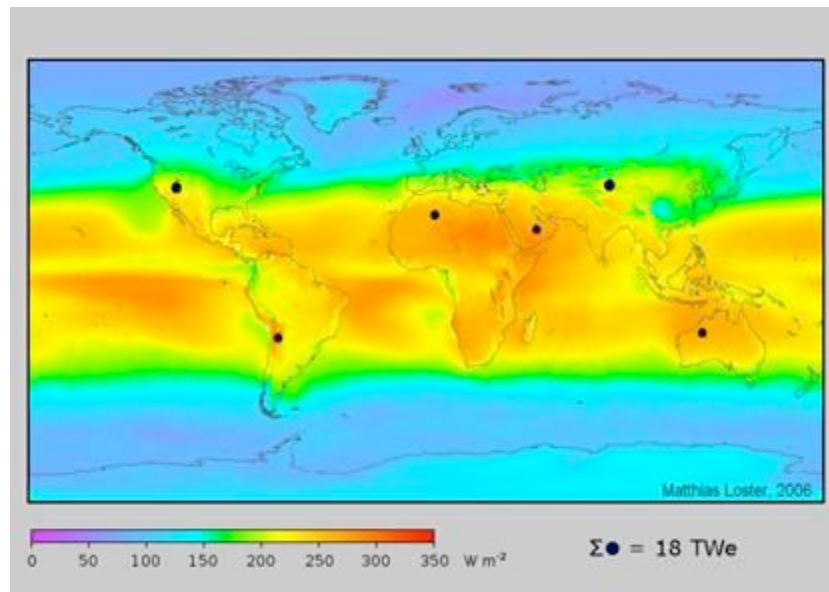
El Sol es una masa de materia gaseosa constituida principalmente por hidrógeno y helio. En el interior de este astro ocurren reacciones de fusión y fisión nuclear para formar otros elementos. En estas reacciones termonucleares se produce una gran cantidad de energía que es liberada al espacio en forma de radiaciones electromagnéticas. La radiación se emite desde la superficie del sol con todas las longitudes de onda que van desde las más largas, como las de radio, hasta las más cortas como los rayos X y los rayos gamma (Esquema 4) (Fligge et al., 2001).



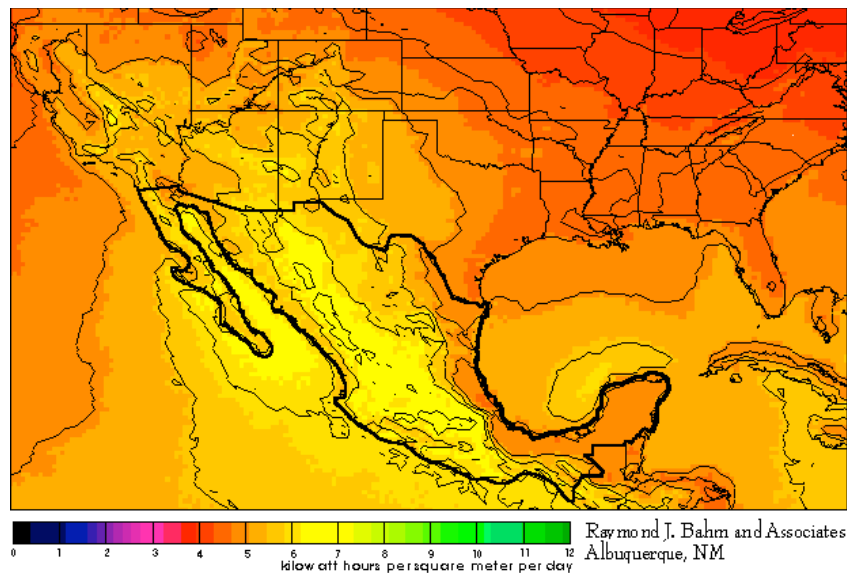
Esquema 4. Espectro electromagnético emitido por el sol. Modificado de Lui y Anderson, 2007.

La energía solar se define como la energía radiante transmitida por el sol e interceptada por la tierra. El tipo de radiación solar que llega a la superficie terrestre comprende principalmente el tipo de energía que se encuentra por encima de los 300 nm. Debido a lo anterior se puede considerar que principalmente llega a la superficie terrestre luz visible e infrarroja y en menor medida la radiación ultravioleta. La magnitud que mide la radiación solar que llega a la Tierra es la irradiancia, este parámetro mide la energía que, por unidad de tiempo y área, alcanza la superficie terrestre, la unidad es el Watt por metro cuadrado (W/m^2) y para expresar la cantidad de energía recibida se considera el kilowatt por hora por metro cuadrado (kWh/m^2). La intensidad de la radiación solar que llega a un determinado lugar en la Tierra varía de acuerdo a la latitud y altitud, la hora del día, y las condiciones atmosféricas que incluyen el tipo y concentración de gases atmosféricos, la nubosidad, partículas de agua, así como los fenómenos de absorción y reflexión de la atmósfera (Fligge et al., 2001).

México está ubicado en el cinturón solar de la tierra por lo que nuestro país tiene una alta incidencia de energía solar en la gran mayoría de su territorio, con una irradiación media anual de aproximadamente $5 kWh/m^2$ por día (Esquema 5) (http://www.conae.gob.mx/wb/procalsol/energia_solar2).



Fuente: http://www.ez2c.de/ml/solar_land_area/



<http://www.ecotec2000.de/espanol/sun6.htm>

Esquema 5. Energía solar aprovechable en la República Mexicana.

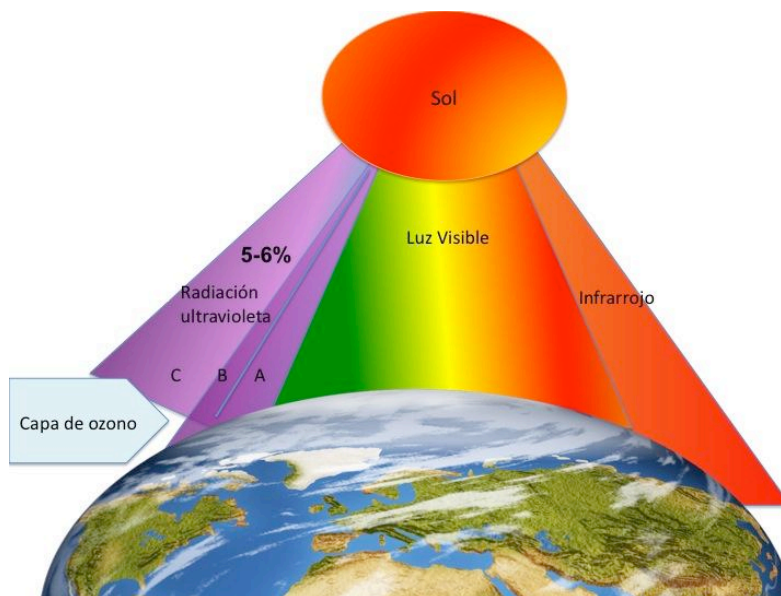
3.2.1 La radiación ultravioleta (RUV)

La radiación electromagnética emitida por el sol que llega a la tierra se divide en: radiación ultravioleta (200-400 nm), luz visible (400 a 760 nm), infrarrojo (>760 nm) y las microondas (Nehal y Lim, 1995). La radiación ultravioleta (RUV) que atraviesa la atmósfera y llega a la tierra es aproximadamente entre el 5 al 6% de la luz emitida por el sol. En esta región del espectro electromagnético, los efectos biológicos de la radiación varían de forma importante de acuerdo a la longitud de onda. En 1932 durante el 2º

Congreso Internacional de la Luz en Copenhague se adoptó dividir la luz ultravioleta en tres zonas o regiones de acuerdo a las propiedades de transmisión de ésta en tres diferentes filtros, así se definió la región UVA de 315 a 400 nm, la UVB de 280 a 315 nm y la región UVC con las longitudes de onda menores a 280 nm. Las categorías mencionadas sólo consideran el comportamiento físico de la RUV, sin embargo no toman en cuenta los efectos biológicos que producen los diferentes tipos de longitudes de onda de la RUV. Debido a lo anterior la Comisión Internacional de Alumbrado (CIE por sus siglas en Francés) toma en consideración aspectos biológicos para definir a las longitudes de onda comprendidas entre los 320 a 400 nm como UVA, en el caso de la UVB se toma en cuenta que las radiaciones menores a 290 no llegan a la superficie terrestre por lo que se considera que la región UVB comprende de los 290 a 320 nm y finalmente la UVC de 290 a 200 nm. Actualmente se considera que la región UVA se divide en dos secciones: UVA-1 (340-400 nm) y UVA-2 (320-340 nm) (Esquema 6) (Diffey y Kochevar, 2007).

La cantidad de luz solar UVB y UVA que llega a la Tierra es afectada por la latitud, la altitud, las estaciones del año, la hora del día, la nubosidad y la capa de ozono (Lui y Anderson, 2007). El espesor de la capa de ozono no es uniforme. La concentración de ozono se incrementa en la región de los polos terrestres, sin embargo en los últimos 20 años se ha observado una disminución en el espesor de ésta en el Polo Sur debido a diversas actividades humanas como la liberación de fluoroclorocarbonos empleados en los aerosoles, en los refrigeradores y en los sistemas de aire acondicionado. Lo anterior ha tenido como consecuencia un incremento en la cantidad de RUV que incide en la Tierra (Landry et al., 1995; Rao y Ormrod, 1995; Bornman et al., 1997; Kullavanijaya y Lim, 2005).

La mayor irradiancia se presenta en el ecuador y en zonas altas. En estas, el grosor de la capa de ozono es menor, lo que provoca un incremento en la intensidad de la RUV entre un 8 a un 10% por cada 304.8 m de altura (1000 ft). La RUV incide con mayor intensidad entre las 10 am hasta las 4 pm. En la superficie terrestre la relación entre la radiación UVA y la UVB es 20:1. Además de lo anterior, existe una menor variación en cuanto a la cantidad de radiación UVA que incide en la Tierra pues se ha visto que es menos afectada por la altitud o la atmósfera comparada con la UVB. Otra característica que distingue a la UVA en relación con la UVB, es que puede penetrar a capas más profundas de la piel y no es filtrada por las ventanas de vidrio (Kullavanijaya y Lim, 2005).



Esquema 6. La radiación ultravioleta que incide en la Tierra.

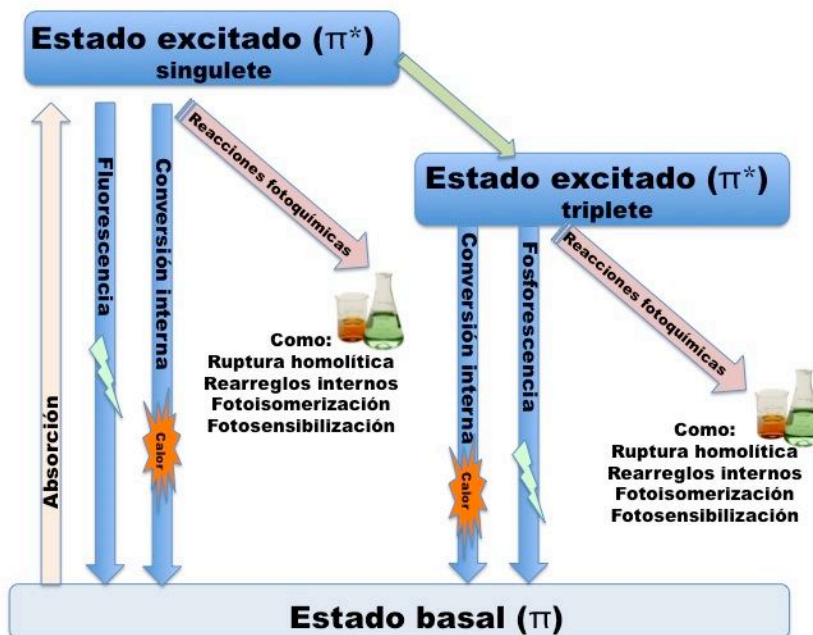
La RUV tiene la energía suficiente para causar cambios químicos en las moléculas sobre las que incide, sin embargo para que estos puedan ocurrir se deben cumplir dos condiciones: a) El fotón debe tener la energía suficiente para llevar a cabo el proceso y b) las moléculas irradiadas deben de absorber el fotón; sólo cuando se cumplen ambos, a las sustancias se les denominará cromóforas. Algunas moléculas cromóforas absorben energía en la región ultravioleta y visible del espectro electromagnético, lo anterior depende de su estructura molecular (Vollhardt y Schore, 2002).

Los compuestos capaces de absorber la RUV son básicamente aquellos que en su estructura cuentan con sistemas π , en forma de dobles enlaces conjugados que puedan presentar traslapamiento de los orbitales o la deslocalización electrónica (Vollhardt y Schore, 2002). En una molécula orgánica los electrones ocupan orbitales moleculares enlazantes en el estado basal. La RUV tiene la cantidad de energía necesaria para transferir a los electrones de valencia a los orbitales de mayor energía denominados como antienlazantes, por lo tanto la molécula se encuentra en un estado electrónico excitado, lo anterior se refiere como la transición de un electrón de un enlace π a un orbital antienlazante π^* ($\pi \rightarrow \pi^*$) (March, 1992; Vollhardt y Schore, 2002). De esta manera, la energía del fotón es convertida a otra forma de energía en el interior del cromóforo (Brown et al., 2003). Lo anterior se rige por las leyes de la mecánica cuántica, cada molécula sólo puede absorber fotones de cierta energía y como la energía de un fotón es inversamente proporcional a la longitud de onda, cada sustancia cromófora tiene un espectro particular de absorción a la luz (Diffey y Kochevar, 2007).

Cuando un cromóforo absorbe la luz, sus electrones adquieren mayor energía y se dice que están en un primer estado excitado llamado singulete. Éste existe sólo por unos pocos nanosegundos (10^{-9} s), posteriormente los electrones regresan a su estado basal emitiendo el exceso de energía como: a) fluorescencia, b) en forma de calor, c) convirtiéndose en un segundo estado excitado llamado triplete ó d) induciendo reacciones fotoquímicas (Esquema 7). El estado de triplete es más estable que el singulete y existe por un periodo de tiempo más prolongado, alrededor de varios microsegundos (10^{-6} s). El estado de triplete regresa al estado basal de manera similar al singulete emitiendo en este caso fosforescencia (March, 1992; Diffey y Kochevar, 2007).

Las reacciones fotoquímicas que se pueden inducir por la RUV incluyen la ruptura homolítica de los enlaces que genera radicales libres, el rearrreglo intermolecular, la fotoisomerización, la abstracción de un átomo de hidrógeno y la fotosensibilización. Durante la fotosensibilización, una molécula en estado excitado (en singulete o triplete) transfiere su exceso de energía a otra molécula (March, 1992).

La RUV puede convertir a la sustancia cromófora en una o varias moléculas diferentes denominadas fotoproductos. Este tipo de reacciones son de gran interés debido a que los fotoproductos pueden tener efectos importantes en los sistemas biológicos (Diffey y Kochevar, 2007).



Esquema 7. Procesos inducidos en una molécula por la absorción de la RUV. Modificado de Diffey y Kochevar, 2007.

3.2.2 Efectos de la radiación ultravioleta en los organismos

Los procesos vitales que ocurren en la biosfera se basan en la energía solar que llega a la superficie terrestre. De manera directa o indirecta todos los organismos dependemos de este tipo de energía, sin embargo la RUV emitida por el sol tiene diversos efectos que afectan a los seres vivos, éstos se inician por una absorción fotoquímica a nivel de moléculas de importancia biológica. La RUV daña directamente importantes componentes celulares como el ADN, los lípidos y las proteínas de todos los seres vivos (Bjorn et al., 2002; Diffey y Kochevar, 2007).

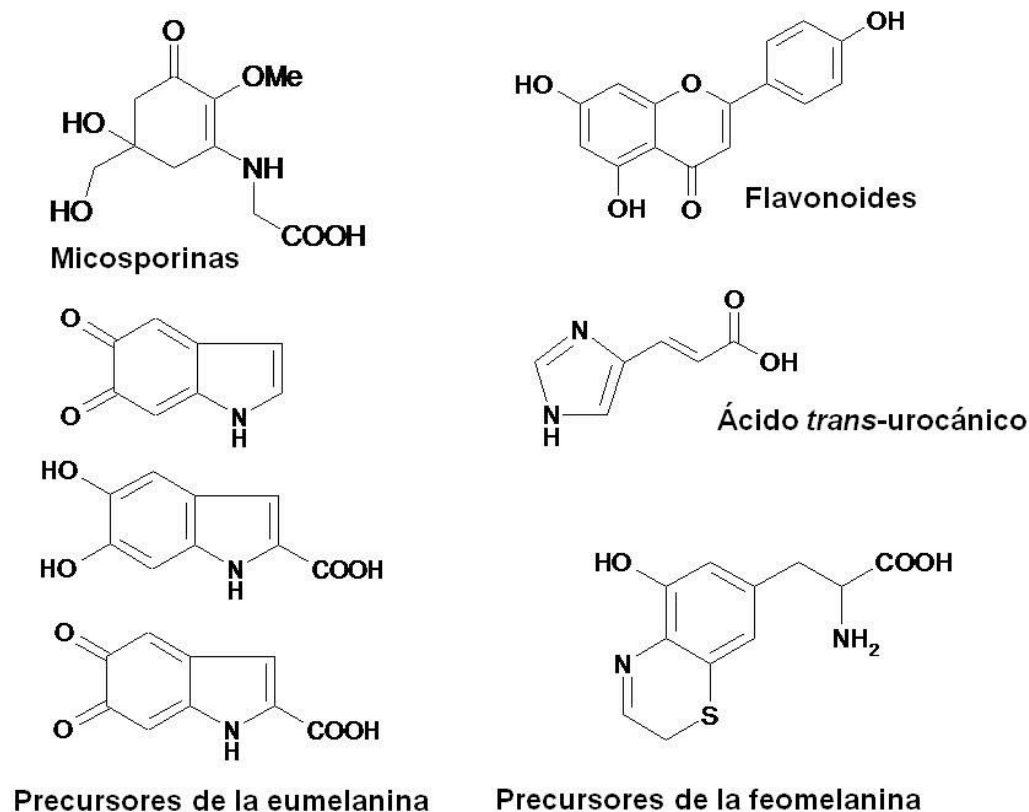
Desde el origen de la vida, los organismos han estado expuestos a la RUV, que ha sido un factor de presión evolutiva y es por ello que en todos se han desarrollado y conservado principalmente tres mecanismos que evitan o reparan los daños producidos por este tipo de radiación: a) la síntesis de moléculas que absorben la RUV, b) diversos antioxidantes, y c) sistemas de reparación del ADN (Bharti y Khurana, 1997; Bjorn et al., 2002).

a) Compuestos capaces de absorber la RUV

La primera línea de defensa ubicua en los seres vivos la constituyen los compuestos cromóforos a la RUV que disminuyen la cantidad de radiación que reciben los organismos. Entre éstos compuestos se encuentran las micosporinas (MAAs) que se acumulan en cianobacterias, algas, levaduras, hongos, microalgas, corales, animales (principalmente acuáticos) y líquenes (Oren y Gunde-Cimerman, 2007).

En plantas superiores se ha determinado la presencia constitutiva de compuestos fenólicos como flavonoides y fenilpropanoides, éstos se acumulan principalmente en las vacuolas de las células epidérmicas donde actúan como filtros selectivos de la radiación solar, pues absorben la RUV pero permiten el paso de la luz visible necesaria para la fotosíntesis. Además, se ha observado la inducción de la síntesis de polifenoles y otros compuestos aromáticos debido a la exposición a la RUV (Esquema 8) (Rozema et al., 1997; Cockell y Knowland, 1999). También se han encontrado este tipo de compuestos combinados con grasas epicuticulares y en las células del mesófilo (Cockell y Knowland, 1999).

Los animales en general tienen una buena protección hacia los daños causados por la RUV ya que se encuentran protegidos por el exoesqueleto, las plumas, o el pelaje (Nigel y Gwynn-Jones, 2003). En los animales, uno de los principales compuestos capaces de absorber la RUV es la melanina, que se encuentra en ojos, plumas, cutícula y piel (Cockell y Knowland, 1999; Yamaguchi et al., 2007). La melanina es una molécula compleja que absorbe en el rango de la luz UV y visible, brindando protección al absorber la RUV. Principalmente, actúa como pantalla e impide el paso de la luz a través de la piel, además disipa la energía en forma de calor y tiene propiedades antioxidantes (Esquema 8) (Chedekel y Zeise, 1997). Sin embargo, la melanina puede producir especies reactivas de oxígeno (ERO) y generar rompimientos en las cadenas de ADN que contribuyen al proceso de carcinogénesis y fotoenvejecimiento. Por otro lado, en la piel también se encuentra el ácido urocánico, derivado de la histidina, que tiene un pico máximo de absorción a los 277 nm. Esta sustancia es considerada uno de los principales cromóforos presentes en la piel, además participa en la diferenciación del estrato córneo y contribuye al pH ácido de la piel. La exposición del ácido *trans* urocánico a la RUV conlleva su isomerización a la forma *cis*, en esta configuración tiene un efecto inmunosupresor (Esquema 8) (Kullavanijaya y Lim, 2005).



Esquema 8. Algunos compuestos capaces de absorber la RUV presentes en los organismos.

b) Antioxidantes

La RUV produce un incremento en el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO) que incluyen el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($HO\bullet$) y el oxígeno singlete (1O_2). Las ERO tienen la capacidad de reaccionar con diversas biomoléculas causando cambios en su estructura y por lo tanto alteran su función celular lo que genera un estado de estrés oxidativo que conlleva daños celulares como la oxidación de las bases nitrogenadas, rompimientos y entrecruzamientos del ADN, la peroxidación de lípidos (LPO) de las membranas celulares y la oxidación de proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los sistemas antioxidantes presentes en las células se dividen en: enzimáticos y no enzimáticos, ambos son considerados como un mecanismo de protección frente a los efectos adversos a la RUV (Rao y Ormond, 1995).

Los sistemas antioxidantes cutáneos incluyen una red de enzimas antioxidantes que son capaces de metabolizar a las ERO. El radical superóxido se convierte primero en peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y éste último es inmediatamente

metabolizado para producir agua por la acción de la catalasa (CAT) o diversas peroxidases como la glutatión peroxidasa (GPx). La acción de éstas enzimas antioxidantes debe estar acoplada para evitar condiciones de estrés oxidativo en las células (Vessey, 1993; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los antioxidantes como el ácido ascórbico, el glutatión, los tocoferoles y los carotenoides, se encuentran en las plantas en altas concentraciones. Se ha observado que el ascorbato y el glutatión son regulados de manera positiva en respuesta a la exposición a la RUV lo que incrementa la capacidad antioxidante de las células vegetales (Jansen et al., 1998). En lo referente a las enzimas antioxidantes, el nivel de la transcripción de la glutatión reductasa, GPx, CAT y la SOD se incrementa en respuesta a la exposición a la RUV (Jansen et al., 1998; Santos et al., 2004). Por otro lado, las ascorbato peroxidases son fundamentales en la eliminación del H_2O_2 tanto en el citoplasma como en los cloroplastos. Estas enzimas usanall ácido ascórbico como substrato reductor y forman parte del ciclo ascorbato-glutatión o Halliwell-Asada (Inzé y Van Montagu, 1995). Se ha determinado que la exposición a la RUV-B (280-320 nm) incrementa la síntesis de las enzimas que participan en este ciclo (Rao y Ormond, 1995).

La actividad de las enzimas antioxidantes en la piel es mayor en la epidermis que en la dermis. La actividad de la SOD en la piel es generalmente de 10 a 20 veces menor que en otros tejidos y en general, se mantiene constante desde el nacimiento hasta la edad adulta en los humanos, en contraste en modelos murinos se ha establecido una disminución en la actividad de esta enzima con la edad. La CAT se ha encontrado en la piel de todos los animales, pero su actividad específica es considerablemente baja comparándola con la del hígado. En la epidermis se ha detectado mayor actividad de la CAT en el estrato granuloso que en el estrato basal. De manera similar, la actividad de la GPx es menor que en el hígado pero comparable al cerebro y a su vez en epidermis tiene el doble de actividad que en la dermis. En piel también se encuentran antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, el ubiquinol, la melanina, el ácido ascórbico, y la vitamina E (Vessey, 1993).

c) Sistemas de reparación del ADN

El último mecanismo propuesto para la protección del daño celular producido por la RUV son los sistemas de reparación del ADN. La absorción de fotones de UV por el ADN favorece la formación de dímeros de pirimidinas (DCP). Los DCP se forman por la interacción covalente de dos pirimidinas adyacentes en la misma cadena. Las pirimidinas

absorben la RUV, esta radiación excita los electrones del doble enlace, los cuales se acoplan con los electrones excitados de la pirimidina adyacente, de tal manera que se lleva a cabo una reacción de cicloadición en la posición 5 y 6. También se pueden formar los fotoproductos denominados pirimidín-pirimidona 6-4 (6-4PP), en donde la unión se lleva a cabo en los carbonos 6 y 4 de las bases adyacentes de timina (Black et al., 1997; Diffey y Kochevar, 2007).

Los fotoproductos del ADN son mutagénicos y alteran el metabolismo celular ya que impiden la transcripción y la replicación. En todos los organismos existen sistemas de reparación de los aductos del ADN basados en la reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés). La reparación es un proceso complejo que involucra a más de 30 proteínas (Ichihashi et al., 2003). La reparación por escisión implica dos mecanismos, la escisión de una sola base o una cadena de nucleótidos. En ambos casos, es necesario el reconocimiento del daño, la ruptura del enlace fosfodiéster a cada lado de la zona dañada mediante la acción de endonucleasas, posteriormente la ADN polimerasa sintetiza un nuevo fragmento que reemplazará al fragmento dañado. Finalmente, por escisión se desprende el fragmento dañado y las ligasas unen el nuevo fragmento a la cadena de ADN (Black et al., 1997).

El mecanismo de reparación por escisión tiene una gran versatilidad en la capacidad de reconocer y corregir las alteraciones en el ADN provocadas por la RUV y otros cancerígenos de tipo químico. Las lesiones que desestabilizan la doble hélice se reparan de forma rápida y eficiente. Los fotoproductos 6-4PP son procesados aproximadamente en una hora, mientras que los DCP tardan alrededor de quince horas en ser reparados (Black et al., 1997). Los genes activos en el proceso de transcripción se reparan rápidamente por el sistema llamado reparación acoplado a la transcripción (TCR por sus siglas en inglés), mientras que los demás genes son procesados por el sistema de reparación genómico global (NGR por sus siglas en inglés). Estos mecanismos difieren únicamente en el proceso de reconocimiento del daño al ADN (Matsumura y Ananthaswamy, 2004).

La reparación por fotoreactivación dependiente de la luz es otro mecanismo importante para eliminar el daño directo de la RUV al ADN en los organismos con excepción de los mamíferos. La fotoreactivación se lleva a cabo por una enzima, la fotoliasa, la cual revierte la dimerización restableciendo las bases nitrogenadas a la forma nativa. En las plantas, hay dos tipos de fotoliasas, una que repara los DCP y otra los 6-4PP, en ambos casos la reparación se lleva a cabo por una sola enzima la cual tiene dos grupos

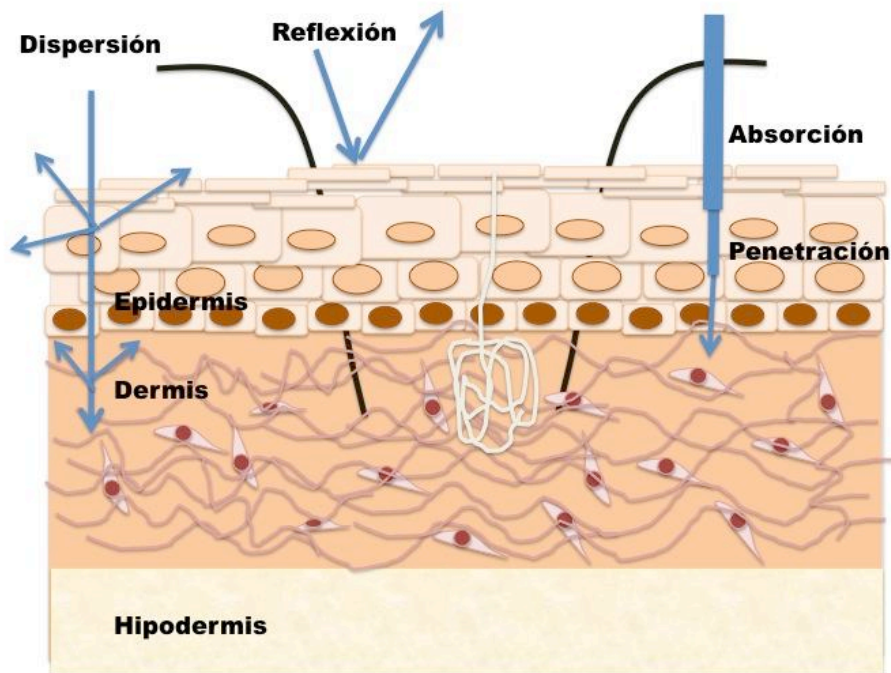
cromóforos que absorben entre los 350 a los 400 nm aproximadamente, la energía de excitación se transfiere a las bases y se revierte la cicloadición (Jansen et al., 1998).

Las fotoliasas pertenecen a la familia de proteínas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Este tipo de enzimas se divide en tres tipos de acuerdo a su función: fotoliasas que reparan CPD, fotoliasas que reparan los fotoproductos 6-4PP y los criptocromos, estos son fotoreceptores que regulan el ciclo circadiano en animales y en plantas regulan la germinación, el crecimiento y el fotoperiodo (Goosen y Moolenaar, 2008).

3.2.3 Interacción de la RUV con la piel

La RUV que incide en la piel puede sufrir diferentes procesos físicos como la reflexión, dispersión, la transmisión y la absorción (Esquema 9). La reflexión es cuando un rayo de luz que incide sobre una superficie es reflejado, ésto ocurre principalmente en el estrato córneo. La transmisión de la RUV implica que la luz pase a través de los diferentes tejidos que forman la piel. En cualquiera de los estratos de la piel, la propagación de luz puede ser alterada o desviada, a lo que se denomina dispersión. La probabilidad de que ocurra la dispersión depende de la longitud de onda de cada fotón, así los fotones de la UVA-2 son dispersados con mayor facilidad y es por esa razón que pueden penetrar en zonas más profundas de la piel. La dispersión de la RUV ocurre principalmente en la dermis por las fibras de colágeno (Lui y Anderson, 2007; Diffey y Kochevar, 2007).

La absorción de la RUV por diferentes moléculas presentes en la epidermis y la dermis incia diferentes respuestas cutáneas tanto agudas como crónicas, debido principalmente a que la energía de los fotones de la RUV es capaz de inducir diversas reacciones fotoquímicas. Como ya se mencionó, sólo los fotones que son absorbidos por alguna molécula cromófora son capaces de iniciar procesos biológicos. Los aminoácidos, los nucleótidos, la melanina, las porfirinas y el deshidrocolesterol son capaces de absorber la RUV. Las diferencias en las características de absorción que presentan estos compuestos explican los diferentes efectos de la RUV en la piel (Diffey y Kochevar, 2007). El estrato córneo llega a absorber hasta el 70% de la RUV que incide en la piel debido a los aminoácidos que forman la queratina, el ácido urocánico, la melanina y los carotenoides (Cortés, 2006; Lui y Anderson, 2007).



Esquema 9. Interacción de la RUV con la piel. Modificado de Cortés, 2006.

Los fotones de la RUV depositan su energía al ir atravesando las diferentes capas de la piel, entre más energéticos sean y por lo tanto de longitudes de onda más pequeñas, su interacción con las moléculas de la piel es más superficial. De esta forma la UVB penetra principalmente la epidermis y sólo alrededor del 10% llega a la dermis. Por otro lado, la UVA puede transmitirse a través de ambas capas tisulares. Sin embargo, debido a que las células epidérmicas expuestas a la RUV secretan diferentes mediadores químicos, como las citocinas, es posible la comunicación entre ambos tejidos. Debido a lo anterior, los efectos de la UVB no se pueden describir únicamente por el rango de penetración de ese tipo de radiación (Garmyn y Yarosh, 2007).

La RUV tiene diversos efectos en la piel los cuales pueden ser divididos en términos prácticos en agudos o crónicos. Dentro de los procesos agudos encontramos los beneficios de la exposición a la RUV que incluyen la sensación de bienestar, el bronceado inmediato o tardío y la síntesis de vitamina D (Pathak, 1986; Cortés, 2006). Por otro lado, también la exposición aguda a la RUV puede provocar en la piel alteraciones en las biomoléculas como el ADN; cambios en el funcionamiento celular al inducir estrés oxidativo, y activar los mecanismos de transducción de señales y factores de transcripción como AP-1, NF κ B, así como efectos a nivel tisular que incluyen la quemadura solar o eritema y alteraciones del sistema inmune. Los efectos crónicos de la exposición a la RUV

incluyen el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis (Garmyn y Yarosh, 2007; Maverakis et al., 2010).

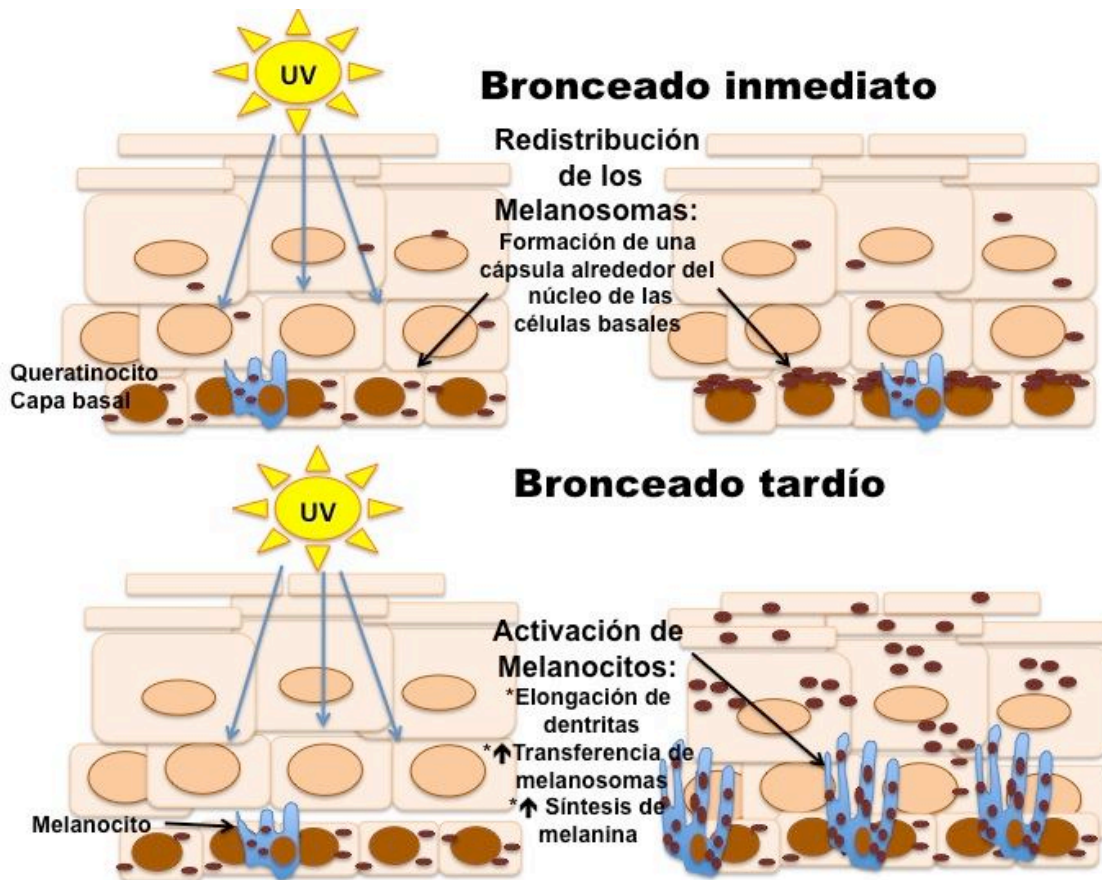
3.2.3.1 Efectos agudos de la exposición a la RUV en la piel

Bronceado

La RUV es el principal factor ambiental que afecta el color de la piel. El bronceado inmediato ocurre a los pocos minutos de la exposición solar y persiste por varias horas. Este rápido incremento de la coloración cutánea se debe a la fotooxidación y polimerización de la melanina ya existente en la piel, así como a la re-distribución de los melanosomas alrededor del núcleo de las células epidérmicas (Esquema 10). El bronceado tardío ocurre entre las 48 a las 72 horas posteriores a la radiación y dura alrededor de 3 semanas e implica la activación de los melanocitos (Cortés, 2006; Yamaguchi et al., 2007).

El bronceado ocurre como una respuesta cutánea a la RUV. Los melanocitos sintetizan dos tipos principales de melanina: la eumelanina y la feomelanina. La eumelanina representa el principal mecanismo fotoprotector de la piel al limitar la penetración de la RUV a las capas más profundas de la piel y atrapar las ERO que pueden causar principalmente daño al ADN, a los lípidos de las membranas y a las proteínas (Kadekaro et al., 2003). La feomelanina puede incrementar el estrés oxidativo de los melanocitos al actuar como fotosensibilizador. La melanina contenida en los melanosomas se distribuye hacia las células de la capa basal de la epidermis. Eventualmente el bronceado se elimina o desaparece cuando la melanina alcanza el estrato córneo y los corneocitos que lo forman se descaman (Esquema 10) (Rhodes y Lim, 2007).

Los mecanismos moleculares implicados en la inducción del bronceado no se conocen en su totalidad, pero sí se ha determinado que está relacionado con los sistemas de reparación del ADN en los queratinocitos irradiados (Yamaguchi et al., 2007). En el bronceado tardío hay incremento en el número de melanocitos así como de la melanogénesis. Lo anterior está caracterizado por el incremento en la actividad de la tirosinasa, la elongación de las dendritas del melanocito y un incremento en la transferencia de los melanosomas hacia los queratinocitos, donde estos organelos se distribuyen alrededor del núcleo formando una "cápsula nuclear" que los protege del daño al ADN inducido por la RUV (Rhodes y Lim, 2007).



Esquema 10. Efecto de la RUV en el bronceado. Modificado de Yamaguchi et al., 2007.

Después de la exposición a la RUV, los queratinocitos secretan melanocortina y la hormona estimuladora de los melanocitos (α -MSH) que estimula la producción de la melanina en los melanocitos (Rhodes y Lim, 2007; Yamaguchi et al., 2007). Aunado a lo anterior, la exposición a la RUV provoca en los melanocitos el incremento en la expresión del factor de transcripción de microftalmia (MITF), el principal factor implicado en la pigmentación, así como las proteínas que la regulan, incluyendo la tirosinasa, la tirosin hidroxilasa y la DOPA cromatasa tautómera (DCT). Por otro lado, en los queratinocitos expuestos a la RUV hay un incremento en la absorción y distribución de los melanosomas (Yamaguchi et al., 2007).

Los melanocitos juegan un papel clave en la respuesta de la piel a la exposición a la RUV. La alteración de estas células pueden llegar a producir el melanoma, el tipo de cáncer de piel más agresivo. El melanoma es el resultado de complejas interacciones entre factores ambientales, constitutivos y genéticos que implica la activación de oncogenes así como la represión de genes supresores de tumores (Kadarkar et al., 2003).

Vitamina D o calcitriol

La exposición de la piel a la RUV inicia la conversión fotoquímica del 7-deshidrocolesterol a la forma activa $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina D3 o calcitriol (25(OH)D), posteriormente ocurren dos hidroxilaciones más que ocurren en el hígado y el riñón para que esta vitamina pueda tener efectos sistémicos (Lehmann y Meurer, 2010). En los queratinocitos epidérmicos existen las enzimas para generar la vitamina D3 activa y otros metabolitos más. La cantidad de la vitamina D3 y la actividad de las hidroxilasas determinan el nivel cutáneo de calcitriol. El metabolito activo de la Vitamina D3 regula un gran número de genes en los queratinocitos, siendo un regulador autócrino y parácrino (Lehmann, 2009).

La piel humana irradiada con luz UV produce alrededor del 90% de la vitamina D que el cuerpo humano necesita para el correcto metabolismo del calcio (Reichrath, 2009). En un día soleado en el verano, la exposición total del cuerpo a la radiación solar produce aproximadamente 250 mg de vitamina D (10,000 UI), se ha estimado que las necesidades diarias de esta vitamina para una persona adulta es de 60 mg (2400 UI) (Reichrath, 2006).

La producción fotoquímica del calcitriol es una de las principales vías metabólicas que ocurren en la piel y es uno de los factores más importantes en el mantenimiento de la salud o el desarrollo de enfermedades cutáneas (Lehmann y Meurer, 2010). En el suero de pacientes que por razones médicas mantienen una protección estricta hacia la radiación solar como los que han sufrido trasplantes renales, con xeroderma pigmentosum, o con el síndrome de nevus de las células basales se han detectado niveles de 25 (OH) D por debajo de los valores normales (37.5-225 nmol/L) (Reichrath, 2006). La protección excesiva hacia la radiación solar puede provocar deficiencias de esta vitamina que de acuerdo con estudios epidemiológicos, esto a su vez se relaciona con otros tipos de cáncer, hipertensión, patologías óseas, autoinmunes, y cardiovasculares, así como una mayor predisposición para sufrir procesos infecciosos. Debido a que la exposición a la RUV representa el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de piel, la protección contra este tipo de radiación cada vez es más frecuente en la población, sin embargo no se toman en cuenta los efectos benéficos de la RUV, sobre todo los relacionados con la vitamina D (Reichrath, 2009).

La aplicación tópica del calcitriol y sus análogos pueden inducir enfermedades en las cuales se presenta la hiperproliferación de la capa epidérmica como en el caso de la psoriasis. Otros estudios han demostrado que la aplicación del calcitriol puede ser empleado para el tratamiento de enfermedades cutáneas relacionadas con procesos

inmunológicos, inflamatorios e infecciosos. Además de lo anterior, el calcitriol también tiene efectos fotoprotectores al disminuir la formación de los CPD en la piel irradiada (Lehmann y Meurer, 2010).

Daño a biomoléculas

Cuando la RUV incide en la piel, la energía de los fotones puede ser absorbida por varias moléculas cromóforas presentes en las células como el ADN. El cromóforo al recibir la energía de la RUV pasa a un estado excitado y puede llevar a cabo reacciones fotoquímicas que como se explicó con anterioridad generan alteraciones a la estructura del ADN por la formación de los DCP y los fotoproductos 6-4 (6-4PP) (Sutherland, 1996; Vink y Roza, 2001; (Maverakis et al., 2010).

El daño al ADN inducido por la RUV es reparado por el sistema de reparación de nucleótidos, con lo cual se disminuye el riesgo de la transformación celular. Los pacientes con xeroderma pigmentosum presentan una alta incidencia de cáncer de piel debido a que tienen un defecto genético en sistema de reparación por escisión de nucleótidos que normalmente localiza, corta y repara estos daños (Maverakis et al., 2010).

Cuando no se reparan los DCP o los 6-4PP ocurre una mutación permanente en el genoma. El tipo de mutación inducido por la RUV es característico pues ocurren en secuencias dipirimidínicas dentro del genoma, produciendo los fotoproductos ya mencionados (DCP y 6-4PP), que provocan la sustitución de bases (C a T). Si hay dos citocinas (CC) adyacentes, pueden sustituirse por timinas (TT), esta mutación es típica de la exposición a RUV, pues no ocurre con otros agentes mutagénicos (Ziegler et al., 1996). Lo anterior se ha comprobado en estudios experimentales con ratones y de estudios de epidemiología molecular en humanos (De Grujil, 1996; Maverakis et al., 2010).

Los DCP y 6-4PP tienen diferentes efectos en las células cutáneas. En los melanocitos inducen la síntesis de melanina de novo y por lo tanto provocan el bronceado. Los fotoproductos en los queratinocitos inducen el arresto del ciclo celular o incluso la apoptosis, además de inducir la liberación de citocinas inmunosupresoras (Maverakis et al., 2010).

Alteraciones celulares:

Estrés oxidativo

Los procesos oxidativos han sido implicados en diversas enfermedades de la piel, incluyendo la inflamación cutánea, la fotosensibilidad, el fotoenvejecimiento y el cáncer. Datos experimentales han mostrado que la RUV contribuye al proceso de carcinogénesis al inducir un estrés oxidativo por la formación de ERO (Halliwell, 1993; Tyrrel, 1996; Fuchs, 1998; Pinell, 2003; Adhami et al., 2008). Aunado a lo anterior, las defensas antioxidantes son cruciales en la prevención del daño causado por la RUV. La exposición prolongada a la radiación disminuye en forma drástica la capacidad antioxidante de la piel, debido a lo anterior se considera que uno de los principales efectos de la RUV, sobre todo aquella que se encuentra entre los 320 a 400 nm es la que provoca el estrés oxidativo que implica la alteración de biomoléculas (Pinnell, 2003).

La exposición de la piel a la radiación UV produce la formación del radical HO• este interactúa con las bases nitrogenadas alterando su estructura. La formación del radical hidroxilo se atribuye principalmente a la reacción de Fenton, en la cual, el H₂O₂ reacciona en presencia de Cu o Fe produciendo este radical. También se ha considerado que cuando el H₂O₂ es sometido a la RUV se puede generar directamente el HO• (Black et al., 1997). Otro mecanismo mediante el cual la RUV puede generar ERO's en la piel es la fotosensibilización. Durante este proceso, una molécula como la feomelanina, capta la energía de la RUV y la transfiere a la molécula de O₂ generando el ¹O₂ (Pattison y Davies, 2006).

Existen aproximadamente 35 modificaciones a las bases nitrogenadas del ADN en presencia de ERO, entre las que destacan la formación de 8-hidroxi-2-deoxi-guanosina que favorece el cambio de guanina a timina (G a T) y la 8-hidroguanina. Sumado a lo anterior, el rompimiento no enzimático de cadena del ADN se atribuye a la acción de radicales libres (Tyrrel, 1996; Black et al., 1997).

El daño causado al ADN por los radicales libres es considerado como iniciador en el proceso de carcinogénesis. Además, dichas mutaciones prevalecen en la célula debido a que también se alteran los mecanismos de reparación del ADN (Black et al., 1997). El estrés oxidativo también se considera promotor en el desarrollo del tumor, pues modifica la transducción de señales mediadas por las cinasa activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) provocando cambios en la expresión genética (Athar et al., 1992; Garmyn y Yarosh, 2007).

Las ERO intervienen en el daño a la membrana celular causado por la RUV (Tyrrell, 1996). La peroxidación de lípidos es un proceso continuo que comprende la degradación oxidativa de fosfolípidos, esfingolípidos, ácidos grasos insaturados y colesterol. Los productos de dicha oxidación son principalmente el malonaldehído, los lipoperóxidos y los alquenes. Estas sustancias son tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, por lo que se les considera como promotores tumorales. En los tejidos sanos se encuentran en bajas cantidades y de forma contraria se incrementan cuando existe un proceso patológico, debido a que hay un aumento en la lipoperoxidación que conlleva a la alteración de la fluidez y permeabilidad de la membrana celular (Lear et al., 1996).

Las proteínas presentes en la piel también se oxidan por las ERO producidas por la exposición a la RUV, sobre todo por la acción del 1O_2 , el cual reacciona principalmente con triptofano, histidina, tirosina, metionina y cisteína. Los productos iniciales de la oxidación de los aminoácidos aromáticos son endoperóxidos y en los residuos con grupos tioles (SH) la generación de sulfóxidos. Estos intermediarios provocan el entrecruzamiento de las proteínas (Pattison y Davies, 2006). En la dermis, la RUV puede generar el entrecruzamiento en la colagena y la elastina lo cual es considerado como uno de los mecanismos implicados en el proceso del fotoenvejecimiento (Garmyn y Yarosh, 2007).

La exposición de la piel a la RUV produce un estado de estrés oxidativo en la piel puesto que afecta los sistemas antioxidantes endógenos. Una sola exposición a la RUV provoca la disminución inmediata de la actividad de la CAT tanto en la piel de ratón como en queratinocitos en cultivo, lo anterior probablemente se deba a la fotooxidación de la enzima. A diferencia de lo anterior, la actividad de SOD disminuye ligeramente mientras que la GPx no se ve afectada (Vessey, 1993; Witt et al., 1993; Steenvoorden y Van Henegouwen, 1997). Sin embargo, se ha detectado un incremento en la actividad de la SOD en diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de piel y en diversas patologías relacionadas con la hiperproliferación epidérmica como la psoriasis, así como en la exposición crónica a la RUV (Vessey, 1993; Punnonen et al., 1995).

Transducción de señales

La activación de receptores de la superficie celular (ligando dependientes o independientes) inducen diferentes vías de transducción de señales que resultan en la activación de factores de transcripción que finalmente modulan la expresión genética en respuesta a la exposición de la piel a la RUV (Esquema 11) (Garmyn y Yarosh, 2007).

Las proteínas cinasas (PK por sus siglas en inglés) que activan diferentes blancos al fosforilarlos juegan un papel importante en la transducción de señales. Dos grupos importantes de PK están implicadas en las diferentes respuestas a la RUV: la familia de las MAPK y otro grupo de cinasas implicadas directamente en la integridad del genoma como ATR, ChK2 y PK-ADN (Garmyn y Yarosh, 2007).

La familia de las MAPK cinasas actúan en la activación celular en respuesta a diferentes tipos de estrés, como la RUV. Las MAPK cinasas incluyen las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), las cinasas N-terminal de c-Jun (JNKs), y las MAPK de p38. Todas las MAPK cinasas se activan por la fosforilación de residuos de treonina y tirosina por una o más cinasas (MAPKKs) que a su vez fueron activadas por otras cinasas (MAPKKKs). El mecanismo de activación de estas enzimas inducido por la RUV ocurre principalmente por la unión de factores de crecimiento y citocinas con sus receptores o por una vía independiente del ligando donde puede estar implicado el estrés oxidativo. JNKs y p38 son activadas por la RUV, mientras que ERK es típicamente activada por factores de crecimiento (Garmyn y Yarosh, 2007).

El segundo grupo de proteínas cinasas (ATR, ChK2 y PK-ADN) está implicado en la revisión de la integridad del genoma con una cascada molecular que detecta y responde a diferentes daños en el ADN. ATR es el principal sensor del daño al ADN y es esencial para la fosforilación de proteínas implicadas en el control del ciclo celular (G1/S). Además ATR participa en la activación de p53 (Garmyn y Yarosh, 2007).

Factores de transcripción

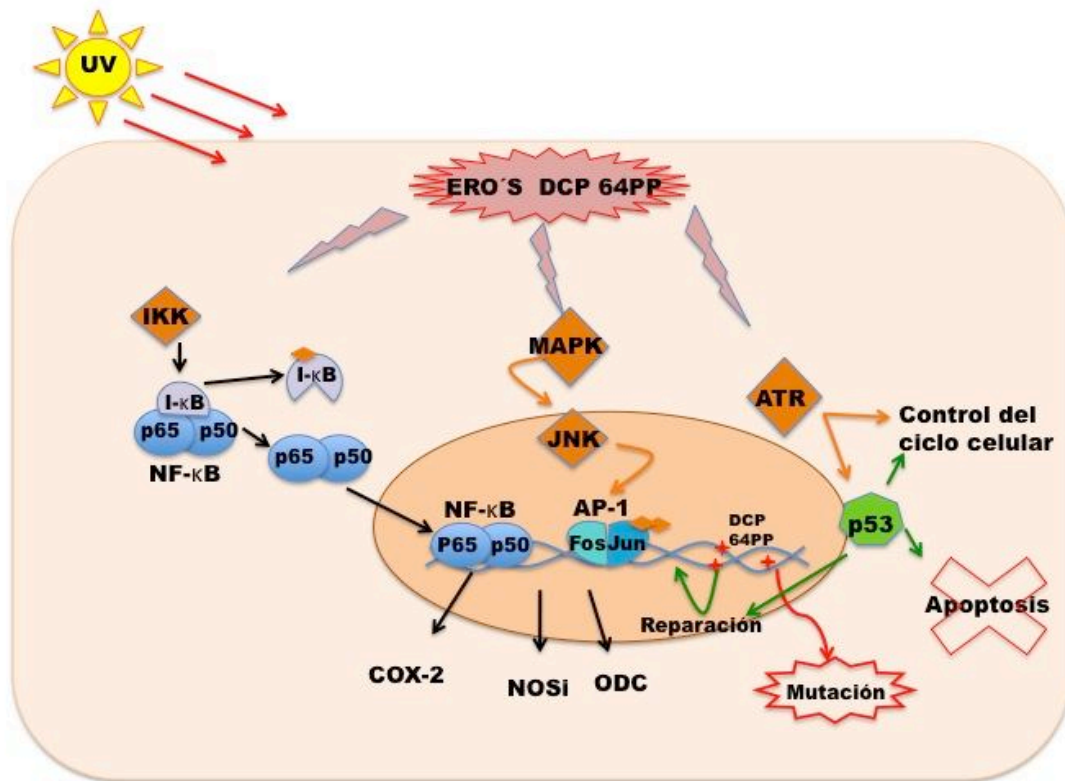
Tres factores de transcripción están involucrados en las respuestas celulares a la exposición de la RUV: p53, la proteína activadora (AP-1) y el factor nuclear kappa (NFκB) (Esquema 11).

El gen p53 es considerado como supresor de tumores porque participa en la activación de los sistemas de reparación del ADN como la reparación por escisión de nucleótidos; el control del ciclo celular y en la inducción de la apoptosis. La activación de p53 ocurre en diferentes tipos de estrés celular que incluyen el daño al ADN (Afaq et al., 2005a). El proceso de activación implica dos eventos: a) el incremento en la vida media de la proteína P53 lo que provoca su acumulación en la célula y b) un cambio conformacional inducido por la fosforilación en el dominio N-terminal, provocando que p53 actúe como factor de transcripción (Garmyn y Yarosh, 2007).

NF- κ B es un factor de transcripción ubicuo perteneciente a la familia Rel que regula a diversos genes implicados en la inflamación, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la oncogénesis. Este factor de transcripción es un heterodímero formado por las proteínas p65 y p50. La activación de NF- κ B está regulada a través de la interacción con su inhibidor I κ B que lo secuestra en el citoplasma. NF- κ B puede ser activado por un amplio rango de estímulos, incluyendo la RUV, los cuales estimulan directa o indirectamente la fosforilación de I κ B por la I κ B cinasa (IKK), lo que incrementa la susceptibilidad del inhibidor para su degradación dependiente de la ubiquitinación. La degradación de I κ B permite la translocación de NF- κ B al núcleo y la activación de los genes blanco de este factor (Afaq et al., 2005a; Garmyn y Yarosh, 2007). Las vías de activación de NF- κ B en los queratinocitos son complejas y se han sugerido diversos mecanismos moleculares como la activación por el estado redox de la célula, la activación independiente de IKK, por la vía de la NADPH oxidasa, por COX y por el factor de necrosis tumoral (α -TNF por sus siglas en inglés). Además, la activación de NF- κ B puede ser independiente del daño al ADN inducido por la RUV (Garmyn y Yarosh, 2007).

AP-1 es un dímero compuesto por dos proteínas de las familias Fos y Jun. Cambios en la expresión o en las modificaciones post-traduccionales de las proteínas que forman AP-1 ocurren en respuesta a una variedad de factores como la RUV y modifican la actividad del factor de transcripción (Garmyn y Yarosh, 2007). La activación de este factor de transcripción está regulado por el estado redox celular (Afaq et al., 2005a).

La activación de AP-1 y NF- κ B por la RUV, de forma coordinada o independiente, regula la expresión de diversos genes cuyas proteínas se consideran marcadores moleculares de diversos procesos como la inflamación, la inmunosupresión y la transformación tumoral como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la óxido nítrico sintetasa (NOS) y la ornitina descarboxilasa (ODC) (Afaq et al., 2005a) AP-1 también está implicado en el fotoenvejecimiento al regular la expresión de varias metaloproteasas que contribuyen a la degradación de las fibras de la matriz extracelular de la dermis (Garmyn y Yarosh, 2007).



Esquema 11. Algunos blancos moleculares implicados en la alteración de las funciones celulares inducidas por la RUV.

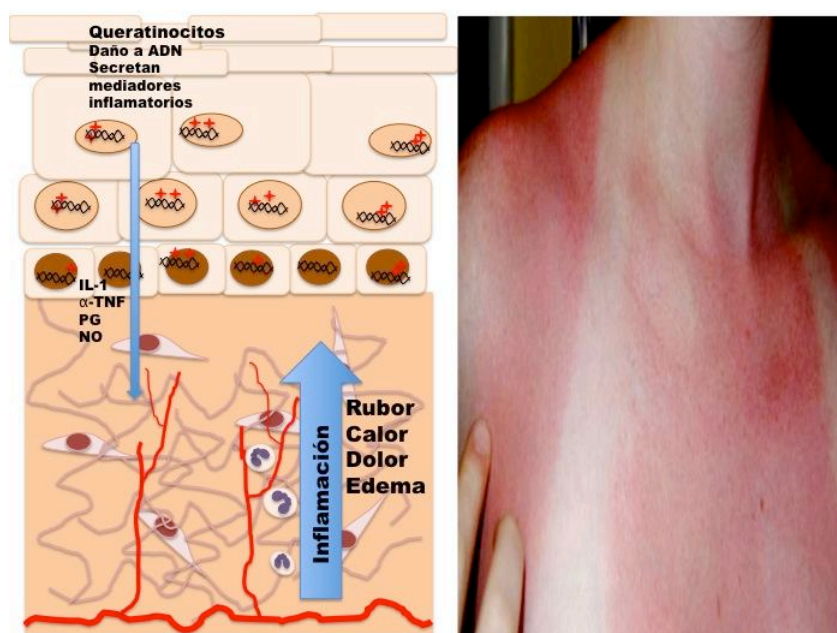
Quemadura solar o eritema

La quemadura solar o eritema es la respuesta inflamatoria aguda de la piel que ocurre después de la exposición a la RUV, y prevalece varios días después. Ésta quizá sea la respuesta más conocida a la radiación UV-B (Vink y Roza, 2001; Matsumura y Ananthaswamy, 2004). La quemadura solar está asociada con los signos clásicos de la inflamación que son el rubor o enrojecimiento, el calor, el dolor y la tumefacción o edema. Debido a que se detecta con facilidad y puede monitorearse a lo largo del tiempo, esta reacción ha sido empleada como marcador de daño por RUV. Generalmente el grado de eritema está determinado por la energía total administrada que puede aumentar por el tiempo de exposición o la intensidad de la radiación (McGregor y Hawk, 2001). El eritema se hace visible entre las 3 a 6 h posteriores a la irradiación, alcanzando un pico máximo entre las 12 y las 24 h. Esta respuesta tisular suele mantenerse por un periodo de 48 h y

posteriormente se desvanece. Se ha determinado que la vasodilatación, que subyace durante el proceso de la quemadura solar, comienza aproximadamente a los 30 minutos post-irradiación, mucho antes de la aparición del eritema (Rhodes y Lim, 2007).

Todo tipo de piel puede sufrir eritema, sin embargo, tanto el grado de pigmentación como el grosor de la piel determinan la susceptibilidad de la misma a la radiación solar. Probablemente la formación del eritema es iniciado por los queratinocitos irradiados, pues éstos liberan citocinas (α -TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12) y otros mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (PG), el óxido nítrico (NO) y la histamina que están relacionados con la dilatación de los vasos sanguíneos en la dermis, la inducción de moléculas de adhesión endoteliales, así como la quimiotaxis de células inflamatorias como se observa en el esquema 12 (Vink y Roza, 2001; Rhodes y Lim, 2007).

La dosis de radiación UV-B que induce el eritema es suficiente para alterar la estructura del ADN por la formación de DCP y 6-4PP. Aproximadamente se forman 10^5 DCP por cada célula epidermal cuando se produce un eritema en la piel. Lo anterior causa un grave daño al genoma de las células, que a la larga pueden producir cáncer de piel (Sutherland, 1996; Vink y Roza, 2001).



Esquema 12. Mecanismos implicados en la quemadura solar.

Cambios histológicos agudos

Los cambios histológicos que ocurren en la piel expuesta a la RUV se pueden identificar desde los 30 minutos posteriores a la irradiación. Las alteraciones tisulares pueden presentarse tanto en la epidermis como en la dermis.

Los daños inducidos en las bases nitrogenadas del ADN actúan como inductores de la proliferación celular lo que conlleva al engrosamiento del estrato córneo o hiperqueratosis. Una característica distintiva de este estrato es el nivel de diferenciación celular que implica la desaparición del núcleo en los corneocitos normales. Sin embargo, si el proceso de diferenciación y maduración se ve alterado o es incompleto se puede detectar la retención de núcleos picnóticos, a este fenómeno se le denomina paraqueratosis. Algunos autores sugieren que éste es un mecanismo de fotoprotección, ya que de esta manera disminuye la cantidad de radiación que se puede absorber en la piel en futuras exposiciones (Fitzpatrick y Bernhard, 2005; Ahsan et al., 2007).

En condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio entre proliferación, diferenciación de los queratinocitos y la descamación de los corneocitos. El aumento en la proliferación o hiperplasia producido por la exposición a la RUV conduce al ensanchamiento de la epidermis debido al aumento de la población queratinocitos (Dhanalakshmi et al., 2004). El crecimiento de la epidermis y la elongación de las papilas dérmicas hace que estas últimas se extiendan hacia el epitelio dando una apariencia estrellada, que se denomina acantosis (Fitzpatrick y Bernhard, 2005).

En la parte suprabasal de la epidermis expuesta a la RUV se puede detectar la presencia de células de quemadura desde los 30 minutos post-exposición. Estas células son queratinocitos en proceso de apoptosis que se distinguen por presentar citoplasma hialino eosinofílico con núcleo picnótico, generalmente se presentan en grupos dentro de la epidermis adyacentes a células con apariencia normal (Laethem et al., 2005). La muerte celular programada de los queratinocitos expuestos a la RUV es un mecanismo de defensa contra el desarrollo del cáncer de piel. Lo anterior se ha demostrado en animales transgénicos que generan pocas células de quemadura, sin embargo tienen una alta predisposición al desarrollo de cáncer de piel (Maverakis et al., 2010).

La espongiosis es el resultado de la pérdida secundaria de la cohesión intercelular debido al flujo de líquido tisular o edema en la epidermis. A medida que el edema intercelular aumenta, los desmosomas se rompen y los queratinocitos se lisan, de tal manera que se forman microcavidades que pueden dar origen a una ampolla (Fitzpatrick y Bernhard, 2005; Campos et al., 2006; Ahsan et al., 2007).

Otro de los rasgos característicos que se pueden observar después de la irradiación con RUV es la disminución rápida de las células de Langerhans. La RUV altera la morfología y los marcadores inmunohistoquímicos como el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II por sus siglas en inglés). El cambio en la morfología celular dificulta su

identificación. También se conoce que se disminuye la capacidad de estas células para presentar antígenos favoreciendo la inmunosupresión (Pathak et al., 2001, Ichihashi et al., 2003).

Los cambios dérmicos posteriores a la irradiación con UV incluyen la congestión de los vasos sanguíneos superficiales y profundos, puede haber extravasación de eritrocitos. También se presenta un infiltrado perivascular, principalmente de monocitos, polimorfonucleares y neutrófilos. La RUV genera radicales libres que pueden dañar directamente las fibras de elastina y colágena de la matriz extracelular (Pathak et al., 2001; Campos et al., 2006; Ahsan et al., 2007).

Alteraciones del sistema inmune

La RUV puede activar o inactivar los componentes del sistema inmune cutáneos e inducir diferentes respuestas inmunológicas. Por ejemplo, los queratinocitos expuestos a la RUV secretan mediadores inflamatorios como las citocinas y quimiocinas, provocando la redistribución y liberación de autoantígenos presentes en células dañadas por la RUV. También pueden alterar las proteínas endógenas haciéndolas más inmunogénicas, incrementar la inmunogenicidad de moléculas externas y finalmente alterar químicamente medicamentos que se administran por la piel generando una respuesta inmune hacia ellos de forma exacerbada (Maverakis et al., 2010).

Los queratinocitos presentes en la epidermis que tienen DCP secretan citocinas, las cuales crean un microambiente inmunosupresor que altera la respuesta inmune local y sistémica (Vink y Roza, 2001). Localmente, en el sitio expuesto a la RUV, se debilita la inducción de la reacción de hipersensibilidad por contacto, al promover la tolerancia de haptenos específicos. De forma sistémica se ha observado la hipersensibilidad hacia una gran variedad de antígenos. También se induce activamente la respuesta inmune no específica. Por otro lado, se considera que la inmunosupresión puede exacerbar infecciones causadas por microorganismos (Cooper; 1996; Black et al., 1997; Ichihashi et al., 2003).

Los queratinocitos producen el ácido *trans* urocánico, el cual es un derivado de las proteínas ricas en histidina presentes en los gránulos queratohialinos. Este compuesto participa en la diferenciación del estrato córneo y contribuye a la homeostasis de las capas superiores de la piel al mantener el pH adecuado (Krien y Kermici, 2000). Este ácido sufre isomerización por efecto de la RUV produciendo el ácido *cis* urocánico, el cual es un inmunosupresor que altera el funcionamiento de las células de Langerhans que

actúan como presentadoras de antígenos (CPA), posiblemente mediante la secreción de la IL-10 (Granstein, 1996; Black et al., 1997).

En la piel irradiada se ha observado una disminución en el número de CPA. En la epidermis, las células de Langerhans muestran alteraciones morfológicas y daño en el ADN. Además, sufren cambios en el nivel de expresión de varias moléculas de superficie como: el complejo de histocompatibilidad tipo II (Cooper, 1996; Black et al., 1997; Ichihashi et al., 2003; Matsumura y Ananthaswamy, 2004; Rhodes y Lim, 2007), moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y de la molécula de adhesión ICAM-I. Lo anterior suprime la actividad de las CPA y por lo tanto no se inicia la respuesta inmune de forma adecuada (Black et al., 1997).

La inmunosupresión provocada por la RUV se considera un factor de riesgo en la inducción del cáncer de piel. En condiciones normales, las células transformadas por RUV son inmunogénicas por lo que son eliminadas por la respuesta inmune anti-tumoral, pero cuando el organismo se encuentra inmunosuprimido no se eliminan las células dañadas favoreciendo de esta manera el desarrollo del carcinoma (Krutmann et al., 1996; Black et al., 1997; Finlay-Jones y Hart; 1998).

3.2.3.2 Efectos crónicos de la exposición a la RUV en la piel

Fotoenvejecimiento

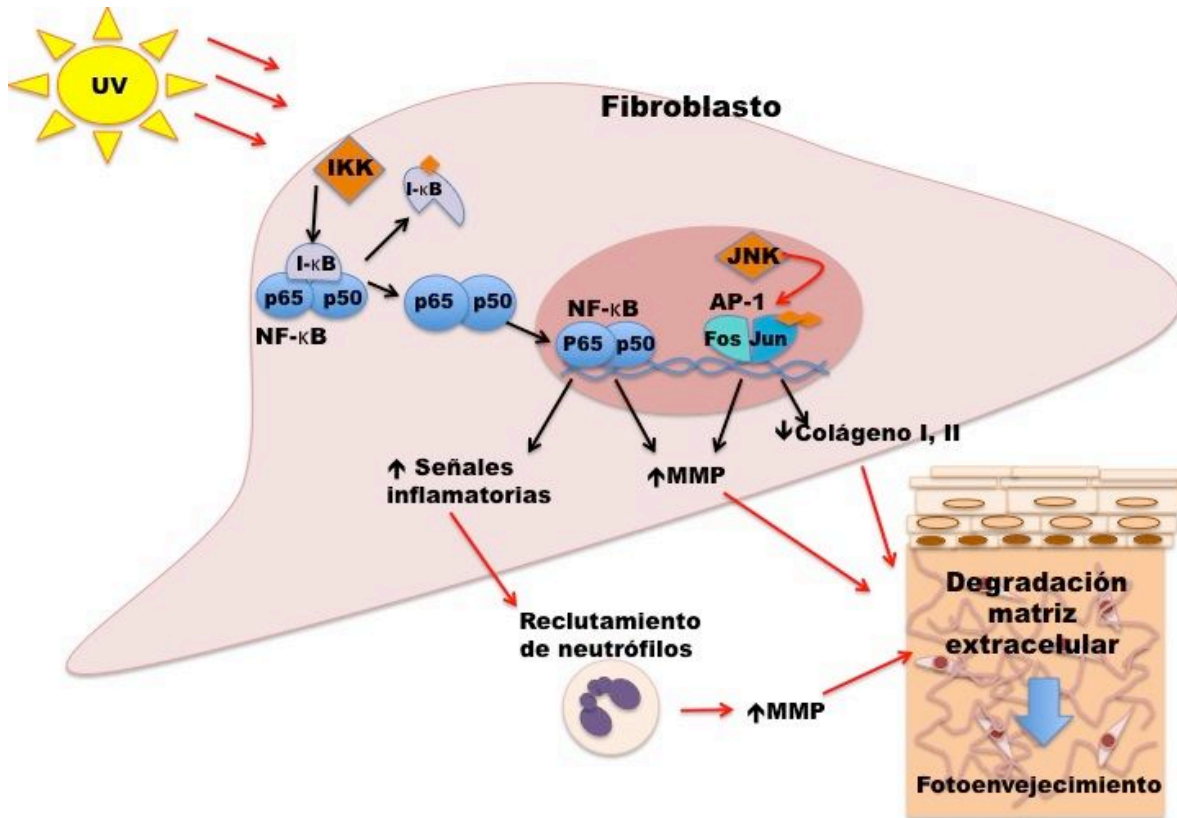
El envejecimiento es un proceso que se define como la disminución máxima de la función y de la capacidad de reserva de todos los órganos del cuerpo produciendo un aumento en la susceptibilidad y severidad de las enfermedades que culminan en la muerte. Con la edad cambia la composición química de los tejidos, se reduce progresivamente la capacidad fisiológica y disminuye la capacidad adaptativa de responder a estímulos ambientales. El envejecimiento es el producto de un programa genético y de la acumulación de efectos fisiológicos provocados por diversos factores ambientales (Baumann, 2002; Chung et al., 2004). Lo anterior también se ha denominado factores intrínsecos y extrínsecos del envejecimiento (Villaverde, 2004).

En la piel es inevitable el envejecimiento, un proceso degenerativo que afecta la función y la apariencia de este órgano, debido principalmente al paso del tiempo así como al efecto traslapado de los factores ambientales como la exposición al sol, el aire, la contaminación y el humo del cigarro. Quizás uno de los factores ambientales más estudiados es el efecto de la radiación UV que provoca un envejecimiento prematuro o fotoenvejecimiento (Chung et al., 2004; Yaar, 2007).

La RUV provoca daño directo al ADN, proteínas y lípidos lo cual afecta directamente la estructura y la función de la piel. La piel fotoenvejecida se presenta en las zonas del cuerpo que han estado constantemente expuestas al sol como la cara y la parte posterior del cuello. El rango y grado de fotoenvejecimiento está determinado por factores genéticos como la inducción del bronceado y la capacidad para reparar las alteraciones al ADN inducidas por la RUV. Generalmente, las personas de piel clara son más susceptibles al fotoenvejecimiento, pero esto no implica que las de tez oscura no lo padezcan (Yaar, 2007).

En la piel humana, a dosis sub-eritematogénicas, se ha detectado un incremento en la actividad del factor de transcripción AP-1 provocando la disminución de la transcripción del receptor para el factor de crecimiento transformante β (β -TGF por sus siglas en inglés), una citocina implicada en la inducción de la síntesis de colágena. A su vez, la disminución del receptor para β -TGF provoca la alteración de la síntesis de colágena tipo I y III en la dermis. Aunado a lo anterior, AP-1 también incrementa la cantidad y la actividad de las metaloproteasas (MMP), enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular en la dermis, especialmente la colagenasa (MMP-1), la estromelisin (MMP-3) y la gelatinasa (MMP-9). Aunado a lo anterior, la exposición de la piel a la RUV también promueve que NF- κ B incremente la actividad de MMP-1 y MMP9, además induce la transcripción de genes involucrados en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- α , IL-6, e IL-8, así como moléculas de adhesión que reclutan a células inflamatorias como los neutrófilos que secretan la colagenasa de neutrófilos o MMP-8 que específicamente degrada a la colágena tipo I (Esquema 13) (Chung et al., 2004; Yaar, 2007).

La degradación de la colágena inducida por la RUV es generalmente incompleta, generando la acumulación de fragmentos de esta proteína parcialmente degradada en la dermis, lo que reduce la integridad estructural de la piel. Aunado a lo anterior, estos fragmentos inhiben la síntesis de nuevas fibras de colágena. Los niveles altos de MMP así como la disminución de la síntesis de fibras de la matriz extracelular están reportados también para el envejecimiento intrínseco, lo que sugiere un mecanismo similar para ambos fenómenos (Yaar, 2007).



Esquema 13. Mecanismos moleculares implicados en el fotoenvejecimiento.

Modificado de Chung et al., 2004.

El paso de los años conduce a una serie de cambios progresivos e irreversibles en la piel que afectan a sus principales componentes: el estrato córneo, la epidermis, la dermis y los anexos cutáneos, que produce la alteración de las funciones de este órgano, lo que contribuye al desarrollo de lesiones benignas y malignas. La piel senil es de aspecto fino o delgado, transparente de color céreo o amarillento, descamativa y seca (Villaverde, 2004). Histológicamente en la piel envejecida se observa atrofia de la epidermis con aplanamiento de la unión dermoepidérmica. La forma y tamaño de los queratinocitos se altera, hay una disminución de los melanocitos y atipias nucleares focales. En la dermis se observa menor densidad celular y una disminución de la vascularización y del número de glándulas (Villaverde, 2004).

En la dermis ocurre una disminución en la densidad y espesor debido a la disminución de los vasos sanguíneos y al número de células que provocan palidez cutánea y problemas en la termorregulación. Los componentes de la matriz extracelular disminuyen lo que

altera las propiedades de limpieza y eliminación de sustancias lo que puede incrementar las dermatitis por contacto (Villaverde, 2004).

Los anexos epidérmicos también sufren alteraciones con el paso del tiempo como son: alteraciones en las glándulas sebáceas, disminución del número de receptores corpúsculares, hiperplasia sebácea, encanecimiento y pérdida del cabello, hipertrichosis supralabial y mentoniana así como cambios ungueales (Villaverde, 2004).

Fotocarcinogénesis: Carcinomas no melanómicos

La fotocarcinogénesis es la suma de una serie de eventos bioquímicos simultáneos y secuenciales que tienen como resultado final el desarrollo de cáncer de piel, el cual se induce por efecto de la RUV. El desarrollo del cáncer de piel depende de la dosis de radiación, el tiempo de exposición y longitud de onda de la RUV a la que se expone un organismo (Black et al., 1997).

Las evidencias que relacionan a la radiación solar con la carcinogénesis cutánea incluyen: a) la presencia de los tumores frecuentemente en las partes del cuerpo expuestas al sol como la cara y el cuello; b) la incidencia de los tumores muestra una correlación con la persistencia del daño al ADN en personas expuestas al sol constantemente como marineros y campesinos; c) existe un alto riesgo de padecer cáncer de piel en pacientes con alteraciones en los sistemas de reparación al ADN, de igual forma en aquellas personas con enfermedades genéticas que tienen una alta sensibilidad a la radiación solar; y d) la RUV induce tumores en modelos animales como los ratones y los peces (Vink y Roza, 2001).

El cáncer es en términos generales, el resultado del crecimiento desmedido de las células tumorales que han perdido los mecanismos moleculares implicados en el crecimiento y la diferenciación debido a diversas mutaciones genéticas (Vink y Roza, 2001). La RUV se considera un carcinógeno completo porque induce y promueve el cáncer de piel. Actúa como un iniciador al provocar y fijar mutaciones en el genoma de la célula. Posteriormente actúa como promotor al activar varios sistemas de trasducción de señales en la membrana celular que estimulan la proliferación de las células transformadas que van a desarrollar el carcinoma (Ziegler et al., 1996). La promoción de las células iniciadas a un estado preneoplásico dura aproximadamente 10 años. Finalmente la progresión del carcinoma *in situ* ocurre en un año (Stratton et al., 2000).

La fotocarcinogénesis involucra la formación de los dímeros cíclicos de pirimidinas (DCP), la alteración del ciclo celular y la supresión de la respuesta inmune, lo que a largo plazo provoca el desarrollo del cáncer de piel (Ichihashi et al., 2003).

Existen evidencias experimentales y epidemiológicas que han demostrado la relación directa de la exposición de la luz UV-B con el cáncer de células escamosas (CCE) y el cáncer de células basales (CCB). La incidencia de CCE es proporcional a la exposición acumulada de la RUV, sin embargo en el caso del CCB se reconoce la misma etiología, aunque este cáncer puede deberse a la acción de otros carcinógenos (De Grujil, 1996). La incidencia del cáncer de piel ha aumentado tan rápido en las últimas décadas que se le ha considerado como la epidemia silenciosa del siglo XX (Mukhtar y Elmets, 1996; Yarosh, 1996).

El cáncer de piel es uno de los padecimientos que más prevalecen en la humanidad. En México, de acuerdo con el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas publicado por la Secretaria de Salud, el cáncer de piel se encuentra entre las 5 neoplasias malignas de mayor incidencia en mujeres en edad productiva (entre los 15 y 65 años de edad) y en hombres se sitúa entre el segundo (15-45 años) y el primer lugar (45-65 años) de incidencia de acuerdo a la edad (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm>). Si bien es cierto que en muchos de los casos estas neoplasias no son letales si hay una detección temprana, si implican un gasto económico importante para el sistema de salud además de generar deformación en las partes afectadas.

No se conocen aún todas las alteraciones moleculares que ocurren durante la fotocarcinogénesis, sin embargo, existen evidencias que muestran que las mutaciones puntuales, amplificaciones y pérdida de la heterocigocidad en el gen supresor de tumor p53 y en el oncogén ras, contribuyen al cáncer de piel, tanto en humanos como en ratones (Ananthaswamy y Kanjilal, 1996; De Grujil, 1996). En las células de CCE se ha reportado la presencia de mutaciones en el gen p53 en el 90% de los casos, mientras que para el CCB la frecuencia es el 50% (Zeigler et al., 1996; Garmyn y Yarosh, 2007).

Fotocarcinogénesis: Melanoma

Los melanocitos juegan un papel clave en la protección de la piel a la RUV, sin embargo el hecho de que este tipo celular tiene una baja capacidad de renovación o división puede ser un punto crítico el mantenimiento de su integridad genómica así como su sobrevivencia pues se puede generar la transformación al melanoma maligno. La transformación de los melanocitos implica la activación de oncogenes así como la

represión de genes supresores de tumores (Kadekaro et al., 2003). Diversos estudios concuerdan que la RUV-A es el principal componente de la radiación solar implicado en la etiología del melanoma (Baldea et al., 2009).

El proceso de iniciación en el melanoma no es claro, especialmente en lo concerniente al papel genotóxico de la RUV en los melanocitos, en donde la melanina actúa como un papel ambivalente al actuar como un agente fotoprotector y a la vez como fotosensibilizador (Baldea et al., 2009).

La sensibilidad a la RUV está directamente relacionada con el color de piel. La gente con una coloración oscura de la piel tienen menor riesgo a padecer cáncer de piel, incluido el melanoma. De forma contraria, las personas de piel clara son las que tienen mayor predisposición para este tipo de padecimientos. Las diferencias pueden explicarse en terminos de la transmisión de la RUV a través de la epidermis, debido a el color de piel se relaciona con el contenido de melanina, el número, tamaño, tipo, distribución y degradación de los melanosomas, así como la actividad de la tirosinasa (Baldea et al., 2009).

En los melanocitos, la melanina y sus precursores forman un complejo sistema redox el cual es modificado de acuerdo al pH, la temperatura, así como a la exposición a la luz visible y ultravioleta. Existen reportes controversiales sobre el papel de la melanina y sus precursores en la modulación de los efectos biológicos de la RUV en la piel. La melanina puede ser el principal antioxidante en los melanocitos. Este tipo celular es extremadamente sensible a la acción de las ERO y se ha propuesto que estas especies participan tanto en los procesos fisiológicos normales de los melanocitos como en los patológicos. En cultivos de melanocitos *in vitro*, la melanogénesis inducida por la RUV o por niveles altos de tirosina provocan una disminución de los antioxidantes enzimáticos. Los diferentes patrones en el nivel de sistemas antioxidantes en los melanocitos, como el contenido de CAT y SOD puede estar relacionado con la coloración de la piel y la susceptibilidad a la radiación UV (Baldea et al., 2009).





En la transformación de los melanocitos también puede estar implicado un cambio en el estado redox de la melanina, pasando de un papel antioxidante al de un prooxidante. Las células de los melanomas poseen un anormal nivel de sistemas antioxidantes como la vitamina E, ácidos grasos poliinsaturados y CAT. Además, en los nevos displásticos, precursores del melanoma se ha observado que las células sufren un estrés oxidativo crónico provocado por un incremento en la síntesis de feomelanina, incluso sin la exposición a la RUV (Baldea et al., 2009).

3.3 Fotoprotección

La exposición a la RUV tiene diversos efectos nocivos en la piel por lo que el hombre ha buscado protegerse de la radiación solar (Pathak, 1992). Las medidas que se recomiendan para prevenir la sobre exposición de RUV incluyen: evitar exponerse a la radiación solar al medio día, usar ropa que proteja cuello, brazos y piernas así como sombreros y lentes contra el sol, el uso de bloqueadores y filtros solares con un factor de protección solar (FPS) de 15 o mayor; enseñar a los niños a protegerse del sol, evitar broncearse deliberadamente en las cámaras de bronceado y examinar la piel regularmente para detectar la presencia temprana de carcinomas (Agarwal y Mukhtar, 1996; Schaefer et al., 2000).

En general, cualquier cambio inusual en la piel, especialmente un crecimiento nuevo o inflamado que no revierte puede ser una señal de alerta de cáncer en la piel y debe ser revisado a tiempo por un médico. Al examinar la piel para detectar cualquier cambio, la Fundación Mexicana para la Dermatología indica que las señales de alerta ABCD son (<http://www.fmd.org.mx/index.php>):

Cuadro 2. Aspectos a considerar para la detección temprana del cáncer de piel.

Señal	Característica	
Asimetría	Si existe un lunar que dividido en dos o más partes, y alguna de ellas no es igual a la otra.	
Borde	Significa que la terminación del lunar es de forma irregular, presentando a veces escotaduras, es decir que las esquinas están cortadas, despuntadas o borrosas.	
Color	Es frecuente el indicio de cáncer cuando el color característico del lunar (café o negro) se intensifica o empieza a cambiar y/o presentarse áreas azuladas o rojizas.	
Diámetro	Cuando el lunar o la lesión mide más de 6 mm, tomando como referencia mayor al tamaño de la goma de un lápiz puede ser un dato más de alarma.	

3.3.1 Filtros solares

Los filtros solares son sustancias químicas que absorben la luz UV eficientemente, se aplican tópicamente y que protegen de los efectos adversos de la luz solar, principalmente el eritema. La mayoría de las formulaciones comerciales contienen varios componentes activos, lo que les permite tener un FPS amplio que abarque de los 280 a los 400 nm (UVB y UVA) (Pathak, 1992).

Para establecer el FPS de un filtro solar, primero se determina la dosis mínima de radiación que produce eritema en la piel sin ninguna protección (DME). Posteriormente la DME se compara con la cantidad de radiación necesaria para formar eritema en piel protegida con 2 mg/cm² del filtro solar (Elmets y Young, 1996). De tal manera que la piel tratada con un filtro solar con un FPS de 15 requerirá 15 veces más radiación para desarrollar eritema.

La mayoría de los filtros solares contienen varios componentes activos, lo que les permite tener un FPS de 15 o mayor. La aplicación de filtros solares antes de la exposición a la radiación UV-B previene la formación del eritema, de la formación de aductos de ADN y por consecuencia previene el cáncer de piel (Finlay-Jones y Hart, 1998; Kerr, 1998; Vink y Roza, 2001). Sin embargo, también pueden inducir efectos adversos como irritación, alergias, reacciones fototóxicas, o pueden afectar la síntesis de vitamina D, algunos causan daño al ADN por fotosensibilización y generan radicales libres y (Pinnell, 2003; Kullavanijaya y Lim, 2005).

3.3.2 Los productos naturales en la fotoquimioprevención

Actualmente, existe un gran interés en el estudio de sustancias naturales o sintéticas que prevengan, retarden o reviertan las alteraciones producidas por la RUV en las células y que puedan ser empleadas de manera tópica o por vía oral en la fotoquimioprevención. Dentro de este amplio concepto podemos encontrar a diversos compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antimutagénicas (Agarwal y Mukhtar, 1996; Afaq et al., 2003; Afaq et al., 2005a).

La combinación de filtros solares con sustancias de origen vegetal que tengan propiedades antioxidantes se propone actualmente para lograr un mejor efecto fotoprotector. La administración oral de antioxidantes implica la protección general de toda la piel, sin embargo esta se ve restringida por la cantidad que llega a este órgano debido a la biodisponibilidad de los compuestos. Por otro lado, la aplicación tópica implica un efecto directo en la piel, pero éste se ve limitado debido a la penetración de los metabolitos a

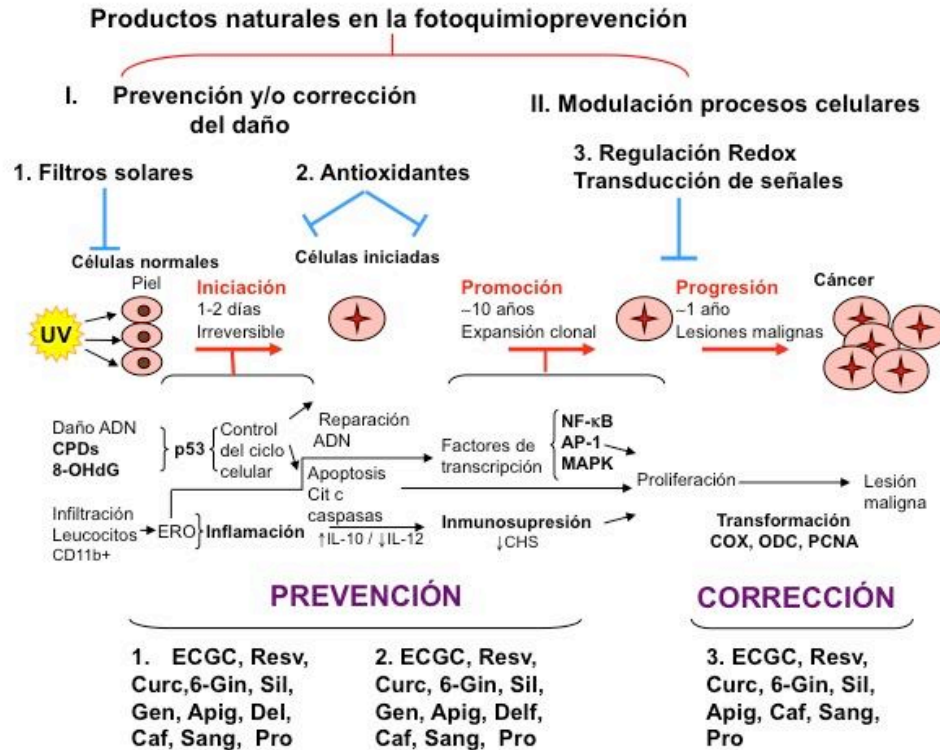
través del estrato córneo (Pinnell, 2003; Kullavanijaka y Lim, 2005). Se ha determinado que el consumo de frutas y verduras disminuyen el riesgo de presentar diversos tipos de cáncer, lo anterior se ha asociado a la presencia de vitaminas y polifenoles con propiedades antioxidantes en las plantas (Ahmad y Mukhtar, 1999).

En años recientes, estudios epidemiológicos y experimentales se han enfocado en diversos productos naturales que brindan protección contra el desarrollo de carcinomas y otros padecimientos cutáneos, ya que pueden alterar o corregir diversas funciones celulares no deseadas teniendo un efecto fotoprotector. Estas sustancias incluyen polifenoles, flavonoides, isoflavonas, fenoles, antocianidinas y carotenos principalmente. El uso de productos naturales con propiedades fotoquimiopreventivas puede tener grandes implicaciones en la reducción del riesgo del cáncer en combinación con modificaciones en el estilo de vida, dieta y productos para el cuidado de la piel (Afaq et al., 2005a).

Existen diversas investigaciones donde se evalúa la protección que brindan sustancias de origen natural a células, tejidos, animales, o a humanos expuestos a la RUV. En general podemos decir que un agente fotoquimiopreventivo puede actuar en dos niveles: a) la prevención o en la corrección de los daños causados por la RUV y b) la modulación de las diferentes respuestas celulares a la RUV (Afaq et al., 2005a).

En lo referente al aspecto preventivo se consideran dos líneas de defensa. La primera involucra las sustancias capaces de absorber la RUV y actuar como filtros. De esta forma se evita que la radiación sea absorbida por el ADN y se formen los aductos de las bases nitrogenadas, también se previene la inmunosupresión producida por el ácido *cis* urocánico. La segunda línea de defensa son los antioxidantes que evitan el estrés oxidativo y el daño a biomoléculas (Afaq et al., 2005a).

Para analizar el segundo nivel de acción de un agente fotoquimiopreventivo se debe considerar que la exposición a la RUV inicia una cascada de eventos que modifican la expresión genética, que implica la transducción de señales que conllevan la inflamación, la apoptosis, la inmunosupresión, la transformación y proliferación celular. Los agentes quimiopreventivos pueden actuar en blancos moleculares como la activación de los factores de transcripción NF- κ B, AP1, y varias cinasas regulando así diversos procesos celulares como la proliferación celular (Esquema 14) (Afaq et al., 2005a).

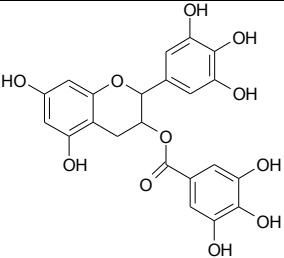
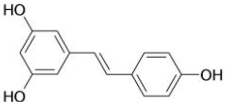
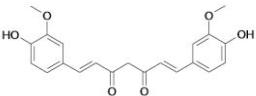
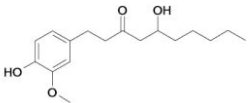


Esquema 14. Mecanismos moleculares donde intervienen algunos compuestos de origen vegetal en la fotoquimiopreención. Apig apigenina; Caf ácido caféico; Curc curcumina; Delf delphinidina; ECGC epigallocatequingalato; 6-Gin 6-gingerol; Gen genisteina; Pro proantocianidinas; Sang sanguinarina; Sil silimarina; Resv resveratrol.

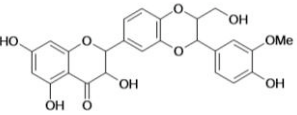
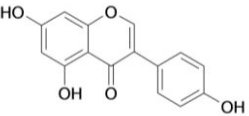
Existen diversos estudios en los que se ha evaluado un amplio rango de compuestos con actividad antioxidante, los cuales pueden prevenir diversos efectos nocivos de la RUV que incluyen desde aspectos moleculares hasta la fotocarcinogénesis en modelos murinos como puede observarse en el cuadro 3 donde se presentan los efectos biológicos de varias sustancias de origen vegetal en relación con su potencial como agentes fotoquimiopreventivos. Los polifenoles presentes en el té verde (PTV) (*Camellia sinensis*) quizás sean los compuestos más estudiados en este aspecto. Estos se han propuesto como agentes quimioprotectores debido a que estudios epidemiológicos han mostrado que el alto consumo de esta bebida disminuye el riesgo de cáncer de piel. El té contiene diversos polifenoles derivados de la catequina que tienen actividad antioxidante, antimutagénica y antitumoral (Ichihashi et al., 2003; Pinnell, 2003; Afaq et al., 2005a). Se ha determinado que tanto la administración tópica como la oral de los PTV disminuyen la incidencia, multiplicidad y volumen de tumores inducidos por la RUV y por agentes

químicos. La aplicación tópica disminuye el número de CPD inducidos por UV, reducen el eritema, y la inmunosupresión mediada por la IL-10 (Pinnell, 2003; Katiyar et al., 2007). Algunos estudios sugieren que la aplicación tópica de los PTV en ratones es más eficiente que la administración oral para prevenir los daños causados por la RUV y al parecer la aplicación crónica no tiene efectos tóxicos aparentes (Katiyar et al., 2007) También se ha reportado que los PTV regulan la progresión del ciclo celular e inducen la apoptosis dependiente de p53 (Ichihashi et al., 2003).

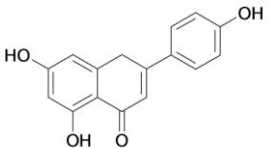
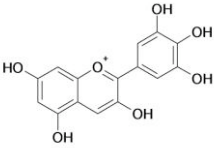
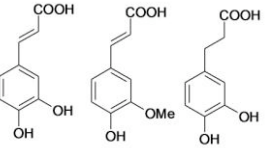
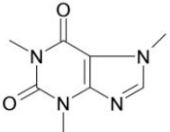
Cuadro 3. Mecanismos moleculares de algunos compuestos de origen vegetal en la fotoquimiopreención.

Compuesto ó fuente	Estructura	Modelo	Blanco/ Mecanismo	Referencia
PTV Té verde <i>Camellia sinensis</i>		Balb/c <i>In vitro</i> C3H/HeN SKH-1 Piel humana <i>In vitro</i>	↓ Incidencia, multiplicidad y volumen de los tumores ↓LPO, ↓Oxidación de proteínas Restablecimiento del nivel de GSH, ↓ERO ↓ Infiltración de células CD11b ⁺ ~ Inhibición de vías de señalización celular; ↓NF-κB, ↓AP-1 ~ citocinas IL 10/IL 12, ↓ Inmunosupresión, ↓Inflamación ↑p53, ↑NER ~ Ciclo celular ~ ERO`S	Ahmad y Mukhtar, 1999 Pinnell, 2003 Katiyar y Mukhtar, 2001 Afaq et al., 2005a Matsumura y Anastawamy, 2004 Katiyar et al., 2007 Lu et al., 2000 Katiyar et al., 2001
Resveratrol Uva <i>Vitis vinifera</i> y otras fuentes		SKH-1 NHEK	Propiedades: antioxidante, anti-inflamatorio, inhibe la proliferación ↓ Edema, ↓ H ₂ O ₂ , ↓ infiltración de leucocitos, ↓ODC, ↓ COX ↓ NF-κB	Dong, 2003 Afaq et al., 2003 Adhami et al., 2003
Curcumina <i>Curcuma longa</i>		CD-1 mice/TPA Células HEC A431 Células HaCat	↓COX, ↓ODC ↓Caspasas, ↓Citocromo c, ↓ Estrés oxidativo, ~ Apoptosis ↓COX, ↓AP-1, ↑Caspasas, ↑Citocromo c, ~Apoptosis	Ishizaki et al., 1996 Oguro y Yoshida, 2001 Chan et al., 2003 Cho et al., 2005
Gingerol <i>Zingiber officinale</i>		Células JB6 Células HaCat SKH-1 Mice SENECAR	↓ AP-1 ↓ ERO, ↓ caspasas, ↓COX-2, ↓ NF-κB ↓COX-2, ↓ NF-κB ↓ Tumor	Bode et al., 2001 Kim et al., 2007 Katiyar et al., 1996

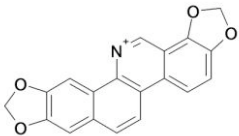
Cuadro 3 (Continuación). Mecanismos moleculares de algunos compuestos de origen vegetal en la fotoquimiopreención.

Compuesto ó fuente	Estructura	Modelo	Blanco/ Mecanismo	Referencia
Silimarina Mezcla de flavonoides		SENECAR SKH-1 Células HaCat C3H/HeN	↓COX-2 ↓Número de tumores ↓Estrés oxidativo, ↓LPO, ↓ERO, Restablece el nivel de GSH ↓IL-10, ↑ IL-12 ↓ERO, ↓Infiltración de células CD11b+	Agarwal et al., 1994 Katiyar et al., 1997 Svobodová et al., 2007 Meeran et al., 2006 Katiyar et al., 2008
Silibinina <i>Silybum marianum</i>		SKH-1 Células HEC A431	↓Aparición, multiplicidad y volumen de los tumores ↓iNOS, ↓COX-2, ↓ Proliferación celular ↓ NF-κB, ↓ CPDs, ↓PCNA, ↓p53 ↑ Apoptosis (pre-tratamiento) ↓ Apoptosis (post-tratamiento)	Gu et al., 2007 Dhanalakshmi et al., 2004 Mallikarjuna et al., 2004 Mohan et al., 2004
Genisteina Isoflavonas de la soya		Células tumurales SKH-1 Ratón Células HEC A431 SENECAR Piel reconstituida	Regulación del ciclo celular ↓H ₂ O ₂ , ↓LPO, ↓8-OHdG ↓Eritema, ↓ inflamación ↓Caspasas ↓ c-fos, ↓c-jun Mantiene la proliferación ↑NER	Barnes y Peterson, 1995 Wei et al., 1996 Wei et al., 2002 Chan y Yu, 2000 Wang et al., 1998 Moore et al., 2006

Cuadro 3 (Continuación). Mecanismos moleculares de algunos compuestos de origen vegetal en la fotoquimiopreención.

Compuesto ó fuente	Estructura	Modelo	Blanco/ Mecanismo	Referencia
Apigenina Diversas plantas vasculares		SKH-1 Líneas celulares C50, 308K, HL-60 Células 308K Células HaCat	↓ Incidencia de tumores, ↓ ODC ~ Ciclo celular Estabilización de p53 ↓ Expresión de COX-2, modulación y estabilidad del ARNm ↑ Apoptosis ↑ Citocromo c	Birt et al., 1997 Lepley et al., 1996 Mc Vean et al., 2000 Tong et al., 2007 Abu-Yousit et al., 2008
Extracto del fruto de Pomegranato Delfinidina <i>Punica granatum</i>		NHEK Células HaCat SKH-1	~ MAPK, ~ NF-κB ↓ LPO, ↓ PCNA, ↓ 8-OHdG, ↓ Caspasas ~ Apoptosis (Bax, Bcl.2), ↓ CPDs, ↓ 8-OHdG	Afaq et al., 2005b Afaq et al., 2007
Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido dihidrocafeico		Voluntarios humanos Células HaCat	↓ Eritema ↓ Interleucinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8	Saija et al., 2000 Poquet et al., 2008
Cafeína Cefé <i>Coffea arabica</i>		SKH-1	↑ Apoptosis, ↑ p53, ↑ células de quemadura ↓ Multiplicidad de los tumores ↑ Apoptosis (solo en los tumores), ↓ Formación del tumor	Lu et al., 2000 Lu et al., 2001 Conney et al., 2007

Cuadro 3 (Continuación). Mecanismos moleculares de algunos compuestos de origen vegetal en la fotoquimiopreención.

Compuesto ó fuente	Estructura	Modelo	Blanco/ Mecanismo	Referencia
Sanguinarina <i>Sanguinaria canadiensis</i>		Líneas celulares HEC A431 Células HaCat SKH-1	⊥ NF-κB ⊥ Crecimiento, supervivencia, ↑ Apoptosis Inhibe la proliferación, ~ Apoptosis ↓Edema, ↓Hiperplasia, ↓Infiltración de leucocitos, ↓ODC, ↓PCNA, ↓H ₂ O ₂	Chaturdevi et al., 1997 Ahmad et al., 2000 Reagan-Shaw et al., 2006 Ahsan et al., 2007
Pro- antocianidinas <i>Vitis vinifera</i>		SKH-1	↓Incidencia y multiplicidad de los tumores ↓Estrés oxidativo, ↓MAPK, ↓ NF-κB ↓Inmunosupresión, ↑ IL-12, ↓ ERO	Mittlal et al., 2003 Mantena y Katiyar, 2006 Sharma et al., 2006 Sharma et al., 2007 Katiyar, 2008

↓: Regulación negativa; ↑: Regulación positiva; ~: modulación; ⊥: inhibición; 8-OHdG: 8-hidroxi 2'-deoxiguanosina; AP-1: Proteína activadora-1; COX: Ciclooxygenasa; CPDs: Dímeros cíclicos de pirimidinas; ERO: especies reactivas de oxígeno; HEC: Carcinoma epidermoide humano; IL: Interleucina; iNOS: Oxido nítrico sintetasa inducible; LPO: Lipoperoxidación; MAPK: Proteín cinasas activadas por mitógeno; NER: Reparación por esición de nucleótidos; NF-κB: Factor nuclear kappa; NHEK: Queratinocitos epidérmicos humanos normales; ODC: Ornitina descarboxilasa; PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.

3.4. Las plantas y la RUV

Landry et al., 1995 proponen que las plantas son más resistentes a la exposición prolongada de la RUV-B que los microorganismos y las células de animales, debido a que producen una amplia variedad de metabolitos secundarios que tienen la capacidad de absorber de manera efectiva la radiación UV.

Las plantas acumulan fenilpropanoides y flavonoides en las vacuolas de la epidermis de las hojas (Bornman et al., 1997; Day, 2001). Estos compuestos al absorber la RUV actúan como filtros solares. En plantas de maíz se ha observado que la deficiencia en la producción de flavonoides provoca un aumento en la acumulación de DCP en el ADN. Por otro lado, en plantas tratadas con UV-B se ha observado un incremento en la concentración de compuestos fenólicos solubles en la epidermis (Landry et al., 1995). La tolerancia a la RUV en varios genotipos de *Arabidopsis* ha sido relacionada con la capacidad de sintetizar flavonoides, con la concentración y localización de los mismos, así como también con el grosor de la epidermis (Rao y Ormond, 1995).

Se ha propuesto que la localización de los flavonoides y derivados del ácido cinámico es discontinua en la epidermis, lo que produce un filtro solar no uniforme, por este motivo la RUV puede provocar daño al ADN y estrés oxidativo en las células vegetales. Lo anterior sugiere que en la tolerancia de las plantas a la RUV-B deben participar otros mecanismos de protección como la desintoxicación de radicales libres y de las ERO (Rao y Ormond, 1995).

Los antioxidantes como el ácido ascórbico, el glutatión, los tocoferoles y los carotenoides, se encuentran en las plantas en altas concentraciones. En lo referente a las enzimas, se considera que las ascorbato peroxidases son fundamentales en la eliminación del H₂O₂ tanto en el citoplasma como en los cloroplastos. Estas enzimas usan el ácido ascórbico como sustrato reductor y forman parte del ciclo ascorbato-glutatión o Halliwell-Asada (Inzé y Van Montagu, 1995). Se ha determinado que la exposición a la RUV-B incrementa la síntesis de las enzimas que participan en este ciclo (Rao y Ormond, 1995). También es importante la actividad de las SOD y las CAT en la eliminación de las ERO.

3.5. El género *Yucca*

Las plantas que viven en zonas con alta radiación solar como las zonas áridas y semiáridas de la región tropical son más tolerantes a la RUV que las que viven en zonas de baja irradiación (Larson, 1988; Bornman et al., 1997). Tal es el caso del género *Yucca*,

que se distribuye en las zonas desérticas de México y Estados Unidos, en donde es una de las especies dominantes. Este género pertenece a la familia Agavaceae.

El género *Yucca* fue descrito por Linneo en 1753 en su obra "Species Plantarum", dentro del grupo Hexandria Monogina. Posteriormente Bentham y Hooker (1862-1883) incluyeron al género en la serie Coronarieae y en la familia Liliaceae, tomando como principal carácter para definir la situación taxonómica del género la posición del ovario (Terrazas, 1973; Orta, 1980; Irish, 2000). Hutchinson en 1934, propone una reclasificación basándose en el hábito arborescente y el tipo de inflorescencia, argumentando que son caracteres más estables que la posición del ovario. Esta clasificación ha originado polémicas desde entonces. Algunos géneros pertenecientes a las Liliaceas y Amarilidaceas las coloca en un nuevo orden denominado Agavales con la familia Agavaceae, y al género *Yucca* en la tribu Yuceae (Terrazas, 1973).

La primera revisión del género *Yucca* la realiza George Englemann en 1873. Tomando en consideración las flores divide el género en dos grupos *Esperoyucca* y *Euyucca*. Este último grupo lo divide en tres secciones debido a las características del fruto y al habitat de las plantas (*Sarcoyucca*, *Clistoyucca* y *Chaenoyucca*). Actualmente, estas son las principales divisiones dentro del género (Irish, 2000).

Rzedowski (1979) señala que el centro de dispersión del género *Yucca* se localiza en la altiplanicie mexicana, aunque su área actual de distribución abarca desde la curvatura del Río Missouri haciendo frontera con Canadá hasta Centroamérica. Las plantas de este género se pueden encontrar en costas, desiertos, bosques e incluso en la selva Lacandona, aunque se ha observado que se establecen mejor en ambientes xerófitos (Irish, 2000).

El género cuenta con alrededor de 35 a 40 especies, lo que lo hace que sea el segundo género más grande de la familia Agavaceae. Son plantas perennes y suculentas (Pellmyr et al., 2007). La diferencia en el número de especies se debe a que diversos autores consideran que algunas son en realidad híbridos (Irish, 2000).

Las especies son acaulescentes, arbustivas o arborescentes. Las hojas nuevas emergen desde un solo punto de crecimiento en la rama o tallo, formando una cabeza con simetría radial o roseta. Esta característica se comparte con *Nolinaceae*, *Aloe* y *Dreacarneae* (Matuda y Piña, 1980; Irish, 2000). Las especies sin tronco generalmente se localizan en las zonas frías de los Estados Unidos, mientras que las especies arborescentes se localizan en áreas cálidas del sur de Estados Unidos, México y Guatemala (Irish, 2000). El tronco es fibroso, típico de monocotiledóneas con crecimiento secundario anómalo.

Las hojas son ascendentes, generalmente están agrupadas hacia los extremos de los tallos, son más o menos rígidas, fibrosas, planas o convexas, muchas tienen filamentos extensivos que se desprenden del margen. Los márgenes de las hojas son lisos, dentados o fibrosos, el ápice es agudo (Matuda y Piña, 1980). El tamaño y forma de la hoja varía considerablemente y no se correlaciona con el tamaño de la planta. El color de las hojas varía de verde brillante hasta un azul pálido. Algunas especies tienen una cubierta cuticular que les otorga un color azul-grisáceo (Irish, 2000).

La inflorescencia es una panícula, puede ser erecta o pendular, generalmente oblonga, pero también puede ser larga y estrecha (Matuda y Piña, 1980; Irish, 2000). El arreglo de la inflorescencia en relación con las hojas varía, puede localizarse dentro de la roseta o afuera de ella (con un tallo largo) o intermedia (Irish, 2000).

Las flores son campanuladas o globosas y tienen tres sepalos y 3 pétalos que son muy similares y frecuentemente son referidos como tépalos o segmentos que se encuentran libres o ligeramente unidos en su base. Los tépalos son gruesos y coriáceos, con color blanco cremoso a blanco verdoso. En algunas especies los tépalos exteriores presentan rayas rosas, marrones, rojas o púrpuras. La coloración es más intensa cuando las flores están en botón (Irish, 2000).

El ovario es súpero y trilobular, con óvulos numerosos arreglados en una placenta axilar. Presentan seis estambres unidos a la base de los tépalos. El estilo es evidente más alto que los estambres lo que previene la autofertilización, tiene glándulas nectarías largas, pero en su mayor parte son inactivas (Orozco, 1970; Matuda y Piña, 1980; Piña, 1980; Irish, 2000).

El fruto puede ser indehiscente, tanto carnoso (baya) como seco y esponjoso o dehiscente (cápsula). La semilla es pequeña, plana, lisa o rugosa, brillante u opaca, de color negro cuando madura debido a la presencia de fitomelano (Piña, 1980; Irish, 2000).

3.5.1 Compuestos fenólicos estudiados en el género *Yucca*

Existen varios estudios fitoquímicos de este género, entre los cuales destacan los realizados en las semillas de *Y. filifera* de los que se aislaron saponinas esteroidales (Arreguin y Romo de Vivar, 1974; Lemieux et al., 1977). En la corteza de *Y. schidigera* se ha detectado la presencia de estilbenos y diversos flavonoides, los cuales por su estructura química podrían intervenir en la resistencia de esta planta a la RUV (Oleszek et al., 2001; Piacente et al., 2002).

El género *Yucca* cuenta con alrededor de 40 especies, los compuestos aislados de algunas de estas plantas con propiedades antioxidantes son: estilbenos, flavonoides y unos compuestos derivados de flavonoides unidos a un centro estilbénico en conformación espiro que no habían sido descritos anteriormente. Las especies estudiadas son: *Y. periculosa*, *Y. schidigera* y *Y. gloriosa*.

En trabajos previos en nuestro laboratorio, de *Y. periculosa* hemos aislado tres estilbenos: el resveratrol, el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno y el 4,4'-dihidroxiestilbeno (Torres et al., 2003).

En el tronco de la especie *Y. schidigera* se han aislado estilbenos, el resveratrol y el *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno, unos compuestos denominados yuccaols que tienen una conformación espiro con una unidad de 15 carbonos posiblemente derivada de flavonoides y otra unidad estilbénica (C14) unidas por un anillo γ -lactónico (yuccaols del A hasta el E), el larixinol (biflavonoide) y la yuccaona un anillo fenólico con un sistema espirobenzopirano-4-ciclopentano-3-ona. Los nueve compuestos tienen actividad antioxidante y fueron evaluados por dos ensayos, la oxidación del ácido linoléico y la capacidad antioxidante equivalente con trolox (TEAC) (Piacente et al., 2004).

Y. gloriosa también contiene estilbenos, yuccaols C-E y los gloriosaols (A a la E). Los gloriosaols difieren de los yuccaols en que tienen dos unidades (C15) de posible origen flavonoide en vez de una unidad (Bassarello et al., 2007a). La capacidad antioxidante de los compuestos de *Y. gloriosa* se evaluó con los métodos descritos para *Y. schidigera* y todos tienen actividad antioxidante (Bassarello et al., 2007b).

3.5.2 *Yucca periculosa* Baker

La especie *Yucca periculosa* es una planta endémica y característica de la reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán, en los estados de Puebla y Oaxaca; aunque también se ha reportado en los estados de Tlaxcala y Veracruz. Se conoce como ntaxha'o, izote o palmillo (Matuda y Piña, 1980).

La posición jerárquica del género de la especie *Yucca periculosa* es:

Dominio: Eucaria

Reino: Plantae

División: Magnoliofita Cronquist, sinn Angiospematofita/Antofita

Subdivisión: Magnoliofitina Frohne &U. Jensen ex Reveal

Clase: Liliopsida Brong

Subclase: Liliidae J.H. Schaffn.

Superorden: Lilianae Takht.

Orden: Agavales Hutch.

Familia: Agavaceae Endl.

Subfamilia: Yuccoideae Kostel.

Tribu: Yuceae Bartl.

Género: *Yucca* L.

Especie: *Yucca periculosa* Baker

Las plantas de la especie *Yucca periculosa* (Esquema 15) son perenes, arborescentes, suculentas que alcanzan a medir de 5 hasta 15 m de altura, en general su tronco es liso, aunque puede presentar ramificaciones. Estos vegetales tienen hojas rígidas, cóncavas, glaucas, glabras, linear-lanceoladas con un margen finamente fibroso y el ápice agudo que termina en una espina; las hojas se agrupan hacia los extremos de las ramas. Presentan una raíz fibrosa. La panícula es anchamente ovoide y llega a medir hasta 1 m de longitud. Las flores son de seis tépalos carnosos pubescentes de color blanco-verdoso a blanco-cremoso. El estilo es abrupto y corto. Las flores tienen 6 estambres, el ovario es súpero trilocular, pluriovulado. El fruto es una baya colgante oblonga de 5 a 8 cm de longitud. Florece de mayo a agosto, dependiendo de la localidad (Matuda y Piña, 1980).

En cuanto al uso etnobotánico de la *Y. periculosa*, en el "Atlas de la medicina tradicional mexicana" publicada por el INI en 1994 y accesible en línea gracias a la UNAM, se reporta que se emplea para el dolor de oídos: se machaca el cucuyo (lo tierno de donde van naciendo las hojas) y se ponen dos gotas en el oído o se hierva el cucuyo en un cuarto de litro de agua, se le ponen cinco gotas de alcohol y se pone en el oído un chorrito de agua tibia, se hace dos o tres veces al día, se humedece un algodón y se tapa el oído (www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=&po=&id=6200&clave_regi on=21).

Esquema 15. *Yucca periculosa* Baker.

Del extracto metanólico de la peridermis de esta especie hemos aislado el resveratrol y otros dos estilbenos: el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno y el 4,4'-dihidroxiestilbeno (Torres et al., 2003). Los estilbenos son compuestos con un grupo cromóforo capaz de absorber la radiación ultravioleta y que además, pueden tener propiedades antioxidantes (Frémont, 2000).

4. Justificación

En los últimos años se ha incrementado el porcentaje de enfermedades causadas por la luz solar, como las reacciones de fotosensibilidad, fotoalergias y el cáncer de piel. Para prevenir los efectos nocivos de la exposición a la radiación solar se emplean filtros solares, muchos de los cuales causan reacciones de fotosensibilidad y fotoalergia.

Las plantas sintetizan diversos metabolitos eficientes en la filtración de la radiación solar y con actividad antioxidante. Estudios fitoquímicos en el género *Yucca* han determinado la presencia flavonoides y polifenoles que por su estructura química podrían ser capaces de absorber la radiación UV y poseer propiedades antioxidantes.

El presente proyecto de investigación pretende contribuir al estudio fitoquímico de la especie *Y. periculosa*, así como aportar conocimientos básicos sobre la capacidad de los metabolitos secundarios como agentes quimiopreventores de los daños en piel inducidos por la exposición aguda y sub-crónica a la RUV. Estos compuestos con propiedades de filtro solar y actividad antioxidante, pueden tener la ventaja de ser biodegradables y probablemente presenten menos efectos secundarios que los filtros solares sintéticos.

Cabe destacar que son pocos los trabajos de metabolitos secundarios en este ámbito y menos aún, en los que se estudie la flora mexicana, por lo tanto, nuestro estudio está dirigido a investigar si los metabolitos secundarios de *Y. periculosa* tienen actividad fotoprotectora al prevenir la formación de eritema y evitar el daño en la piel a nivel histológico. Además, si las propiedades antioxidantes del extracto metanólico y los compuestos evitan que se presente un estado de estrés oxidativo por la disminución de los sistemas antioxidantes endógenos de la piel expuesta a la RUV. Estos conocimientos darán pauta para estudios posteriores en los cuales se establezca si estos metabolitos intervienen en otros procesos como la inflamación, la inmunosupresión, así como dilucidar cuales son los mecanismos moleculares en los que intervienen para poder actuar como quimiopreventores de la fotocarcinogénesis.

De forma contundente, en humanos sólo los filtros solares han mostrado una eficacia considerable en la prevención del cáncer de piel. Por lo tanto el descubrimiento de sustancias con capacidad fotoprotectora y que además tengan actividad antioxidante sería importante en la prevención de este tipo de cáncer.

5. Hipótesis

En las zonas áridas y semiáridas tropicales, la incidencia de la radiación UV es intensa. Las especies dominantes en estos hábitats como *Y. periculosa* deben tener metabolitos que absorban al radiación UV y que además presenten actividad antioxidante. Estos metabolitos, por sus propiedades fotoprotectoras y antioxidantes, podrían ser usados tópicamente para evitar los efectos nocivos agudos, sub-crónicos y crónicos de la RUV en la piel, como la formación del eritema, la disminución de los antioxidantes endógenos, la inmunosupresión y a largo plazo, el desarrollo del cáncer de piel y el fotoenvejecimiento.

6. Objetivos

6.1 Objetivos generales

Contribuir al conocimiento fitoquímico de la especie *Yucca periculosa* Baker.

Evaluar la actividad fotoprotectora y antioxidante del extracto metanólico y los compuestos aislados de *Yucca periculosa* Baker.

6.2 Objetivos particulares

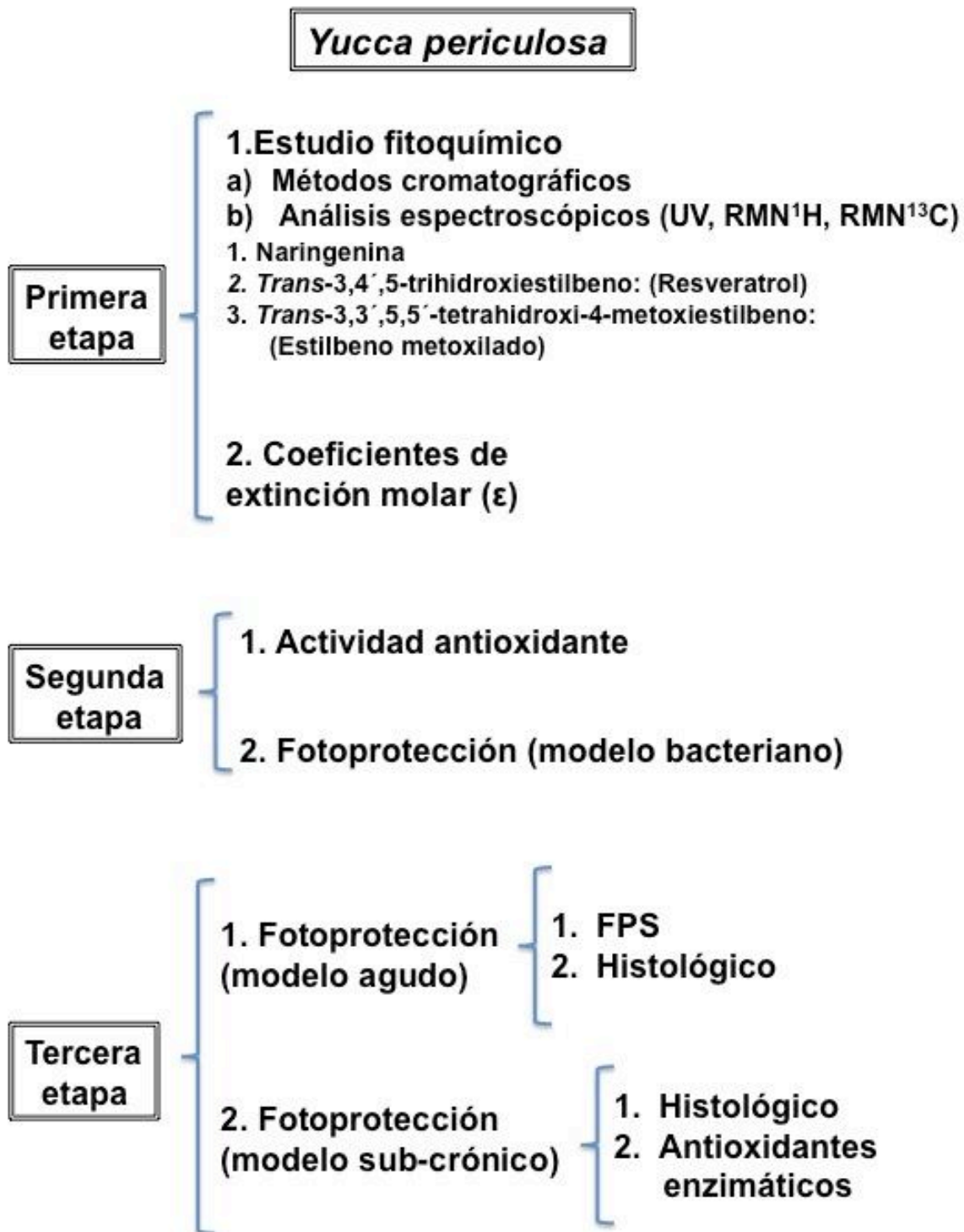
1. Obtener el extracto metanólico libre de grasas de la peridermis de *Y. periculosa*.
2. Aislar y purificar los metabolitos del extracto metanólico de *Y. periculosa*.
3. Realizar los estudios químicos y espectroscópicos necesarios para elucidar las estructuras de los compuestos aislados.
4. Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto y los compuestos aislados de *Y. periculosa*.
5. Evaluar la actividad fotoprotectora del extracto metanólico y los compuestos que tengan absorción en la región de UV-B del espectro electromagnético empleando bacterias como modelo experimental preliminar.
6. Determinar el factor de protección solar (FPS) en piel de cuyo de las sustancias que absorban en la región del UV-B del espectro electromagnético.
7. Estudiar histopatológicamente el efecto fotoprotector del extracto y los compuestos puros de *Y. periculosa* en un modelo animal expuesto a dosis agudas (cuyos) y sub-crónicas (ratón SKH-1) de RUV.
8. Determinar si el extracto y los compuestos puros de *Y. periculosa* evitan el estrés oxidativo causado por la exposición sub-crónica de RUV en un modelo animal (ratón SKH-1).

7. Estrategia metodológica

El trabajo experimental fué dividido en tres etapas (Esquema 16). La primera consistió en la separación y elucidación de la estructura de los componentes químicos del extracto metanólico de *Y. periculosa*. Como parte de los estudios espectroscópicos de las sustancias aisladas se obtuvieron los barridos en la región UV del espectro electromagnético y de esta forma se determinaron los picos máximos de absorción (λ_{max}) en la región UV-B y el coeficiente de extinción molar de cada compuesto de interés. Gracias a los resultados anteriores, se seleccionaron las sustancias que potencialmente podrían poseer actividad fotoprotectora, y de esta forma pasar a la segunda fase de este estudio.

Durante la segunda etapa, se evaluó la capacidad fotoprotectora del extracto y los metabolitos secundarios en un modelo usando bacterias. Además, se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto y los metabolitos aislados. Finalmente, en la tercera etapa se evaluó la capacidad fotoprotectora de las sustancias en dos modelos animales (cuyos y ratones sin pelo de la cepa SKH-1) mediante un estudio histopatológico. Así mismo, se determinó si la aplicación tópica de los metabolitos de *Y. periculosa* evitan el estrés oxidativo causado por la exposición sub-crónica a la RUV.

Cabe destacar que los resultados obtenidos de la primera y segunda etapa, así como la evaluación de la actividad fotoprotectora en cuyos se publicaron en el Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2010, 9(2): 100–108 (Apéndice 2).



Esquema 16. Estrategia metodológica.

8. Primera etapa

8.1 Metodología

8.1.1 Recolecta del material vegetal

La peridermis de *Y. periculosa* se recolectó en los alrededores de Zapotitlán Salinas, en el Valle de Tehuacán, Puebla en el mes de septiembre de 2004. Esta localidad se localiza en la región meridional del sureste del estado de Puebla, entre los 17° 30' y 19° de latitud Norte y entre los 97° y 98° de longitud Oeste.

El material vegetal se recolectó por desgajamiento. Una vez en el laboratorio, la peridermis se secó a la sombra sobre hojas de papel, para después procesarla en un molino manual. También se colectaron y prensaron algunos ejemplares herborizados para su depósito e identificación en el herbario IZTA de la FES-Iztacala de la UNAM.

8.1.2 Extracción

El extracto metanólico de un kilogramo de la peridermis molida de *Y. periculosa* fue obtenido mediante maceración con metanol y se concentró a presión reducida. Posteriormente, se lavó con hexanos obteniéndose la fase hexánica y el extracto metanólico libre de grasas y poder determinar el rendimiento por diferencia de peso.

El extracto metanólico se dividió en dos partes. La primera (200 g) se empleó para realizar un fraccionamiento cromatográfico para aislar los metabolitos presentes en el extracto con la finalidad de seleccionar aquellos compuestos que presentaron actividad antioxidante y que además absorbían en la región UV-B del espectro electromagnético. El resto del extracto (40g) se utilizó en las pruebas biológicas.

En pruebas preliminares se determinó que la fase hexánica no absorbe en la región del UV-B del espectro electromagnético y además que no presenta actividad antioxidante. Debido a lo anterior, no se evaluó la capacidad fotoprotectora y antioxidante de esta fase.

8.1.3 Separación de los componentes del extracto metanólico

8.1.3.1 Métodos cromatográficos

El fraccionamiento del extracto metanólico de *Y. periculosa* se llevó a cabo mediante cromatografía de adsorción en columna abierta (cc), las cuales se realizaron sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck malla 70-230 ASTM). Cuando fue necesario la cc se realizó de manera repetida.

Los extractos y los compuestos se analizaron por cromatografía en capa fina (ccf) mediante cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck 0.2 mm de espesor). La ccf permitió verificar el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de los compuestos obtenidos. Como agentes cromogénicos se emplearon: a) El revelado con luz UV a 254 y 366 nm (Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet. Spectroline Mod CX-20), b) Una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, en este caso para observar el desarrollo del color fue necesario calentar las placas cromatográficas durante dos minutos a 110 °C.

8.1.3.2 Equipo usado para la determinación de las constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron con un aparato Fisher-Johns. Estos datos se describen sin corregir.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) fueron obtenidos en un equipo Varian Unity VXR-200s Y Jeol eclipse 300, los cuales se operaron a una frecuencia de 200 y 75.44 MHz respectivamente. Los espectros se obtuvieron usando los disolventes: cloroformo-*d*, metanol-*d*, DMSO-*d* y una mezcla de cloroformo-*d* con DMSO-*d* dependiendo de la solubilidad de los compuestos aislados. Los desplazamientos químicos se expresan en unidades de ppm (δ) con respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna.

El espectro de absorción en la región del UV-B del extracto metanólico y de los compuestos aislados se determinó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 25.

8.1.3.3 Fraccionamiento del extracto metanólico

El extracto metanólico (200 g) se preadsorbió en celita para fraccionarlo en una cromatografía en columna abierta con 1 Kg de gel de sílice 60 F₂₅₄. La columna se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de diclorometano–metanol (CH₂Cl₂-MeOH). Se recolectaron 130 alícuotas de 350 ml, las cuales se destilaron a presión reducida y se analizaron por ccf. De acuerdo a su patrón cromatográfico se reunieron en 11 fracciones. En el cuadro 4 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes.

Cuadro 4. Fraccionamiento del extracto metanólico de *Y. periculosa*.

Eluyente	Proporción (%)	Alícuotas recolectadas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción	Peso (g)
CH ₂ Cl ₂	100	1-6	1-6	A	Nd
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	7-21	7-16 17-21	B C	0.789 Nd
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	22-52	22-39 40-52	D E	0.606 4.580
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	53-84	53-64 65-67 68-84	F G H	8.021 8.473 29.206
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	85-87	85-90	I	6.601
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	7:3	88-90			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	91-110	91-110	J	13.200
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	5:5	111-125	111-130	K	39.43
MeOH	100	126-130			

Nd: No determinado.

Las fracciones obtenidas del extracto metanólico se procesaron en otras cc, como se describe a continuación, con el propósito de aislar los compuestos con propiedades antioxidantes y fotoprotectoras. Cabe mencionar que debido al bajo rendimiento de las fracciones A y C éstas no se procesaron.

Separación de la fracción B

La fracción B (0.789 g) se sometió a un proceso cromatográfico en cc con 15 g de gel de sílice para aislar sus principales componentes. La fase móvil se constituyó con mezclas de polaridad ascendente de hexanos-cloroformo (Hex-CHCl₃). Se colectaron 225 alícuotas de 5 ml. El desarrollo de la cc se verificó por ccf, y por la similitud en las alícuotas se reunieron 7 fracciones. Los sistemas de eluyentes se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Separación cromatográfica de la fracción B del extracto metanólico de *Y. periculosa*.

Eluyente	Proporción (%)	Alícuotas recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)
Hex	100	1-26	1-26	Nd
Hex-CHCl ₃	95:5	27-112	27-112	Nd
Hex-CHCl ₃	9:1	113-198	Sitosterol (113-198)	0.438
Hex-CHCl ₃	8:2	199-212	199-212	Nd
Hex-CHCl ₃	7:3	213-221	213-221	Nd
Hex-CHCl ₃	6:4	222-224	222-224	Nd
CHCl ₃	6:4	225	225	Nd

Nd: No determinado.

De las fracciones 113-198 se aisló un sólido cristalino en forma de agujas con un punto de fusión de 134-135°C. El *r_f* de este compuesto coincide con el de una muestra auténtica del β-sitosterol (evaluado en varios sistemas cromatográficos).

Cabe hacer notar que el resto de las fracciones no se siguieron fraccionando para aislar sus componentes debido al bajo rendimiento y a que no absorben en la región UV-B del espectro electromagnético.

Separación de la fracción E

La separación de la fracción E (4.58 g) se llevó a cabo mediante una cc con 120 g de gel de sílice. Como fase móvil se emplearon mezclas de polaridad ascendente de cloroformo-metanol (CHCl₃-MeOH). Se colectaron 138 alícuotas de 50 ml, las cuales se reunieron en 5 fracciones de acuerdo a su patrón en ccf (Cuadro 6).

De la fracción 81-100 se aisló un sólido amarillo-claro con p.f. de 223-225°C que sólo mostraba una mancha en ccf con diferentes mezclas de solventes como fase móvil. Debido a lo anterior se les realizaron los estudios de UV, RMN ¹H, RMN ¹³C, para determinar la estructura del compuesto (Espectros 1, 2 y 3). De acuerdo con los datos reportados por Wenkert y Gottlieb, 1977 y por Markham y Geiger, 1994 se determinó que se trataba de la naringenina.

Cuadro 6. Separación cromatográfica de la fracción E del extracto metanólico de *Y. periculosa*.

Eluyente	Proporción (%)	Alícuotas recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)
		1-4		Nd
CHCl ₃	100	5-22	1-61	Nd
		23-50		Nd
		51-61		Nd
		62-80		Nd
CHCl ₃ -MeOH	95:5	81-100	Naringenina (81-100)	0.339
		101-120	101-123	Nd
CHCl ₃ -MeOH	9:1	121-123	Resveratrol (124-138)	Nd
		124-138		0.348

Nd: No determinado.

A partir de la fracción 124-138 se aislaron unos cristales con brillo metálico con p.f. de 260°C a los cuales se les realizaron estudios de UV, RMN ¹H, RMN ¹³C. Se determinó que este compuesto corresponde al resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno) aislado por Torres et al., 2003 en la corteza de *Y. periculosa* (Espectros 4, 5 y 6).

Separación de la fracción F

En el perfil en ccf de la fracción F (8.021 g) del extracto metanólico de *Y. periculosa* se observó una mancha fluorescente a 366 nm con coloración azul. Debido a lo anterior, se procedió a separar los componentes de dicha fracción mediante una cromatografía en cc con 250 g de gel de sílice. La fase móvil fueron mezclas de polaridad ascendente de cloroformo-acetona (CHCl₃-CH₃COCH₃) y acetona-metanol (CH₃COCH₃-MeOH). Se colectaron 124 alícuotas de 100 ml reunidas en 8 fracciones (Cuadro 7).

La fracción 52-61 presentó cristales con forma de aguja con p.f. de 170-172°C solubles en metanol. A este compuesto se le realizaron los estudios de UV, RMN ¹H y RMN ¹³C para determinar la estructura del compuesto (Espectros 7, 8 y 9). De acuerdo a las características físicas y a sus datos espectroscópicos se estableció que se trata del *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxi-4-metoxiestilbeno (Torres et al., 2003).

Cuadro 7. Separación cromatográfica de la fracción F del extracto metanólico de *Y. periculosa*.

Eluyente	Proporción (%)	Alícuotas recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)
CHCl ₃	100	1-11	1-11	Nd
CHCl ₃ - CH ₃ COCH ₃	9:5	12-17	Naringenina (12-17)	0.029
CHCl ₃ - CH ₃ COCH ₃	9:1	18-51	18-51	0.046
CHCl ₃ - CH ₃ COCH ₃	8:2	52-61	Estilbeno metoxilado (52-61)	2.143
CHCl ₃ - CH ₃ COCH ₃	7:3	62-70	62-70	0.038
CHCl ₃ - CH ₃ COCH ₃	6:4	71-78	71-78	Nd
CH ₃ COCH ₃	100	79-85		
CH ₃ COCH ₃ - MeOH	9:1	86-94	79-101	0.022
CH ₃ COCH ₃ - MeOH	8:2	95-101		
CH ₃ COCH ₃ - MeOH	7:3	102-116		
CH ₃ COCH ₃ - MeOH	5:5	117-120	102-120	0.011
MeOH	100	121-124	121-124	Nd

Nd: No determinado.

Separación de la fracción G

La separación de los principales componentes de la fracción G (8.473 g) se realizó mediante una cc con 280 g de gel de sílice. Se emplearon como fase móvil mezclas en orden creciente de polaridad de diclorometano–metanol (CH₂Cl₂-MeOH). Se recolectaron 124 alícuotas de 350 ml, las cuales se destilaron a presión reducida y se analizaron por cc. De acuerdo a su patrón cromatográfico se reunieron en 6 fracciones. En el cuadro 8 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes.

Cuadro 8. Separación cromatográfica de la fracción G del extracto metanólico de *Y. periculosa*.

Eluyente	Proporción (%)	Alícuotas recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)
CH ₂ Cl ₂	100	1-7	1-7	Nd
			Naringenina	
		8-25	(8-25)	0.350
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	26-30	Estilbeno metoxilado	0.453
		31-52	(26-30)	2.639
			31-52	
		53-70	53-70	Nd
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	71-75	71-75	0.040
		76-80	76-80	0.135
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	81-92	81-92	0.089
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	7:3	93-115	93-115	Nd
	6:4			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	5:5	116-125	116-125	Nd

Nd: No determinado.

A partir de la las fracción 8-25 se aisló naringenina y de la 26 a la 30 el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.

Fracciones de la H a la K

Debido a la naturaleza polar de las fracciones de la H a la K del extracto metanólico y a que éstas no presentaron máximos de absorción en la región del UV-B no se realizaron procedimientos cromatográficos para la separación de sus componentes.

8.1.4 Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ)

Como parte de la primera etapa de esta investigación se aislaron tres compuestos de la peridermis de *Y. periculosa* capaces de absorber en la región ultravioleta del espectro electromagnético, para poder comparar éstas con un filtro solar comercial (parsol mcx) se determinó el coeficiente de extinción molar (ϵ). Se prepararon soluciones metanólicas de los compuestos (en dilución 10^{-5} M), las mediciones se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 cm.

El coeficiente de extinción molar se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula (Silverstein et al., 1991):

$$\epsilon = A / c l$$

En donde:

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

A = Absorbancia

c = Concentración molar del soluto

l = Diámetro de la cubeta (habitualmente 1 cm)

8.2 Resultados y discusión de la primera etapa

8.2.1 Datos de herbario de la planta *Y. periculosa*

El material vegetal de *Y. periculosa* fue colectado en los alrededores de la localidad de Zapotitlán Salinas, Puebla. Ésta se encuentra dentro de la reserva de biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, la cual, es una de las regiones áridas y semiáridas de México con mayor diversidad biológica y endemismo (Dávila, 2002). La determinación de la especie fue realizada por la Biol. Ma. Edith López Villafranco, responsable del Herbario IZTA de la FES-Iztacala.

Los datos de herbario se encuentran en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Datos de herbario de *Yucca periculosa*.

Nombre común	Izote
Especie	<i>Yucca periculosa</i> Baker
Familia	Agavaceae
Número de registro	27516

8.2.2 Rendimiento de los extractos

A partir de 1 Kg de la peridermis de *Y. periculosa* se obtuvieron los siguientes rendimientos (Cuadro 10) del extracto metanólico libre de grasas y la partición hexánica.

Cuadro 10. Rendimiento de los extractos de la peridermis de *Y. periculosa*.

Solvente	Rendimiento	
	g	%
Metanol	241	24.1
Hexano	7.95	0.8

El extracto metanólico de *Y. periculosa* fue el que presentó el mayor rendimiento, debido al tipo de tejido vegetal empleado, es factible considerar que en dicho extracto se encuentren compuestos fenólicos como las antocianinas, estilbenos, taninos y flavonoides, entre otros.

Los compuestos fenólicos están representados en las plantas, por un grupo muy amplio de estructuras químicas, más de 8000, y se caracterizan por presentar, todos ellos, un núcleo aromático, unido a uno o más sustituyentes hidroxilo. La mayoría de estos

compuestos son derivados de las vías de los fenilpropanoides y fenilpropanoides-malonato (Croteau et al., 2000).

Las funciones biológicas de este tipo de compuestos en las plantas es muy variada. Algunos participan en la formación de la pared celular, como los lignanos, por lo que se consideran sustancias estructurales, mientras que otros están implicados en diversos roles ecológicos como la atracción a polinizadores, y la defensa ante el ataque de microorganismos, herbívoros e incluso otras plantas (Croteau et al., 2000). Aunado a lo anterior, los polifenoles proporcionan las características distintivas a los diferentes tipos de tallos, maderas, cortezas, etc., por lo tanto son indispensables para la sobrevivencia de todos los tipos de plantas vasculares (Croteau et al., 2000).

En las especies leñosas de las monocotiledóneas, como es el caso de las plantas del género *Yucca*, el tejido protector que presentan se denomina súber estratificado (Terrazas, 1973; Evert, 2006), el cual está formado por células muertas que almacenan suberina y diversos compuestos fenólicos. Este tejido protege de la desecación así como del ataque de insectos, herbívoros, microorganismos y del daño mecánico a los tejidos vivos que se encuentran en el interior del tallo (Croteau et al., 2000).

8.2.3 Compuestos aislados de la peridermis de *Y. periculosa*

a) Naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona)

De las fracciones 81-100, obtenidas de la separación de la fracción E del extracto metanólico, se aisló un sólido amarillo-claro, p. f. 223–225 °C, al cual se le realizaron los estudios de UV, RMN ¹H y RMN ¹³C.

El espectro de absorción en la región UV del compuesto aislado de la fracción E presenta dos picos máximos de absorción en λ_{\max} 212 y 288 nm, así como pico menor alrededor de los 332 nm que puede considerarse una inflexión (Espectro 1).

El espectro de RMN¹H del sólido de la fracción E muestra la señal de un protón de un grupo hidroxilo desplazado a campo bajo a δ 12.065. Con las siguientes señales se observa un sistema A₂B₂ aromático con un acoplamiento orto que presenta: una señal centrada en δ 7.273 (2H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H2', H6') y otra en δ 6.876 (2H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H3', H5'). En δ 5.972 (s amplio, 2H, H6, H8) se detectan los protones vecinos a dos hidroxilos en posición meta, característicos del anillo A de flavonoides. En δ 5.305 (1H, *dd*, *J* = 3, 12.8 Hz, H2) la señal que integra para un protón de un metino vecino de un grupo metileno cuyas señales se desplazan a δ 3.077 (1H, *dd*, *J*=12.8, 17.2 Hz, H3 ax) y a δ 2.712 1H, *dd*, *J*=3, 17.2 Hz, H3 eq) y que representa un sistema ABX típico de

flavanonas. Las señales del espectro de RMN¹H del compuesto se compararon con las reportadas por Markham y Geiger, 1994 para la naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona) (Cuadro 11, Espectro 2).

Cuadro 11. Asignación de las señales del espectro de RMN¹H de la naringenina.

Desplazamiento (δ)			
	Markham y Geiger, 1994	Integración	Interpretación
12.065	12.15	1	OH
7.273	7.32	2	H2', H6'
6.876	6.81	2	H3', H5'
5.972	5.95	2	H6, H8
5.305	5.43	1	H2
3.077	3.26	1	H3 ax
2.712	2.80	1	H3 eq

La señales detectadas en el espectro de RMN¹³C (Espectro 3) se compararon con las reportadas para la naringenina por Wenkert y Gottlieb, 1977 como se muestra en el cuadro 12.

En ambos casos, los datos espectroscópicos de RMN¹H y de ¹³C coinciden con los reportados para la naringenina. La estructura de esta flavanona se muestra a continuación en la figura 1:

Cuadro 12. Asignación de las señales del espectro de RMN¹³C de la naringenina.

Carbono	Desplazamiento (δ)	
	Wenkert y Gottlieb, 1977	
2	78.713	78.8
3	42.493	42.4
4	195.217	196.4
5	163.551	163.7
6	96.09	96.3
7	166.42	166.9
8	95.018	95.4
9	162.589	163.1
10	101.77	102.1
1'	128.47	129.1
2', 6'	127.25	128.5
3', 5'	115.148	115.6
4'	157.346	157.9

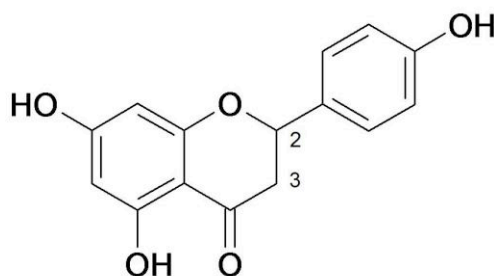


Figura 1. Estructura de la naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona).

La naringenina es un polifenol que pertenece al grupo de los flavonoides, los cuales se caracterizan por tener dos anillos aromáticos (A y B) conectados por un heterociclo de pirano (C) (Croteau et al., 2000). Los flavonoides se hallan en todas las plantas vasculares, dentro de este amplio grupo de compuestos se encuentran las flavanonas. Las flavanonas se distinguen por presentar saturación entre los carbonos 2 y 3 del anillo C. La

naringenina (4',5,7-trihidroxi flavanona) es una sustancia amarga que se encuentra frecuentemente en la cáscara de los cítricos (Erlund, 2004).

El espectro de absorción en la región UV de la naringenina obtenido en este trabajo (Espectro 1) es el característico para las flavanonas, en él se puede distinguir una fuerte absorción desde los 270 a los 295 nm conocida como banda II, y un pequeño pico correspondiente a una inflexión entre los 300 y 360 nm o banda I. A diferencia de lo anterior, otros flavonoides como las flavonas, flavonoles y chalconas, que tienen una insaturación en el anillo C, presentan de manera característica una fuerte absorción en la banda I (Grayer, 1989).

Algunas de las actividades biológicas que se han reportado para la naringenina incluyen: actividad antiinflamatoria (Erlund, 2004; Hirai et al., 2007), mediante la inhibición del factor de transcripción NF- κ B el cual está involucrado en la inducción de la enzima NOSi que interviene en la síntesis del óxido nítrico, metabolito indispensable en los procesos inflamatorios (Hämäläinen et al., 2007). Aunado a lo anterior, la naringenina modula el metabolismo de los lípidos (Erlund, 2004; Jeon et al., 2007), la expresión de enzimas involucradas en la reparación del ADN en células aisladas de cáncer de próstata (Gao et al., 2006). Esta flavanona también participa en la modulación del citocromo P-450 (Ueng et al., 1999). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que la aplicación de la naringenina en cultivos celulares de queratinocitos humanos (HaCat) incrementa la eliminación de los CPD y evita la apoptosis, ambos eventos inducidos por la radiación UV-B (El-Mahdy et al., 2008).

b) Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno)

Las alícuotas 124-132 de la fracción E del extracto metanólico presentaron cristales con brillo metálico (0.348 g) a los cuales se les realizaron los estudios de UV, RMN¹H y ¹³C.

El espectro de absorción en la región UV de este compuesto presenta tres picos máximos de absorción a 220, 305 y 320 nm (Espectro 4).

El espectro de RMN ¹H (Espectro 5, cuadro 13) muestra la señal de dos protones aromáticos (H2, H6) los cuales se observan en δ 6.38 (2H, *d*, *J* = 1.8 Hz). En la región de δ 6.11 se encuentra la señal que integra para un protón (1H, *t*, *J* = 2.1 Hz) que corresponde a protón H4. En el espectro también hay una señal centrada a δ 7.39 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz,) que corresponde a dos protones aromáticos equivalentes (H3', H5'). En δ 6.75 (2H, *d*, *J* = 8.4 Hz) la señal integra para dos protones de un anillo aromático (H2', H6') y que tienen acoplamiento con las señales de H3', H5'. Finalmente, en δ 6.93 (1H, *d*, *J* = 16.2 Hz, H β) y

en δ 6.80 (1H, *d*, $J=16.5$ Hz, H_{α}) las señales corresponden a las de dos protones vinílicos en *trans*. De acuerdo a lo anterior, la estructura del compuesto aislado corresponde a un estilbeno formado por dos anillos aromáticos unidos por un doble enlace.

Cuadro 13. Asignación de las señales del espectro de RMN¹H del resveratrol.

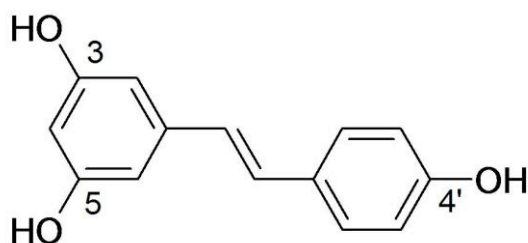
Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Interpretación
6.11	Triple	1	H4
6.38	Doble	2	H2, H6
6.75	Doble	2	H2', H6'
7.39	Doble	2	H3', H5'
6.93	Doble	1	Vinílico
6.80	Doble	1	Vinílico

Las señales detectadas en el espectro de RMN¹³C (Espectro 6) coinciden con las reportadas por Oleszek et al., 2001 para el resveratrol. La asignación para cada uno de los carbonos se muestra en el cuadro 14.

Del extracto metanólico de la corteza de *Y. periculosa* se aisló el resveratrol, la identidad del compuesto se confirmó por que las señales de RMN¹H y ¹³C concuerdan con las reportadas por Oleszek et al., 2001. La estructura de este compuesto se muestra a continuación (Figura 2):

Cuadro 14. Asignación de las señales del espectro de RMN¹³C del resveratrol.

Carbono	Desplazamiento (δ)
1	139.234
2 y 6	104.270
3 y 5	158.464
4	101.735
1'	128.046
2' y 6'	115.488
3' y 5'	127.813
4	157.182
7	127.813
8	125.627

Figura 2. Estructura química del resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno).

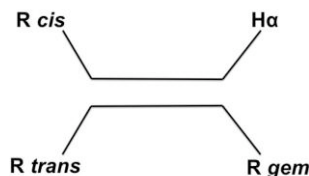
El resveratrol es un estilbeno, el nombre estilbeno deriva de la palabra griega “stilbos”, que significa brillante. Los estilbenos hidroxilados son compuestos fenólicos que se forman por la condensación del ácido *p*-hidroxicinámico con tres moléculas de malonil coenzima A, mediante la acción de la estilbeno sintetasa. Los estilbenos se encuentran presentes en briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas. Se han descrito alrededor de 300 estructuras diferentes que corresponden a este tipo de compuestos. Los estilbenos tienen diversas funciones en las plantas, entre las cuales destaca la protección de los tallos hacia las infecciones de diversos microorganismos, principalmente los hongos (Croteau et al., 2000).

Los estilbenos tienen un grupo cromóforo formado por dos anillos aromáticos unidos por un grupo vinílico, por lo que son capaces de absorber la RUV (Gorham, 1989; Frémont, 2000), lo anterior se confirma al observar en el espectro 4 los λ_{\max} de absorción en la región UV de este compuesto, especialmente a los 305 y 320 nm. La sustitución de un hidrógeno en el benceno por grupos cromóforos produce desplazamientos batocrómicos en todas las bandas, especialmente en la banda primaria cuya mayor intensidad puede traslaparse con la banda secundaria en el caso de sistemas de extensa conjugación. En los estilbenos se observan diferencias en la absorción en UV entre los isómeros *cis* y *trans*. En el isómero *cis* el impedimento estérico destruye la planaridad del sistema conjugado lo que se refleja en un efecto hipso e hipocrómico, por lo tanto el isómero *cis* absorbe a longitudes de onda menores (más energéticas) y con menor intensidad en relación al *trans* estilbeno (Silverstein et al., 1991). El resveratrol aislado de *Y. periculosa* es un estilbeno en configuración *trans*, lo cual se confirmó por la longitud de onda en que absorbe (305 nm) así como la intensidad de la misma.

En el presente estudio se aisló el resveratrol, un estilbeno que se puede encontrar en la configuración *cis* o *trans*. La RMN de ^1H y de ^{13}C permite deducir que isómero está presente en la muestra de acuerdo al desplazamiento químico, por ejemplo para calcular el desplazamiento para protones olefínicos se emplea la fórmula:

$$\delta = 5.28 + \sum Z_i$$

donde Z_i es cada uno de los sustituyentes del doble enlace que pueden estar en posición gem, *cis* o *trans* con respecto al H_α como se observa en el esquema 17.



Esquema 17. Posibles sustituyentes del enlace vinílico.

En el caso de los estilbenos, el enlace vinílico tiene dos H_α con dos anillos aromáticos como vecinos (Silverstein et al., 1991), así que de acuerdo con lo anterior, para el isómero *trans* del resveratrol el desplazamiento químico de los protones vinílicos debe encontrarse cercano a 7: $\delta = 5.28 + 1.35$ (Z_i gem de aromático) + 0.37 (Z_i *cis* de aromático). Aunado a lo anterior, la configuración *cis* y *trans* se puede identificar de acuerdo al valor que se

obtiene de la constante de acoplamiento. En este caso el espectro de RMN ^1H del resveratrol (Espectro 5) muestra una señal en forma de doblete en δ 6.93 que integra para un protón ($J = 16.2$ Hz, $\text{H}\beta$) y de igual forma en δ 6.80 esta la señal de un protón en un doblete ($J = 16.5$ Hz, $\text{H}\alpha$) por el desplazamiento químico las señales corresponden a las de dos protones vinílicos. Como se puede observar, el valor de J se encuentra en el rango que corresponde al isómero *trans*.

El resveratrol fue identificado por primera vez en 1940 en la raíz de *Veratrum graniflorum* O. Loes, una planta empleada en la medicina tradicional oriental conocida como “Li Lu”, posteriormente se aisló de la raíz de *Polygonum cuspidatum*, conocida como Ko-jo-kon, esta planta es la fuente natural más rica que se conoce para este compuesto y también es usada para el tratamiento de dermatitis, gonorrea así como alteraciones en el metabolismo de los lípidos en la región asiática. Actualmente se ha reportado la presencia del este estilbeno en por lo menos 72 especies de plantas, es uno de los principales componentes fenólicos en el vino tinto y se le considera responsable de la denominada “paradoja francesa”. Este nombre se ha aplicado al hecho de que en Francia la incidencia de enfermedades cardiovasculares, como la arterioesclerosis, es menor que en otros países, aunque la mayoría de los franceses siguen una dieta rica en grasas saturadas (Shishodia y Aggarwal, 2006).

El resveratrol es capaz de modular diferentes blancos celulares por lo que puede ser un buen candidato para realizar estudios donde se busque la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. Reflejo de lo anterior es que en la literatura se reportan diversas actividades biológicas de este compuesto, entre las que destacan sus propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y antioxidantes (Shishodia y Aggarwal, 2006). Actualmente, se encuentra un protocolo en Fase I para determinar si este compuesto previene el cáncer en voluntarios sanos dentro del proyecto de inhibidores naturales de la carcinogénesis quimioprotectores del Centro Nacional de Cáncer (NCI por sus siglas en inglés) (Balunas y Kinghorn, 2005).

c) *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno

De las fracciones F y G del extracto metanólico de *Y. periculosa* se aislaron 2.596 g de un sólido cristalino con forma de agujas, solubles en metanol y con p.f de 170-172 °C. La identidad del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno (MS) se determinó por medio de sus constantes físicas y datos espectroscópicos que se compararon con los de Oleszek et al., 2001 y los de Torres et al., 2003.

El espectro de absorción en la región UV muestra que el estilbeno metoxilado tiene dos picos de máxima absorción a los 228 y a 316 nm. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se consideró que éste compuesto podía ser potencialmente una sustancia con propiedades fotoprotectoras ya que absorbe en la región UV-B (280-320) (Espectro 7).

El espectro de RMN ^1H (Espectro 8) muestra en δ 6.86 (1H, *d*, $J=16.2$ Hz) y en 6.79 (1H, *d*, $J=16.2$ Hz) las señales de dos protones vinílicos y cuya magnitud de sus constantes de acoplamiento corresponde a un sistema *trans*. En δ 6.50 (*s*) la señal integra para dos protones de un anillo aromático vecinos a una doble ligadura (H2, H6). La señal en δ 6.40 indica también la presencia de dos protones de un anillo aromático similares a los anteriores (H2', H6') (2H, *d*, $J=2.14$ Hz). La señal de un protón aromático (H4') se observa en δ 6.24 (*d*, $J=2.14$ Hz). Por último, la presencia de un grupo metoxilo se detecta por la integración de tres protones en δ 3.79 (*s*) (Cuadro 15).

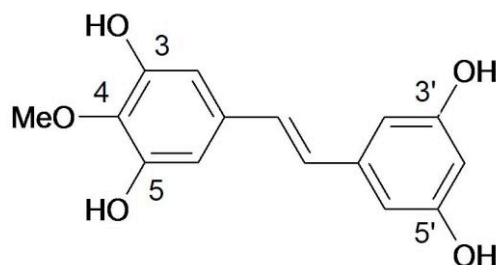
Cuadro 15. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Interpretación
6.86	Doble	1	Vinílico
6.79	Doble	1	Vinílico
6.50	Simple	2	H2, H6
6.40	Doble	2	H2', H6'
6.24	Doble	1	H4'
3.79	Simple	3	Metoxilo

La asignación de las señales detectadas en el espectro de ^{13}C (Espectro 9) se muestran en el cuadro 16, las cuales coinciden con las reportadas por Oleszek et al., 2001 y Torres et al, 2003 para el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno (Figura 3).

Cuadro 16. Asignación de las señales del espectro de RMN¹³C del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.

Carbono	Desplazamiento (δ)
1	139.9
2 y 6	106.4
3 y 5	150.7
4	135.8
1'	134
2' y 6'	105.6
3' y 5'	158.5
4'	102.5
CH ₃ O	60.7
7	128.8
8	128.3

Figura 3. Estructura del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.

El *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno sólo se ha reportado en especies del género *Yucca* como *Y. schidigera* (Piacente et al., 2002), *Y. periculosa* (Torres et al., 2003) y *Y. gloriosa* (Bassarello et al., 2007a). De éstas, también se ha aislado el resveratrol. La diferencia en los λ_{\max} de absorción entre ambos estilbenos aislados se debe a la presencia de un grupo metoxilo en la posición 4 en el *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno que provoca dos efectos principales: un cambio batocrómico en la absorbancia en UV y la activación del anillo aromático. Ambos estilbenos han sido sujeto de diversas investigaciones para determinar sus propiedades biológicas como se describe en el cuadro 17.

Cuadro 17. Diversas actividades biológicas del resveratrol y el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.

Actividad biológica	Descripción	Compuesto
Efecto antiplaquetario	<p>1. Los estilbenos reducen la agregación de las plaquetas activadas con trombina y ADP (Olas et al., 2002).</p> <p>2. Los estilbenos inhiben la generación de radicales libres en plaquetas activadas con trombina. El tratamiento de las plaquetas con el resveratrol incrementa las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, mientras que el estilbeno metoxilado las reduce (Olas et al., 2003).</p> <p>3. Al estudiar el mecanismo de la actividad antiplaquetaria se determinó que todos los compuestos disminuyen la adhesión plaquetaria a la colágena y el fibrinógeno (Olas et al., 2005).</p>	Resveratrol y <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno
Actividad insecticida	Los estilbenos retardan el desarrollo del gusano <i>Spodoptera frugiperda</i> . El estilbeno metoxilado fue el compuesto más activo, al parecer interviene en el proceso de muda del insecto (Torres et al., 2003).	Resveratrol y <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno
Efecto en la síntesis, proliferación, migración de PAF en células de sarcoma de Kaposi's	Se muestran evidencias del potencial anti-tumoral, anti-invasivos y anti-inflamatorios de estos compuestos (Balestrieri et al., 2006).	Resveratrol y <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno
Propiedades antioxidantes	Los estilbenos inhiben la oxidación de biomoléculas en células sanguíneas. Ambos compuestos inhiben la carbonilación de proteínas y reducen la oxidación de los grupos tiol, disminuyen la LPO y el daño al DNA en plaquetas tratadas con compuestos de platino (Olas et al., 2006). Un efecto similar se encontró al inducir el daño con peroxinitrito (Olas et al., 2008).	Resveratrol y <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno
Actividad anti-proliferativa y anti-apoptótica	Tiene una moderada capacidad anti-proliferativa al detener el ciclo celular en G ₀ /G ₁ (Nigro et al., 2007).	Resveratrol
Actividad mutagénica	Ningún compuesto mostró actividad mutagénica en la prueba de Ames con y sin activación (Czeczot et al., 2003).	Resveratrol y <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno

8.2.4 Absorción en la región UV del espectro electromagnético: Coeficiente de extinción molar (ϵ)

El coeficiente de extinción (ϵ) de cada una de las sustancias aisladas de la peridermis de *Y. periculosa* se determinó para evaluar su capacidad para absorber la RUV. Este parámetro define que tan eficientemente una sustancia absorbe la luz a una determinada longitud de onda de acuerdo a la concentración molar. Como se observa en el cuadro 18, los tres compuestos aislados, presentan lo máximos de absorción en la región del UV-B del espectro electromagnético por lo que potencialmente son sustancias fotoprotectoras, además tienen coeficientes de extinción similares a los reportados para las sustancias fotoprotectoras empleadas comercialmente (Shaath, 1997; Pattanaargson et al., 2004; Shaath, 2005). El extracto metanólico también absorbe en la región UV-B del espectro.

Cuadro 18. Absorción en la región UV-B y coeficiente de extinción molar del extracto metanólico, los compuestos aislados de *Y. periculosa* y varios filtros solares comerciales.

Sustancia	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Extracto metanólico	232, 313	Nd
Naringenina	212, 288	12 555, 7 745
Resveratrol	218, 305	29 823, 37 895
<i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno	227, 316	40 278, 45 374
Filtros comerciales		
Etil-hexil- <i>p</i> -metoxicinamato (Parsol mcx) (Pattanaargson et al., 2004)	310	24 000
Octilsalato (Shaath, 2005)	308	4,900
Avobenzona (Shaath, 2005)	351	30,500
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico (Shaath, 2005)	293	14,000
Padimato-O (Shaath, 2005)	307	27,300

Nd: No determinado.

El valor del coeficiente de extinción molar es la base para comparar la eficacia de los filtros solares. De forma general, una sustancia con un valor alto de ϵ es más eficiente para absorber la radiación UV en comparación con un compuesto con un menor valor de ϵ . Lo anterior se relaciona directamente con el tipo de transición electrónica que ocurra en el interior de la molécula. Las transiciones electrónicas permitidas tienen coeficiente de absorción mayor que las prohibidas. Aunado a lo anterior, el grado de la deslocalización electrónica por resonancia en una molécula indica de forma clara sobre el valor de los λ_{\max} y la predicción del valor de ϵ (Shaath, 2005).

En los estilbenos aislados de la corteza de *Y. periculosa* observamos que la diferencia estructural entre el resveratrol y el *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno es la presencia del grupo metoxilo en la posición 4 y el número y posición de los hidroxilos. El grupo metoxilo en posición *para* (*p*) con respecto al enlace vinílico produce un marcado efecto batocrómico (227 nm ϵ_{\max} 40 278; 316 nm ϵ_{\max} 45 374), con respecto al resveratrol (220 nm ϵ_{\max} 29 823; 305 nm ϵ_{\max} 37 895).

En el benceno la sustitución de un hidrógeno por un grupo auxócromo produce desplazamientos batocrómicos de todas las bandas. La interacción del auxócromo con el sistema π bencénico reduce la simetría e intensifica marcadamente la banda secundaria. Un sustituyente auxócromo es un grupo saturado que desplaza e intensifica la absorción de un grupo cromóforo, altera la longitud de onda a la que absorbe hacia longitudes de onda (λ) menos energéticas e incrementa la intensidad de la banda por lo que aumenta el coeficiente de extinción. El efecto batocrómico se atribuye a la hiperconjugación de los electrones del sustituyente que entran en resonancia con el anillo aromático, en este caso se intensifica la banda de 256 nm por la conjugación $n \rightarrow \pi^*$. Algunos grupos auxóchromos son Cl, OH, NH₂, OCH₃ (Silverstein et al., 1991; March, 1992; Vollhardt y Schore, 2002). Cuando la molécula presenta dos sustituyentes en posición *p* el efecto batocrómico es mucho mayor, ejemplo de lo anterior lo podemos observar en derivados del benceno que tienen a un grupo metoxilo en esta posición, en los cuales la banda de absorción principal o primaria se desplaza +25 nm, pero si la substitución es en *orto* (*o*) o *meta* (*m*) sólo se incrementa en 7 nm (Silverstein et al., 1991).

La influencia electrónica de cualquier sustituyente en un compuesto aromático afecta fuertemente en su reactividad. Estos grupos se clasifican en: activadores o desactivadores. Los primeros provocan que la reacción sea más rápida que en el compuesto no sustituido y los segundos lo contrario. Un grupo o sustituyente se considera un activador del anillo si cede densidad electrónica al sistema aromático y orientan una

segunda sustitución electrofílica en posición orto o para. Dependiendo de la estructura del sustituyente pueden tener un efecto inductor o de resonancia. El efecto inductor ocurre a través de los enlaces σ , disminuye con la distancia y se ve afectado por la electronegatividad de los átomos. Los grupos alquilo son activantes débiles por efecto inductivo. Por otro lado, los grupos que pueden ceder por resonancia pares de electrones no compartidos al sistema π son activadores, entre estos podemos encontrar las funciones amino, hidroxilo y sus derivados como el metoxilo (Vollhardt y Schore, 2002).

8.3 Resumen de resultados y conclusiones de la primera etapa

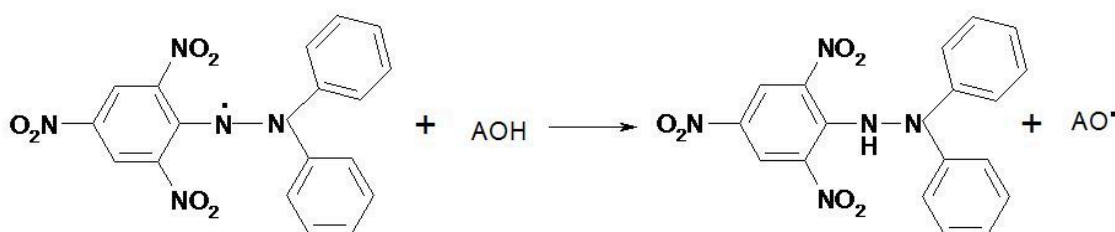
En esta primera etapa se aislaron del extracto metanólico de *Y. periculosa*: el β -sitosterol, la naringenina, el resveratrol, y el *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxil-4-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado). Además, se determinó que el extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa*, con excepción del sitosterol, absorben en la región de luz UV-B del espectro electromagnético y tienen un coeficiente de extinción similar a los de los filtros comerciales por lo que se consideró que potencialmente son sustancias fotoprotectoras y por ese motivo se evaluaron en la segunda etapa de este trabajo.

9. Segunda etapa

9.1 Metodología

9.1.1 Actividad antioxidante

La capacidad de atrapar radicales libres del extracto y los compuestos aislados de *Y. periculosa* se determinó midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de la 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH•, Sigma D-9132) al 0.2%. El radical libre de la difenilpicrilhidracina tiene un máximo de absorción a los 517 nm, cuando es reducido por un compuesto antioxidante la coloración desaparece.



Esquema 18. Reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo.

Para determinar la capacidad antioxidante media (CA_{50}) del extracto metanólico de *Y. periculosa* y de los tres compuestos aislados, se obtuvo el porcentaje de decoloración del DPPH• de cada una de las sustancias a diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 180 y 320 ppm). El porcentaje de decoloración se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación (Joyeux et al., 1995; Mathiesen et al., 1995; Villaño et al., 2007):

$$\% \text{ de decoloración} = 1 - (\text{absorbancia del problema} / \text{absorbancia del blanco}) \times 100$$

La CA_{50} , expresa la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% al radical DPPH•. Valores bajos de CA_{50} indican una mayor potencial antioxidante. Como sustancias de referencia se usaron butil-hidroxi-anisol (BHA) y α -tocoferol en las mismas concentraciones que los problemas. Como blanco se utilizó metanol. Los resultados muestran el promedio y la desviación estandar de 5 repeticiones de cada medición. Se realizó un ANOVA simple para determinar las diferencias significativas en la CA_{50} de cada tratamiento, seguido de una prueba de Tukey.

9.1.2 Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región del UV-B del extracto y los compuestos aislados: Fotoprotección empleando un modelo bacteriano

El primer modelo que se utilizó para evaluar la actividad fotoprotectora del extracto metanólico y los metabolitos secundarios de *Y. periculosa* fue el propuesto por Avila et al., 2005. En el cual, suspensiones bacterianas son expuestas a la RUV con y sin protección para determinar y comparar la constante de mortalidad (K) que se obtiene a partir de las curvas de sobrevivencia.

La bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) se dejó crecer en caldo Mueller-Hinton durante 12 horas a 37°C, posteriormente se realizó la dilución 1:10 en caldo de infusión cerebro-corazón de bovino, cuando el crecimiento poblacional alcanzó una densidad óptica (550 nm) de 0.3, el inóculo se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. La pastilla de bacterias se suspendió en 100 ml de PBS (pH 7.0) para obtener un inóculo de aproximadamente 10^7 bacterias/ml. Finalmente, esta suspensión bacteriana se colocó en cubetas de cuarzo estériles para posteriormente ser irradiadas con y sin protección.

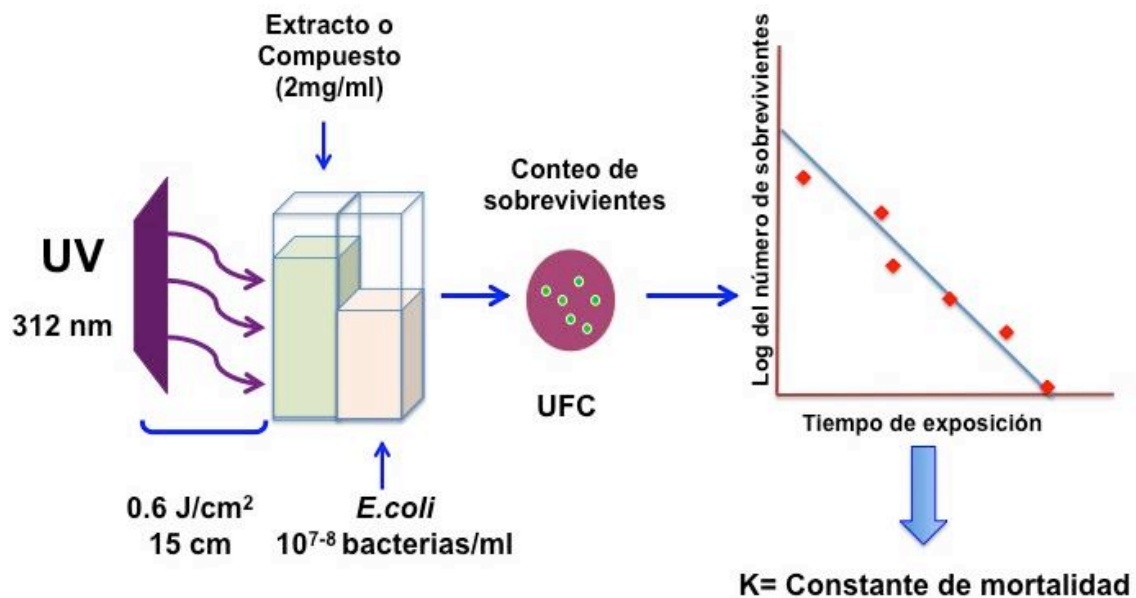
Las sustancias a evaluar (extractos, compuestos y controles) se colocaron en las cubetas de cuarzo a una concentración de 2.0 mg/ml, usando los disolventes apropiados en cada caso. El control negativo fue el solvente empleado para diluir cada una de las muestras a evaluar y como control positivo se utilizó el etil-hexil-*p*-metoxicinamato diluido en metanol (Parsol mcx IESP VAN DIK).

Las unidades experimentales se formaron al unir una cubeta con la sustancia a evaluar y otra con las suspensiones bacterianas. Se colocaron a 15 cm de una lámpara de luz UV-B (312 nm Spectroline EB-280C), para ser irradiadas a diferentes tiempos. La dosis de irradiación fue de 0.60 J/cm^2 (medido con un radiómetro Spectroline DM-300HA) con intensidad de campo de 130 Watt/m^2 .

Se tomaron muestras de 100 μl de cada una de las unidades experimentales (con y sin protección) en cada tiempo de exposición a la radiación UV-B, para realizar el conteo de microorganismos sobrevivientes mediante la técnica de dilución (Eisenstadt et al., 1994). En los experimentos sin protección (cubetas únicamente con solventes), el primer tiempo de irradiación fue de 30 segundos y posteriormente se aumentó el tiempo de exposición cada 30 segundos hasta los 5 minutos y finalmente se tomó una muestra a los 10 minutos. En los experimentos con protección (extracto, compuestos puros y el control positivo), los tiempos de exposición fueron de 2.5, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

Los resultados se expresaron graficando el logaritmo del número de sobrevivientes con relación al tiempo de irradiación (curvas de supervivencia). Se llevaron a cabo tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

Cabe mencionar que las soluciones del extracto metanólico, las de los estilbenos y la de la naringenina de cada uno de los tiempos de irradiación se recuperaron con la finalidad de observar si existían cambios en el espectro de absorción en la región del UV-B de los mismos.



Esquema 19. Modelo de muerte celular de *E. coli* inducida por la radiación UV-B.

9.2 Resultados y discusión de la segunda etapa

9.2.1 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de diversos metabolitos secundarios se ha asociado con el efecto protector de estos compuestos ante diversas patologías como la inflamación, la arterioesclerosis y la carcinogénesis (Soleas et al., 1997; Kong et al., 2001). Debido a lo anterior, es muy importante determinar la actividad antioxidante de los compuestos aislados y del extracto metanólico de *Y. periculosa* ya que la prevención del daño en la piel causado por la exposición a la RUV puede relacionarse con ésta propiedad.

Como se observa en la figura 4, en todos los casos evaluados se observó que la eficacia en la decoloración la solución del DPPH• fue dependiente de la concentración. Cabe mencionar que el extracto metanólico de *Y. periculosa* en las concentraciones más altas se presentó un incremento en la absorbancia. Este fenómeno probablemente se deba a un efecto pro-oxidante del extracto o a la presencia de sustancias capaces de absorber en la región de luz visible del espectro electromagnético cercana a los 517 nm.

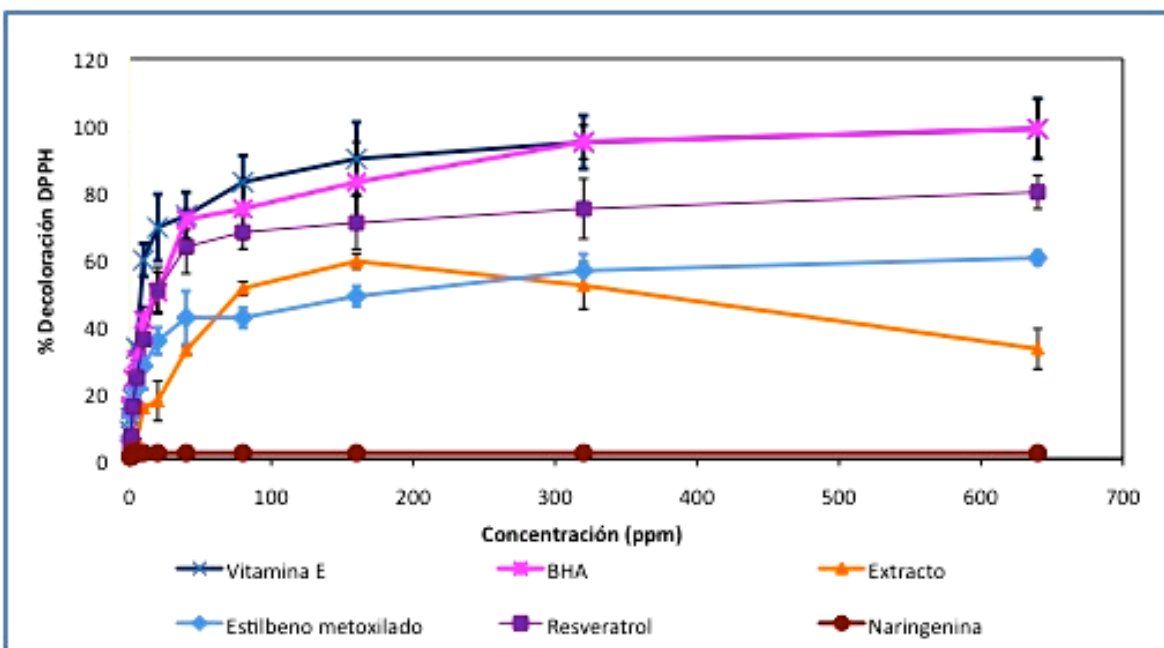


Figura 4. Porcentaje de decoloración del DPPH• de cada una de las sustancias evaluadas.

Los resultados de la CA_{50} de cada tratamiento se muestran en el cuadro 19. Como se puede observar el resveratrol (28.09 ± 1.2) y el extracto metanólico de *Y. periculosa* (29.12 ± 2.4) son las sustancias que mostraron mayor capacidad para atrapar al radical DPPH• sin mostrar diferencias significativas entre ellos. El estilbeno metoxilado tiene un

valor de CA_{50} (193 ± 3.6) significativamente más alto que el resveratrol y el extracto lo que muestra que tiene menor actividad antioxidante ($p < 0.05$). La naringenina en esta prueba no presentó actividad antioxidante. Comparando las sustancias evaluadas con el BHA y el α -tocoferol, todas las muestras de la *Y. periculosa* mostraron valores más altos de CA_{50} y por lo tanto una moderada actividad antioxidante.

Cuadro 19. Capacidad antioxidante media (CA_{50}) de acuerdo con la decoloración del DPPH• del extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa*.

Sustancia	Capacidad antioxidante media (CA_{50} ppm)
BHA	15.05 ± 0.8
α -tocoferol	9.13 ± 0.4
Extracto metanólico	$28.09 \pm 1.2^*$
Naringenina	SA
Resveratrol	$29.12 \pm 2.4^*$
Estilbeno metoxilado	$193 \pm 3.6^{*\diamond}$

BHA: Butil-hidroxi-anisol, SA: Sin actividad. * $p < 0.05$ con respecto al BHA y el α -tocoferol, $\diamond p < 0.05$ con respecto al extracto metanólico y al resveratrol.

El extracto metanólico y los estilbenos aislados de *Y. periculosa* tienen una moderada actividad antioxidante. Los estilbenos son de naturaleza fenólica y se ha reportado que este tipo de sustancias tienen propiedades antioxidantes (Afaq et al., 2003; Seyoum et al., 2006; Villaño et al., 2007). En el caso particular del resveratrol se han estudiado las propiedades energéticas y geométricas de la transferencia de protones y otras reacciones iónicas en este compuesto. Gracias a lo anterior, se ha reportado que la actividad antioxidante del resveratrol se debe principalmente al grupo hidroxilo del carbono 4', siendo éste más reactivo que los presentes en las posiciones 3 y 5, lo anterior se debe al efecto de resonancia (Seeram et al., 2006). De acuerdo con los resultados de esta investigación el estilbeno metoxilado tiene una menor capacidad antioxidante comparado con el resveratrol. Lo anterior puede explicarse al considerar que en esta molécula la posición 4 está ocupada por un grupo metoxilo lo que imposibilita la transferencia de protones al radical DPPH•, reaccionando únicamente los hidroxilos en 3, 3', 5, y 5' los cuales se encuentran en posición *meta* lo que limita el efecto de resonancia y por lo tanto el estilbeno metoxilado es menos antioxidante.

Los radicales centrados en el nitrógeno como el DPPH• reaccionan con los compuestos fenólicos por dos mecanismos diferentes: a) por la abstracción directa de un átomo de hidrógeno del fenol, y b) por la transferencia de un electrón del anión fenóxido al DPPH•. La contribución de cada reacción depende del potencial redox de cada uno de los compuestos involucrados y el solvente utilizado. Generalmente en solventes apolares predomina el primer tipo de reacción, mientras en solventes polares, como el metanol empleado en la prueba, el segundo mecanismo es el que predomina (Villaño et al., 2007). La aplicación tópica de antioxidantes tiene efectos fotoprotectores ya que pueden disminuir el daño cutáneo inducido por la RUV al suplementar las reservas de antioxidantes de bajo peso molecular en la piel (Pinell, 2003). Debido a lo anterior, la aplicación de los estilbenos y el extracto metanólico pueden contribuir al efecto fotoprotector de *Y. periculosa*.

9.2.2 Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región del UV-B del extracto y los compuestos aislados: Fotoprotección empleando un modelo bacteriano

La capacidad fotoprotectora de los compuestos aislados y del extracto metanólico se evaluó de acuerdo al modelo propuesto por Avila et al., 2005.

En la figura 5 se presentan los resultados del experimento de irradiación de suspensiones bacterianas sin protección. La curva de sobrevivencia fue una cinética exponencial característica de las curvas de mortalidad bacterianas (datos no mostrados). El ajuste de la curva exponencial a una recta indica que el efecto de la luz UV-B sobre la población de *E. coli* es de un solo impacto, ya que solo se presenta una recta con un valor único para la pendiente (K) (Davis y Dulbecco, 1996). Lo anterior implica que la luz altera a un componente celular muy importante que compromete la sobrevivencia de la bacteria en los primeros minutos de exposición sin dar oportunidad de activar los mecanismos de reparación apropiados que permitirían la viabilidad bacteriana. Lo anterior se ve reflejado por el valor de la constante de mortalidad ($K=0.8776$), este parámetro indica el rango de la inactivación o muerte bacteriana con respecto al tiempo.

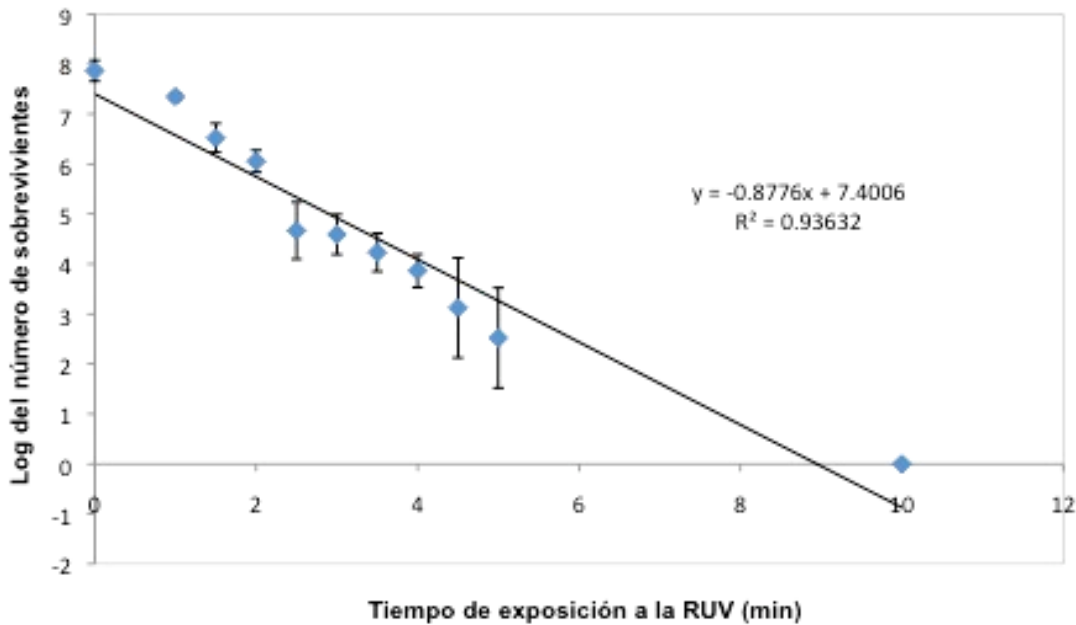


Figura 5. Muerte celular inducida por la RUV en *E. coli*: experimento sin protección.

La luz ultravioleta produce cambios fotoquímicos en el ADN bacteriano provocando la muerte celular. Se estima que la exposición de un cultivo bacteriano a la RUV produce la disminución rápida de la población debido a las alteraciones directas en el material genético lo que se observa en la primera parte de las curvas de mortalidad (Eisenstark, 1998; Taghipour, 2004; Jungfer et. al., 2007). La exposición de una población bacteriana a la RUV produce especies reactivas de oxígeno las cuales reaccionan con otros componentes celulares (proteínas, lípidos, etc.) alterando su función y pueden contribuir de forma secundaria al daño celular causado por la RUV (Taghipour, 2004). Lo anterior explicaría el efecto letal de la RUV en la bacteria *E. coli* que se refleja en una cinética de muerte lineal en la curva de mortalidad del experimento sin protección. A los 3 minutos de irradiación el tamaño de la población bacteriana es de 4 órdenes de magnitud logarítmica menor con respecto al inóculo inicial ($\pm 10^4$ bacterias/ml), esto indica que la población viable es significativamente menor y al continuar con la exposición a la RUV, el daño que se produce en los componentes celulares es letal por lo que a los 10 minutos se produce la muerte de toda la población.

La capacidad fotoprotectora del parsol, el extracto metanólico y los tres metabolitos aislados de *Y. periculosa* se muestran en la figura 6. Cabe mencionar que en todos los casos el efecto letal de la luz UV en la población de *E. coli* mostró, en la curva de sobrevivencia, una cinética exponencial característica de las curvas de mortalidad bacterianas (datos no mostrados) Los parámetros obtenidos de los experimentos de desafío a partir de los ajustes de cada una de las curvas exponenciales a una recta se presentan en el cuadro 20.

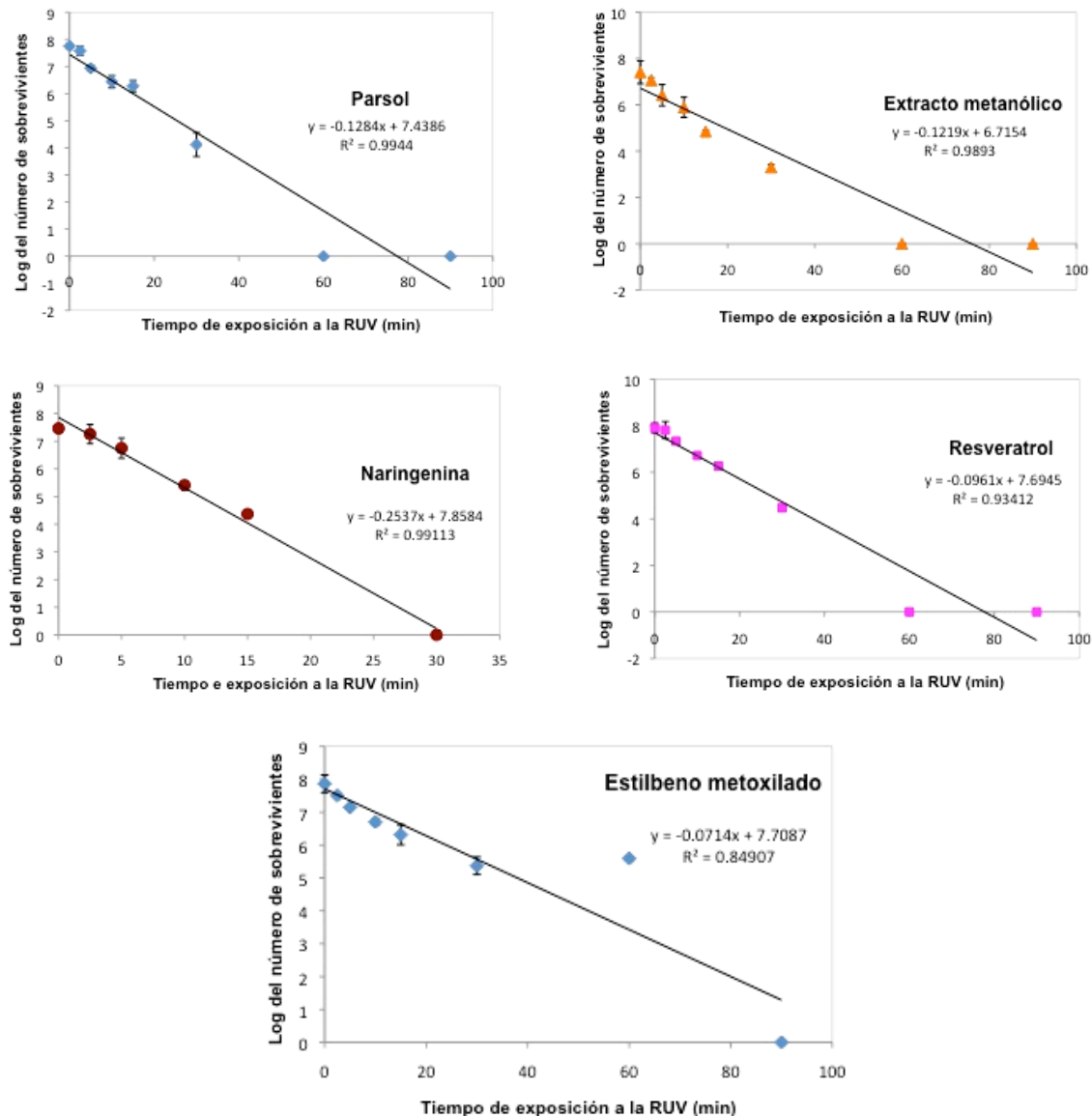


Figura 6. Muerte celular inducida por la RUV en *E. coli*: experimentos con protección.

En la figura 6 se observa claramente que la naringenina es la sustancia que tiene una menor actividad fotoprotectora por que la muerte de toda la población bacteriana ocurre a los 30 minutos de exposición. Por otra parte, el extracto metanólico, el resveratrol y el parsol protegen de manera similar a la población de *E. coli* de la muerte celular causada por la RUV debido a que la muerte de toda la población bacteriana se alcanza a los 60 minutos de exposición a la RUV. Finalmente, el estilbeno metoxilado es el compuesto que tiene la mayor capacidad fotoprotectora (90 minutos).

Cuadro 20. Coeficientes de determinación (R^2) y constantes de mortalidad (K) de los experimentos de irradiación bacteriana con y sin protección.

Sustancia	K	R^2	Protección de la muerte celular (min)
Metanol	0.8776	0.9363	5
Parsol	0.1284	0.994	30
Extracto metanólico	0.1219	0.989	30
Naringenina	0.2537	0.9911	15
Resveratrol	0.0961	0.934	30
Estilbeno metoxilado	0.0714	0.8491	60

De los metabolitos aislados de la corteza de *Y. periculosa*, la naringenina es la que presenta menor efecto fotoprotector (Figura 6, Cuadro 20). Como se mencionó en los resultados de la primera etapa, la naringenina tiene una λ_{max} de absorción a los 288 nm la cual se encuentra en el límite del rango de la RUV-B (280 a 320 nm) lo cual limita la fotoprotección que puede brindar esta sustancia, al evitar la muerte celular inducida por la RUV en *E. coli* puesto que los experimentos se llevaron a cabo a los 312 nm. Aunado a lo anterior, la naringenina tiene el coeficiente de extinción más bajo ($\epsilon = 7\ 745$) comparado con los estilbenos, este hecho implica que la flavanona es menos eficiente para absorber la RUV. Sin embargo al comparar su actividad con el experimento sin protección observamos que la flavanona protege de la muerte celular a las suspensiones bacterianas durante 15 minutos, alcanzando la muerte de toda la población a los 30 minutos de exposición a la RUV-B. También se observa que presenta una constante de mortalidad 3.5 veces menor que los experimentos sin protección ($K=0.2537$).

La fotoprotección del parsol, el extracto metanólico y el resveratrol es similar como se observa en la figura 6. Estas sustancias protegen a las bacterias de los daños producidos

por la RUV-B, puesto que la muerte de toda la población ocurre hasta los 60 minutos de exposición. Además de lo anterior, la constante de mortalidad es entre 7 y 9 veces menor a la del experimento sin protección ($K=0.8276$) lo que indica que la muerte bacteriana ocurre de manera más lenta, es por ello que la reducción de la población del inóculo inicial en cuatro órdenes de magnitud logarítmica ocurre hasta los 30 minutos de irradiación (Cuadro 20). Lo anterior demuestra la capacidad fotoprotectora del parsol, el extracto metanólico y el resveratrol.

El parsol mcx es el filtro solar más utilizado en el mundo en diversas formulaciones cosméticas. En general se considera que este compuesto tiene un bajo potencial para generar reacciones de fotosensibilidad y fotoalergia. A pesar de lo anterior, la fotoestabilidad del parsol es un punto muy importante a considerar en las formulaciones para los filtros solares (Bonda, 2005) debido a que la luz solar afecta la eficacia de este compuesto para absorber la RUV ya que después de 20 minutos de exposición se presenta un efecto hipsocrómico, ocurre una fotoisomerización (*trans* a *cis*) (Figura 7) y además disminuye su coeficiente de extinción (*trans* $\lambda_{\max}=310$ nm, $\epsilon=24\,000$ M⁻¹ cm⁻¹; *cis* $\lambda_{\max}=301$ nm, $\epsilon=12\,600$ M⁻¹ cm⁻¹) (Shaath, 1997; Pattannaargson et al., 2004). Posteriormente se ha documentado que ocurre la degradación del compuesto rápidamente al generar fotoproductos en la formulación, pues se detecta un incremento en la absorbancia en longitudes de onda superiores a los 375 nm, lo que indica la presencia de compuestos que absorben en la región de luz visible que pueden interactuar con los componentes celulares de la piel (Bonda, 2005).

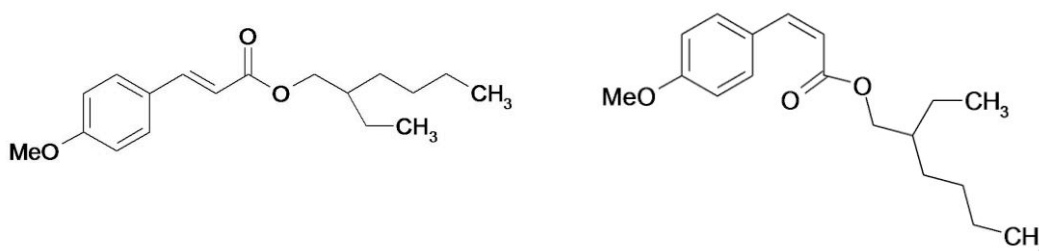


Figura 7. Isómeros *trans* y *cis* del parsol (etil-hexil-*p*-metoxicinamato).

La constante de mortalidad ($K=0.0714$) de los experimentos en los que las suspensiones bacterianas fueron irradiadas y protegidas con el estilbeno metoxilado es 12 veces menor comparada con el experimento sin protección ($K=0.8879$) y al resto de las sustancias

evaluadas en este trabajo (Figura 6), mostrando una mayor capacidad fotoprotectora. El valor de R^2 es de 0.849 y es menor que en los experimentos anteriores debido a que en el periodo de los 30 a los 60 minutos de exposición a la RUV se mantiene la población en 100 000 bacterias/ml, fenómeno que no ocurre cuando se protege con las otras sustancias (Cuadro 20). Lo anterior indica que la cinética de mortalidad que se presenta en los experimentos protegidos con este estilbeno es multiimpacto, esto implica que la RUV afecta varios blancos celulares importantes para la sobrevivencia bacteriana (Davis y Dulbecco, 1996) y que además durante el tiempo de exposición se activan los mecanismos de reparación molecular ante diferentes situaciones de estrés, como es el caso de la exposición a la RUV, lo que produce la activación o sobreexpresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes como la CAT y la SOD, así como proteínas de reparación y protección al ADN (Eisenstark, 1998). Se ha propuesto que estos mecanismos reparan los daños causados por la RUV-B en la fase de meseta de las curvas de mortalidad (Taghipour, 2004).

La eficacia en la protección de las soluciones bacterianas aumenta en el siguiente orden: naringenina < parsol, extracto metanólico, resveratrol < estilbeno metoxilado.

9.2.3 Isomerización de los estilbenos de la *Y. periculosa* por efecto de la RUV-B

Durante el desarrollo de los experimentos se observó que las soluciones del extracto metanólico y de los estilbenos cambian de color de manera proporcional con el tiempo de irradiación al que habían estado expuestos. Debido a lo anterior, se decidió recuperar las muestras y obtener los espectros de absorción en la región UV-B del espectro electromagnético de cada una de las sustancias en cada uno de los tiempos de exposición que se fijaron para llevar a cabo los experimentos de desafío con la suspensión bacteriana de *E. coli*.

La exposición de las soluciones metanólicas del extracto metanólico de *Y. periculosa* (2 mg/ml) a la RUV-B durante los diferentes intervalos de tiempo (2.5 a 90 minutos) produce una disminución en la eficacia para absorber la radiación afectando de esta forma su capacidad fotoprotectora (Figura 8). De igual forma, la exposición de las soluciones metanólicas del resveratrol (Figura 9) y el estilbeno metoxilado (Figura 10) a la RUV-B produce una disminución en la capacidad de absorber la luz a los 305 nm y 316 nm respectivamente, en relación al tiempo de exposición.

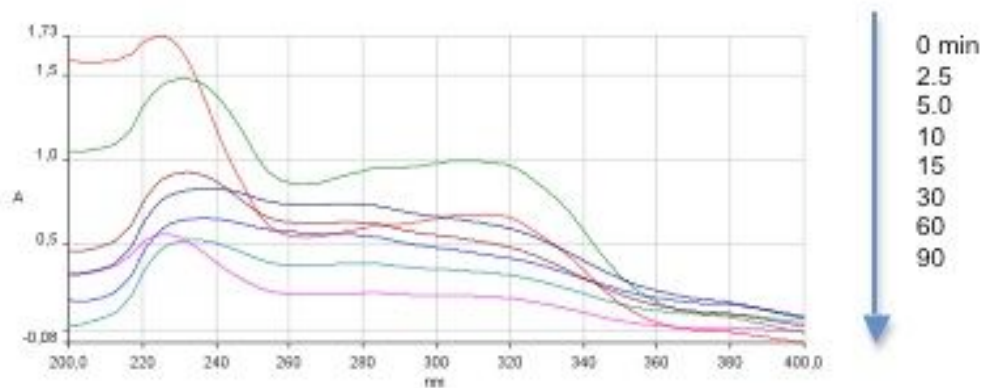


Figura 8. Espectros de absorción del extracto metanólico de *Y. periculosa* irradiados a diferentes tiempos con luz UV-B (312 nm).

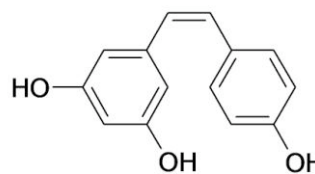
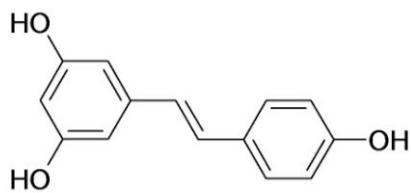
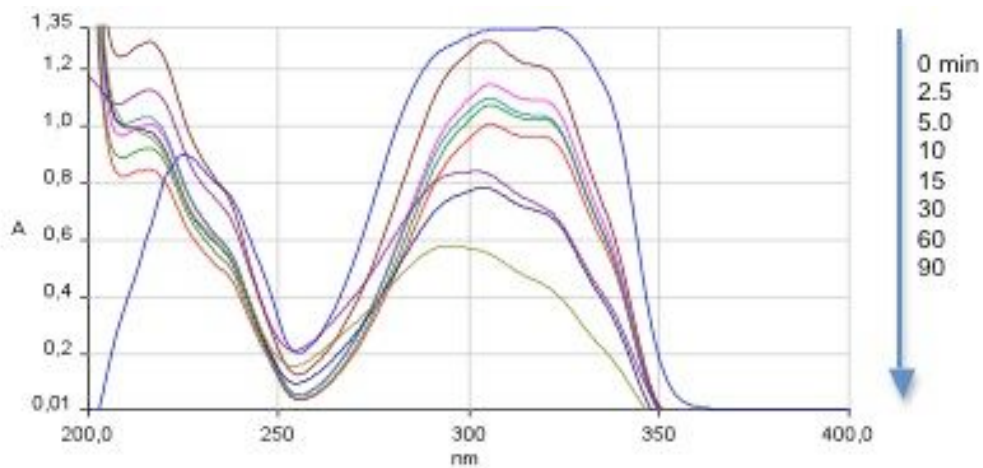


Figura 9. Espectros de absorción del resveratrol irradiados a diferentes tiempos con luz UV-B (312 nm).

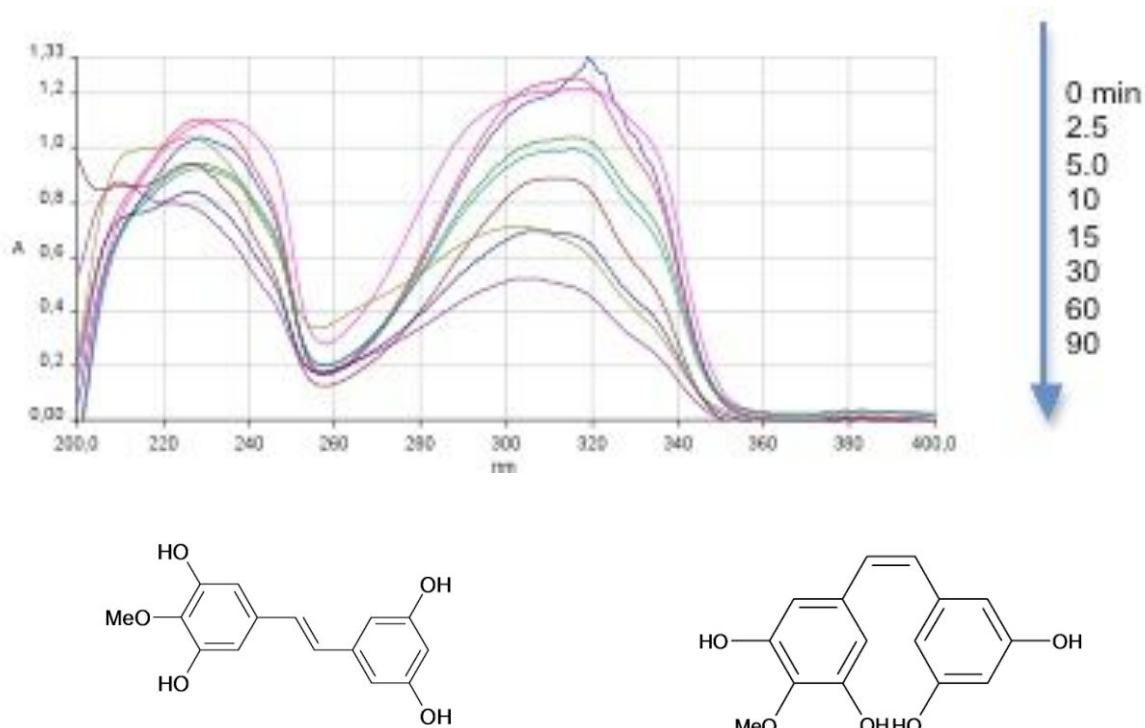


Figura 10. Espectros de absorción del estilbeno metoxilado irradiados a diferentes tiempos con luz UV-B (312 nm).

El fenómeno observado en los tres casos es similar a lo que ocurre en diversos filtros solares comerciales como en el caso del parsol (Sección 9.2.2) y el padimato-O. Este último compuesto es un *para*-aminobenzoato disustituido con una λ_{\max} a los 307 nm (Shaaf, 2005). Cuando se expone el padimato-O a la RUV en simuladores solares después de 20 minutos de exposición, este filtro solar pierde todo su potencial fotoprotector (Serpone et al., 2002; Serpone et al., 2007).

El esqueleto estructural de los estilbenos comprende dos anillos aromáticos unidos por un doble enlace, la presencia de éste permite la formación de los isómeros *trans* y *cis*, que corresponden a los diastereoisómeros *E* y *Z* respectivamente (Seeram et al., 2006). Los estilbenos presentan grupos cromóforos capaces de absorber la RUV, emiten fluorescencia y cuando se encuentran en solución y son expuestos a la luz (visible y RUV) llevan a cabo la fotoisomerización de *trans* a *cis* (Momotake y Arai, 2004; Montsko et al., 2007). Este proceso ocurre cuando una molécula en estado excitado inicial pasa a un estado excitado de menor energía, el cual no mantiene la geometría inicial, de tal forma que los productos en el estado basal son isómeros de la molécula original (Martincigh et al., 1999). La fotoisomerización generalmente produce una disminución en la capacidad

de absorber la RUV debido al impedimento estérico, esto se refleja en la menor intensidad de los picos de absorción lo que puede afectar su capacidad fotoprotectora ya que además de cambiar su potencial para absorber la RUV se ha reportado, en el caso del resveratrol, que el isómero *cis* tiene propiedades biológicas diferentes al *trans* (Orallo, 2006; Seeram et al., 2006). Es importante mencionar, que los filtros solares no tienen el mismo comportamiento en estado líquido que en estado sólido, como es el caso de las formulaciones cosméticas por lo que es necesario realizar estudios en ese aspecto.

9.3 Resumen de resultados y conclusiones de la segunda etapa

A partir de los resultados de la decoloración del DPPH• se determinó que el extracto metanólico y los estilbenos aislados de *Y. periculosa* tienen una moderada capacidad antioxidante. Además, se observó que el extracto metanólico y el resveratrol mostraron una fotoprotección similar al parsol al proteger hasta los 60 minutos a las bacterias de la muerte celular provocada por la exposición a la RUV-B y que el estilbeno metoxilado fue la sustancia aislada de la *Y. periculosa* que tiene una mayor actividad fotoprotectora. A partir de estos resultados se estableció que los dos estilbenos y el extracto metanólico pasarían a la siguiente fase del estudio para determinar el efecto fotoprotector de estos compuestos en los modelos animales irradiados de manera aguda y sub-crónica.

Es importante mencionar que aunque la naringenina fue la sustancia que protegió por menos tiempo a las bacterias y no mostró en este estudio actividad antioxidante, existen reportes que indican que la administración de esta flavanona en cultivos de queratinocitos humanos promueve los sistemas de reparación para la remoción de los DCP del ADN inducidos por la RUV (El-Mahdy et al., 2008). Debido a lo anterior se decidió que esta sustancia también sería evaluada en la tercera etapa de este trabajo.

10. Tercera etapa

10.1 Metodología

10.1.1 Modelo agudo en cuyos de la cepa Hartley para la evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto y los compuestos aislados de *Y. periculosa*

10.1.1.1 Determinación del factor de protección solar (FPS)

A partir de la irradiación de las zonas dorsales de cuyos (con y sin protección) se determinó el factor de protección solar (FPS) del extracto metanólico y de los compuestos aislados de *Y. periculosa*, también se realizó un estudio histopatológico que permitió comparar el efecto fotoprotector de los diferentes tratamientos en la piel irradiada con luz UV-B.

Para realizar este estudio se emplearon hembras de cuyos de la cepa Hartley con un peso aproximado de 500g. Los animales se mantuvieron en el bioterio de las FES-Iztacala, los cuales se aclimataron al menos una semana antes de realizar los experimentos, tuvieron disposición de agua y alimento (Purina Chow 5025) *ad libitum*, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con una temperatura de 23 a 25°C y a una humedad relativa del 45-55 %.

Los tratamientos consistieron en siete grupos con cinco cuyos cada uno (5n), los cuales se distribuyeron al azar. El primer grupo recibió la aplicación tópica de 0.2 g de gel Soavence forte que se utilizó como vehículo en los siguientes tratamientos. Al segundo grupo se le aplicaron 2 mg/cm² de parsol, un filtro comercial de acuerdo a las dosis estipuladas por la Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) (Pathak, 1992). Del tercer y hasta el sexto grupo se les aplicó el extracto metanólico o alguno de los compuestos aislados a la misma dosis que el filtro comercial (naringenina, resveratrol y *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno). Del primer al séptimo grupo se expusieron a la RUV, mientras que el último grupo sirvió como testigo y fue manipulado igual que los otros grupos pero no recibió ningún tratamiento.

Las zonas dorsales de los cuyos se afeitaron con una rasuradora eléctrica y se depilaron empleando una crema depiladora Veet para piel sensible. Posteriormente, se lavó la zona depilada. Después de 16 horas, la piel de la zona dorsal de cada cuyo se cubrió dejando ventanas de exposición de 2 cm² donde se aplicaron 2 mg/cm² de las sustancias a evaluar o del vehículo (Soavence forte y metanol 4:1). Las ventanas de exposición se

prepararon con cinta adherible y papel aluminio, tres de cada lado de la zona de la espina dorsal.

El lapso de tiempo entre el tratamiento tópico y la irradiación con luz UV-B fue de aproximadamente de 15 minutos. Los animales se colocaron en sujetadores a 15 cm de separación de la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La energía de irradiación a esta distancia es de 0.60 J/cm² (intensidad de campo 130 watt/m²) calculada con un radiómetro calibrado (Spectroline DM-300HA).

Los animales se irradiaron a diferentes lapsos de tiempo (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 minutos). Concluido cada tiempo se cerró la ventana de exposición correspondiente. Si existía evidencia de eritema antes de cerrar la última ventana se daba por concluido el experimento (Figura 11).

La formación del eritema se evaluó 24 horas después del experimento, usando como referencia la piel adyacente no expuesta del animal y la del grupo testigo, definiendo el eritema como el enrojecimiento claro en cuatro puntos, es decir en las cuatro esquinas de la ventana de exposición a la RUV. El valor de 1 DEM (dosis eritematogénica mínima) que corresponde al tiempo de irradiación que provoca enrojecimiento detectable en el área expuesta se determinó previamente y corresponde a 20 minutos de exposición a la dosis antes mencionada. El factor de protección solar se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Bissett et al., 1987):

$$\text{FPS} = \frac{\text{Dosis de UV que provoca 1 DME con protección}}{\text{Dosis de UV que provoca 1 DME sin protección}}$$

El análisis estadístico entre los tratamientos y dentro de cada tratamiento se determinó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Cuyos de la cepa Hartley



Cuyos con la crema para depilar



Cuyos depilados



Colocación de las camisas



Irradiación

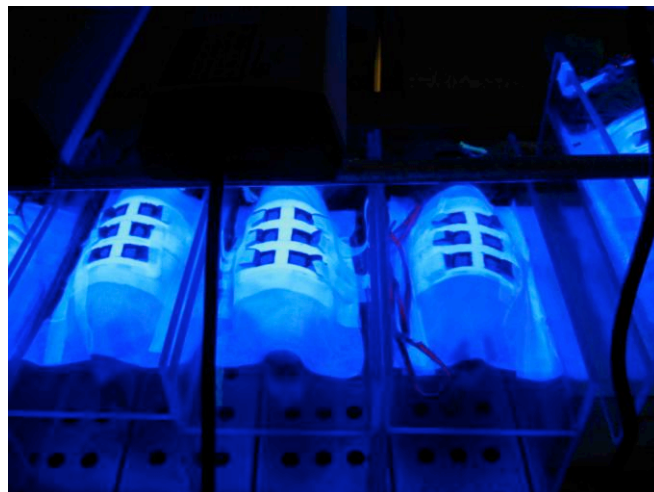


Figura 11. Modelo agudo de irradiación en cuyos.

10.1.1.2 Estudio histopatológico

Los modelos animales permiten evaluar el efecto de la RUV en diversos procesos fisiológicos como la formación del eritema y la inflamación. A partir de los experimentos para la determinación del FPS de cada una de las sustancias se tomaron 105 muestras de piel de aproximadamente 25 mm² de las siguientes áreas: la no expuesta a la RUV; de la dosis eritematogénica (DEM); y una anterior (suberitematogénica) (S-DEM). Las muestras se conservaron en formaldehído al 10% disuelto en buffer de fosfatos 0.1M pH 7 durante 24 horas. Posteriormente, se deshidrataron según la técnica histológica estándar para incluir las muestras en parafina y realizar 3 preparaciones con 4 cortes histológicos a 5 µm de cada una. Los cortes se tiñeron con eosina y hematoxilina (Elenitsas et al., 1997). A cada muestra se le asignó una clave sin tener ninguna relación con el grupo experimental al que pertenece.

El estudio histopatológico consistió en la evaluación de la epidermis donde se tomó en cuenta la lesión (grado, extensión y curso), queratinización, proliferación epitelial, formación de edema, úlceras, necrosis y la cantidad de células de quemadura. En la dermis se evaluó la infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares, hemorragia y congestión (edema perivenular) (Cuadro 21). El diagnóstico se basó en lo reportado para quemadura por irradiación de luz UV-B de tipo agudo comparándolo con el tejido de piel de cuyo sin protección con relación a los tejidos protegidos con las sustancias fotoprotectoras (Fitzpatrick y Bernhard, 2005; Lowe y Friedlander, 1997; McGregor y Hawk, 2001).

La revisión de las muestras se realizó a doble ciego, por lo tanto, al momento de hacer el diagnóstico no se conoce la procedencia de la muestra. Una vez realizado el diagnóstico histopatológico éste se confirmó con el Biól. José del Carmen Benítez Flores, especialista en histopatología.

Cuadro 21. Descripción de los daños principales en la piel por efecto de la RUV (Fitzpatrick y Bernhard, 2005).

Tejido	Lesión	Descripción del daño
Epidermis	Hiperqueratosis	Engrosamiento del estrato córneo
	Ortoqueratosis	Estrato córneo puede parecer cualitativamente similar a la capa espinosa normal
	Paraqueratosis	Cornificación defectuosa y acelerada que conduce a la retención de núcleos picnóticos de células epidérmicas
	Acantólisis	Perdida primaria de cohesión de las células epidérmicas
	Disqueratosis	Cornificación prematura de células individuales en las capas viables de la epidermis
	Espongiosis	Pérdida secundaria de cohesión entre células por flujo tisular en la epidermis
Dermis	Edema	Presencia de líquido tisular lo que provoca separación de las fibras de colágena
	Infiltrados inflamatorios	Presencia de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, etc.
	Congestión	Incremento en el flujo sanguíneo en un vaso sanguíneo o capilar
	Hemorragia	Presencia de eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos o capilares

10.1.2 Modelo sub-crónico en ratones SKH-1 para la evaluación de la capacidad fotoprotectora de los compuestos aislados de *Y. periculosa*.

10.1.2.1 Estudio histopatológico

Los ratones SKH-1 (Charles River) tienen una mutación espontánea en el alelo *hr* que les produce la pérdida de pelo y un incremento considerable en cuanto a la sensibilidad a la luz UV y al desarrollo del cáncer de piel. La irradiación de ratones hembras SKH-1 (con y sin protección) permitió determinar el efecto fotoprotector de los metabolitos secundarios de *Y. periculosa* mediante un estudio histopatológico en la piel de estos animales.

Los ratones hembras SKH-1 de 6 a 8 semanas de edad fueron mantenidos en el bioterio de las FES-Iztacala. Los animales se aclimataron al menos una semana antes de realizar los experimentos. Los ratones se mantuvieron con agua y alimento (Purina Chow 5001)

ad libitum, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, a una temperatura de 23 a 25°C y con una humedad relativa del 45-55%.

Los tratamientos consistieron en nueve grupos, los cuales se describen en el cuadro 22. Los compuestos aislados de *Y. periculosa* se aplicaron de forma tópica en la parte dorsal de cada animal 2 mg de cada sustancia disuelta en 200 µl de etanol al 90%. Las sustancias se aplicaron 10 minutos antes de llevar a cabo la irradiación.

Cuadro 22. Tratamientos para la evaluación del efecto fotoprotector en ratones SKH-1.

Tratamiento	No. Animales
1. Testigo (sin ninguna manipulación)	3
2. Etanol	3
3. Etanol + UV	6
4. Naringenina + Etanol	3
5. Naringenina + Etanol + UV	5
6. Resveratrol + Etanol	5
7. Resveratrol + Etanol + UV	5
8. Estilbeno metoxilado + Etanol	5
9. Estilbeno metoxilado + Etanol + UV	5

Los animales se colocaron en cajas de acrílico especiales para la irradiación a 15 cm de separación de la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La energía de irradiación a esta distancia es de 0.60 J/cm² (intensidad de campo 130 watt/m²) calculada con un radiómetro (Spectroline DM-300HA). Las lámparas fueron sistemáticamente alternadas para compensar o minimizar cambios en el flujo de las mismas. En estos experimentos sub-crónicos el tiempo de irradiación en el que los animales estuvieron expuestos fue de 45 s cada tercer día durante 15 días (9 exposiciones) (Figura 12).



Mantenimiento de los ratones SKH-1



Aplicación de los tratamientos



Cámaras de irradiación

Figura 12. Modelo sub-crónico de irradiación en ratones sin pelo SKH-1.

El sacrificio de los animales se realizó 24 h después de la última exposición a la RUV en cámaras de CO₂, y se tomaron las muestras de piel del centro de la zona dorsal de cada uno de los animales para determinar si los tratamientos previenen del daño histopatológico sub-crónico causado por la RUV en la piel de ratón RUV así como también su efecto en los sistemas antioxidantes endógenos en la piel.

Las muestras de piel se fijaron 24 h en paraformaldehído al 10% en PBS, posteriormente se deshidrataron e incluyeron en parafina. Se realizaron 3 preparaciones de cada biopsia con un mínimo de 4 cortes cada una. A cada muestra se le asignó una clave sin tener ninguna relación con el grupo experimental al que pertenece. La revisión de los cortes histológicos se realizó a doble ciego, por lo tanto, al momento de hacer el diagnóstico no se conoce la procedencia de la muestra. Al igual que en los experimentos con los suyos, una vez realizado el diagnóstico de las muestras, éste lo confirmó el Biól. José del Carmen Benítez.

10.1.2.2 Protección contra la disminución de los antioxidantes endógenos de la piel de ratones SKH-1

La exposición de la piel a la RUV induce la producción de especies reactivas de oxígeno capaces de reaccionar con diversas biomoléculas como los lípidos. La piel posee diversos mecanismos enzimáticos antioxidantes que protegen a las células del estrés oxidativo, los cuales disminuyen al ser expuesta ésta a la RUV. En el presente estudio se determinó la actividad de la GPx, la CAT y la SOD como enzimas antioxidantes en fracciones citosólicas de epidermis de piel de ratón SKH-1 expuesta a la RUV con y sin protección.

Preparación de las fracciones citosólicas y membranales

Después de la irradiación se tomaron muestras de piel de 1.5 cm x 5 cm, 0.6 mm de profundidad, las cuales se incubaron toda la noche en una solución de 5 U/ml de diaspasa (Invitrogen). Posteriormente, la epidermis se separó de la dermis con pinzas (Figura 13). La epidermis se disgregó en un politrón en PBS con KCl. Se centrifugó a 18000 g por 15 minutos a 4°C. De esta forma se obtuvieron las fracciones citosólicas y membranales al 10% (peso/volumen) (Afaq et al., 2003). Las muestras se congelaron a -80 °C.



Separación de la epidermis



Epidermis

Figura 13. Procedimiento para la obtención de la epidermis de ratón SKH-1.

Catalasa (CAT)

El ensayo de la actividad de la CAT se determinó por el método descrito por Beers y Sizer, 1952. El peróxido de hidrógeno absorbe la luz en la región UVC del espectro electromagnético. Debido a lo anterior, se puede medir la descomposición del H₂O₂ a 240 nm. La diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo es una forma de medir la actividad de la catalasa.

La mezcla de reacción consistió en un amortiguador de fosfatos 0.05 M a pH 7.0, 0.019 M de H_2O_2 y de 20 a 30 μg de la fracción citosólica, con un volumen final de 1.5 ml. El cambio en la absorbancia se midió a 240 nm. La actividad de la catalasa es expresada en nmol de H_2O_2 consumidas/min/mg de proteína.

Se aplicó una prueba de t de Student para determinar las diferencias significativas de los tratamientos respecto al grupo testigo.

Glutación peroxidasa (GPx)

Los niveles de GPx se midieron en la fracción citosólica de la epidermis de acuerdo con el método de Paglia y Valentine, 1967. Esta enzima cataliza la oxidación de glutati6n (GSH) utilizando el H_2O_2 . A su vez, el glutati6n oxidado (GSSG) puede regresar a su estado reducido por la enzima glutati6n reductasa con formaci6n equimolar de NADP⁺. En condiciones de equilibrio, las reacciones se realizan de forma c6clica. La disminuci6n en la absorbancia del NADPH a 340 nm es proporcional a la actividad de la glutati6n peroxidasa.

A 100 μl de muestra se le adicionaron 100 μl de reactivo de Drabkin, se mezclaron con 2.5 ml de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.0. Posteriormente se adicion6 en orden 100 μl de NADPH 0.008 M, 10 μl de GSSG-reductasa, 10 μl de $NaNO_3$ 1.125 M y 10 μl de GSH 0.15 M. Se inici6 la reacci6n con 100 μl de H_2O_2 1.0022 M. Se midi6 la absorbancia a 340 nm al tiempo cero y despu6s a los 2 y 9 minutos de iniciada la reacci6n. La actividad enzimática de una unidad de glutati6n peroxidasa se expresa como la cantidad de μmol de NADH oxidados/min/ml de muestra.

Se aplic6 una prueba de t de Student para determinar las diferencias significativas de los tratamientos respecto al grupo testigo.

Super6xido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se determin6 de acuerdo con el m6todo propuesto por Beauchamp y Fridovich, 1971. La dismutaci6n del radical super6xido ($O_{2}^{\bullet -}$) a H_2O_2 es catalizada por la enzima SOD. Debido a la reactividad del sustrato, todos los bioensayos son m6todos indirectos. El flujo de $O_{2}^{\bullet -}$ es generado por la actividad de la xantina oxidasa. La producci6n del $O_{2}^{\bullet -}$ es cuantificado por la reducci6n del NBT a 560nm. La actividad de la enzima super6xido dismutasa presente en la muestra se midi6 por la capacidad de inhibir la reducci6n del NBT.

A 25 μl de la fracción citosólica se le agregó 1 ml de la mezcla de reacción (NBT 2.5×10^{-5} M, xantina 10^{-4} M, EDTA 10^{-4} M y Na_2CO_3 0.05 M). Posteriormente se añadieron de 1 a 10 μl de xantina oxidasa a 2.2×10^{-9} M. Se midió la absorbancia a 560 nm un minuto después de iniciada la reacción. Una Unidad de SOD es la cantidad que causa el 50% de la inhibición de la reducción del NBT.

Se aplicó una prueba de t de Student para determinar las diferencias significativas de los tratamientos respecto al grupo testigo.


10.2 Resultados y discusión de la tercera etapa

10.2.1 Modelo agudo en cuyos de la cepa Hartley para la evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto y los compuestos aislados de *Y. periculosa*

10.2.1.1 Determinación del factor de protección solar (FPS)

La dosis mínima eritematogénica en los cuyos expuestos a 0.60 J/cm^2 (intensidad de campo 130 W/m^2) fue de 20 minutos. Los experimentos realizados de acuerdo con el modelo de Bissett et al., 1987, indican que el filtro comercial parsol tiene un FPS de 2, el extracto metanólico de *Y. periculosa* de 3.4, la naringenina de 3.6, el resveratrol de 5 y el estilbeno metoxilado de 5.6 (Cuadro 23). En todos los tratamientos se observa que las sustancias obtenidas de *Y. periculosa* proporcionan mayor protección que en el control positivo (parsol) en los cuyos expuestos a la RUV, lo cual coincide con el coeficiente de extinción determinado anteriormente.

Cuadro 23. Factor de protección solar (FPS) de las sustancias evaluadas en cuyos.

Sustancia (2 mg/cm^2)	FPS	DME (minutos)	Eritema
Vehículo	- -	20	
Parsol	2.0*	40	
Extracto metanólico	3.4**	68	
Naringenina	3.6**	72	
Resveratrol	5.0*	100	
Estilbeno metoxilado	5.6**	112	

* $p < 0.05$ respecto al vehículo, ** $p < 0.05$ respecto al estilbeno metoxilado, • $p < 0.05$ respecto al resveratrol.

La prueba estadística de Kruskal-Wallis indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Lo anterior sugiere que el grado o la eficacia de la fotoprotección dependen de la sustancia evaluada.

El extracto metanólico y la naringenina tienen un FPS similar puesto que no existen diferencias significativas entre estos tratamientos. En los experimentos de fotoprotección con las bacterias, la flavanona mostró una menor actividad comparada con el extracto. La diferencia en la actividad entre estos dos modelos experimentales se debe a que con las bacterias sólo se evalúa la capacidad que tienen los compuestos de absorber la RUV, mientras que en la determinación del FPS se mide el tiempo de exposición a la RUV

necesario para producir un proceso inflamatorio conocido como eritema. El eritema o inflamación por quemadura solar es la respuesta cutánea aguda más conocida provocada por la RUV y está asociada con los signos clásicos de la inflamación, rubor, calor, dolor y tumefacción (McGregor y Hawk, 2001). La naringenina puede proteger a la piel de la formación del eritema porque es capaz de absorber la radiación y además posee propiedades antiinflamatorias (Erlund, 2004; Hirai et al., 2007) al inhibir al factor de transcripción NF- κ B el cual induce la expresión de enzimas implicadas en el proceso inflamatorio como la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Hämäläinen et al., 2007).

El estilbeno metoxilado y el resveratrol mostraron el mismo nivel de fotoprotección cuando se determinó el FPS, lo cual se debe a la capacidad de ambas sustancias por absorber la RUV (λ_{max} 316 nm, $\epsilon=45,374$ y λ_{max} 305 nm, $\epsilon=37,895$ respectivamente). Aunado a lo anterior, los estilbenos pueden brindar protección a la piel debido a su interacción con procesos celulares que inducen el eritema. Después de la exposición a la RUV en la piel se sintetizan y liberan citocinas (IL1, IL6, IL8, IL 10) y diversos mediadores inflamatorios, como resultado del daño ocasionado a los queratinocitos. Los mediadores del eritema son prostaglandinas, eicosanoides e histamina. Estas moléculas en conjunto regulan la expresión de las moléculas de adhesión del endotelio vascular produciendo la activación y reclutamiento de células mononucleares, además de ser responsables de la vasodilatación (McGregor y Hawk, 2001; Valdivia, 2002). Se considera que la exposición a la RUV estimula la inflamación por los siguientes mecanismos: inducción de la liberación de óxido nítrico, liberación de neuropéptidos, incremento en la proliferación de queratinocitos y engrosamiento del estrato córneo (Honeyman, 2002).

El resveratrol es uno de los compuestos que ha provocado un gran interés en las investigaciones científicas y se han realizado numerosos estudios sobre el mecanismo de acción de este compuesto en los procesos inflamatorios puesto que se ha relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares y el cáncer. El resveratrol inhibe la liberación de mediadores inflamatorios como la histamina, el α -TNF, leucotrienos y prostaglandinas. Aunado a lo anterior, este estilbeno también regula la expresión de las moléculas de adhesión de los vasos sanguíneos previniendo la migración a los tejidos de células inflamatorias así como la formación del edema. Asimismo, el resveratrol también inhibe la expresión de la NOSi, COX-2 por la inactivación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Surh y Kindu, 2006).

10.2.1.2 Estudio histopatológico

Se llevó a cabo la evaluación a nivel histológico de la piel expuesta a la RUV. La piel de cuyo sin ningún tipo de manipulación o tratamiento se muestra en la figura 14, en donde se observa claramente la epidermis con el estrato córneo, así como la dermis en la cual están presentes los folículos pilosos y glándulas sebáceas.

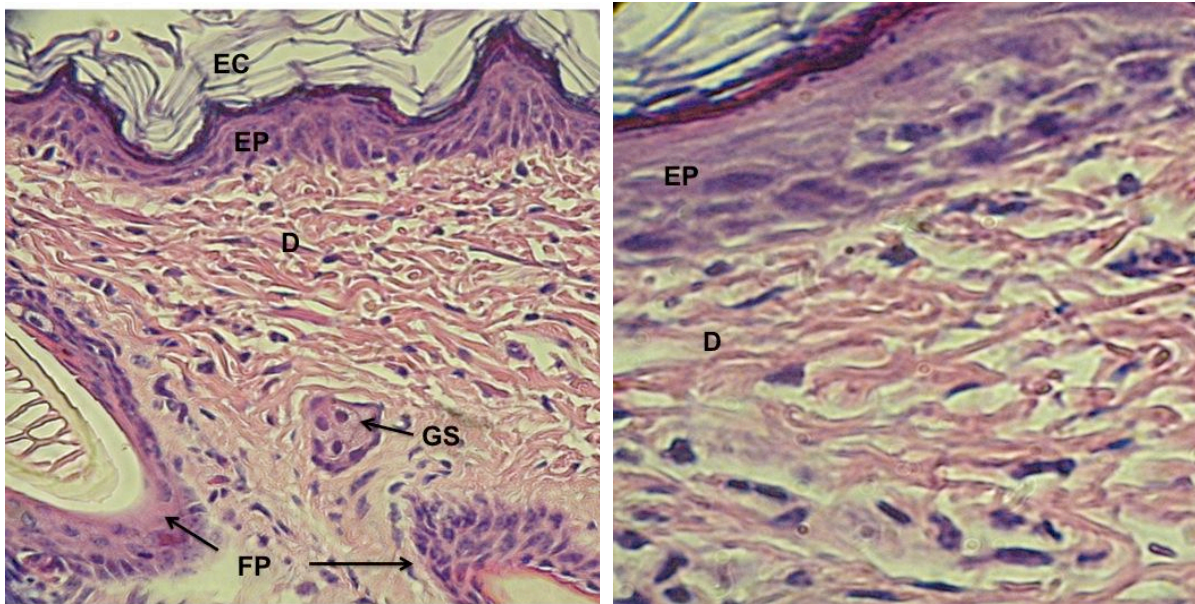


Figura 14. Piel normal de la zona dorsal de cuyo de la cepa Harley. D dermis, EC estrato córneo; EP epidermis; FP folículo piloso; GS glándula sebácea.

El daño histológico que provoca la quemadura solar a los 20 minutos de exposición (1DEM) se observa en la figura 15. La hiperqueratosis en el estrato córneo concuerda con lo reportado por Lowe y Friedlander en 1997 y McGregor y Hawk en el 2001 para la piel expuesta a la RUV. En la epidermis se detectaron abundantes células de quemadura, además de espongiosis de moderada a severa multifocal. En la dermis se observó la congestión de los vasos sanguíneos y edema moderado, ambos eventos de forma multifocal.

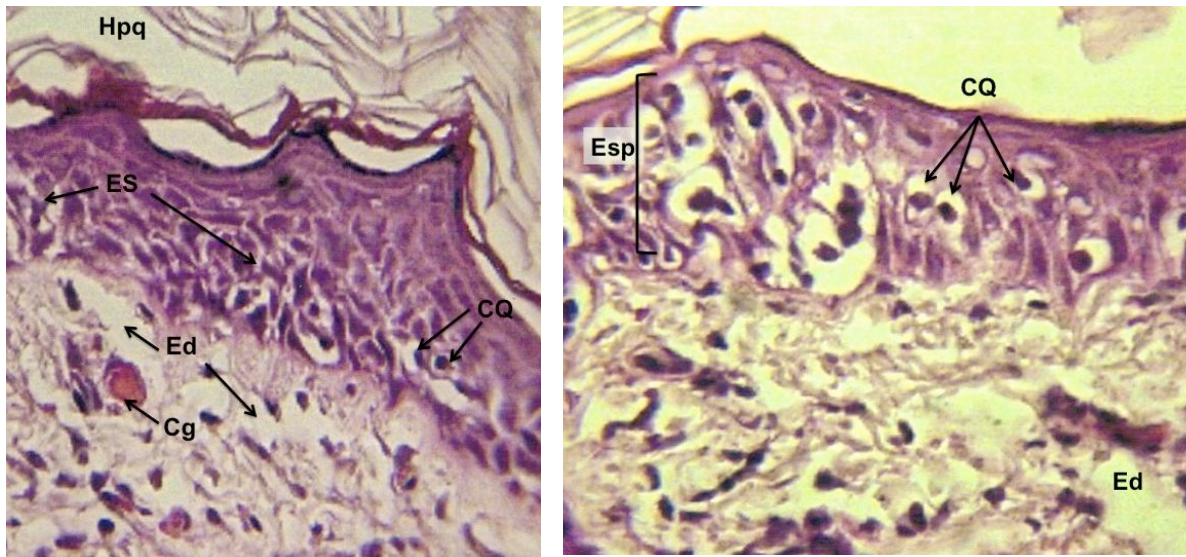
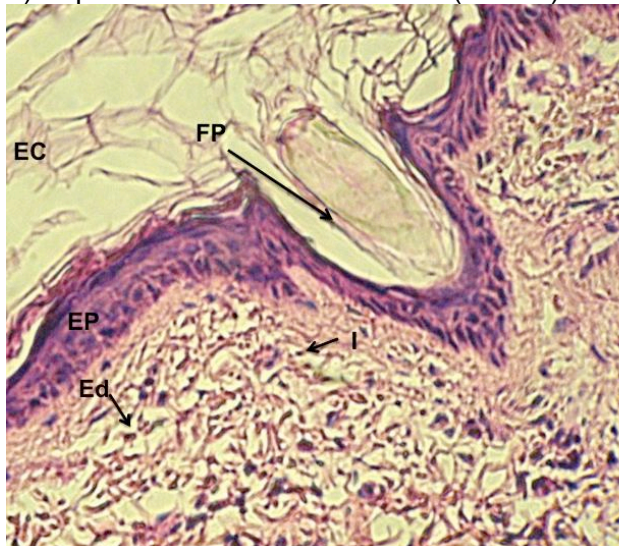


Figura 15. Fotografías de piel de cuyo expuesta a un DEM (20 minutos) sin protección. Cg congestión; CQ células de quemadura; Ed edema; Esp espongiosis; Hpq hiperqueratosis.

La aparición del eritema en los animales tratados con el parsol ocurrió hasta los 40 minutos. El diagnóstico de las muestras tomadas a dosis suberitematogénicas fue de una leve dermatitis con curso agudo debido a que se observó una inflamación leve focalizada debido a la presencia de edema y de células sanguíneas en la dermis. Mientras que a la dosis eritematogénica se observan células de quemadura en la epidermis. Aunado a lo anterior, la congestión de los vasos sanguíneos es multifocal con un edema leve multifocal en la dermis (Figura 16).

a) Exposición a una dosis S-DME (20 min)



b) Exposición a una DEM (40 min)

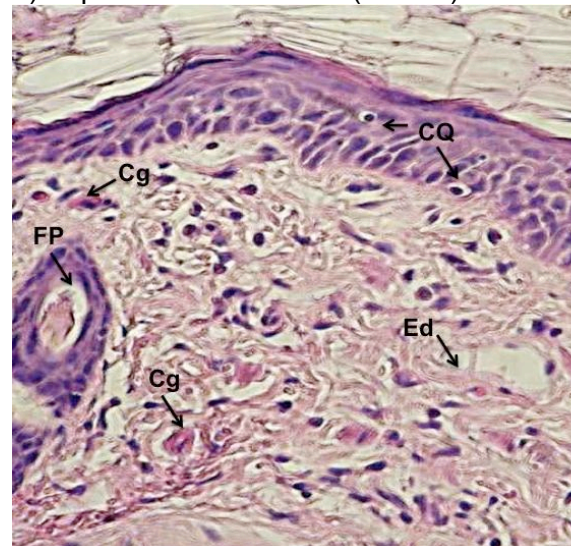
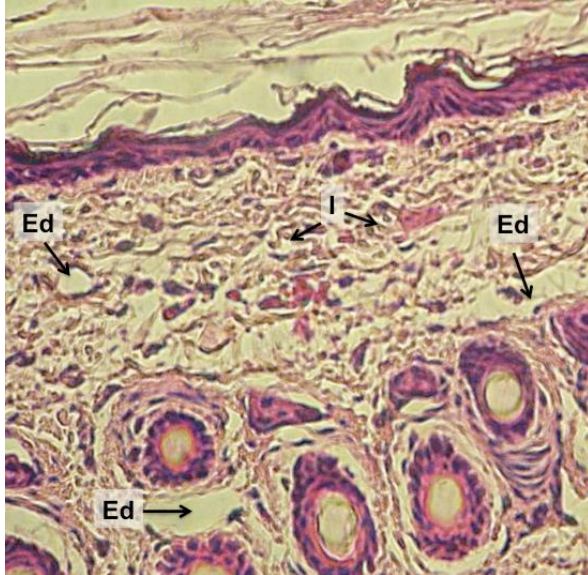


Figura 16. Fotografía de piel de cuyo protegida con el parsol. CQ células de quemadura; EC estrato córneo; Ed edema; EP epidermis; Cg congestión; FP folículo piloso; I infiltrados inflamatorios.

El extracto metanólico de *Y. periculosa* tiene un FPS de 3.4, por lo tanto la aparición de la quemadura solar fue evidente hasta los 68 minutos de exposición. El estudio histopatológico indicó que a dosis suberitematogénicas (40 min) la piel de cuyo protegida con el extracto muestra una inflamación leve como en el caso del parsol, pero a diferencia de este filtro, en la dosis eritematogénicas se observa la presencia de células de quemadura en el epitelio y una hiperplasia leve multifocal (Figura 17).

a) Exposición a una dosis S-DME (40 min)



b) Exposición a una DEM (≈70 min)

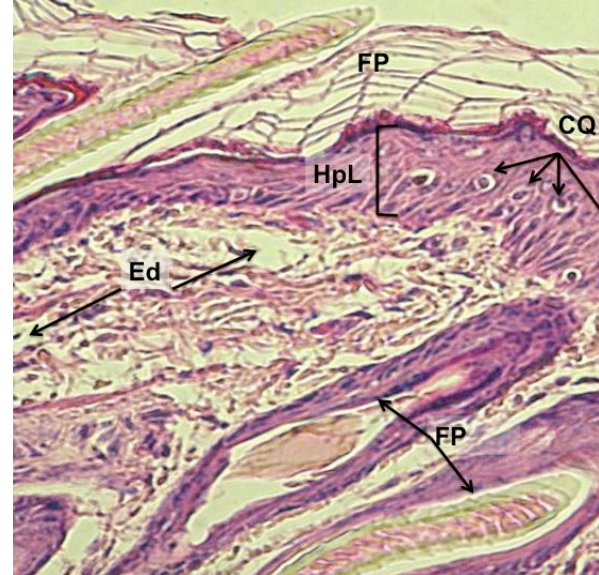
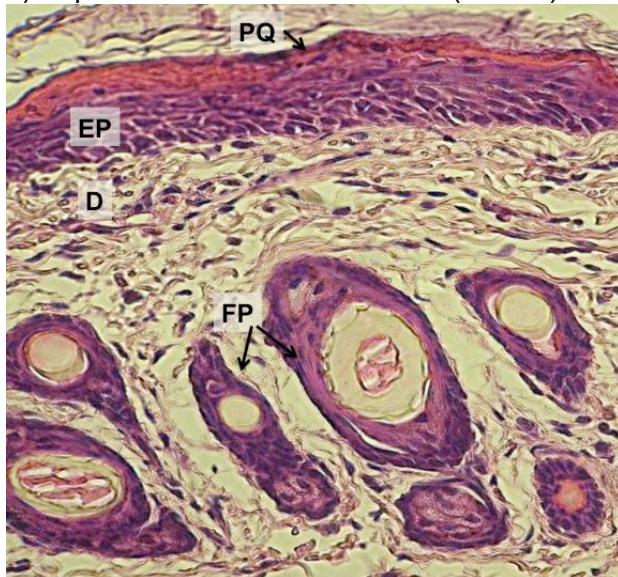


Figura 17. Fotografía de piel de cuyo protegida con el extracto metanólico de *Y. periculosa*. CQ células de quemadura; Ed edema; FP folículo piloso; HpL hiperplasia; I infiltrados inflamatorios.

La naringenina tiene un FPS similar al extracto metanólico de *Y. periculosa*, sin embargo, a nivel tisular los efectos que tienen son distintos, ya que esta flavanona a la dosis suberitematogénica (~40 min) provoca paraqueratosis pero el edema y la congestión es mínimo. A los 72 minutos (dosis eritematogénica), el diagnóstico histopatológico concuerda con un cuadro inflamatorio agudo (figura 18) con extravasación de eritrocitos.

a) Exposición a una dosis S-DME (40 min)



b) Exposición a una dosis DEM (≈70 min)

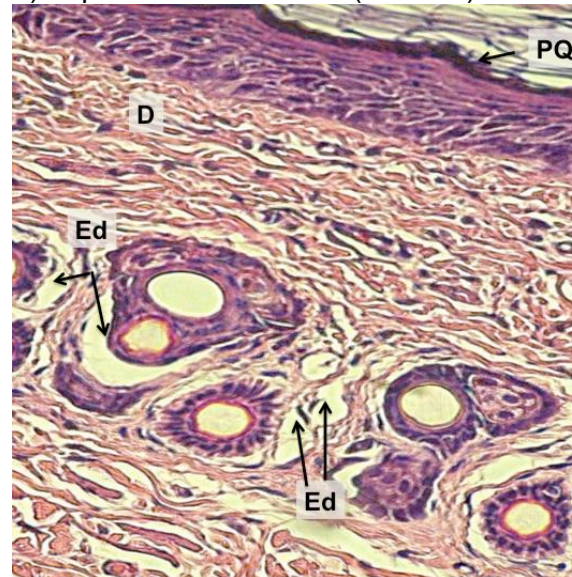
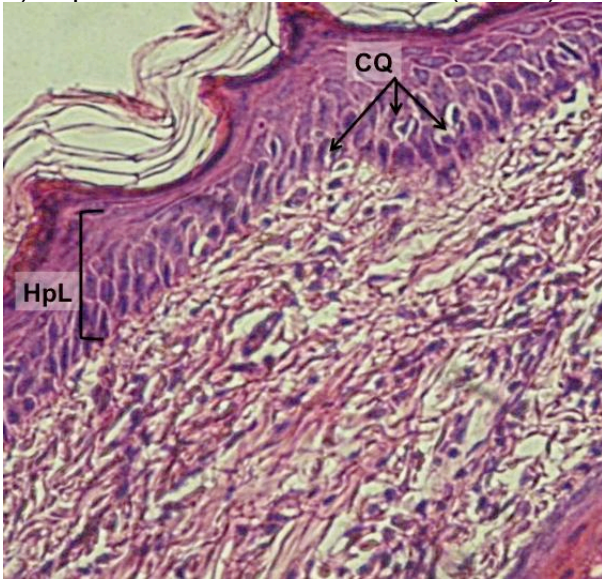


Figura 18. Fotografía de piel de cuyo protegida con la naringenina. D dermis; Ed edema; EP epidermis; FP folículo piloso; PQ paraqueratosis.

El resveratrol y el estilbeno metoxilado tienen valores de FPS similares (5.0 y 5.6 respectivamente). En ambos casos las muestras de piel para las dosis sub-eritematogénicas se tomaron a los 80 minutos de exposición, mientras que las eritematogénicas fue aproximadamente a los 100 minutos. A pesar de estas similitudes en la fotoprotección a nivel macroscópico, podemos observar claramente que el resveratrol produce hiperplasia de la epidermis multifocal moderada, la presencia de diversas células de quemadura de manera difusa, así como hipertrofia focalizada en las células del estrato granuloso de la epidermis (Figura 19). De forma contraria, en el caso del tratamiento tópico del estilbeno metoxilado produce un adelgazamiento de la epidermis o atrofia severa multifocal. En ambos casos se observó la congestión multifocal de los vasos sanguíneos y la presencia de edema leve multifocal (Figura 20).

a) Exposición a una dosis S-DME (80 min)



b) Exposición a una dosis DEM (≈100 min)

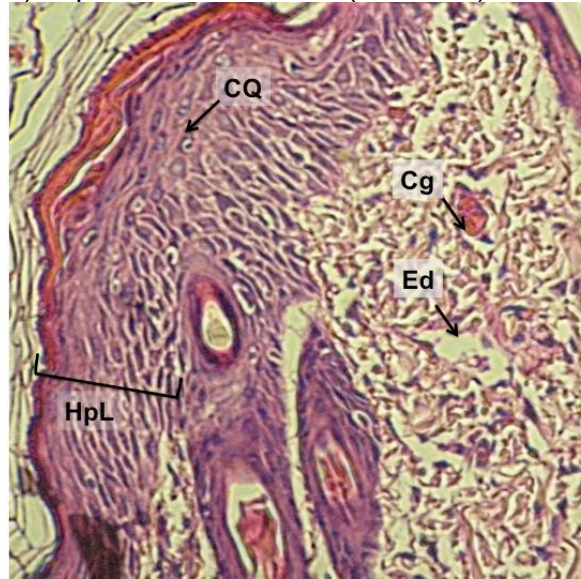
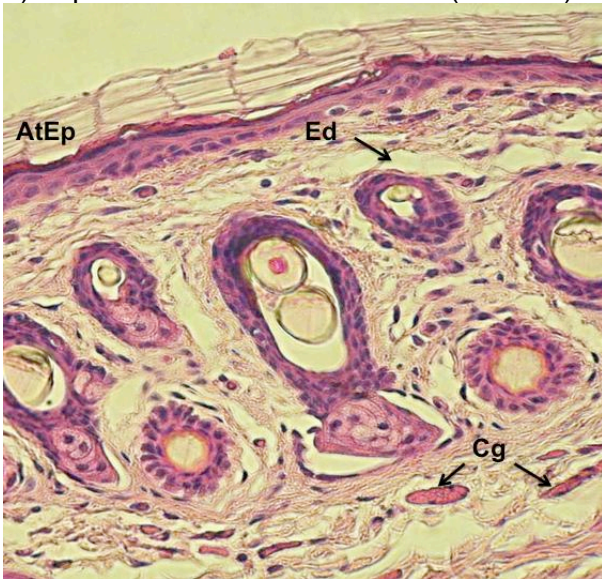


Figura 19. Fotografía de piel de cuyo protegida con el resveratrol. CQ células de quemadura; Cg congestión; Ed edema; HpL hiperplasia.

a) Exposición a una dosis S-DME (≈80 min)



b) Exposición a una dosis DEM (≈120 min)

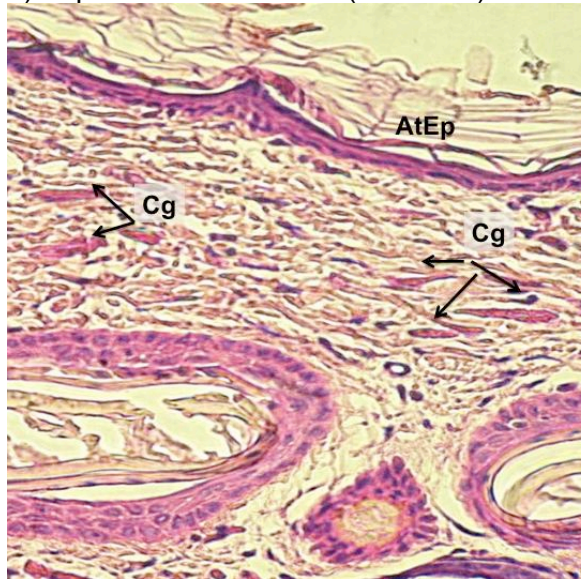


Figura 20. Fotografía de piel de cuyo protegida con el estilbeno metoxilado. AtEp atrofia epitelial; Cg congestión; Ed edema.

10.2.2 Evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto y los compuestos aislados de *Y. periculosa*

Modelo sub-crónico en ratones SKH-1

10.2.2.1 Estudio histopatológico

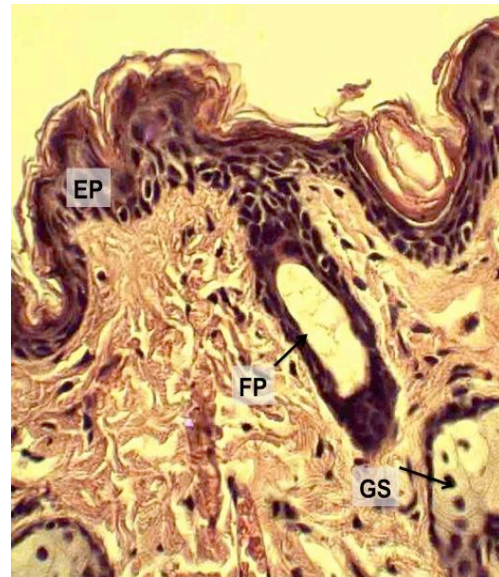
Los cortes histológicos de la piel de los ratones SKH-1 se puede observar en la epidermis todos los estratos que forman este tejido con alrededor dos o tres capas de células espinosas. En estos animales los folículos pilosos en su mayoría se observan atrofiados, puede llegar a presentar hiperqueratosis en el estrato córneo. En la dermis se pueden observar glándulas sebáceas atípicas en cuanto a su desarrollo y localización. Es común la presencia de quistes pilosos o sebáceos asociados a epitelio escamoso o cúbico que contienen pequeñas cantidades de fibras de queratina o fragmentos pilosos. Debido a que la piel de estos animales es muy delgada, es común observar hipodermis atípica y así como tejido muscular (Crew y Mirskaia, 1932; Montagna et al., 1952; NTP, 2005). El diagnóstico histológico realizado en este estudio de la piel del ratón SKH-1 sin irradiar concuerda con lo descrito previamente (Cachon-Gonzalez, 1994; NTP, 2005) y se observan en la figura 21.

En la figura 22 se muestran las fotografías de algunos cortes histológicos del segundo tratamiento el cual corresponde a ratones que sólo recibieron la aplicación tópica de etanol al 90%. Como se puede observar el diagnóstico concuerda con el de un tejido sano (Crew y Mirskaia, 1932; Montagna et al., 1952; NTP, 2005).

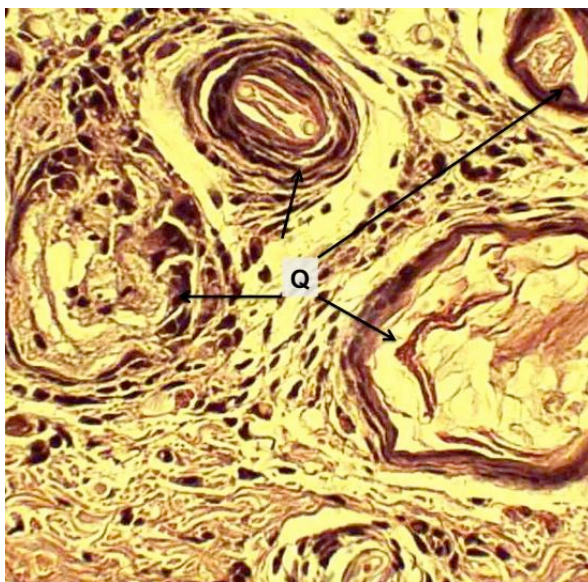
a) Testigo 10x



b) Testigo 40x



c) Testigo 40x

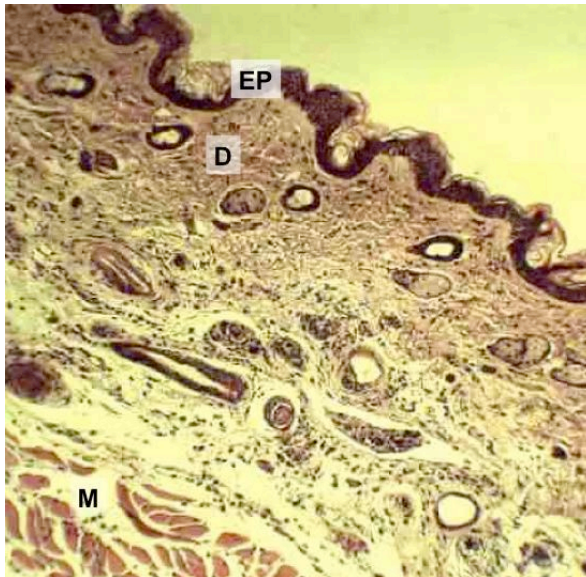


d) Testigo 40x



Figura 21. Piel de ratón SKH-1 normal sin ningún tratamiento. D dermis; EP epidermis; FP folículo piloso; GS glándula sebácea; M músculo; Q quiste.

a) Etanol 10x



b) Etanol 40x

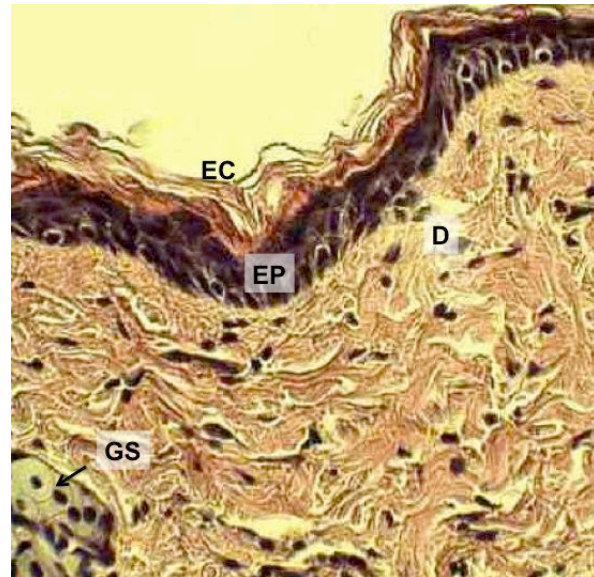
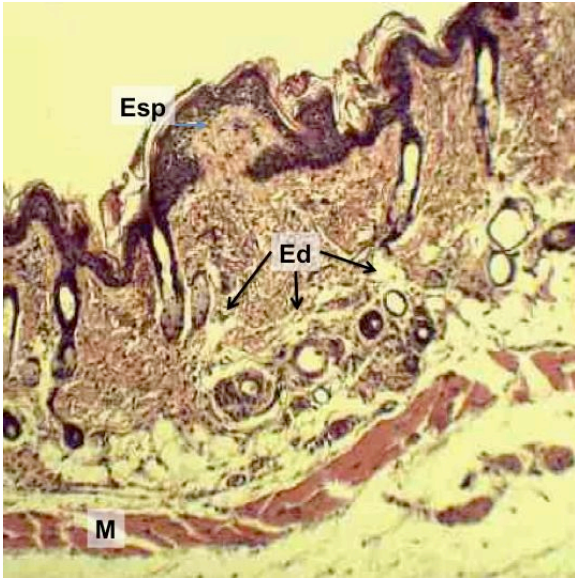


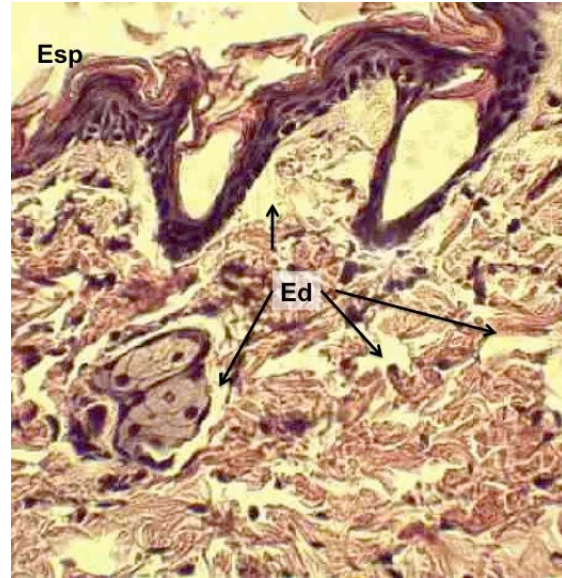
Figura 22. Piel de ratón SKH-1 con aplicación tópica de etanol al 90%. EC estrato córneo; EP epidermis; D dermis; GS glándula sebácea; M músculo.

La exposición a la RUV genera una hiperplasia escamosa, la cual es definida como el engrosamiento de la epidermis de manera focalizada, la cual puede ser mínima (2 a 4 capas), leve (4 a 6 capas), moderada (6 a 9 capas) o severa (>9 capas), debido a un incremento en la proliferación celular. Aunado a lo anterior, es común la presencia de hiperqueratosis así como la presencia de células de quemadura y la pérdida de la cohesión celular debido a un edema intracelular que conllevan a la formación de la espongirosis (Cachon-Gonzalez, 1994; NTP, 2005). Los resultados del presente estudio histopatológico concuerdan con los reportados para el daño producido en epitelio por la exposición a la RUV para este tipo de animales como se observa en la figura 23, también se detectó la presencia de paraqueratosis (núcleos en el estrato córneo) y atrofia epitelial, ambas focalizadas. En la dermis se observó la congestión de vasos sanguíneos, así como edema de forma difusa. En algunos casos se observó hemorragia. Cabe hacer notar que también se detectó atrofia de las fibras musculares de manera leve y focalizada. Debido a lo anterior, el diagnóstico histopatológico indica un cuadro inflamatorio agudo generalizado.

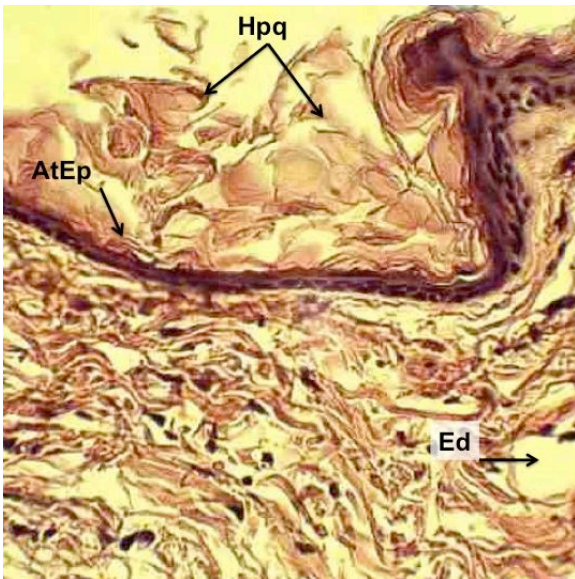
a) Etanol + UV 10x



b) Etanol + UV 40x



c) UV 40x



d) UV 40x

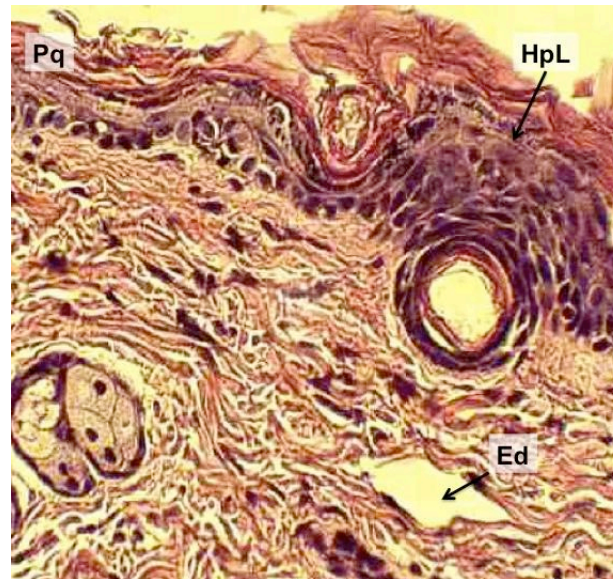
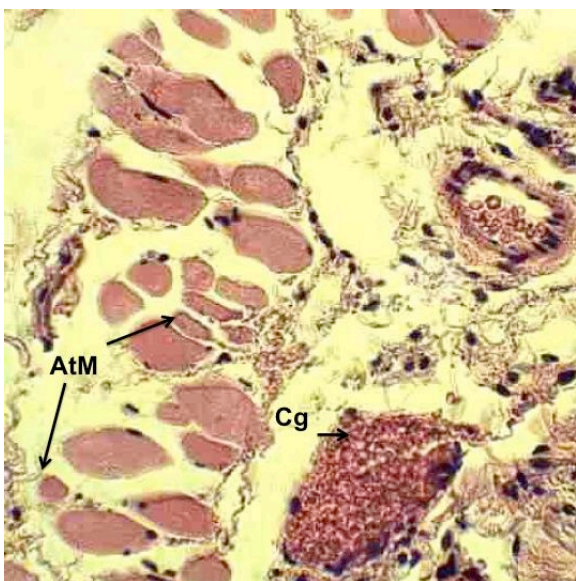


Figura 23. Piel de ratón SKH-1 expuesta a dosis sub-crónicas de RUV. AtEp Atrofia epitelial; Ed edema; Esp espongiosis; HpL hiperplasia; Hpq hiperqueratosis; Pq paraqueratosis.

e) UV 40x



f) UV 40x

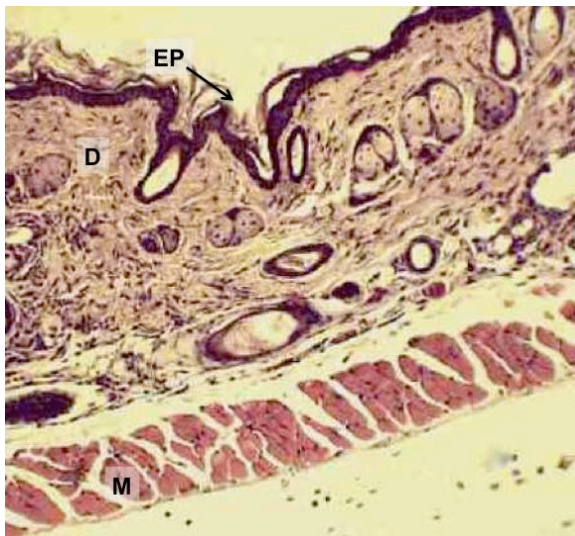


Figura 23 (Continuación). Piel de ratón SKH-1 expuesta a dosis sub-crónicas de RUV. AtM atrofia muscular; Cg congestión; CQ células de quemadura; Esp espongiosis.

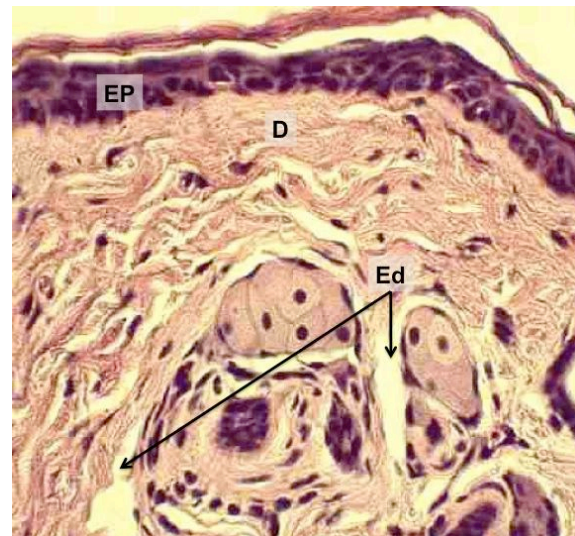
La aplicación tópica de naringenina en la piel de los ratones hembra SKH-1 produce la aparición de hiperplasia mínima muy localizada con la presencia de edema dérmico focalizado cerca de las glándulas sebáceas (Figura 24 a y b). Debido a lo anterior podemos concluir que esta sustancia es ligeramente irritante para la piel de los animales. En los cortes histológicos de piel del grupo de animales que recibieron como tratamientos la naringenina y la exposición sub-crónica a la RUV se observó hiperplasia, espongiosis, la presencia de células de quemadura y la congestión de los vasos sanguíneos de manera focal (Figura 24 c-f). Cabe destacar que no se observó hemorragia. El hecho de que el daño causado por la RUV, sea focalizado en los animales protegidos con la naringenina nos indica que este compuesto sí presenta propiedades fotoprotectoras. Se han reportado diversas propiedades biológicas de la naringenina en estudios *in vitro* que pueden explicar la protección de la piel contra los daños por la exposición a la RUV entre las que destacan la actividad antiinflamatoria (Erlund, 2004), así como el incremento en la remoción de los DCP inducidos por la RUV en queratinocitos humanos de la línea celular HaCat, por lo cual la naringenina previene la inducción de la apoptosis (El-Mahdy et al., 2008).

Los resultados obtenidos con el modelo de los ratones SKH-1 concuerdan con los obtenidos previamente en este estudio, donde se determinó que la naringenina posee un FPS mayor que el filtro comercial parsol. Además, evita la muerte celular provocada por la exposición a la RUV en una población de *E. coli* por 30 minutos a diferencia de los experimentos sin protección donde se provoca la muerte de toda la población a los 10 minutos de exposición. Lo anterior nos indica que esta flavanona posee propiedades fotoprotectoras en los tres modelos evaluados.

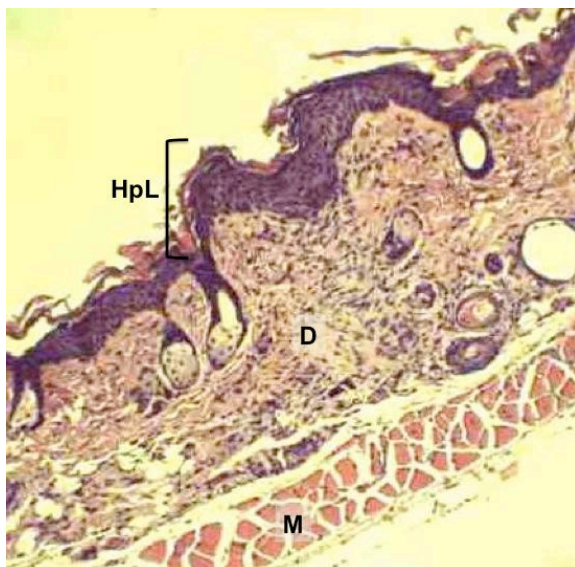
a) Naringenina 10x



b) Naringenina 40x



c) Naringenina + UV 10x

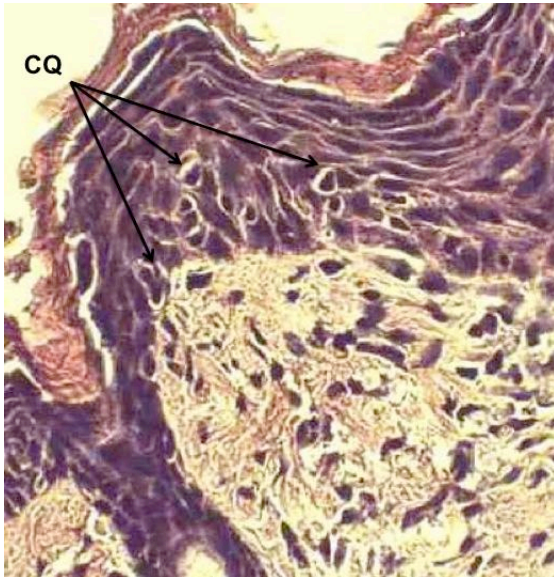


d) Naringenina + UV 40x



Figura 24. Piel de ratón SKH-1 que recibieron la aplicación tópica de naringenina con y sin exposición a dosis sub-crónicas de RUV. Cg congestión; Ed edema; Esp espongiosis; EP epidermis; D dermis; HpL hiperplasia; M músculo.

e) Naringenina + UV 40x



f) Naringenina + UV 40x

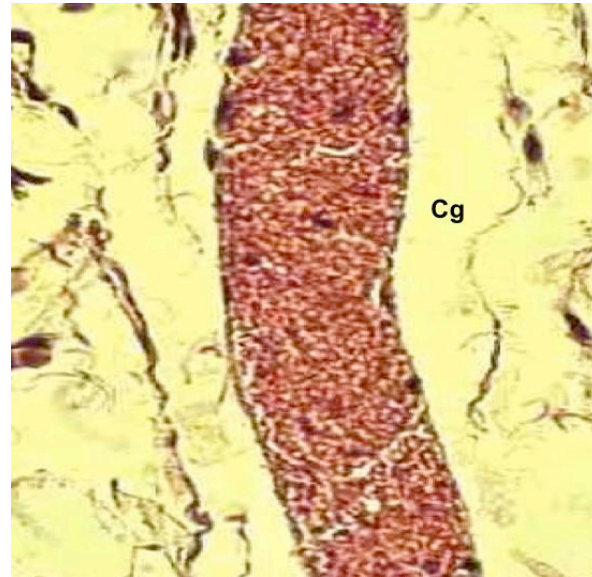


Figura 24 (Continuación). Piel de ratón SKH-1 que recibieron la aplicación tópica de naringenina con y sin exposición a dosis sub-crónicas de RUV. Cg congestión; CQ células de quemadura.

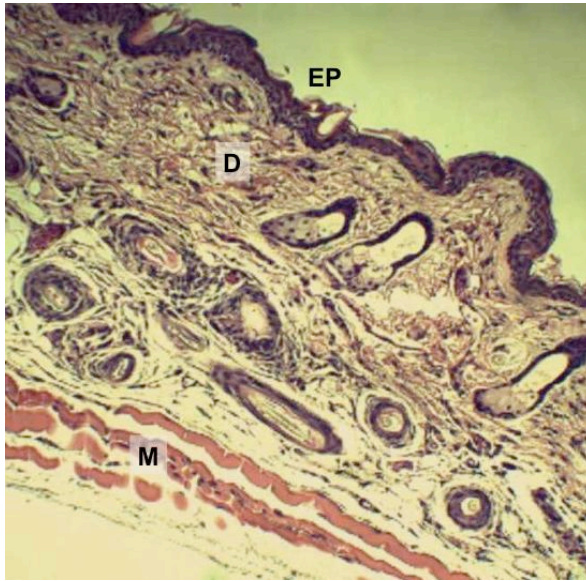
El resveratrol aplicado tópicamente induce de forma focal la presencia de edema intracelular en el epitelio lo cual es evidente por la pérdida de la cohesión intercelular conocida como espongirosis. También se observó la presencia focalizada de papilas hipertóxicas moderadas, lo cual indica que el resveratrol provoca el incremento del tamaño celular en el estrato granuloso (Figura 25 a-c).

El estudio histopatológico de las muestras de piel de ratón expuestas a la RUV protegidas con el resveratrol indica un cuadro inflamatorio leve con edema en la dermis, congestión de los vasos sanguíneos moderada. En el epitelio se observan papilas hipertróficas leves e hiperplasia leve multifocal (Figura 25 d-f). Cabe mencionar que no hay atrofia muscular. La fotoprotección que brinda el resveratrol a los ratones irradiados coincide con el estudio histopatológico agudo que se realizó en cuyos donde también se observó la hipertrofia a dosis sub-eritematogénicas (80 minutos).

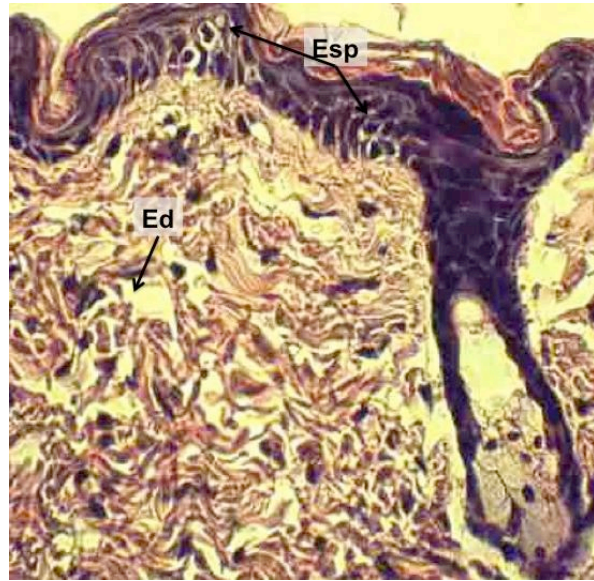
La hiperplasia se produce por un aumento en la división celular de los queratinocitos lo cual puede producir un incremento en el número de capas celulares que forman el epitelio. La hiperplasia es considerada por algunos autores como un mecanismo de protección contra la RUV debido a que el aumento del número celular provoca que sea menor la cantidad de luz que puede penetrar hasta la capa basal (McGregor y Hawk, 2001).

Tanto la hiperplasia como la hipertrofia implican cambios en la diferenciación celular. Diversos estudios *in vitro* indican que el resveratrol puede interactuar con numerosos blancos moleculares que afectan el crecimiento celular, la inflamación, la apoptosis y la angiogénesis entre otros procesos (Athar et al., 2009). En cultivos celulares, este compuesto evita la proliferación y modula el ciclo celular (disminuye la expresión de las ciclinas D1 y D2, Cdk2, 4 y 6; incrementa p21). En células de cáncer de células escamosas (CCE) el resveratrol induce el arresto del ciclo celular en la fase G1 (Athar et al., 2007). Este estilbeno inhibe la expresión de proteínas anti-apoptóticas como la survivina, también provoca la disminución en algunos marcadores de la promoción de tumores como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la ornitina descarboxilasa (ODC) (Afaq et al., 2005a). En general se considera que el resveratrol se puede emplear para prevenir el desarrollo de diversos tipos de cáncer al actuar como agente quimioprotector, sin embargo es necesario considerar que el efecto de esta sustancia depende del modelo seleccionado, así como de la dosis y la vía de administración empleada ya que en los modelos *in vivo* puede ser diferente su mecanismo de acción debido a la participación de todos los componentes del órgano, como es el caso de los experimentos en la piel de los animales SKH-1, a diferencia de los modelos *in vitro*.

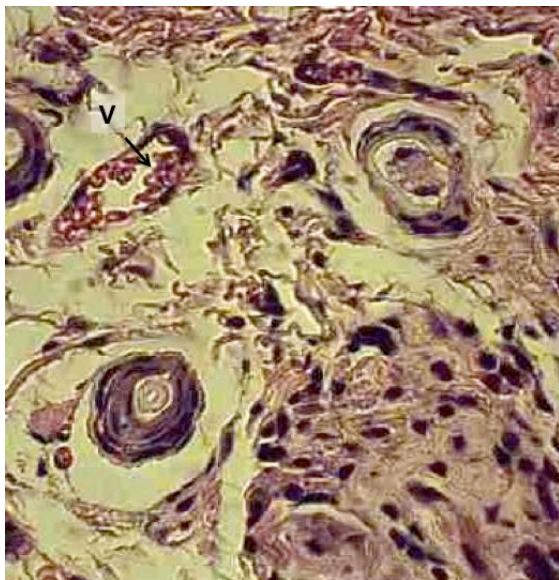
a) Resveratrol 10x



b) Resveratrol 40x



c) Resveratrol 40x

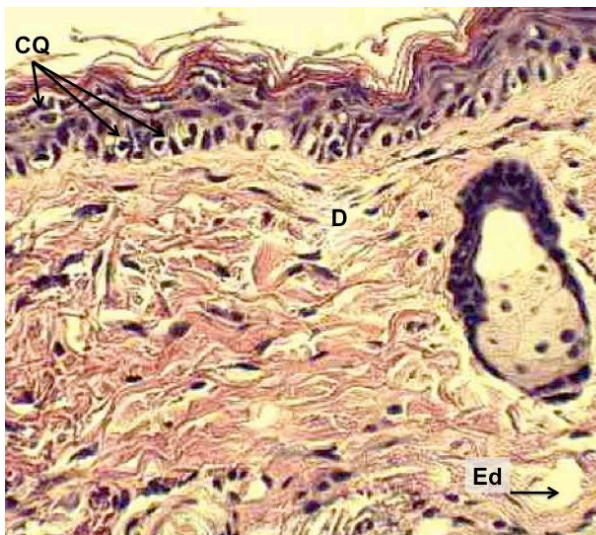


d) Resveratrol + UV 10x



Figura 25. Piel de ratón SKH-1 que recibieron la aplicación tópica de resveratrol con y sin exposición a dosis sub-crónicas de RUV. Cg congestión; Ed edema; Esp espongiosis; EP epidermis; D dermis; M músculo; V vaso.

e) Resveratrol + UV 40x



f) Resveratrol + UV 40x

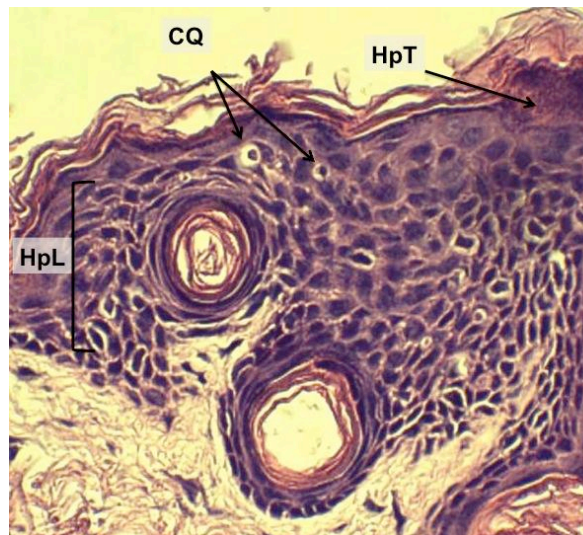


Figura 25 (Continuación). Piel de ratón SKH-1 que recibieron la aplicación tópica de resveratrol con y sin exposición a dosis sub-crónicas de RUV. CQ célula de quemadura; Ed edema; D dermis; HpL hiperplasia; HpT hipertrofia.

El estilbeno metoxilado aplicado tópicamente en los ratones SKH-1 genera una inflamación aguda leve debido a que durante el estudio histopatológico se detectó la presencia de espongiosis en el epitelio, edema dérmico además de la congestión de vasos sanguíneos y hemorragia (Figura 26 a-c). Cabe mencionar que en nuestro laboratorio y en el de Recursos Naturales de la FES-Iztacala se están realizando de forma paralela estudios de toxicidad en el modelo de *Artemia salina* y en *Vicia faba*. En el primer caso se determinó que este estilbeno es moderadamente tóxico con una concentración letal cincuenta (CL_{50}) de 492 $\mu\text{g/mL}$ de acuerdo a lo propuesto por McLaughlin en 1991. Asimismo, el estilbeno metoxilado tiene un efecto citotóxico y genotóxico en el modelo de *V. faba* (Sánchez, 2009).

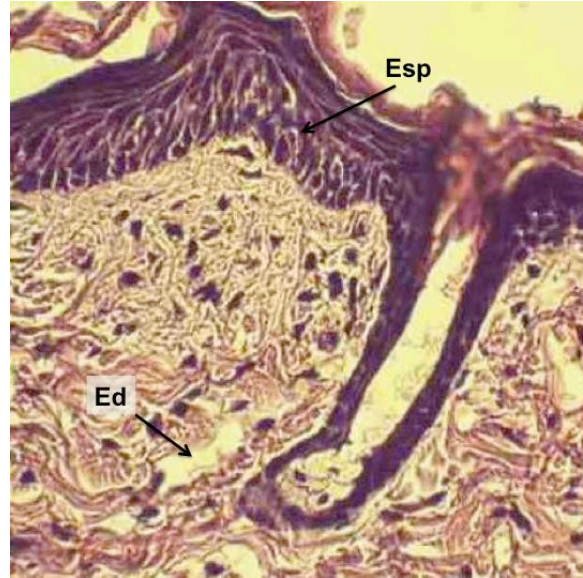
En la piel de los ratones expuestos a dosis sub-crónicas de RUV y protegidos con el estilbeno metoxilado se diagnosticó hiperplasia epidérmica, espongiosis, edema dérmico moderado, lo cual es indicador del daño generado por la RUV en la piel de acuerdo a lo reportado (Cachon-Gonzalez et al., 1994; NTP en el 2005) (Figura 26 d-f). También se detectó atrofia epitelial moderada focalizada. El efecto de la RUV en este grupo experimental no es multifocal por lo que podemos concluir que la aplicación tópica del estilbeno sí brinda fotoprotección. Es necesario estudiar, el o los posibles mecanismos moleculares por los cuales este compuesto puede proteger a la piel de los efectos

adversos de la RUV aunque debe tomarse en consideración la toxicidad de este compuesto.

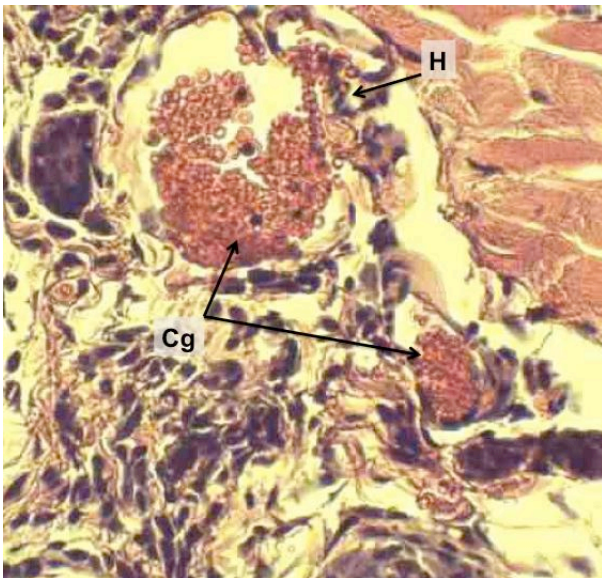
a) Metoxilado 10x



b) Metoxilado 40x



c) Metoxilado 40x



d) Metoxilado + UV 10x

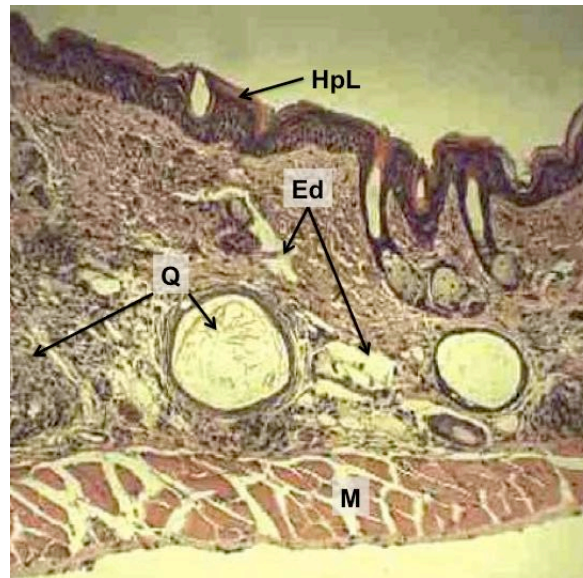
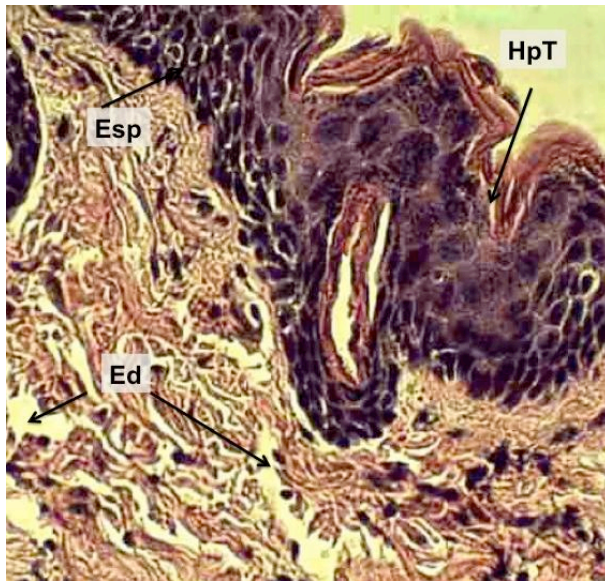


Figura 26. Piel de ratón SKH-1 que recibieron la aplicación tópica del estilbeno metoxilado con y sin exposición a dosis sub-crónicas de RUV. Cg congestión; Ed edema; EP epidermis; Esp espongiosis; D dermis; H hemorragia; HpL hiperplasia; M músculo; Q quiste.

e) Metoxilado + UV 40x



d) Metoxilado + UV 40x

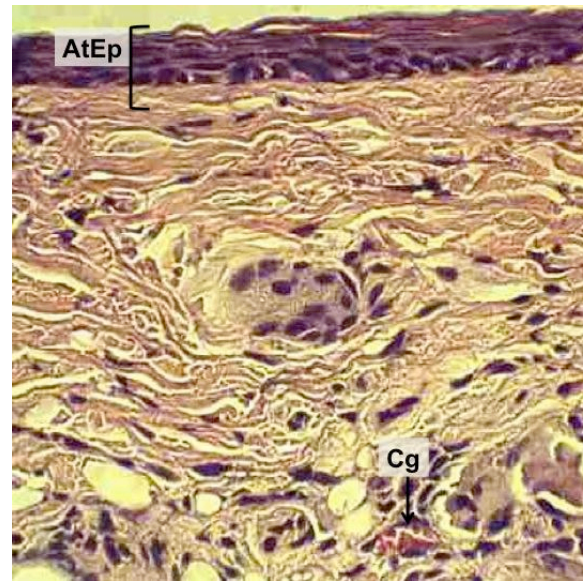


Figura 26 (Continuación). Fotomicrografías de piel de ratón SKH-1 que recibieron la aplicación tópica del estilbeno metoxilado con y sin exposición a dosis sub-crónicas de RUV. AtEp Atrofia epitelial; Cg congestión; Ed edema; Esp espongiosis; HpT hipertrofia.

La protección que brindan sustancias de origen natural a células, tejidos, animales, o a humanos expuestos a la RUV se debe a que actúan en la prevención o en la corrección de los daños causados por la RUV y/o en la modulación de las diferentes respuestas celulares a la RUV. En lo referente al aspecto preventivo se consideran dos líneas de defensa. La primera involucra las sustancias capaces de absorber la RUV y actuar como filtros. De esta forma se evita que la radiación sea absorbida por el ADN y se formen los aductos de las bases nitrogenadas, también se previene la inmunosupresión producida por la acción del ácido *cis* urocánico. La exposición a la RUV inicia una cascada de eventos que modifican la expresión genética, que implica la transducción de señales que pueden producir la inflamación, la apoptosis, la inmunosupresión, la transformación y proliferación celular. Los agentes quimiopreventivos que actúen en estos procesos celulares estarán involucrados en la segunda línea de defensa.

En el presente estudio se determinó que el extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa* actúan a en la primera línea de defensa propuesta para los productos naturales ya que son sustancias capaces de absorber la RUV de manera similar a los filtros solares comerciales. Además protegen a la piel de la quemadura solar puesto que los cuyos expuestos a la RUV con los tratamientos experimentales necesitaron más tiempo de irradiación para formar un eritema evidente. Así mismo, el estudio

histopatológico de las muestras de piel de cuyo y de ratones SKH-1 expuestas a la RUV con protección nos demuestra que la aplicación tópica de cada uno de los tratamientos experimentales protege de forma diferencial de los daños causados por la RUV, lo que podría ser un indicio de que la protección que brindan las sustancias aisladas de *Y. periculosa* también estarían vinculadas a la modulación de procesos celulares.

10.2.2.2 Efecto protector de los compuestos aislados de *Y. periculosa* en los sistemas antioxidantes de la piel de ratón SKH-1 expuestos a la RUV de forma sub-crónica

La RUV produce un incremento en el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO) lo que genera un estado de estrés oxidativo que produce daños celulares como la oxidación de las bases nitrogenadas, rompimientos y entrecruzamientos del ADN, la peroxidación de lípidos (LPO) de las membranas celulares y la oxidación de proteínas. En el presente estudio se irradiaron con luz UV de manera sub-crónica (9 exposiciones) ratones SKH-1 a los cuales se les aplicaron las tres sustancias aisladas de la *Y. periculosa* para determinar si éstos prevenían la disminución de algunos de los antioxidantes enzimáticos presentes en la piel. Las defensas antioxidantes son importantes en la prevención del daño causado por la RUV. La exposición prolongada a la radiación disminuye en forma la capacidad antioxidante de la piel, debido a lo anterior se midió la actividad de las principales enzimas antioxidantes en la epidermis de los ratones irradiados con y sin protección.

La actividad de la CAT en los diferentes grupos se muestra en la figura 26. Como se puede observar la aplicación tópica de etanol (el vehículo para las sustancias a evaluar) produce un incremento en la actividad de esta enzima (45% con respecto al grupo testigo), y de forma contraria la exposición sub-crónica a la radiación UV-B provoca la disminución de dicha actividad (28%), aunque ambos eventos no muestran una diferencia significativa con el grupo control.

Diversos autores reportan que una sola exposición a la luz UV equivalente a 10 DEM provoca la disminución inmediata de la actividad de la CAT (Vessey, 1993; Witt et al., 1993; Steenvoorden y Van Henegouwen, 1997). Una diferencia importante entre los trabajos de estos autores y el presente es la dosis de irradiación ya que al someter a los animales a una exposición sub-crónica (9 exposiciones) la dosis de UV aplicada sólo fue de 1 MED. Aunado a lo anterior, se ha reportado que la exposición crónica a la RUV (36 semanas) produce una disminución de la CAT (Okada et al., 1994). Por otro lado, en fibroblastos expuestos a la RUV-A de forma crónica a los 5 días post-exposición se

observa una recuperación de la actividad enzimática de la CAT (Shindo y Hasimoto, 1997).

La relación entre la exposición a varias dosis suberitematogénicas de la RUV y los sistemas antioxidantes no es clara, debido a que los resultados de las investigaciones varían de acuerdo al modelo experimental, la dosis de exposición y la toma de la muestra. Por ejemplo en algunos sistemas (queratinocitos en cultivos, en piel irradiada *ex vivo*) se observa la disminución en la CAT, mientras que en otros (queratinocitos en cultivo, piel reconstituida, algunos modelos animales como el SKH-1) se incrementa, o después de varias exposiciones se reestablece la actividad (Franco et al., 2009). Es probable que en el presente estudio no se haya producido una disminución drástica de la CAT por la dosis de irradiación y/o que a lo largo del experimento (15 días) se haya producido una recuperación de la actividad de esta enzima en la piel.

El efecto sobre la CAT de cada una de las sustancias aisladas del extracto metanólico de *Y. periculosa* con y sin irradiación se muestran en la figura 27. Como se observa, al igual que en el caso de la epidermis irradiada sin ninguna protección, hay una disminución no significativa en la actividad enzimática en todos los grupos. En el caso de la naringenina la aplicación tópica de esta sustancia junto con el etanol provocó una disminución de la actividad de la CAT del 44%, mientras que en los animales a los que se les aplicó esta sustancia y además fueron irradiados, la disminución fue del 17%. En el caso del resveratrol ambos tratamientos (sin UV y con UV) mostraron una disminución de la actividad del 43 y 42% respectivamente. Es interesante resaltar que la aplicación del estilbeno metoxilado a los animales sólo provocó la disminución de la CAT en un 7%, mientras que en los irradiados fue del 13%, por lo que prácticamente los tejidos protegidos con la sustancia restablecieron la actividad enzimática al nivel del grupo control.

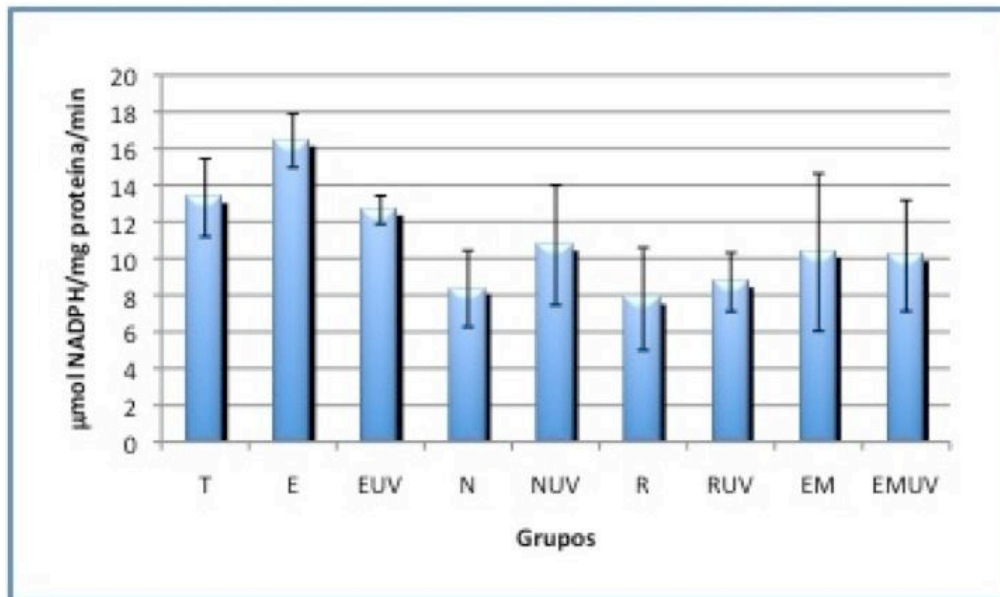


Figura 27. Actividad de la catalasa en epidermis de ratón SKH-1. T testigo (sin ningún tratamiento); E Etanol; EUV Etanol+UV; N Naringenina; NUV Naringenina+UV; R Resveratrol; RUV Resveratrol+UV; EM Estilbeno metoxilado; EMUV Estilbeno metoxilado+UV. Se representa el promedio de 5 repeticiones \pm la desviación estandar.

El efecto de la exposición de la RUV con y sin las sustancias a evaluar en la actividad de la GPx se observa en la figura 28. Podemos notar que en todos los tratamientos hay una ligera disminución de la actividad enzimática con respecto al grupo testigo pero esta no es significativa. Además, entre los grupos (naringenina, resveratrol y estilbeno metoxilado) con y sin irradiación tampoco existen diferencias. Lo anterior concuerda con lo reportado por Witt et al., 1993 donde se reporta que no hay cambios en la actividad de esta enzima en piel de ratón *ex vivo* tratado con UV-B y UV-A.

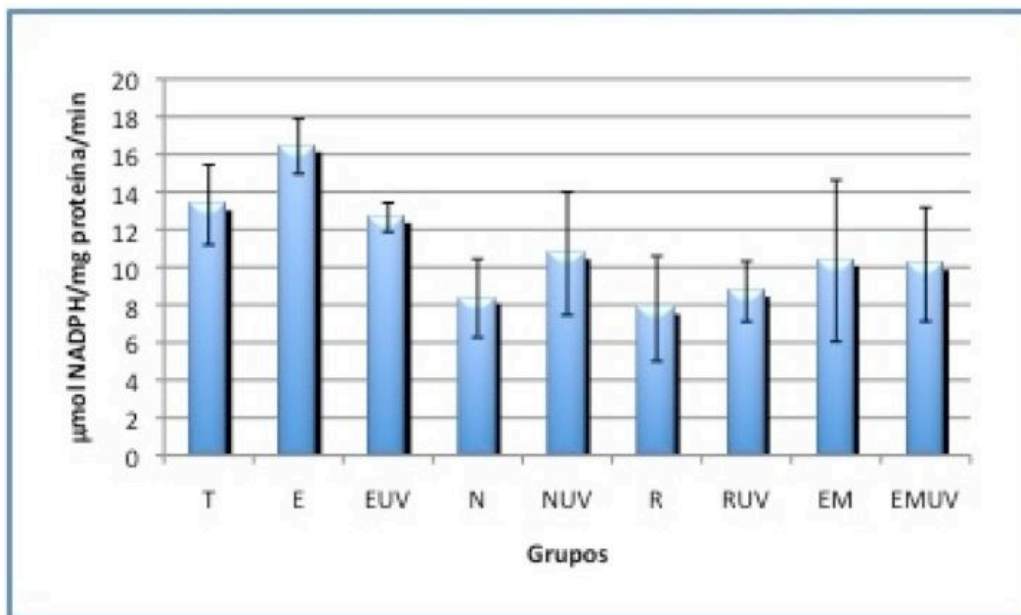


Figura 28. Actividad glutatión peroxidasa en epidermis de ratón SKH-1. T testigo (sin ningún tratamiento); E Etanol; EUV Etanol+UV; N Naringenina; NUV Naringenina+UV; R Resveratrol; RUV Resveratrol+UV; EM Estilbeno metoxilado; EMUV Estilbeno metoxilado+UV. Se representa el promedio de 5 repeticiones \pm la desviación estandar.

La SOD es una enzima clave en la depuración del anión superóxido. Como se puede observar en la figura 29, la aplicación tópica de etanol disminuye significativamente ($p > 0.05$) la actividad de la SOD en la epidermis de ratón. Se ha reportado que la administración crónica de etanol disminuye la actividad de esta enzima en otros tejidos como el cerebro (Augustyniak et al., 2005) y el hígado (Kasdallah-Grissa et al., 2007). La exposición a la RUV produce una disminución no significativa con respecto al grupo testigo. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos con una sola exposición a la RUV (Witt et al., 1993). A diferencia de lo anterior, en la exposición crónica (36 semanas) se ha observado un incremento en la actividad de esta enzima que gradualmente retorna al nivel basal (Okada et al., 1994). En humanos se ha observado que en epidermis se produce un incremento en la actividad de la SOD después de la exposición crónica a la RUV (Punnonen et al., 1995).

La aplicación tópica de los compuestos aislados del extracto metanólico de *Y. periculosa* producen una disminución no significativa de la actividad de la SOD (naringenina 45%, resveratrol 44% y estilbeno metoxilado 26%), al igual que en el grupo expuesto a la RUV y protegido con el resveratrol (40%). Sin embargo, la aplicación de la naringenina y el

estilbena metoxilada junto con la exposición a la RUV produce una disminución significativa de la actividad de SOD con respecto al grupo testigo ($p > 0.05$) en un 59% y 81% respectivamente.

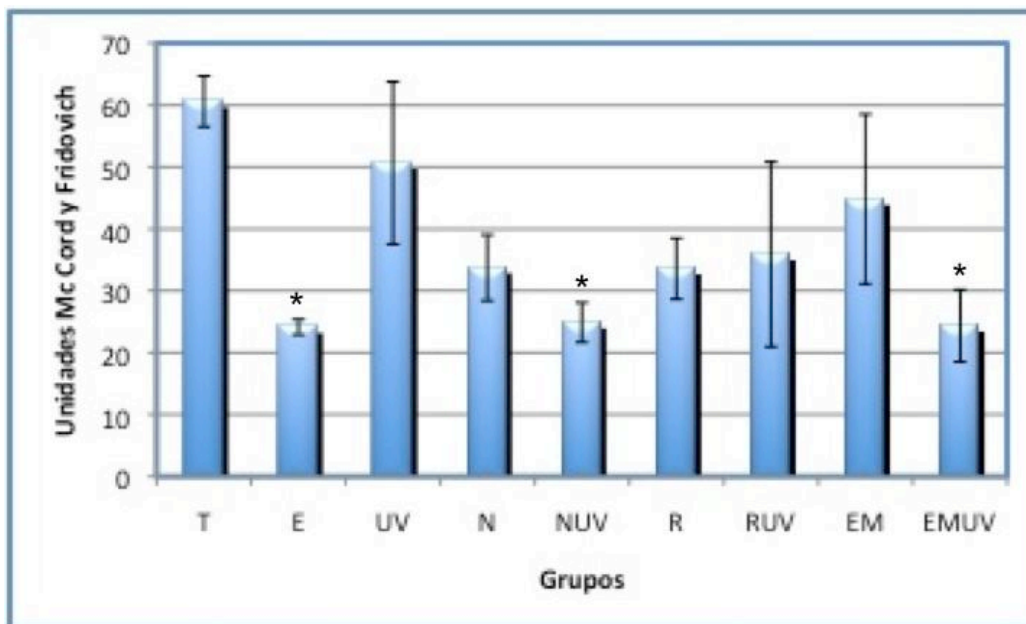


Figura 29. Actividad de la superóxido dismutasa en epidermis de ratón SKH-1. T testigo (sin ningún tratamiento); E Etanol; EUV Etanol+UV; N Naringenina; NUV Naringenina+UV; R Resveratrol; RUV Resveratrol+UV; EM Estilbena metoxilada; EMUV Estilbena metoxilada+UV. Se representa el promedio de 5 repeticiones \pm la desviación estandar. * $p < 0.05$ con respecto al testigo.

Como se puede observar en las figuras anteriores, la aplicación tópica de los compuestos aislados de *Y. periculosa* afectan, aunque no de forma significativa, la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas en este estudio. Normalmente se reportan las propiedades antioxidantes de diversos compuestos fenólicos de origen vegetal que tienen efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, estas sustancias también pueden tener efectos pro-oxidantes. Los compuestos polifenólicos pueden actuar en este sentido en cualquier sistema que contenga metales de transición como el Cu y el Fe, éstos promueven la formación de ERO, así como la formación de otros radicales orgánicos que pueden dañar al ADN, lípidos y proteínas celulares (Sakihama et al., 2002). Asimismo, las enzimas que se ven afectadas por la RUV son la CAT y la SOD, pero la actividad de éstas no está regulada de forma coordinada tras la exposición crónica a la RUV (Okada et al., 1994). Por otro lado, se ha demostrado en la línea celular de carcinoma de células escamosas A431 que dosis pequeñas o fraccionadas de radiación UV tienen un mayor efecto citotóxico comparado con una alta dosis de RUV (Merwald et al., 2005). Ésta puede

ser una de las causas por las cuales, en los grupos experimentales con las sustancias a evaluar y expuestas a la RUV, muestran niveles más bajos de las enzimas antioxidantes evaluadas en el presente estudio.

Las sustancias capaces de absorber la RUV evitan que la radiación sea absorbida por el ADN y se formen los aductos de las bases nitrogenadas, también se previene la inmunosupresión producida por el ácido *cis* urocánico. En el presente estudio se ha determinado que el extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa* actúan a este nivel, debido a que son sustancias capaces de absorber la RUV de manera similar a los filtros solares comerciales y además protegen a la piel de la quemadura solar, por lo que los animales expuestos a la RUV con los tratamientos experimentales necesitaron más tiempo de irradiación para formar un eritema evidente.

La exposición a la RUV inicia diversos eventos celulares que afectan la integridad de un tejido ya que modifica la expresión genética así como la transducción de señales que están involucrados en la inflamación, la apoptosis, la inmunosupresión, la transformación y proliferación celular (Afaq et al., 2005a). El estudio histopatológico de las muestras de piel expuestas a la RUV con y sin protección nos demuestra que la aplicación tópica de cada uno de los tratamientos experimentales tiene un efecto diferente en la piel. Finalmente, la aplicación tópica del estilbeno metoxilado protege la actividad de la enzima CAT en la epidermis de ratones irradiados de manera sub-crónica, a diferencia de lo que ocurre con el resveratrol y la naringenina en donde se observa que estos compuestos no confieren protección a las enzimas antioxidantes CAT y SOD, lo cual es un reflejo de la modulación de los procesos celulares que tienen cada uno de los compuestos administrados.

10.3 Resumen de resultados y conclusiones de la tercera etapa

Durante los experimentos realizados en la tercera etapa de este estudio se evaluó la actividad fotoprotectora del extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa* en dos modelos animales. De esta forma se determinó que el factor de protección solar (≈ 3) del extracto metanólico y la naringenina es similar, al igual que entre los dos estilbenos de ≈ 5 . Además, todas las sustancias de *Y. periculosa* tienen un factor de protección solar más alto que el parsol al proteger por más tiempo a los sujetos de la aparición del eritema provocado por la exposición a la RUV-B.

El extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa* actúan en la prevención de los daños en piel causados por la RUV al absorber la radiación. Además, de acuerdo al

estudio histopatológico en cuyos y en ratones SKH-1 las sustancias aisladas de *Y. periculosa* podrían intervenir en la modulación de procesos celulares pues la protección es diferencial. Por último, se determinó que la aplicación tópica del estilbeno metoxilado protege a la piel de los ratones SKH-1 de la disminución de la actividad de la catalasa provocada por la RUV.

11. Conclusiones generales

- ◇ El extracto metanólico de *Y. periculosa* contiene: resveratrol, *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno y naringenina.
- ◇ El extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa* absorben en la región de la radiación UV-B del espectro electromagnético y tienen coeficientes de extinción similares a los de los filtros comerciales.
- ◇ El extracto metanólico y los estilbenos aislados de *Y. periculosa* tienen una moderada capacidad antioxidante de acuerdo a su capacidad de reducir al radical difenilpicrilhidracilo.
- ◇ El extracto metanólico y el resveratrol mostraron una fotoprotección similar al parsol en el modelo bacteriano empleado en este estudio y el estilbeno metoxilado protege más tiempo a las bacterias de la muerte celular provocada por la exposición a la RUV-B.
- ◇ El factor de protección solar del extracto metanólico y la naringenina es similar empleando cuyos como modelo.
- ◇ El estilbeno metoxilado y el resveratrol tienen un factor de protección solar más alto que el parsol al proteger por más tiempo a los cuyos de la aparición del eritema provocado por la exposición a la RUV-B.
- ◇ El extracto metanólico y los compuestos aislados de *Y. periculosa* actúan en la prevención de los daños en piel causados por la RUV al absorber la radiación. Además, de acuerdo al estudio histopatológico en cuyos y en ratones SKH-1, intervienen en la modulación de procesos celulares pues la protección es diferencial.
- ◇ La aplicación tópica del estilbeno metoxilado protege a la piel de los ratones SKH-1 de la disminución de la actividad de la catalasa provocada por la RUV.

12. Bibliografía

- Abu-Yousif, A.O., Smith, K.A., Getsios, S., Green, K.J., Van Dross, R.T., Pelling, J.C. 2008. Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures. *Cancer Research*. 68: 3057-3065.
- Adhami, V.M., Afaq, F., Ahmad, N. 2003. Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF- κ B in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia*. 5: 74-82.
- Adhami, V.M., Syed, D.N., Khan, N., Afaq, F. 2008. Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages. *Photochemistry and Photobiology*. 84: 489-500.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Ahmad, N. 2003. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 186: 28-37.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H. 2005a. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 57: 153-173.
- Afaq, F., Malik, A., Syed, D., Maes, D., Matsui, M.S., Mukhtar, H. 2005b. Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor κ B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*. 81: 38-45.
- Afaq, F., Mukhtar, H. 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 63: 61-69.
- Afaq, F., Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.H., Khan, N., Zaid, M.Z., Mukhtar, H. 2007. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT Keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 127: 222-232.
- Agarwal, R., Katiyar, S.K., Lundgren, D.W., Mukhtar, H. 1994. Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice. *Carcinogenesis*. 15: 1099-1103.
- Agarwal, R., Mukhtar, H. 1996. Chemoprevention of photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 63: 440-444.
- Ahmad, H., Mukhtar, H. 1999. Green tea polyphenols and cancer: Biologic mechanisms and practical implications. *Nutrition Reviews*. 57: 78-83.

- Ahmad, N., Gupta, S., Husain, M.M., Heiskanen, K.M., Mukhtar, H. 2000. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*. 6: 1524-1528.
- Ahsan, H., Reagan-Shaw, S., Eggert, D.M., Tan, T.C., Afaq, F., Mukhtar, H., Ahmad, N. 2007. Protective effect of sanguinarine on ultraviolet B-mediated damages in SKH-1 hairless mouse skin: Implications for prevention of skin cancer. *Photochemistry and Photobiology*. 83: 986-993.
- Amado, S. 2001. *Lecciones de dermatología*. 14a. edición. Méndez Editores. México.
- Ananthaswamy, H.N., Kanjilal, S. 1996. Oncogenes and tumor suppressor genes in photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 63: 428-431.
- Arenas, R. 2005. *Atlas de dermatología. Diagnóstico y tratamiento*. 3a. Edición. Mc Graw Hill Interamericana.
- Arreguin, B., Romo de Vivar, A. 1974. Steroidal glycosides in *Yucca filifera*. *Journal of Steroid Biochemistry*. 5: 301.
- Athar, M., Agarwal, R., Bickers, D.R., Mukhtar, H. 1992. Role of reactive oxygen species in skin. In: Mukhtar, H. 1992. *Pharmacology of the skin*. CRC.
- Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A. 2007. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224: 274-283.
- Athar, M., Back, J.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A.L. 2009. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 486: 95-102.
- Augustyniak, A., Michalak, K., Skrzydlewska, E. 2005. The action of oxidative stress induced by ethanol on the central nervous system (CNS). *Postepy Hig Med Dosw.* 59: 464-71.
- Avila, A. J. G., Castañeda, M.C., Benitez, F.J.C., Durán, D.A., Barroso, V.R., Martínez, C.G., Muñoz, L.J.L., Martínez, C.A., Romo de Vivar, A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*. 76:301-309.
- Balestrieri, C., Felice, F., Piacente, S., Pizza, C., Montoro, P., Oleszek, W., Vizcaíno, V., Balestrieri, M.L. 2006. Relative effects of phenolic constituents from *Yucca schidigera* Roetzl. bark on Kaposi's sarcoma cell proliferation, migration, and PAF synthesis. *Biochemical Pharmacology*. 14: 1479-1487.
- Baldea, I., Mocan, T., Cosgarea, R. 2009. The role of ultraviolet radiation and tyrosine stimulated melanogenesis in the induction of oxidative stress alterations in fair skin

- melanocytes. *Experimental Oncology*. 31: 200-208.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 78: 431-441.
- Barnes, S., Peterson, T.G. 1995. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 208: 103-108.
- Bassarello, C., Bifulco, G., Montoro, P., Skhirtladze, A., Benidze, M., Kemertelidze, E., Pizza, C, Piacente, S. 2007a. Gloriosols A and B, two novel phenolics from *Yucca gloriosa*: structural characterization and configurational assignment by combined NMR-quantum mechanical strategy. *Tetrahedron*. 63: 148-154.
- Bassarello, C., Bifulco, G., Montoro, P., Skhirtladze, A., Benidze, M., Kemertelidze, E., Pizza, C, Piacente, S. 2007b. *Yucca gloriosa*: A source of phenolic derivatives with strong antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6636-6642.
- Baumann, L. 2002. Photoaging. In: Baumann, L. Weisberg, E. (Eds). *Cosmetic dermatology. Principles and practice*. Mc Graw Hill.
- Beauchamp, Ch., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutasa: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287.
- Beers, R., Sizer, I. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biological Chemistry*. 195: 133-140.
- Bharti, A.K., Khurana, J. P. 1997. Mutants of Arabidopsis as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UV-B protection mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*. 65: 765-776.
- Birt, D.F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P., Pinch, H.C. 1997. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Research*. 17: 85-91.
- Bissett, D.L., Hannon, D.P., Thomas, V. 1987. An animal model of solar-aged skin: Histological, physical and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochemistry and Photobiology*. 46: 367-378.
- Bjorn, L.O. Widell, S., Wang, T. 2002. Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Adv. Space. Res*. 30: 1557-1562.
- Black, H.S., De Gruijl, F.R., Forbes, P.D., Cleaver, J.E., Ananthaswamy, H.N., de Fabo, E.C., Ullrich, S.E., Tyrrell, R.M. 1997. Photocarcinogenesis: An overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 40: 29-47.

- Bode, A.M., Ma, W.Y., Surh, Y.J., Dong, Z. 2001. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. *Cancer Research*. 61: 850-853.
- Bonda, C. 2005. The photostability of organic sunscreen actives: a review. In: Shaath, N.A. (ed). *Sunscreens. Regulation and Comercial Development*. 3a. Edition. *Cosmetics Science and Technology Series*. Vol 28. Taylor & Francis.
- Bornman, J.F., Reuber, S., Cen, Y. P., Weissenbock, G. 1997. Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In: Lumsden, P (Ed). *Plantas and UV-B. Responses to environmental change*. Society for Experimental Biology, Seminar Series 64. Cambridge University Press. New York, USA. pp.
- Bouclier, M., Shroot, B. 1987. Metabolismo de las drogas en la piel. En: Freedberg, I., Eisen, A., Wolf, K., Austen, K.F., Goldsmith, L.A., Katz, S. (Directores). *Fitzpatrick. Dermatología en medicina general*. Tomo III. 6ª edición. Panamericana.
- Brown, T., Le May, H.E., Bursten, B.E., Borage, J.R. 2003. *Chemistry. The central science*. Pearson Education. EUA.
- Cachon-Gonzalez, M., B., Fenner, S., Coffin, J.M., Moran, S., B., Stoye, J., P. 1994. Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proc. Nadl. Acad. Sci*. 91: 7717-7721.
- Campos, P.M.B.G., Gianeti, M.D., Kanashiro, A., Lucisano-Valim, Y.M. y Gaspar, L.R. 2006. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. *Photochemistry and Photobiology*. 82: 683-688.
- Chan, W.H., Yu, J.S. 2000. Inhibition of UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermal carcinoma A431 cells by genistein. *Journal of Cellular Biochemistry*. 78: 73-84.
- Chan, W.H., Wu, C.C., Yu, J.S. 2003. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 90: 327-338.
- Chaturvedi, M.M., Kumar, A., Darnay, B.G., Chainy, G.B., Agarwal, S., Aggarwal, B.B. 1997. Sanguinarine (pseudochelethrythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 272: 30129-30134.

- Chedekel, M.R., Zeise, L. 1997. Melanins. In: Lowe, N.J., Shaath, N.A., Phathak, M.A. (Eds) Sunscreens. Development, evaluation and regulatory aspects. 2a ed. Merce Dekker. N.Y. USA.
- Cho, J.W., Park, K., Kweon, G.R., Jang, B.C., Baek, W.K., Suh, M. H., Kim, C.W., Lee, K. S. Suh, S. I. 2005. Curcumin inhibitd the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. *Experimental and Molecular Medicine*. 37: 186-192.
- Chung, J., Cho, S., Kang, S. 2004. Why does the skin age? In: Rigel, D.S., Weiss, R., Lim, H.W., Dover, J. (Eds). Photoaging. Merce Dekker. New York.
- Cockell, C., Knowland, J. 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.*74: 311-345.
- Conney, A.H., Zhou, S., Lee, M.J., Xie, J.G., Yang, C.S., Lou, Y.R., Lu, Y. 2007. Stimulatory effect of oral administration of tea, coffee or caffeine on UVB-induced apoptosis in the epidermis of SKH-1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 224: 209-213.
- Cooper, K. 1996. Cell-mediated immunosuppressive mechanisms induced by UV radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 66: 400-405.
- Cortés, L.N. 2006. Efecto de la administración de ácido ascórbico sobre el daño agudo por UVA en pacientes de fototerapia. Tesis de la Especialidad en Dermatología. Facultad de Medicina. UNAM. México.
- Crew, F.A.E., Mirskaia, L. 1932. The caraccter "hairless" in the mouse. *J. of Genetics*. 25: 17-24.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruiemm, W., Jones, R. (Eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Czeczot, H., Podsiad, M., Skrzycki, M., Stochmal, A., Oleszek, W. 2003. Evaluation of the mutagenic activity of phenolics from the bark of *Yucca schidigera*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 60: 357-362.
- Dávila, P., Arizmendi, M. C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J.L., Casas, A., y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacan-Cuicatlán Valley. México. *Biodiversity and Conservation*. 11: 421-442.

- Davis, R.D., Dulbecco, R. 1996. Aspectos moleculares de la replicación y variación del ADN. En: Davis, R D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. (eds). Tratado de Microbiología. 4a. Edición. Masson. México.
- Day, T. 2001. Ultraviolet radiation and plant ecosystems. In: Cockell, Ch. S. and Blaustein, A.P. (Eds). Ecosystems evolution and ultraviolet radiation. Springer. New York.
- De Grujil, F.R. 1996. Photobiology of photocarcinogenesis. Photochemistry and Photobiology. 63: 372-374.
- Dhanalakshmi, S., Mallikarjuna, G.U., Singh, R.P., Agarwal, R. 2004. Silibinin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice via decrease in thymine dimmer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. Carcinogenesis. 25: 1459-1465.
- Diffey, B., Kochevar, I.E. 2007. Basic principles of photobiology. In: Lim, H.W., Hönigsmann, H., Hawk, J.L.M. (Eds). Photodermatology. Informa Healthcare. New York.
- Dong, Z. 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. Mutation Research. 523-524: 145-160.
- Eisenstadt, E., Carlton, B., C., Brown, B., J. 1994. Gene mutation. In: Gerhardt, P. (ed). Methods for general and molecular bacteriology. ASM, Washington D.C. USA. pp. 297-303.
- Eisenstark, A. 1998. Bacterial gene products in response to near-ultraviolet radiation. Mutation Research. 422: 85-95.
- El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Wang, Q.E., Wani, G., Patnaik, S., Zhao, Q., Arafa, S., Barakat, B., Mir, S.N., Wani, A.A. 2008. Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. Photochem Photobiol. 84: 307-16.
- Elenitsas, R., Van Belle, P., Elder, D. 1997. Laboratory methods. In: Elder, D. (ed). Lever's histopathology of the skin. Eight edition. Lippincott-Raven Philadelphia. USA. pp 51-60.
- Elmets, C., Young, A. C. 1996. Sunscreens and photocarcinogenesis: An objective assessment. Photochemistry and Photobiology. 63 (4):435-439.
- Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. Nutrition Research. 24: 851-874.

- Evert, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy. Meristems, cells, and tissues of the plant body. Their structure, function and development.* 3^a Edition. Jhon Wiley & Son. USA.
- Finlay-Jones, J., Hart, P.H. 1998. Photoprotection: sunscreens and the immunomodulatory effects of UV irradiation. *Mutation Research.* 422: 155-159.
- Fitzpatrick, J.E., Bernhard, J.D. 2005. Estructura de las lesiones cutáneas y fundamentos de diagnóstico. En: Fitzpatrick, J.E., Freedberg, I., Eisen, A., Wolf, K., Austen, K.F., Goldsmith, L.A., Katz, S. Fitzpatrick. *Dermatología en medicina general.* Tomo III. 6^a edición. Panamericana.
- Fligge, M., Solankib, S.K., Papc, J.M., Fröhlichd, C., Wehrli, Ch. 2001. Variations of solar spectral irradiance from near UV to the infrared—measurements and results. *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics.* 63: 1479–1487.
- Franco, R. Sánchez-Olea, R, Reyes-Reyes, EM., Panayiotidis, M. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 674: 3-22.
- Frémont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences.* 66(8):663-673.
- Fuchs, J. 1998. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radic Biol Med.* 25: 848-73.
- Fuchs, J., Freisleben, H-J., Packer, L. 1992. Antioxidants in the skin. In: Mukhtar, H. 1992. *Pharmacology of the skin.* CRC.
- Gao, K., Henninga, S.M., Niua, T.Y., Youssefian, A.A., Seerama, N.P. Xub, A., Hebera, T.D. 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17: 89–95.
- Garmyn, M., Yarosh, D.B. 2007. The molecular and genetics effects of ultraviolet radiation exposure on skin cells. In: Lim, H.W., Hönigsmann, H., Hawk, J.L.M. (Eds). *Photodermatology.* Informa Healthcare. New York.
- Goosen N., Moolenaar, G.F. 2008. Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair.* 7: 353–379.
- Gorham, J. 1989. Stilbenes and phenanthrenes. In: Harborne, J.B., Dey, P.M. (Eds). *Methods in plant biochemistry.* Academia Press. USA.
- Granstein, R.D. 1996. Cytokines and photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology.* 63: 390-393.
- Grayer, 1989. Flavanoids. In: Dey, PM., Harborne, J.B. (Eds). *Plant phenolics. Methods in Plant Biochemistry.* Academic Press. San Diego, CA.

- Gu, M., Singh, R.P., Dhanalakshmi, S., Agarwal, C., Agarwal, R. 2007. Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Cancer Research*. 67: 3483-3491.
- Halliwell, B. 1993. Reactive oxygen species in pathology with special reference to the skin. In: Fuchs, J., Packer, L. *Oxidative stress in dermatology*. Marcel Dekker. N.Y.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C.J. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford University.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*. 2007:45673-45683.
- Hirai, S., Kim, Y. I., Goto, T., Kang, M. S., Yoshimura, M., Obata, A., Yun, R. Y Kawada, T. 2007. Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Life Sciences* 81: 1272–1279.
- Honeyman, J. 2002. Efectos de las radiaciones ultravioleta en la piel. *Revista Peruana de Dermatología*.12: 104-111.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Biyo, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 189: 21-39.
- Inzé, D., Van Montagu, M. 1995. Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 6: 153-158.
- Ishizaki, C., Oguro, T., Yoshida, T., Wen, C.Q., Suekei, H., Iijima, M. 1996. Enhancing effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase induction and dermatitis evoked by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and its inhibition by curcumin in mouse skin. *Dermatology*. 193: 311-317.
- Irish, M.G. 2000. *Agaves, Yuccas and related plants. A gardener's guide*. Timber Press. Oregon.
- Jackson, S.M., Elias, P.M. 1997. La piel como órgano protector. En: Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M. Austin, K.F. (Eds). *Dermatología en medicina general*. 4ª edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Jansen, M.A.K., Gaba, V., Greenberg, B.M. 1998. Higher plants and UV.B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*. 3: 131-135.

- Jeon, S.M., Kim, H.K., Kim, H.J., Do, G.M., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S. 2007. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Transl Res.* 149: 15-21.
- Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., Mortier, K. 1995. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from *Ginkgo* and some flavonoids. *Planta Medica.* 6: 6-129.
- Jungfer, C., Schwartz, T., Obst U. 2007. UV induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water Research.* 41: 188-196.
- Kadekaro, A.L., Kavanagh, R.J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M.A., Abdel-Malek, Z.A. 2003. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Research.* 16: 434-47.
- Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., El May, M., Gharbi, N., Kamoun, A., El-Fazaâ, S. 2007. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci.* 80: 1033-9.
- Katiyar, S.K. 2008. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular Nutrition & Food Research.* 52: S71–S76.
- Katiyar, S.K., Afaq, F., Perez, A., Mukhtar, H. 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis.* 22: 287-294.
- Katiyar, S. K., Agarwal, R., Mukhtar, H. 1996. Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of *Zingiber officinale* rhizome. *Cancer Research.* 56: 1023–1030.
- Katiyar, S.K., Elmets, C.A., Katiyar, S.K. 2007. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 18: 287-296.
- Katiyar, S.K., Korman, N.J., Mukhtar, H., Agarwal, R. 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *Journal of the National Cancer Institute.* 89: 556-566.
- Katiyar, S. K., Meleth, S., Sharma, S.D. 2008. Silymarin, a flavonoid from milk thistle (*Silybum marianum* L.), inhibits UV-induced oxidative stress through targeting infiltrating CD11b+ cells in mouse skin. *Photochemistry and Photobiology.* 84: 266-

- Katiyar, S., K. Mukhtar, H. 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. *Journal of Leukocyte Biology*. 69: 719-726.
- Kerr, C. 1998. The effects of two UV-B radiation-absorbing sunscreens on UV radiation-induced carcinogenesis, suppression of the contact hypersensitivity response and histological changes in the hairless mouse. *Mutation Research*. 422: 161-164.
- Kim, J.K., Kim, Y., Na, K.M., Surh, Y.J., Kim, T.Y. 2007. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. *Free Radical Research*. 41: 603-614.
- Kong, A-N, T., Yu, R., Hebbar, V., Chen, Ch., Owuor, E., Hu, R., Ee, R., Mandlekar, S. 2001. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mutation Research*. 480-481: 231-241.
- Krien, P.M., Kermici, M. 2000. Evidence for the existence of a self regulated enzymatic process within the human stratum corneum. An unexpected role for urocanic acid. *Journal of Investigation in Dermatology*. 115: 414-420.
- Krutmann, J., Ahrens, C., Roza, L., Altett, C.F. 1996. The role of DNA damage and repair in ultraviolet B radiation-induced immunomodulation: Relevance for human photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 63: 394-396.
- Kullavanijaya, P., Lim, W.H. 2005. Photoprotection. *J.Am. Acad. Dermatol*. 52: 937-958.
- Laethem, A.V., Claerhout, S., Garmyn, M., and Agostinis, P. 2005. The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 37: 1547-1553.
- Landry, L.G., Chapple, C.C.S., Last, R.L. 1995. *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology*. 109: 1159-1166.
- Larson, R. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27: 969-978.
- Lear, J., Heagerty, A., Smith, A., Bowers, B., Jones, P., Gilford, J., Alldersea, J., Fryer, A., Strange, R. 1996. Polymorphism in detoxifying enzymes and susceptibility to skin cancer. *Photochemistry and Photobiology*. 63: 424-427.
- Lehmann, B., Meurer, M. 2010. Vitamin D metabolism. *Dermatologic Therapy*. 23: 2-12.
- Lehmann, B. 2009. Role of the vitamin D3 pathway in healthy and diseased skin--facts,

- contradictions and hypotheses. *Experimental Dermatology*. 18: 97-108.
- Lemieux, R.U., Ratcliffe, R.M., Arreguin, B., Romo de Vivar, R., Castillio, M. J. 1977. ¹³C-NMR characterizations of the sarsasapogenin disaccharides, the filiferins a and b: 2-O-(β-D-xylopyranosyl)- and 2-O-(β-D-glucopyranosyl)- 2-O-(β-D-galactopyranosides). *Carbohydrate Research*. 55: 113-120.
- Lepley, D.M., Li, B., Birt, D.F., Pelling, J.C. 1996. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis*. 17: 2367-2375.
- Lowe, N.J., Friedlander, J. 1997. Sunscreens: Rationale for use to reduce photodamage and phototoxicity. In: Lowe, N.J., Shaath, N.A., Pathak, M.A. (Eds). *Sunscreens. Development, evaluation and regulatory aspects*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp 35-58.
- Lu, Y.P., Lou, Y.R., Li, X.H., Xie, J.G., Brash, D., Huang, M.T., Conney, A.H. 2000. Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21 (WAF1/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. *Cancer Research*. 60: 4785-4791.
- Lu, Y.P., Lou, Y.R., Lin, Y., Shih, W.J., Huang, M.T., Yang, C.S., Conney, A.H. 2001. Inhibitory effects of orally administered green tea, black tea, and caffeine on skin carcinogenesis in mice previously treated with ultraviolet B light (high-risk mice): relationship to decreased tissue fat. *Cancer Research*. 61: 5002-5009.
- Lui, H., Anderson, R.R. 2007. Radiation sources and interaction with skin. In: Lim, H.W., Hönigsmann, H., Hawk, J.L.M. (Eds). *Photodermatology*. Informa Healthcare. New York.
- Magaña, M.G., Magaña, M.L. 2003. *Dermatología*. UNAM. Editorial Médica Panamericana. México.
- Mallikarjuna, G., Dhanalakshmi, S., Singh, R.P., Agarwal, C., Agarwal, R. 2004. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. *Cancer Research*. 64: 6349-6356.
- Mantena, S.K., Katiyar, S.K. 2006. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-κB signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 40: 1603-1614.
- March, J. 1992. *Advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms and structure*. 4 ed. John Wiley & Sons.

- Markham, K.R., Geiger, H. 1994. ^1H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glucosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: Harborne, J.B. The Flavonoids. Advances in Research Since 1986. Chapman & Hall.
- Martincigh, B.S., Allen, J.M., Allen, S.K. 1999. Sunscreens: The molecules and their photochemistry. In: Gasparro, F.P. (Ed). Sunscreen photobiology: Molecular, cellular and physiological aspects. Springer. Germany.
- Mathiesen, L., Malterud, K.E., Sund, R.B. 1995. Antioxidant activity of fruit exudates and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*. *Planta Medica*. 61: 515-518.
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H.N. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. In press
- Matuda, E., Piña, L. 1980. Las plantas mexicanas del género *Yucca*. Colección Miscelánea del Estado de México. México.
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M.P., Correa, G., Ono, Y., Goodarzi, H. 2010. Light, including ultraviolet *Journal of Autoimmunity*. 34: 247-257.
- McGregor, J. M., Hawk, J.L.M. 2001. Efectos agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Fitzpatrick, T.B (Ed). *Dermatología en Medicina General*. Tomo 2. 5ª.Edición. Editorial Médica Panamericana. México D.F., México.
- McLaughlin, J.L. 1991. Crown gall tumors on potato disc and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: Dey, P.M., Harborne, J.B., Hostettman, K., eds., *Methods in Plant Biochemistry*. Assay for Bioactivity, vol 6, London Academic, pp. 1-31.
- McVean, M., Xiao, H., Isobe, K., Pelling, J.C. 2000. Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis*. 21: 633-639.
- Meeran, S.M., Katiyar, S., Elmets, C.A., Katiyar, S.K. 2006. Silymarin inhibits UV radiation induced immunosuppression through augmentation of interleukin-12 in mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5: 1660-1668.
- Merwald, H, Klosner, G, Kokesch, C, Der-Petrossian, M, Hönigsmann, H, Trautinger, F. 2005. UVA-induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. *J Photochem Photobiol B*. 79: 197-207.
- Mittlal, A., Elmets, C.A., Katiyar, S.K. 2003. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: Relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis*. 24: 1379–1388.

- Mohan, S, Dhanalakshmi, S, Mallikarjuna, G.U, Singh, R.P, Agarwal, R. 2004. Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 320: 183-9.
- Montagna, W, Chase, H.B, Melaragno, HP. 1952. The skin of hairless mice. I. The formation of cysts and the distribution of lipids. *J Invest Dermatol.*19: 83-94.
- Momotake, A., Arai, T. 2004. Photochemistry and photophysics of stilbene dendimers and related compounds. *J Photochem Photobiol B.* 5: 1-25.
- Montsko, G., Nikfardjam, M.S.P., Szabo, Z., Boddi, K., Lorand, T., Ohmacht, R. and Mark, L. 2007. Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by meand of HPLC-APCI-MS. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A:Chemistry.* 196: 44-50.
- Moore, J.O., Wang, Y., Stebbins, W.G., Gao, D., Zhou, X., Phelps, R., Lebwoh, M., Wei, H. 2006. Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 27: 1627–1635.
- Mukhtar, H., Agarwal, R., Bickers, D.R. 1992. Cutaneous metabolism of xenobiotics and steroid hormones. In: Mukhtar, H. (Ed). *Pharmacolgy and toxicology. Pharmacology of the skin.* CRC Press.
- Mukhtar, H., Elmets, C. 1996. Photocarcinogenesis: Mechanisms, models and human health implications. *Photochemistry and Photobiology.* 63: 356-357.
- National Toxicology Program. 2005. Photocarcinogenesis study of glycolic acid and salicylic acid in SKH-1 mice. NTP TR 524. NIH Publication No. 05-4472
- Nehal, K., Lim, H. 1995. Phototoxicity and Photoallergy. *Dermatology Nursing.* 7: 227-236.
- Nigel, D.P, Gwynn-Jones, D. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution.* 18: 48-55.
- Nigro, P., Bloise, E., Turco, M.C., Skhirtladze, A., Montoro, P., Pizza, C., Piacente, S., Belisario, M.A. 2007. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of novel phenolic derivatives of resveratrol. *Life Sciences.* 23: 873-883.
- Oguro, T., Yoshida, T. 2001. Effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase and metallothionein gene expression in mouse skin. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine.* 17: 71-78.

- Okada, K., Takahashi, Y., Ohnishi, K., Ishikawa, O., Miyachi, Y. 1994. Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *J Dermatol Sci.* 8: 183-6.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Placente, S., Pizza, C., Cheeke, P. 2001. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roezl. *Journal of Agriculture Food and Chemistry.* 49: 747-752.
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W. 2002. Anti-platelet effects of different phenolic compounds from *Yucca schidigera* Roezl. bark. *Platelets.* 13: 167-173.
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W. 2003. Inhibition of oxidative stress in blood platelets by different phenolics from *Yucca schidigera* Roezl. bark. *Nutrition.* 19: 633-640.
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W. 2005. Inhibition of blood platelet adhesion and secretion by different phenolics from *Yucca schidigera* Roezl. bark. *Nutrition.* 21: 199-206.
- Olas, B., Wachowicz, B., Majsterek, I., Blasiak, J., Stochmal, A., Oleszek, W. 2006. Antioxidant properties of trans-3, 3', 5, 5'-tetrahydroxi-4'-methoxystilbene against modification of variety of biomolecules in human blood cells treated with platinum compounds. *Nutrition.* 22: 1202-1209.
- Olas, B., Wachowicz, B., Nowak, P., Stochmal, A., Oleszek, W., Glowacki, R., Bald, E. 2008. Comparative studies of the antioxidant effects of naturally occurring resveratrol analogue trans-3, 3', 5, 5'-tetrahydroxi-4'-methoxystilbene and resveratrol against oxidation and nitration of biomolecules in blood platelets. *Cell Biology and Toxicology.* 24: 331-340.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Placente, S., Pizza, C., Cheeke, P. 2001. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roezl. *Journal of Agriculture Food and Chemistry.* 49: 747-752.
- Orallo, F. 2006. Biological effects of *cis-* versus *trans-*resveratrol. In: Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (Eds). *Resveratrol in health and disease.* CRC Taylos & Francis.
- Orozco, O. M. C. 1970. Estudio anatómico-morfológico de cuatro fases juveniles de *Y. lacandonica* Gómez Pompa Y Valdes (Agavaceae). Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Oren, A., Gunde-Cimerman, N. 2007. Micosporines and micosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol Lett.* 269: 1-10.

- Orta, A. 1980. Las Yucca: Recurso natural del desierto. En: *Yucca*. Serie del desierto. Centro de Investigación en química aplicada. Comisión Nacional de zonas áridas. México.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal Lab & Clinical Medical*. 70: 158-169.
- Pathak, M.A. 1986. Sunscreens: Topical and systemic approaches for the prevention of acute and chronic sun-induced skin reactions. *Dermatology Clinical*. 4: 321-334.
- Pathak, M.A. 1992. Sunscreens: Principles of Photoprotection. In: Mukhatar, H. 1992. *Pharmacology of the skin*. CRC.
- Pathak, M.A., Nghiem, P., Fitzpatrick, T.B. 2001. Efectos agudos y crónicos de la exposición al sol. En: Fitzpatrick, T.B., Freedberg, I.M., Eisen, A.Z., Wolf, K., Austen, K.F., Goldsmith, L.A., Katz, S.T. (Eds). *Dermatología en medicina general*. 5ª Edición. Médica Panamericana. Argentina.
- Pattanaargson, S., Munhapol, T., Hirunsupachot, P., Luangthongaram, P. 2004. Photoisomerization of octylmethoxycinnamate. *J of Photochemistry and Photobiology: A Chemistry*. 161: 269-274.
- Pattison, D.I., Davies, M.J. 2006. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*. (96):131-57.
- Pellmyr, O., Segrave, K.A. Althoff, D.M., Balcazar-Lara, M., y Leebens-Mack, J. 2007. The phylogeny of yuccas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 3: 493-501.
- Piacente, S., Bifulco, G., Pizza, C., Stochmal, A., Oleszek, W. 2002. A novel phenolic spiro derivative, yuccaona A from *Yucca schidigera* bark. *Tetrahedron Letters*. 43: 9133-9136.
- Piacente, S., Montoro, P., Oleszek, W., Pizza, C. 2004. *Yucca schidigera* Bark: Phenolic Constituents and Antioxidant Activity. *J. of Natural Products*. 67: 882-885.
- Pinnell, S.R. 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 48: 1-22.
- Piña, L.I. 1980. Algunos aspectos sobre las plantas del género *Yucca*. En: *Yucca*. Serie del desierto. Centro de Investigación en química aplicada. Comisión Nacional de Zonas Áridas. México.
- Poquet, L., Clifford, M.N., Williamson, G. 2008. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 476: 196-204.

- Potts, R., Bommannan, B.D., Guy, R.H. 1992. Percutaneous absorption. In: Mukhtar, H. (Ed). Pharmacology of the skin. CRC Press. London.
- Punnonen, K., Lehtola, K., Autio, P., Kiistala, U., Ahotupa, M. 1995. Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J Photochem Photobiol B*. 30: 43-8.
- Rao, M.V., Ormrod, D.P. 1995. Impact of UVB and O₃ on the oxygen free radical scavenging system in *Arabidopsis thaliana* genotypes differing in flavonoid biosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*. 62: 719-726.
- Reagan-Shaw, S., Breur, J., Ahmad, N. 2006. Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5: 418-429.
- Reichrath, J. 2006. The challenge resulting from positive and negative effects of sunlight: How much solar UV exposure is appropriate to balance between risks of vitamin D deficiency and skin cancer? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 92: 9-16.
- Reichrath, J. 2009. Skin cancer prevention and UV-protection: how to avoid vitamin D-deficiency? *Br J Dermatol*. 161: 54-60.
- Rhodes, L.E., Lim, H.W. 2007. The acute effects of ultraviolet radiation on the skin. In: Lim, H.W., Hönigsmann, H., Hawk, J.L.M. (Eds). *Photodermatology*. Informa Healthcare. New York.
- Ross, M.H., Pawlina, W. 2007. *Histología. Texto y atlas a color con Biología Celular y Molecular*. 5a Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina
- Rozema, J., De Staij, J.V., Björn, L.O., Caldwell, M. 1997. UV-B as an environmental factor in plants life: stress and regulation. *Trends in Ecology and Evolution*. 12: 22-28.
- Rusell, O. 1992. Structure of the skin. In: Mukhtar, H. *Pharmacology of the skin*. Series in Pharmacology and Toxicology. CRC Press.
- Rzedowski, J. 1979. *Vegetación de México*. Limusa. México.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., Bonina, F. 2000 *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*. 199: 39-47.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 177: 67-80.

- Sánchez, A., M., A. 2009. Evaluación de la genotoxicidad de la naringenina, resveratrol, metoxi y extracto de *Yucca periculosa* por presencia de micronúcleos en raíces de *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala.UNAM.
- Santos, I., Fidalgo, F., Almeida, J.M., Salema, R. 2004. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science*. 167: 925-935.
- Schaefer, H., Moyal, D., Fourtanier, A. 2000. State of the art sunscreens for prevention of photodermatoses. *Journal of Dermatological Science*. 23: S62-S74.
- Seeram, N.P., Kulkarni, V.V., Padhye, S. 2006. Sources and chemistry of resveratrol. In: Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (Eds). *Resveratrol in health and disease*. CRC Taylor & Francis.
- Serpone, N., Salinaro, A., Emeline, A.V., Horikoshi, H., Hidaka, J., Zhao, J. 2002. An *in vitro* systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. *Photochem Photobiol Sci*. 1: 970-981.
- Serpone, N., Dond, D., Albini, A. 2007. Inorganic and organic filters. Their role and efficacy in sunscreens and skincare products. *Inorganica Chimica Acta*. 360: 794-802.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Kiky, F.K. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67: 2058-2070.
- Shaath, N.A. 1997. The chemistry of sunscreens. In: Lowe, N. Shaath, N.A., Pathak, M. (ed). *Sunscreens. Development, evaluation and regulatory aspects*. 2a. Edition. *Cosmetics science and technology series*. Vol 5. Marcel Dekker.
- Shaath, N.A. 2005. The chemistry of ultraviolet filters. In: Shaath, N.A. (ed). *Sunscreens. Regulation and Commercial Development*. 3a. Edition. *Cosmetics Science and Technology Series*. Vol 28. Taylor & Francis.
- Sharma, S.D., Katiyar, S.K. 2006. Dietary grape-seed proanthocyanidins inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12. *Carcinogenesis*. 27: 95-102.
- Sharma, S.D., Meeran, S.M., Katiyar, S.K. 2007. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling in vivo SKH-1 hairless mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6: 995-1005.
- Shindo Y, Hashimoto T. 1997. Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. *J Dermatol Sci*. 14: 225-32.

- Shishodia, S. Aggarwal, B.B. 2006. Resveratrol: A polyphenol for all seasons. In: Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (Eds). Resveratrol in health and disease. CRC Taylos & Francis Group.
- Silverstein, R. Basslek, G., Morrill, T. 1991. Spectrometric Identification of organic compounds. 5a ed. Jhon Wiles & Sons.
- Soleas, G., J. Diamandis, E., P., Goldberg, D.M. 1997. Resveratrol: A molecule whose time has come? and gone?. Clinical Biochemistry. 30: 91-113.
- Steenvoorden, D.P., Van Henegouwen, G.M. 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. J Photochem Photobiol B. 41: 1-10.
- Stratton, S.P., Dorr, R.T., Alberts, D.S. 2000. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. European Journal of Cancer. 36: 1292-1297.
- Surh, Y.J., Kundu, J.K. 2006. Resveratrol as an antiinflammatory agent. In: Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (Eds). Resveratrol in health and disease. CRC Taylos & Francis.
- Sutherland, B.M. 1996. Mutagenic lesions in carcinogenesis: Induction and repair of pyrimidine dimmers. Photochemistry and Photobiology. 63: 375-378.
- Svobodová, A., Zdarilová, A., Walterová, D., Vostálová, J. 2007. Flavonolignans from *Silybum marianum* moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes. Journal of Dermatological Science. 48: 213-24.
- Taghipour, T. 2004. Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation. Water Research. 38: 3940-3948.
- Terrazas, A. T. 1973. Anatomía de *Y. elephantipes* Regel. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Tong, X., Van Dross, R.T., Abu-Yousif, A., Morrison, A.R., Pelling, J.C. 2007. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. Molecular and Cellular Biology. 27: 283-296.
- Torres, P., Avila, J.G., Romo de Vivar, A., García, A.M., Maríán, J.C., Aranda, E., Cespedes, C.L. 2003. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. Phytochemistry. 64: 463-473.
- Tyrrel, R.M. 1996. Oxidant, antioxidant status and photocarcinogenesis: The role of gene activation. Photochemistry and Photobiology. 63: 380-382.
- Ueng, Y. F., Chang, Y. L., Oda, Y., Park, S. S., Liao, J. F., Lin, M. F. Y Chen, C. F. 1999. *In vitro* and *in vivo* effects of naringin on cytochrome P450-dependent monooxygenase in mouse liver. Life Sciences 65: 2591-2602.

- Valdivia, B.L. 2002. Fotobiología cutánea: Generalidades. Revista Peruana de Dermatología. 12: 98-103.
- Vessey, D.A. 1993. The cutaneous antioxidant system. In: Fuchs, J. and Packer, L. Oxidative stress in dermatology. Marcel Dekker. N.Y.
- Villaverde, G.C. 2004. Fisiopatología del envejecimiento cutáneo. En: Villaverde, R.R., Blasco, M.J. Dermatología geriátrica (Eds). Formación Alcalá. España.
- Vink, A.A., Roza, L. 2001. Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimmers. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 65: 101-104.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH• free radical. Talanta. 71: 230-235.
- Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E. 2002. Organic chemistry. Structure and function. 3 ed. W.H. Freeman and Company. USA.
- Wang, Y., Zhang, X.S., Lebwohl, M., Deleo, V., Wei, H.C. 1998. Inhibition of ultraviolet B (UVB)-induced c-Fos and c-Jun expression in vivo by a tyrosine kinase inhibitor genistein. Carcinogenesis. 19: 649-654.
- Wenker, E., Gottlieb, H, E. 1977. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. Phytochemistry. 16: 1811-1816.
- Wei, H., Cai, Q., Rahn, R.O. 1996. Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. Carcinogenesis. 17: 73-77.
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y., Lebwohl, M. 2002. Inhibition of ultraviolet light induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. Cancer Letters. 185: 21-29.
- Witt, E.H., Motchnik, P., Packer, L. 1993. Evidences for UV light as an oxidative stressor in skin. In: Fuchs, J., Packer, L. Oxidative stress in dermatology. Marcel Dekker. N.Y.
- Yaar, M. 2007. The chronic effects of ultraviolet radiation on the skin: Photoaging. In: Lim, H.W., Hönigsmann, H., Hawk, J.L.M. (Eds). Photodermatology. Informa Healthcare. New York.
- Yarosh, D., Klein, J. 1996. DNA repair enzymes in prevention of photocarcinogenesis. Photochemistry and Photobiology. 63: 445-447.
- Yamaguchi, Y., Brenner, M., Hearing, V.J. 2007. The Regulation of Skin Pigmentation. The Journal of Biological Chemistry. 282: 27557-27561.

Ziegler, A., Jonason, A., Simon, J., Leffell, D., Brash, D.E. 1996. Tumor suppressor gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 63: 432-434.

Páginas electrónicas consultadas:

Radiación solar: 16 de marzo de 2010

http://www.ez2c.de/ml/solar_land_area/

<http://www.ecotec2000.de/espanol/sun6.htm>

Comisión nacional para el uso eficiente de energía: 16 de marzo de 2010

http://www.conae.gob.mx/wb/procalsol/energia_solar2

Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas: fecha de consulta: 5 abril del 2008

(<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm>)

Fundación Mexicana para la Dermatología: fecha de consulta: 2 de febrero de 2010

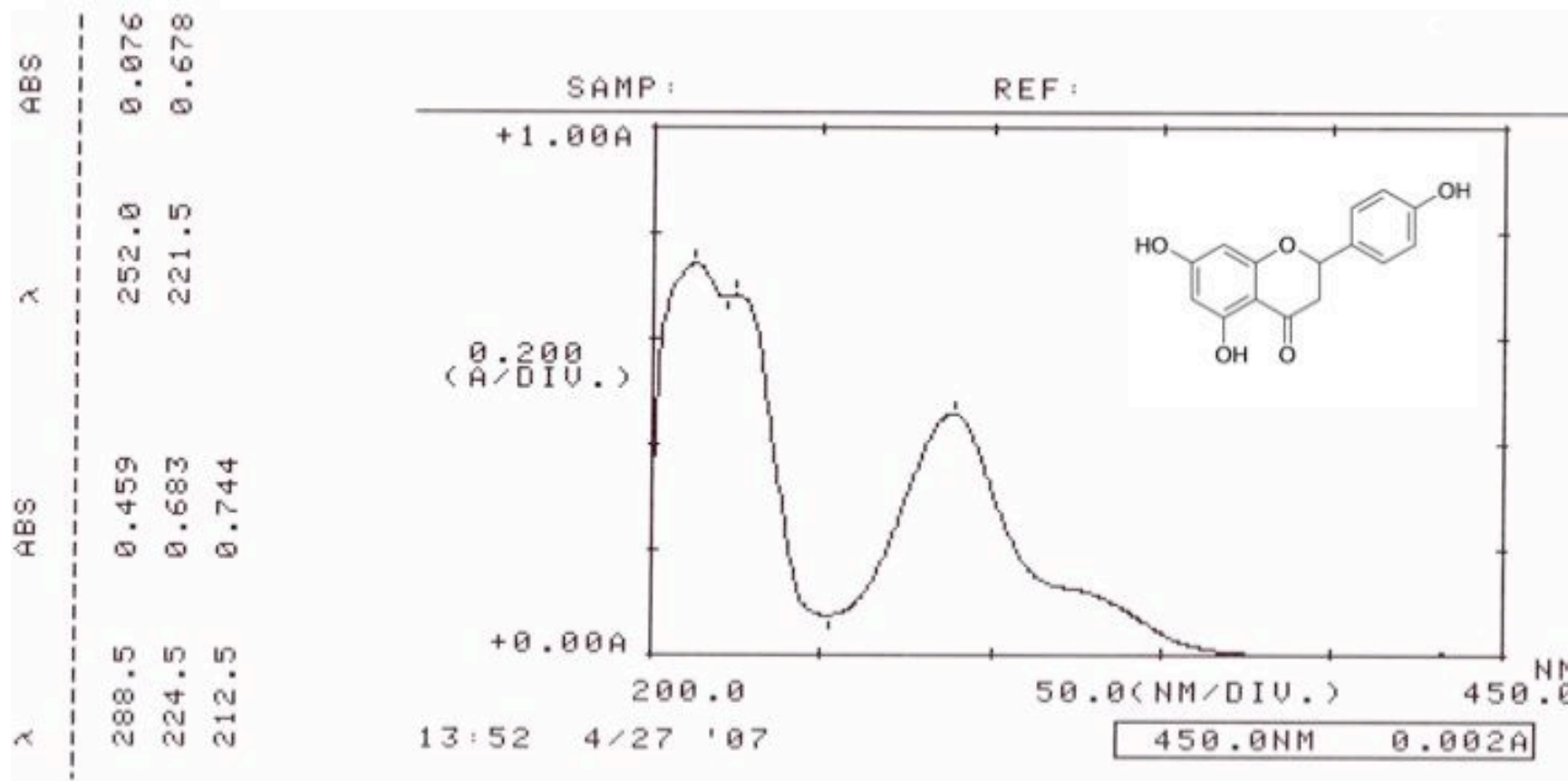
(<http://www.fmd.org.mx/index.php>)

Enciclopedia de la medicina tradicional mexicana: fecha de consulta: 13 de marzo de 2010

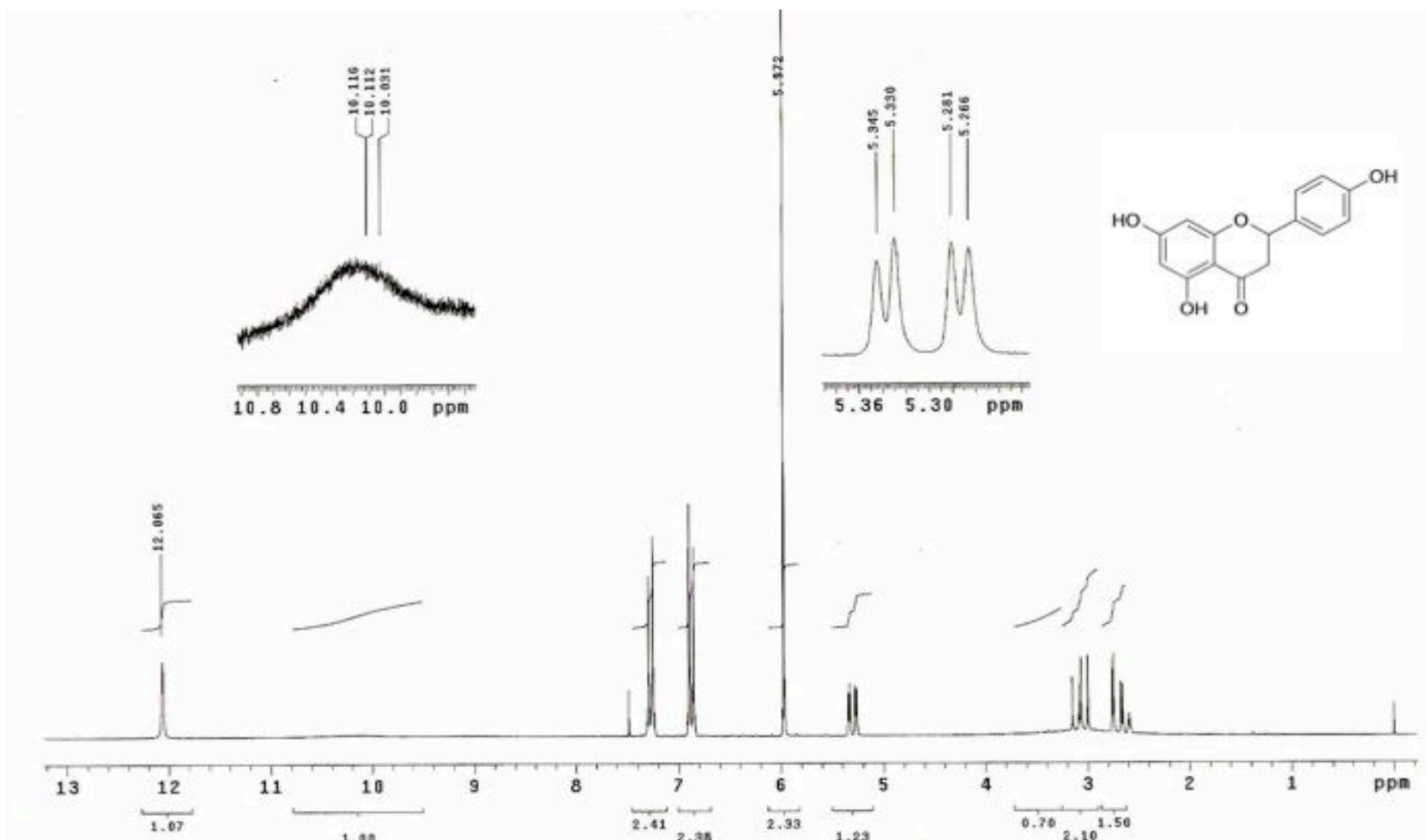
(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=&po=&id=6200&clave_registro=21).

13. Apéndices

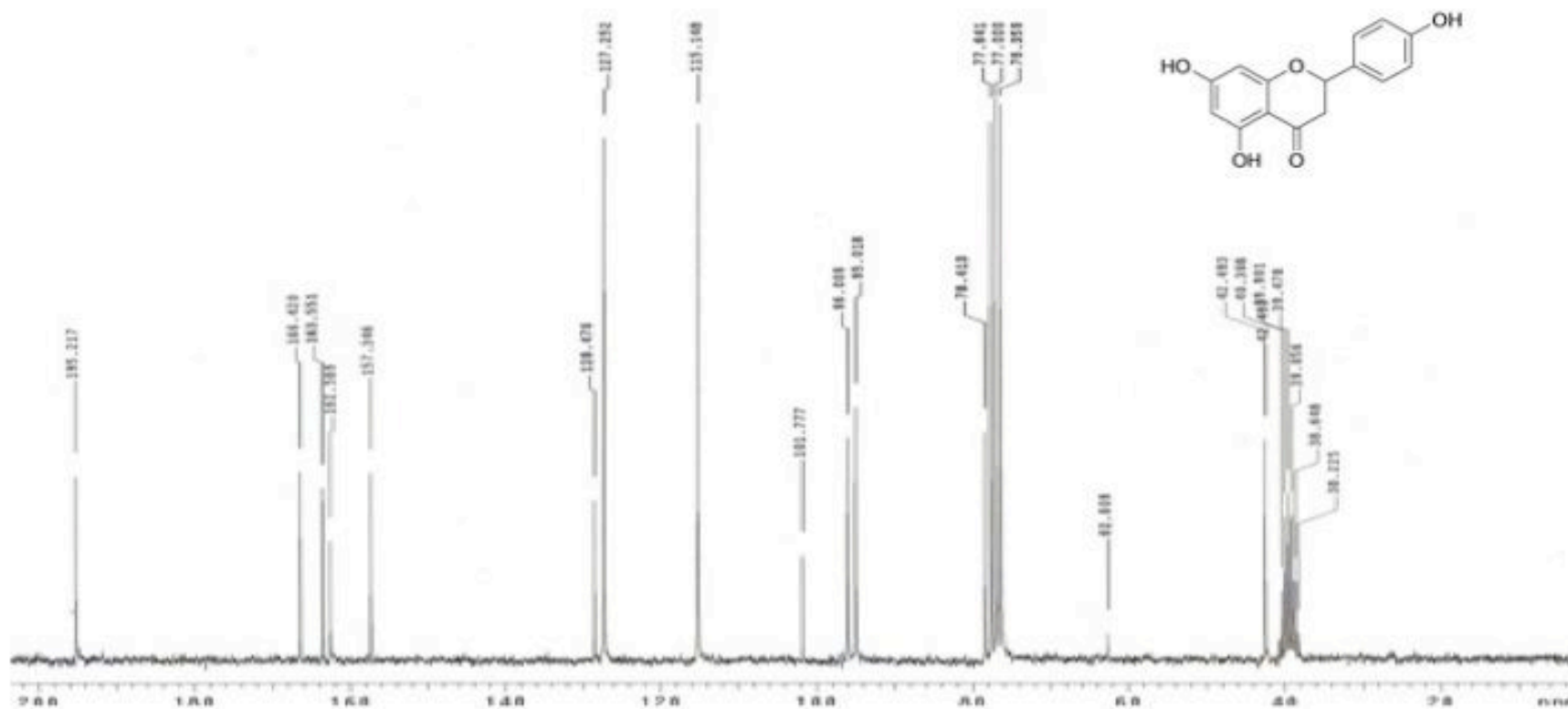
13.1 Espectros



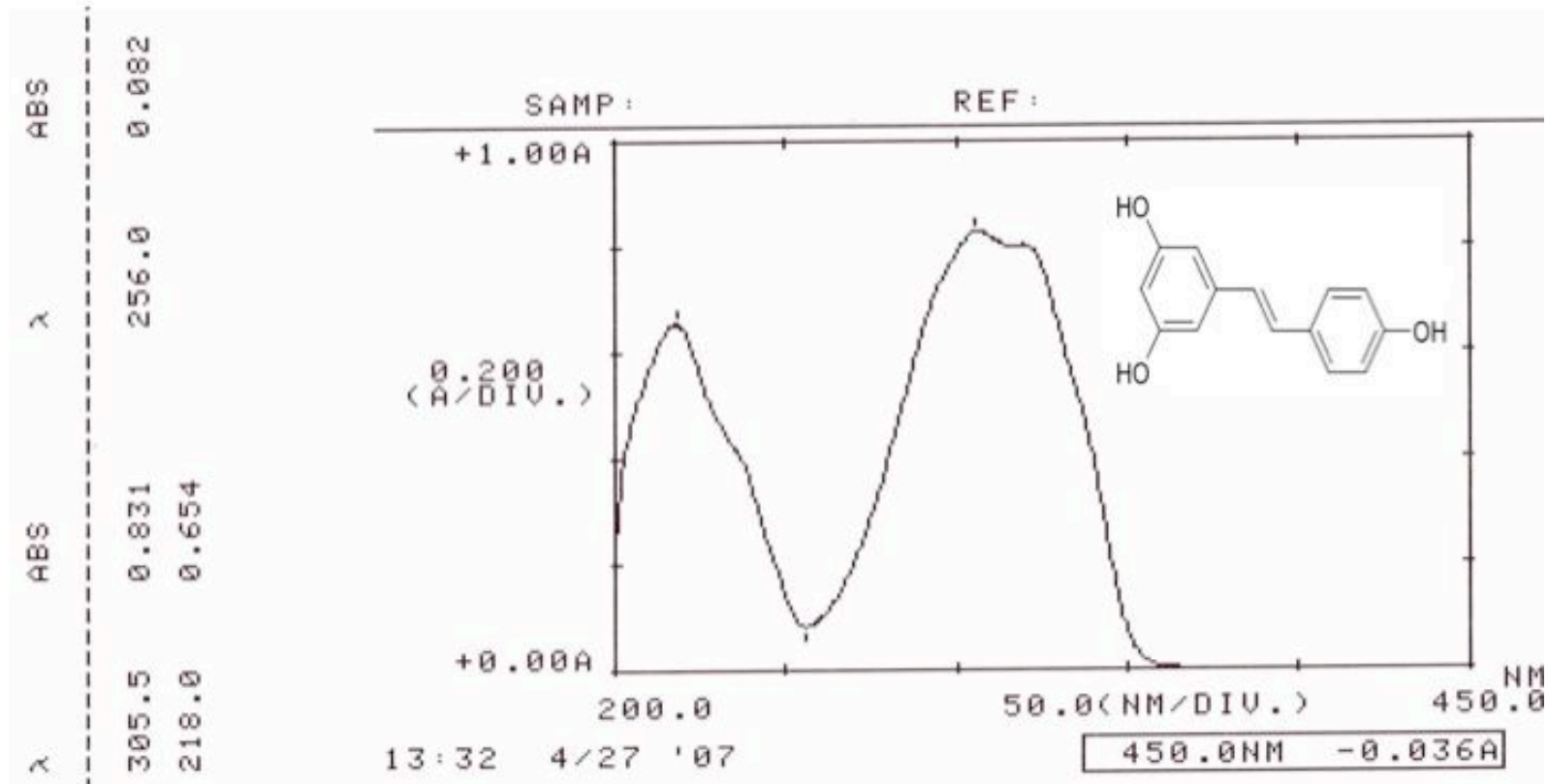
Espectro 1. Espectro de absorción en la región UV de la naringenina.



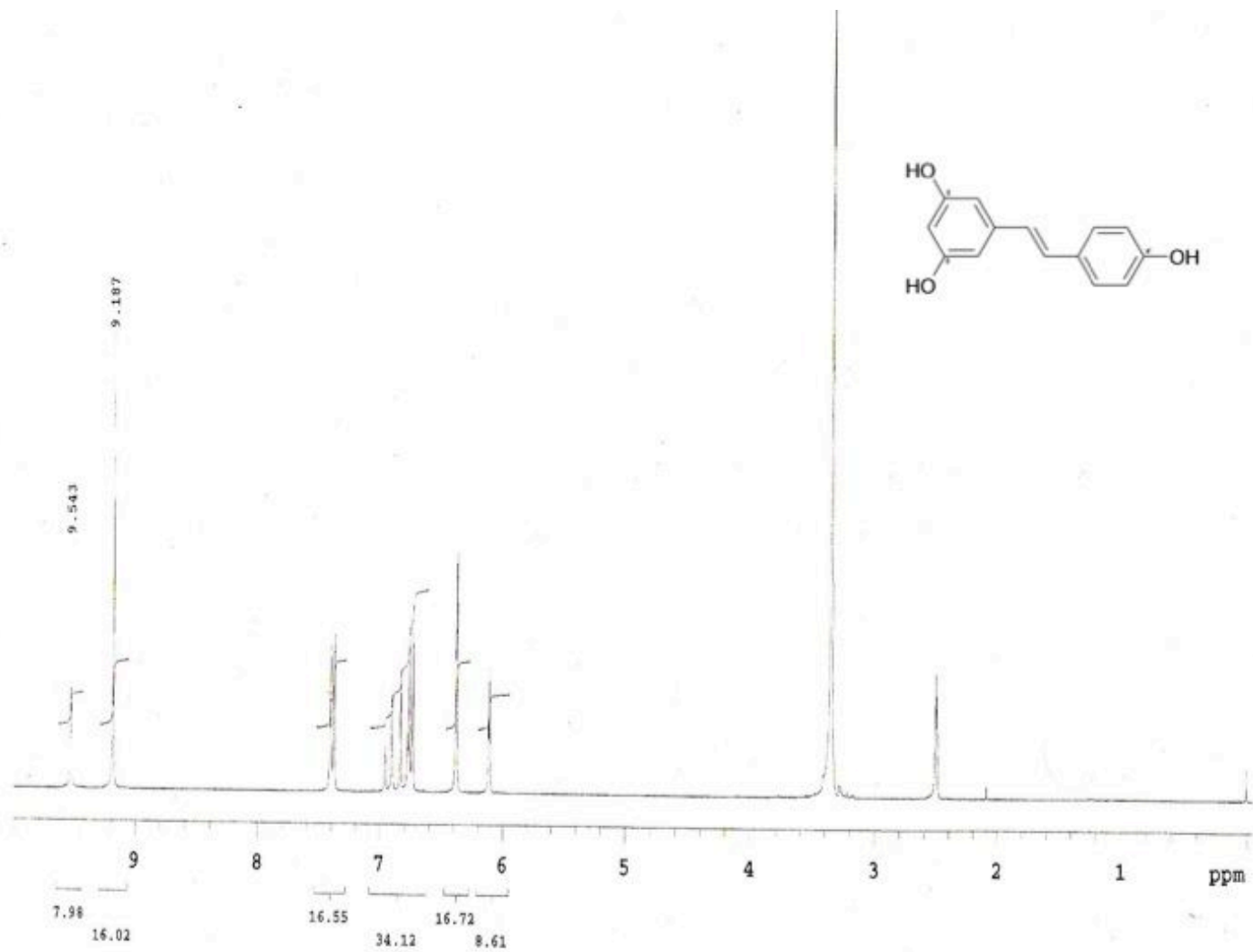
Espectro 2. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H de la naringenina.



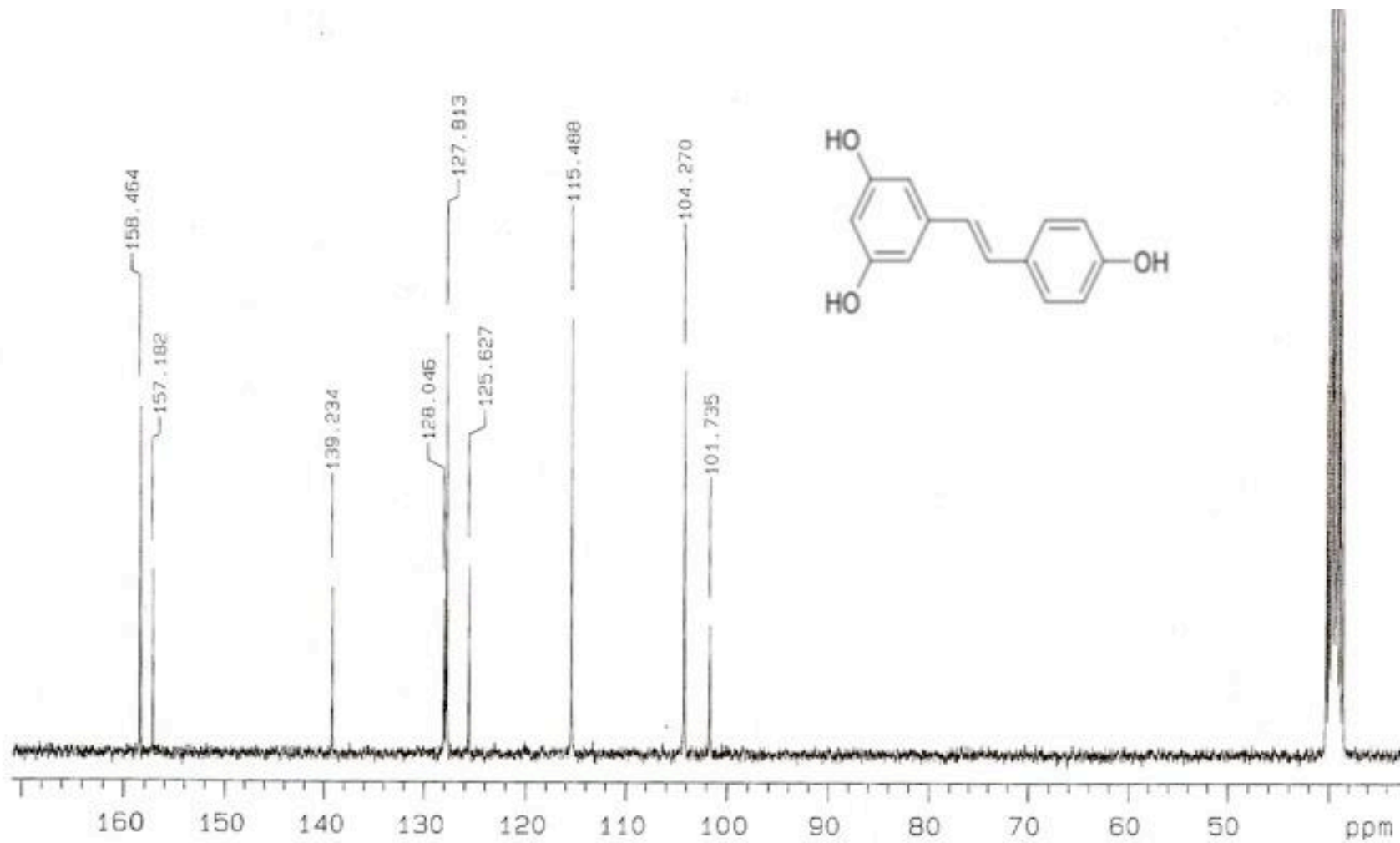
Espectro 3. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C de la naringenina.



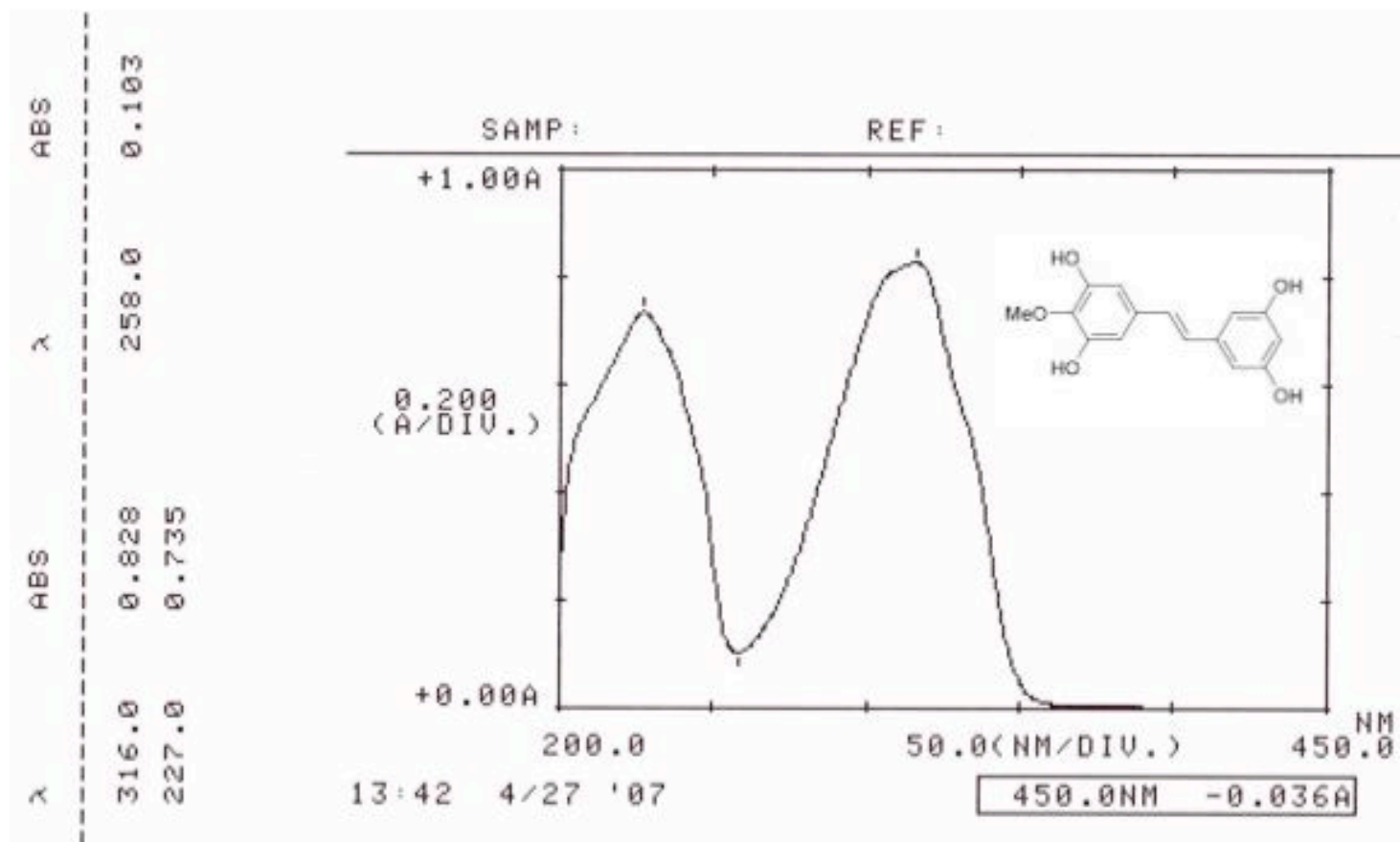
Espectro 4. Espectro de absorción en la región UV del resveratrol.

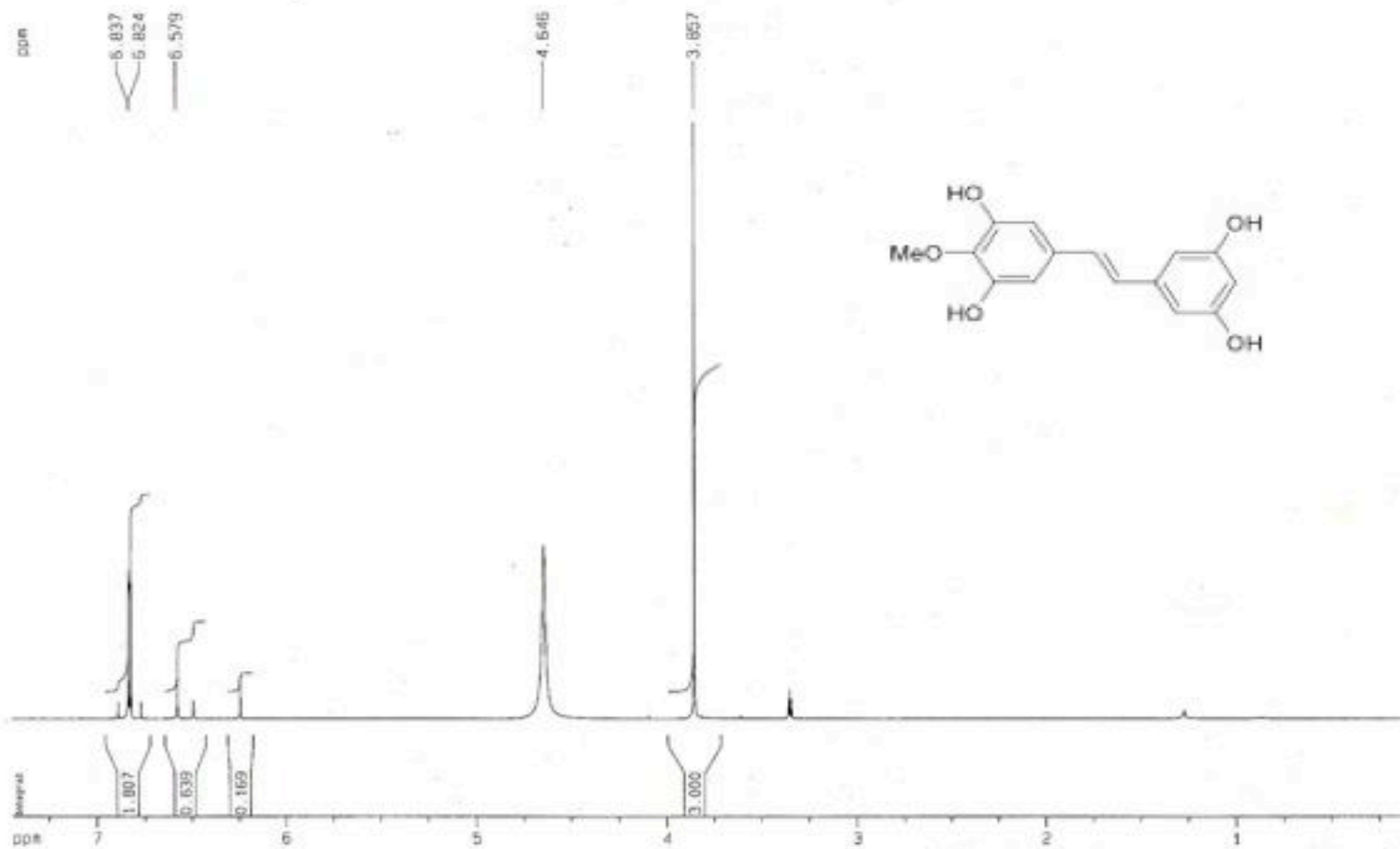


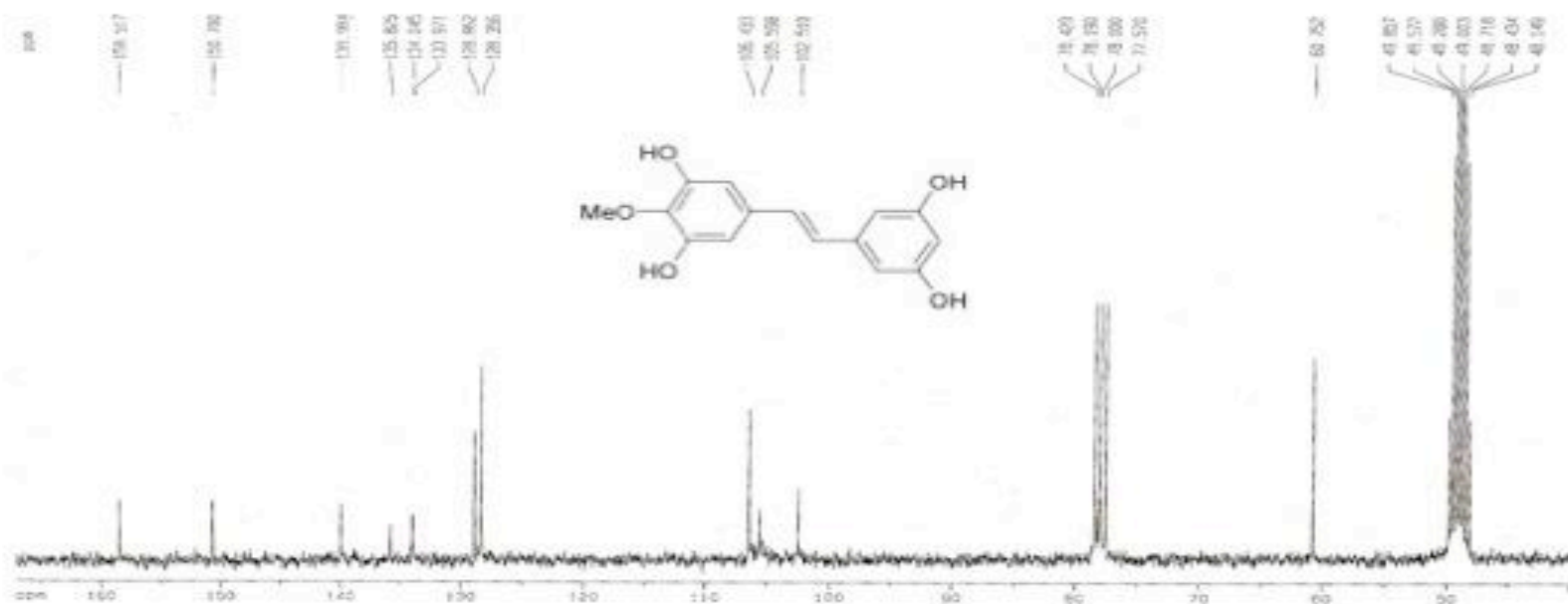
Espectro 5. Resonancia magnética nuclear de ¹H del resveratrol.



Espectro 6. Resonancia magnética nuclear de ¹³C del resveratrol.

Espectro 7. Espectro de absorción en la región UV del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.

Espectro 8. Resonancia magnética nuclear de ^1H del *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxi-4-metoxiestilbeno.



Espectro 9. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno.

13.2 Artículos publicados



© 2010 The Authors
 © 2010 Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 9 (2), 100 - 108
 BLACPMA ISSN 0717 7917

Artículo Original | Original Article

Photoprotective activity of *Yucca periculosa* polyphenols

[Actividad fotoprotectora de los polifenoles de *Yucca periculosa*]

Ana María GARCÍA-BORES^{1,4*}, Christian BELLO¹, Yukiko CAMPOS¹, José del Carmen BENITEZ², Saul FLORES³,
 Margarita CANALES¹, Tzasná HERNÁNDEZ¹, José Guillermo AVILA ACEVEDO¹

¹Laboratorio de Fitoquímica, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México; ²Laboratorio 1, UMF, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México; ³Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México ⁴Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Abstract

The aim of this work was to investigate the potential utility of the methanolic extract of the bark of *Yucca periculosa*, as well as *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (MS), resveratrol, and naringenin for their potential as photochemopreventive agents. All substances have photoprotective effect against UV-B induced cell death in *Escherichia coli*, with MS and resveratrol showing the highest photoprotective properties. The sun protection factor (SPF) of the substances was evaluated by a guinea pig bioassay and a histopathological skin study. All substances prevented skin damage induced by UV and have an SPF higher than the octyl methoxycinnamate (OMC) a commercial sunscreen. The results showed the *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene isolated from *Y. periculosa* may afford substantial protection against the damages caused by UV exposure.

Keywords: Photoprotective activity; polyphenols; *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene; *Yucca periculosa*.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto fotoprotector del extracto metanólico de la corteza de *Yucca periculosa*, y de las sustancias aisladas del extracto: el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxí-4'-metoxiestilbeno (MS), el resveratrol y la naringenina. Todas las sustancias tuvieron un efecto fotoprotector al evitar la muerte celular de *Escherichia coli* inducida por la radiación UV, siendo el MS y el resveratrol los que poseen mayores propiedades fotoprotectoras. El factor de protección solar (FPS) de las sustancias se evaluó en cobayos y mediante un estudio histopatológico de la piel irradiada con UV. Se determinó que todas las sustancias previenen del daño histológico en la piel inducido por la UV, además poseen un FPS mayor que el octil metoxicinnamato OMC, un filtro solar comercial. Los resultados muestran que el MS de *Y. periculosa* presenta un mayor efecto fotoprotector.

Palabras Clave: Actividad fotoprotectora; polifenoles; *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxí-4'-metoxiestilbeno; *Yucca periculosa*.

Recibido | Received: July, 17, 2009.

Aceptado en Versión Corregida | Accepted in Corrected Version: December 21, 2009.

Publicado en Línea | Published Online 25 March 2010

Declaración de intereses | Declaration of interests: authors have no competing interests.

Financiación | Funding: This work was partially financed by grant 52485 CONACYT, IN213309 PAPIIT-DGAPA-UNAM and an internal grant from FES-Iztacala PAPCA-UNAM

This article must be cited as: Ana María García-Bores, Christian Bello, Yukiko Campos, José del Carmen Benitez, Saul Flores, Margarita Canales, Tzasná Hernández, José Guillermo Avila. Photoprotective activity of *Yucca periculosa* polyphenols. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 9(2):100-108. (EPub 25 March 2010).

*Contactos | Contacts: E-mail: boresana@yahoo.com; Tel.: + 52-5-623-11-36; Fax + 52-5-623-12-25;



BLACPMA es una publicación de la Cooperación Latinoamericana y Caribeña de Plantas Medicinales y Aromáticas

This is an open access article distributed under the terms of a Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivative Works 3.0 Unported Licence. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>) which permits to copy, distribute and transmit the work, provided the original work is properly cited. You may not use this work for commercial purposes. You may not alter, transform, or build upon this work. Any of these conditions can be waived if you get permission from the copyright holder. Nothing in this license impairs or restricts the author's moral rights.

Este es un artículo de Acceso Libre bajo los términos de una licencia "Creative Commons Atribución-No Comercial-No trabajos derivados 3.0 Internacional" (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/docs/es>) Usted es libre de copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra bajo las condiciones siguientes: Reconocimiento. Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra). No comercial. No puede utilizar esta obra para fines comerciales. Sin obras derivadas. No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra. Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra. Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor. Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.

INTRODUCTION

Yucca periculosa Baker is a plant of the Agavaceae family, which is native to the states of Oaxaca, Puebla, Tlaxacala and Veracruz in México. The bark of this plant was used in traditional medicine as anti-inflammatory and to treat pain caused by ear infections (Aguilar et al. 1994). In previous studies in our laboratory found that the methanolic extract contains polyphenolic compounds with antioxidant properties: resveratrol and *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (MS) (Torres et al. 2003). The MS showed strong radical scavenging and even stronger antiplatelet activity than did resveratrol (Piacente et al. 2004). We also isolated from *Yucca periculosa* a flavanone, naringenin. Naringenin possess some antioxidant activity, though its activity is poorer in comparison with many other phenols (Erlund, 2004).

Botanical antioxidants have attracted considerable attention because of their skin photoprotective effects. This has generated a great interest in using topical antioxidants for the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. Exposure of the skin to ultraviolet (UV) radiation from the sun, particularly to its UV-B component (280-320 nm), can result in erythema, edema, hyperplasia, hyperpigmentation, sunburn cells, immunosuppression, photoaging, and skin cancer (Afaq and Mukhtar, 2006). Recent changes in lifestyle and the decrease in the earth's ozone layer have led to a significant increase in the amount of UV-B radiation that people receive, leading to a surge in the incidence of skin cancer and photoaging. As these trends are likely to continue in the foreseeable future, the adverse effect of UV-B has become a major human health concern (Baliga and Katiyar, 2006; Nichols and Katiyar, 2009).

A growing awareness of the risks associated with skin exposure to UV-B radiation over the past decades has led to increased use of sunscreen products. Sunscreens provide protection from UV-B radiation by producing a protective layer on the skin in which UV light is absorbed by organic compounds (Rodil and Moeder, 2008). Sunscreens are useful, but their protective properties are not adequate enough to prevent the risk of UV-induced skin cancer, due to their inadequate use, incomplete spectral protection, and toxicity (Baliga and Katiyar, 2006). Therefore, the development of novel strategies to reduce the occurrence of skin cancer and delay the process of photoaging is a highly desirable goal. One approach to reduce the occurrence of skin cancer and photoaging is

through photochemoprevention, which is defined as the use of agents capable of ameliorating the adverse effects of UV-B on the skin (Afaq and Mukhtar, 2006; Baliga and Katiyar, 2006; Nichols and Katiyar, 2009). In recent years, considerable interest has been focused on identifying naturally occurring botanicals for the prevention of photocarcinogenesis. A wide variety of botanicals, mostly flavonoids and other phenolic substances, have been reported to possess substantial anticarcinogenic and antimutagenic activities, due to their antioxidant, anti-inflammatory and sunscreen properties (Afaq and Mukhtar, 2006; Baliga and Katiyar, 2006; Adhami et al. 2008) or promote the repair of molecules like DNA adducts (Nichols and Katiyar, 2009).

One of the most studied compounds is resveratrol. It was showed to possess the potential to ameliorate the damage caused by UVB exposure (acute, semichronic and chronic) to SKH-1 mice. It appears that the protective effects of resveratrol are mediated via its antioxidant potential and its ability to modulate cell cycle and apoptosis signaling pathways (Reagan-Shaw et al. 2008), although has not been determined its sunscreen potential.

Most of the natural polyphenols can absorb UV radiation. Therefore, when applied topically, they can prevent penetration of the radiation into the skin like a sunscreen. This ability of natural polyphenols as sunscreens can reduce the damage induced by UV in the skin (Nichols and Katiyar, 2009). The present study was designed to estimate the potential utility of topically applied polyphenolic compounds isolated from *Y. periculosa* like photochemopreventive agents. With this aim, we evaluated the photoprotective effect of the methanolic extract, stilbenes and naringenin of *Yucca periculosa* against UV-B induced cell death and UV-B induced skin damage in guinea pigs as well as to obtain the sun protection factor.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Yucca periculosa Baker (Agavaceae) bark was collected in September 2004 in Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México and it was identified by Dra. Edith Lopez Villafranco of the IZTA Herbarium at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. A voucher specimen was deposited at the IZTA herbarium (Voucher n° IZTA 27516).

García-Bores et al.

Photoprotective activity of *Yucca periculosa* stilbenes

Extraction procedure

Dried and ground barks of *Y. periculosa* (1,000 g) were extracted at room temperature with methanol. The MeOH extract was filtered and concentrated under vacuum. The remaining residue from the methanolic extract was redissolved in MeOH, and hexane was added to it in a separatory funnel. After solvent-solvent extraction, the fat-free methanolic extract was removed from the hexane portion. The methanol layer was evaporated under reduced pressure, and the extract was kept in the dark at 4 °C until it was tested. The MeOH extract yield was 24.1% w/w, and the extract yield of the hexane portion was 0.8%. Ten grams of the MeOH extract was used in the bioassays, and 230 g was submitted to silica gel column chromatography (G60, Merck) as the solid phase. Elution was carried out with CHCl_3 :MeOH mixtures. Fractions of CHCl_3 :MeOH (95:5, 9:1 and 8:2) gave the following natural products: naringenin (0.718 g) (1), resveratrol (0.348 g) (2), and *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (MS) (2.143 g) (3), respectively. The pure substances were analyzed and characterized by their R_f , UV and ^1H NMR spectroscopic data (Fig. 1). Identification of the compounds was conducted by both spectroscopic analyses and direct comparisons with authentic samples (Wenker and Gottlieb, 1977; Oleszek et al. 2001; Torres et al. 2003).

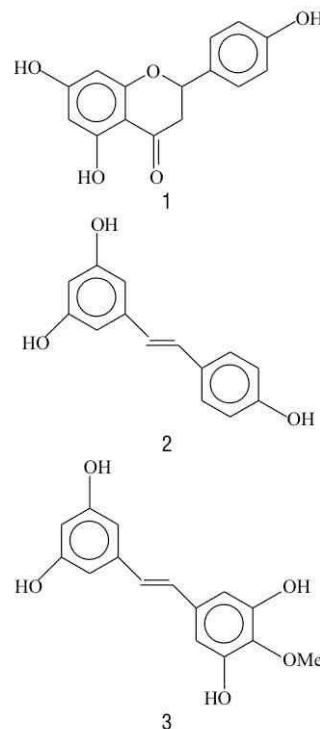
Protective effect against UV-B induced cell death

A strain of *Escherichia coli* (ATCC 25922) was grown in a heart and brain infusion broth (Bioxon-112) until the culture reached a concentration of 10^7 cells/mL (O.D. 0.3 read at 550 nm). The bacteria were centrifuged for 10 min at 5000 rev/min, suspended in Ringer PBS (pH 7.0), and transferred into quartz cuvettes (Pye Unicam B53875 A, thickness 1 mm, capacity 4 mL). Each photoprotective substance was dissolved in MeOH (2 mg/mL) and put in a quartz cuvette. A cuvette containing bacteria was placed behind the cuvette containing the photoprotective substance, forming one experimental unit. The experimental units were irradiated with a UV-B lamp (312 nm, Spectroline EB-280C), with an irradiation dose of 0.60 J/cm^2 (Avila et al. 2005). The number of surviving bacteria was detected in accordance with the dilution method at different time periods. The substances employed were the *Y. periculosa* MeOH extract, naringenin, resveratrol and MS. The positive control was octyl methoxycinnamate (OMC) (ISP VAN DIK) and the negative control was MeOH. Tests

were repeated in at least three independent experiments and the assays were performed in triplicate.

The mortality rate (K) was calculated by linear regression analysis with Microsoft Excel.

Fig. 1. Structures of naringenin 1, resveratrol 2, and *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (MS) 3.



Photoprotective activity against UV-B induced skin damage

Adult female guinea pigs of the Hartley strain weighing 300-350 g were used in this study. The animals were selected at random for each group. The animals were reared on laboratory chow, fed *ad libitum*, and had free access to water at all times. The room was maintained at 22 ± 2 °C with natural daylight. All animal experiments in this study were approved by the Institutional Biosecurity and Animal Ethics Committee.

García-Bores et al.

Photoprotective activity of *Yucca periculosa* stilbenes

The dorsal skin of the guinea pigs to be irradiated was shaved with an electric clipper (Oster Mod 274-01), followed by application of hair removal cream (Velvinette-Wella) a day before exposure of the animals to UV-B radiation. The skin was rinsed under warm tap water and dried. After 24 h, the dorsal skin was treated with 2 mg/cm² of the photoprotective substances – OMC, *Y. periculosa* MeOH extract, naringenin, resveratrol, MS, or vehicle (setting gel-Stil Net) – or was left untreated. Five animals at a time from each group were then wrapped with 7.5 cm wide tape containing six exposure windows (three windows each side of the spinal line) 2.0 cm² in area. After 15 min, the animals were placed under a bank of 5 UV-B lamps (312 nm, Spectroline EB-280C) with an irradiation of 0.60 J/cm². All irradiance measurements were performed using a calibrated radiometer (Spectroline DM-300HA) at the same distance from the lamps as used during cutaneous exposures. Irradiation times of the six exposure windows on each animal were set to bracket the suspected SPF of the substance being tested. The exposure windows were covered at the end of each time point. After irradiation, the tape was removed from the animals (Bissett et al. 1991; Avila et al. 2005).

Sun protection factor

Sunburn erythema is the most conspicuous and well-recognized acute cutaneous response to UV irradiation, and it is the most widely used endpoint in dermatological photobiology. The molecules responsible for light absorption (chromophores) that initiate sunburn inflammation have not been precisely identified. However, the action spectrum of erythema is consistent with the hypothesis that UV interactions with DNA are of major importance. Indirect oxidative damage might also occur secondarily to endogenous photosensitization reactions (Matsumura and Ananthaswamy, 2004). A widely accepted method for sunscreen efficacy measurement is SPF, which is defined as the ratio of the dose of UVR (290–400 nm) required to produce 1 MED (Minimal Erythema Dose) on sunscreen-protected skin (after application of 2 mg/cm² of product) over the dose required to produce 1 MED on unprotected skin (Bissett et al. 1991).

Visual assessment of skin reaction (perceptible unambiguous erythema) was performed 16–24 h after UV-B exposure by three trained observers in the same room under the same lighting conditions. For each animal, the MED on unprotected skin and that on skin protected by the substances were recorded. A

statistical analysis was performed on all the collected data. The non-parametric methods for Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-tests were used to determine the level of significance against the vehicle in each of the experimental SPF determinations. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Histopathological study

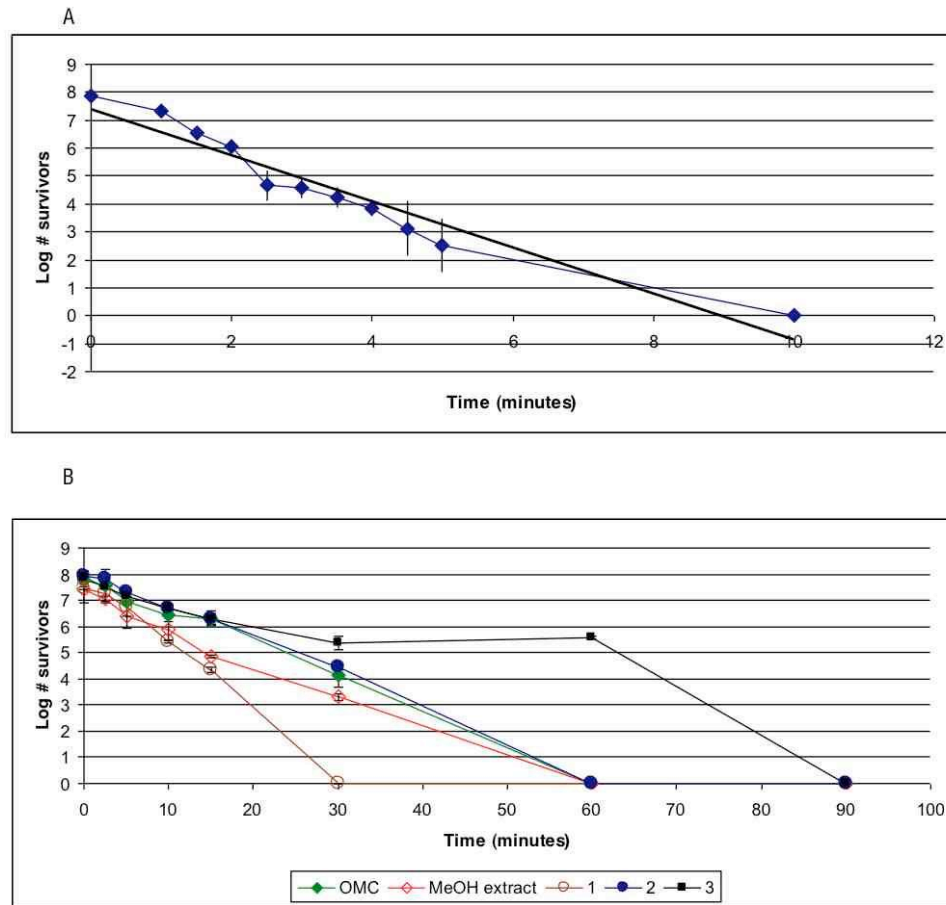
After 24 h of irradiation, the animals were sacrificed using sodium pentobarbital. The UV-B exposed portion of cutaneous tissue was quickly removed and fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and sectioned at 6 μm. Sections were stained with hematoxylin and eosin dyes (H&E stain). Five slides were checked for each of the five animals, and photomicrographs were obtained using a Nikon Labophot-2 microscope with a Nikon Coolpix digital camera.

Table 1. Sun protection factor (SPF) in guinea pigs

Compounds (2 mg/cm ²)	SPF	Exposition time without erythema (min)
Without protection	-	20 ± 2.0
OMC*	2.0 ± 0.1	40 ± 4.5
MeOH extract* ⁺	3.4 ± 0.5	68 ± 9.5
Naringenin* ⁺	3.6 ± 0.6	72 ± 10.1
Resveratrol*	5.0 ± 0.7	100 ± 12.3
MS* ⁰	5.6 ± 0.5	112 ± 8.5

OMC: octyl methoxycinnamate; MS: *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene. *p < 0.05 statistical significance compared with the group without protection, + p < 0.05 statistical significance compared with the group with OMC, ⁰p < 0.05 statistical significance compared with the groups with resveratrol.

García-Bores et al.

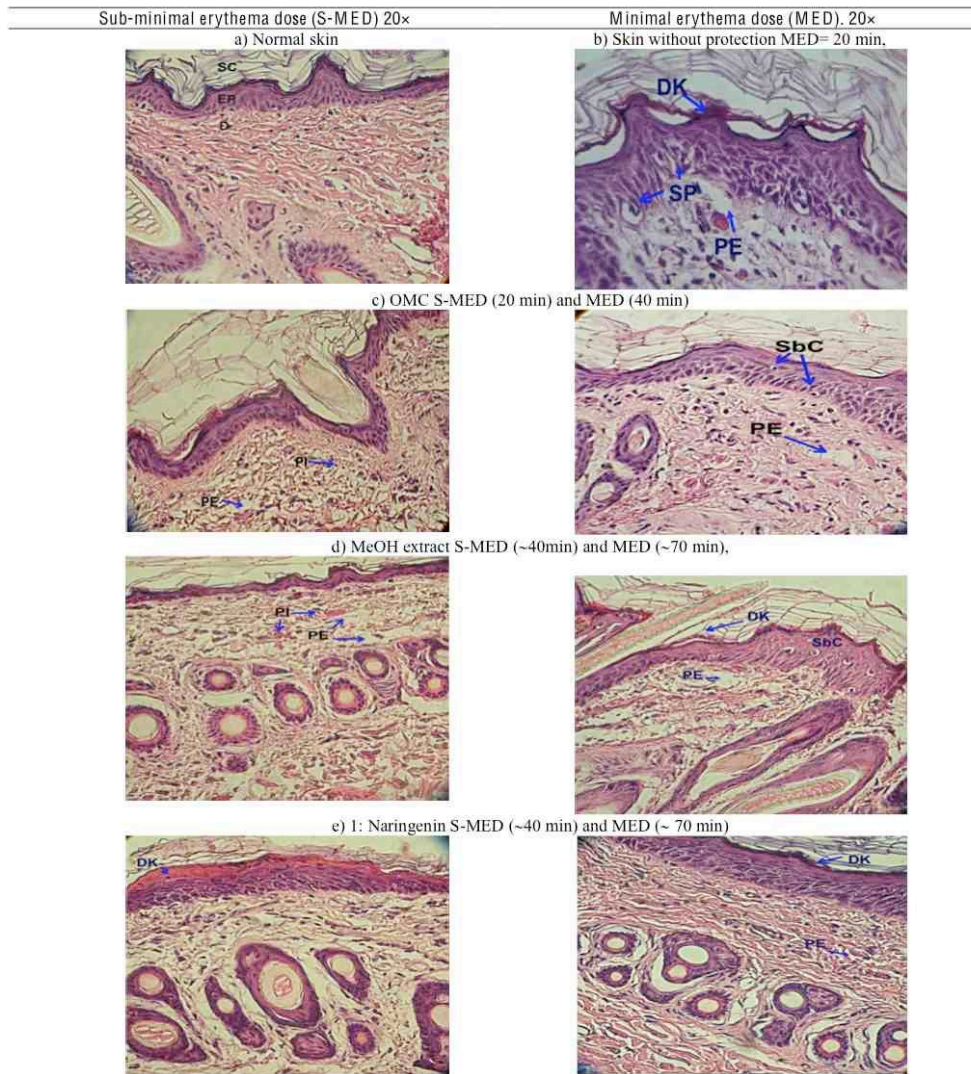
Photoprotective activity of *Yucca periculosa* stilbenesFigure 2. Protective effect against UV-B induced cell death of *E. coli*.

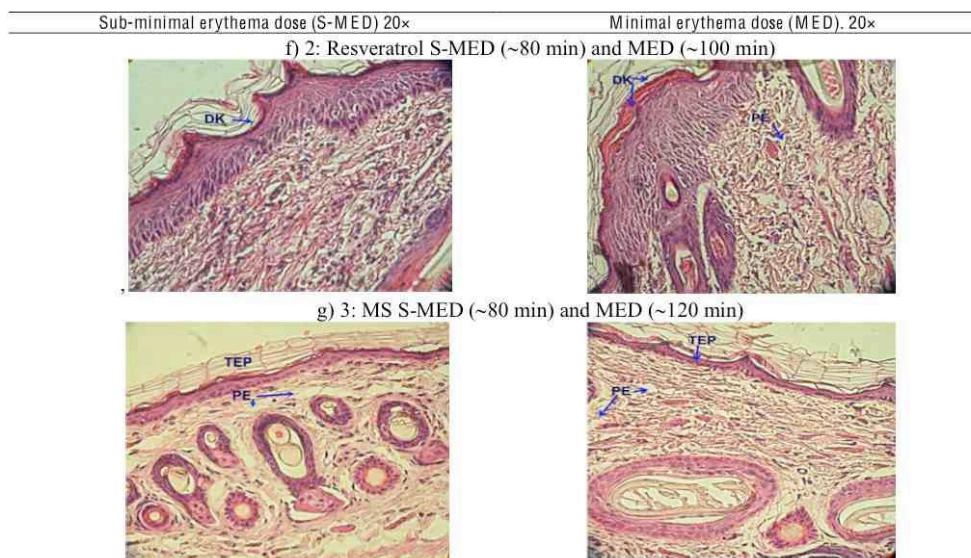
A) Without protection ($K = 0.87$, $R^2 = 0.93$). B With protection, OMC (\blacklozenge) ($K = 0.13$, $R^2 = 0.99$); MeOH extract (\diamond) ($K = 0.12$, $R^2 = 0.99$); 1: Naringenin (\circ) ($K = 0.25$, $R^2 = 0.99$); 2: Resveratrol (\bullet) ($K = 0.09$, $R^2 = 0.93$); 3: MS, *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (\blacksquare) ($K = 0.07$, $R^2 = 0.85$). Each group represents the mean \pm of three independent experiments.

García-Bores et al.

Photoprotective activity of *Yucca periculosa* stilbenes

Figure 3. Histology of skin of UVB-irradiated mice treated with polyphenols of *Yucca periculosa*.





D dermis; DK dyskeratosis; EP epidermis; PE perivascular edema; PI perivascular infiltration; SbC Sunburn cell; SC stratum corneum; SP spongiosis; TEP Thickening epidermis.

RESULTS AND DISCUSSION

Photoprotective activity

The protective effect against UV-B induced cell death was evaluated using *E. coli* as a cell model. The results showed that the bacteria population ($\approx 10^7$) without protection reached cell death at 10 min, with a mortality rate of 0.87 (Fig 2A). Naringenin possesses pronounced photoprotective activity when compared to the negative control, though the results show that it was less active than OMC as a positive control (cell death at 35 min). The MeOH extract and resveratrol both protected their respective bacteria populations in a similar manner and with OMC did not reach cell death until 60 min. The MS protected the bacteria more efficiently than the positive control did; the bacteria population protected by this compound did not reach cell death until 90 min of irradiation with UV-B (Fig 2B).

The constant mortality K is a parameter that indicates the range of inactivation of *E. coli*. The data in Fig. 2 show the photoprotective effect of the phenols of *Y. periculosa* tested. In the present work, all substances (OMC, methanolic extract, naringenin, resveratrol and MS) protected the bacterial population from the lethal effects of UVR. All substances

presented K values lower than experiments without protection (Fig 2B). In the experiments with protection, the K ranged between 0.07 and 0.25. MS showed a strong photoprotective effect against UV-B induced cell death; the K (0.07) was 12.5-fold below the K without protection (0.87). The bacterial decay depends mainly on the dose of radiation that induces damage to DNA. *E. coli* was inactivated when exposed to UV. The effectiveness of UV light in the biological inactivation primarily results from the fact that DNA molecules absorb UV photons between 200 and 320 nm, with peak absorption at 265 nm. In case of lethal damage, DNA replication is blocked by DNA alterations, mainly cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and the pyrimidine (6-4) pyrimidinone (6-4PP), which ultimately results in reproductive cell death. The exposure of a bacterial culture to UV-B produces the rapid decline in population due to damage to the DNA (Oguma et al. 2001; Taghipour, 2004).

The SPF values of the tested substances in this study were determined on guinea pigs (Table 1). The negative control (guinea pigs with vehicle) showed perceptible erythema at 20 ± 2 min; this time was considered as the MED. All the substances of *Y. periculosa* were more active than OMC (SPF $2.0 \pm$

0.1), because a significant difference was observed in comparison with controls ($p < 0.05$). The SPFs obtained for the MeOH extract and for naringenin were 3.4 ± 0.5 and 3.6 ± 0.6 , respectively. Resveratrol and MS were the compounds with the highest photoprotective activity ($p < 0.05$). Their SPFs were 5.0 ± 0.7 and 5.6 ± 0.5 , respectively. These compounds also retarded the appearance of erythema at about $\cong 100$ min. The methanolic extract and the three isolated compounds have maximum absorptions in the UV-B region of the electromagnetic spectrum and are, therefore, potentially photoprotective substances. These substances absorb in the UV-B region as follows: naringenin (λ_{\max} 288 nm), resveratrol (λ_{\max} 305 nm) and MS (λ_{\max} 316 nm). In addition, resveratrol and MS have molar extinction coefficients higher than the OMC (ϵ 37 800 $M^{-1}cm^{-1}$ and ϵ 45 300 $M^{-1}cm^{-1}$, respectively). These results explain the protective properties of the methanolic extract and the compounds isolated in both models against UV-B induced cell death and skin damage.

Sunscreens have long been used to protect against the acute effects of UVR. OMC is a widely used UV-B filter in various cosmetic formulations. It is known that all organic sunscreen agents may induce adverse effects such as irritation, allergic contact reaction, photoallergy, or phototoxicity. Kullavanijaya and Lim (2005) reported photosensitization and/or photoallergic reactions induced by this compound. Previous studies have shown that when exposed to sunlight, this UV-B filter will change from octyl-*p*-methoxy-*trans*-cinnamate (E-OMC) to octyl-*p*-methoxy-*cis*-cinnamate (Z-OMC). The study showed a hypsochromic shift and reduction of the molar extinction coefficient (*trans*: λ_{\max} 310 nm, ϵ 24 000 $M^{-1}cm^{-1}$; *cis*: λ_{\max} 301 nm, ϵ 12600 $M^{-1}cm^{-1}$) (Tarras-Wahlberg et al. 1999).

A histological evaluation was also performed on the guinea pig skin exposed to UVR, and both the unprotected skin and the skin protected by each of the substances. The histological changes after 20 minutes of UV irradiation in guinea pig skin compared with normal skin (Fig. 3a) included thickening of stratum corneum and epidermis, intra-/intercellular and perivascular edema, perivascular infiltration, dyskeratosis, and spongiosis, as shown in Fig. 3b. The guinea pigs treated with a topical, sub-minimal erythema dose of the methanolic extract, the isolated compounds or OMC did not show these UVB-induced inflammatory changes, as shown in the left panels of Figs. 3c to 3g. The histopathological study of the skin

samples exposed at MED with protection showed that a topical application of each of the experimental treatments had a different effect on the skin, which could be an indication that the protection was also linked to the modulation of cellular processes. The appearance of erythema in animals treated with resveratrol and MS occurred at $\cong 100$ minutes, while those animals treated with naringenin or the methanol extract had an appearance of erythema $\cong 70$ minutes. Finally, those animals treated with OMC had an appearance of erythema $\cong 40$ minutes of exposure to RUV. Many agents, like ultraviolet light filters, affect the transmission of ultraviolet light to human skin. In addition, there are agents, such as antioxidants, that can modulate the effects of ultraviolet light on the skin. Most of the naturally occurring chemopreventive polyphenolics exert multifaceted action, and any clinical applications using these substances should be based on the precise understanding of the physiologically relevant action mechanisms. Treatment of UVB-irradiated HaCaT cells with naringenin enhances the removal of CPD from the genome, as observed by both direct quantitation of CPD in genomic DNA and immunolocalization of the damage within the nuclei. Naringenin could protect skin from UVB-induced damage and carcinogenesis via an inhibition of excessive apoptosis and accelerated elimination of UVB-induced promutagenic and precarcinogenic CPD lesions (El-Mahady et al. 2008). Resveratrol imparts protection from short-term UV-B exposure-mediated cutaneous damages in SKH-1 hairless mice (Afaq et al. 2003; Reagan-Shaw et al. 2008). MS has anti-inflammatory and antiplatelet properties and prevents the carbonylation of blood proteins (Wenzig et al. 2008). It is necessary to study the molecular mechanisms of MS-mediated protection of UV-B damage of skin. In the case of the methanolic extract, the effect on the modulation of cellular processes could be diverse, because it is a mixture of compounds. It is also made up of other polyphenolic compounds that are polar in nature and that may interact with the cellular components of skin.

CONCLUSION

The increase in skin cancer morbidity and mortality is alarming and expensive, in both human and economic terms. New strategies are needed to combat this disease. The development of promising chemopreventive agents is a demanding process that requires continuous dedication and funding for the

García-Bores et al.

Photoprotective activity of *Yucca periculosa* stilbenes

development of agents from start to finish. The research of natural products with chemopreventive properties has focused on the antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic activities of the compounds. In addition, this study shows that the polyphenolic compounds isolated from *Y. periculosa*, in particular, MS, are able to absorb UVR, reducing the transmission of this type of radiation to the skin and this is the first report of MS as a photoprotective agent. These compounds thus provide photoprotection due to their antioxidant properties and act as a sunscreen.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Edith López Villafranco and Rosario González Valle for their technical assistance. This work was partially financed by grant 52485 CONACYT, IN213309 PAPIIT-DGAPA-UNAM and an internal grant from FES-Iztacala PAPCA-UNAM.

REFERENCES

- Adhami VM, Syed DN, Khan N, Afaq F. 2008. Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages. *Photochem Photobiol* 84: 489-500.
- Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. 2003. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 18: 28-37.
- Afaq F, Mukhtar H. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol* 15: 678-684.
- Aguilar A, Argueta A, Cano L, Ballesteros L. 1994. Flora Medicinal Indígena de México. Vol II. Instituto Nacional Indigenista. México D. F. pp. 950
- Avila JGA, Castañeda CMC, Benítez FJC, Durán DA, Barroso VR, Martínez CG, Muñoz LJL, Martínez CA, Romo de Vivar A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* 76: 301-309.
- Baliga MS, Katiyar SK. 2006. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci* 5: 243-53.
- Bissett DL, McBride JF, Hannon DP, Patrick LF. 1991. Time-dependent decrease in sunscreen protection against chronic photodamage in UVB-irradiated hairless mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 9: 323-34.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Patnaik S, Zhao Q, Arafa S, Barakat B, Mir SN, Wani AA. 2008. Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Photochem Photobiol* 84: 307-16.
- Erlund I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 24: 851-874.
- Kullavanijaya P, Lim HW. 2005. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol* 52: 937-958.
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195: 298-308.
- Nichols JA, Katiyar SK. 2009. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* Nov 7.
- Oguma K, Katayama H, Mitani H, Morita S, Hirata T, Ohgaki S. 2001. Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. *Appl Environ Microbiol* 67: 4630-4637.
- Oleszek W, Sitek M, Stochmal A, Piacente S, Pizza C, Cheeke P. 2001. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roetzl. *J Agric Food Chem* 49: 747-752.
- Piacente S, Montoso P, Oleszek W, Pizza C. 2004. *Yucca schidigera* bark: phenolic constituents and antioxidant activity. *J Nat Prod* 67: 882-885.
- Reagan-Shaw S, Mukhtar H, Ahmad N. 2008. Resveratrol imparts photoprotection of normal cells and enhances the efficacy of radiation therapy in cancer cells. *Photochem Photobiol* 84(2): 415-421.
- Rodil R, Moeder M. 2008. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1179: 81-88.
- Taghipour T. 2004. Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation. *Water Res.* 38: 3940-3948.
- Tarras-Wahlberg N, Stenhagen G, Larkö O, Rosén A, Wennberg AM, Wennerström O. 1999. Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 113: 547-553.
- Torres P, Avila JG, Romo de Vivar A, García AM, Marín JC, Aranda E, Céspedes CL. 2003. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry* 64: 463-473.
- Wenker E, Gottlieb HE. 1977. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. *Phytochemistry* 16: 1811-1816.
- Wenzig EM, Oleszek W, Stochmal A, Kunert O, Bauer R. 2008. Influence of phenolic constituents from *Yucca schidigera* bark on arachidonate metabolism *in vitro*. *J Agric Food Chem* 56: 8885-8890.



NATURAL PRODUCTS: MOLECULAR MECHANISMS IN THE PHOTOCHEMOPREVENTION OF SKIN CANCER

ANA M. GARCÍA-BORES[†], J. GUILLERMO AVILA

(Recibido Diciembre 2008; Aceptado Diciembre 2008)

ABSTRACT

Cutaneous overexposure to solar radiation, especially its ultraviolet (UVR) component can cause several skin related disorders, some of these include sunburns, immunosuppression and skin cancer. Changes in lifestyle together with depletion in the atmospheric ozone layer during the last decades have led to an increase in the skin cancer (both melanoma and non-melanoma). In Mexico, skin cancer ranks second in frequency among all malignancies, which constitutes 13.6%. Recently, considerable attention has been focused on identify natural products capable of inhibiting, retarding or reversing the multi-stage photocarcinogenesis. A wide array of phenolics substances have been reported to possess substantial antioxidant and anticarcinogenic properties. The photochemopreventive agents can act on molecular targets that modulate cellular processes such as inflammation, immunity, cell cycle progression, and apoptosis. This revision presents the main molecular mechanisms of various phytochemicals in the chemoprevention of skin cancer.

Key words: skin cancer, ultraviolet radiation, photochemoprevention, polyphenols, oxidative stress, signal transduction, immunosuppression

Abbreviations: ↓: down-regulation; ⊥: inhibition; ~: modulation; ↑: up-regulation; (6-4): pyrimidin-piromidona photo aducts; 6-Gin: 6-gingerol; 8-OHdG: 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine; AP-1: activator protein-1; APC: antigen presenting cells; Apig: apigenin; BCC: basal cell cancer; Caff: cafein; CHS: contac hypersensitivity; COX: cyclooxygenase; CPD: cyclobutane pyrimidine dimmer; Cur: curcurmin; Cyt c: cytochrome c; Delp: delphinidin; DFC-DA: 2',7'-dichlorofluorescin diacetate; ECGC: epigallocatechin gallate; Gen: genistein; GGR: global genomic repair; GSH: glutathione; GSP: grape seed proanthocyanidins; GTP: Green tea polyphenols; HEC: human epidermoid carcinoma; IL: interleukin; iNOS: inducible nitric oxide synthasa; LPO: lipid peroxidation; MAPK: mitogen activated protein kinase; NER: nucleotide excision repair; NF-κB: nuclear factor kappa; NHEK: Normal human epidermal keratinocytes; ODC: ornithine decarboxylase; ON: nitric oxide; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; PFE: Pomegranate fruit extract; Pro: proanthocyanidins; Resv: reveratrol; RHNM: Registro histopatológico de neoplasias malignas; ROS: reactive oxygen species; Sang: sanguinarine; SCC: sqamous cell cancer; Sil: sylimarin/silibinin; SPF: sun protection factor; TCR: transcription-coupled repair;

Laboratorio de Fitoquímica, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México. Tel.: + 52-5-623-11-36; Fax + 52-5-623-12-25 e-mail address: boresana@yahoo.com

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; UCA: urocanic acid; UVA: Ultraviolet radiation (320-400 nm) ; UVB: Ultraviolet radiation (280-320 nm) ; UVC : Ultraviolet radiation (200-280 nm) ; UVR : Ultraviolet radiation.

RESUMEN

La exposición excesiva a la radiación solar, especialmente la luz ultravioleta puede causar diversos padecimientos cutáneos, algunos de ellos incluyen las quemaduras solares, la inmunosupresión y el cáncer de piel. Durante las últimas décadas, cambios en el estilo de vida y la disminución en la capa de ozono han provocado el incremento en la incidencia del cáncer de piel melanómico y no melanómico. En México, el cáncer de piel ocupa el segundo lugar en incidencia con una prevalencia del 13.6% de acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Recientemente, una gran cantidad de investigaciones se han enfocado en los productos naturales capaces de inhibir, retardar o revertir la fotocarcinogénesis. Se han propuesto una amplia variedad de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes y anti-mutagénicas como agentes quimioprotectores, los cuales pueden actuar en blancos moleculares que modulen diversos procesos celulares implicados en la inflamación, la inmunidad, el ciclo celular y la apoptosis. Esta revisión presenta los principales mecanismos moleculares de productos naturales en la quimioprevención del cáncer de piel.

Palabras clave: Cáncer de piel, radiación ultravioleta, fotoquimioprevención, polifenoles, estrés oxidativo, transducción de señales, inmunosupresión

Skin and UVR

In the last decades, several human activities such as the release to the environment of chlorofluorocarbon compounds have led to the diminution of the ozone layer. This has resulted in an increase in the amount of solar radiation reaching the earth's surface. Ultraviolet radiation (UVR) from the sun is divided into UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) and UVA (320-400 nm). The amount of UVR which crosses the atmosphere and reaching the earth is approximately 6% of the sun's radiation. The radiation intensity depends on several factors like altitude, latitude and seasons of the year, hour of the day, cloudiness and light dispersion (Goettsch *et al.*, 1998; De Grujil, 1999).

The skin is the body organ that is more exposed to UVR. Several studies *in vitro*

and *in vivo* have demonstrated that UV-B causes damage to various molecules and cellular components, and produces alterations in cell functions. The DNA is the main target; its damage can lead to the skin cancer development (Marrot and Meunier, 2008). The harmful effects of UVR in the skin can be divided into acute (sunburn or erythema, phototoxic reactions, photoallergic, and photosensitivity) and chronic (photoaging, skin cancer and immunosuppression) (Matsumura and Ananthaswamy, 2004; Adhami *et al.*, 2008).

There are experimental and epidemiologic evidences which have show the direct correlation between exposure to UVB with squamous cell cancer (SCC) basal cell cancer (BCC) and melanoma (Black *et al.*, 1997, De Grujil, 1999, Armstrong and Kricke, 2001, Matsumura and Ananthaswamy, 2004). The skin cancer incidence has in-

creased so fast in the last decades that it has been considered as the silent epidemic of the XX century (Stratton *et al.*, 2000). Cutaneous overexposure to solar radiation, especially its ultraviolet (UVR) component can cause several skin related disorders. In México, skin cancer ranks second in frequency among all malignancies, which constitutes 13.6% in the last report of the "Registro histopatológico de neoplasias malignas" (RHNM, 2001). The non-melanoma skin cancer comprising BCC and SCC, are the most frequently diagnosed cutaneous malignancies in the world now and its incidence is increasing. It is well known that they are associated with a low mortality rate, but they have a high cost in the health system. In addition, they produce a high range of disfigurement if the lesions are located in the head or neck. Melanoma is related to the frequency of severe sunburn in childhood. Melanoma can be surgery if it is detected in time, however, when it presents metastasis there is no cure (Stratton *et al.*, 2000).

UVR and DNA damage

The genotoxic effect of UVR is mainly mediated by the absorption of photons by the DNA. The cyclic pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidin-piromidona (6-4) are the main DNA adducts induced by UVR (Hemminki *et al.*, 2000; Marrot and Meunier, 2008). It also produces breaks in DNA, and DNA cross-linking of cross-linking DNA-protein (Pinnell, 2003; Afaq *et al.*, 2005a; Melnikova and Ananthaswamy, 2005). The CPDs and 6-4 occur frequently in sequence with pyrimidines in tandem. Both injuries are potentially mutagenic if not repaired by the system of nucleotide excision repair (NER) (Black *et al.*, 1997; Matsumura and Ananthaswamy, 2004). The mutations are in the form of transitions from C to T and CC to TT, which are characteristic of DNA damage induced by

UVR (De Grujil, 1996; Marrot and Meunier, 2008). NER is a complex system involving more than 30 proteins (Ichihashi, *et al.*, 2003). The mechanism of NER has great versatility in the ability to recognize and repair the alterations in DNA caused by UVR and other carcinogenic chemicals. 6-4 adducts are processed in about one hour after its formation, while the DCPs takes about fifteen hours to be repaired (Black, *et al.*, 1997). It was established that also vary the speed of repairs. The genes active in the transcription process are repaired quickly through the system called the transcription-coupled repair (TCR), while other genes are processed by the system of global genomic repair (GGR). These mechanisms differ only in the process of recognition of the damage to the DNA (Matsumura and Ananthaswamy, 2004).

The p53 tumor suppressor gene plays a decisive role in protecting cell from DNA damage. The increased level of p53 protein after DNA damage is also associated with enhanced apoptosis, presumably in those cells that are too damaged for adequate DNA repair. High doses of UVR have been shown to be associated with the formation of sunburn cells, initiated by p53. On the other hand, p53 is also involved directly and indirectly in NER (Afaq *et al.*, 2005a).

UVR and oxidative stress

The UVR generates ROS and induced oxidative stress in skin cells. Oxidative stress may cause damage at the cellular level, as well as at the molecular level, and this can result in cutaneous inflammation, lipid and protein oxidation, DNA damage, and activation or inactivation of certain enzymes, all of which could potentially contribute to UVB-induced photodamage of the skin. It has been estimated that there are approximately 35 DNA adducts in the presence of ROS, one of the key markers of oxidative DNA damage is 8-hydroxy-2-deoxy-guano-

sine (8-OHdG), which induce the change of guanine to thymine (G T) (Ichihashi *et al.*, 2003). ROS are intracellular mediators that are implicated in signal transduction. ROS generation leads to the expression of specific genes involved in the development of pathological conditions such as immunosuppression and all stages of photocarcinogenesis in skin. Nuclear factor kappa (NF- κ B) is a ubiquitously expressed transcription factor, regulates gene involved in inflammation, immunity, cell cycle progression, and apoptosis. NF- κ B activation is subject to redox regulation. Activator protein-1 (AP-1) transcription factor is a protein dimer composed of proteins from the Fos and Jun families. AP-1 activation, which is also redox regulated, principally leads to cell proliferation and transformation. In addition, NF- κ B and AP-1 are activated by UVR, either independently or coordinately regulate the expression of several target genes whose protein products are molecular markers of processes such as inflammation, immunosuppression, and tumor transformation, such as cyclooxygenase (COX), nitric oxide synthase (NOS) and ornithine decarboxylase (ODC) (Afaq *et al.*, 2005a).

UVR and immunosuppression

Epidermis keratinocytes with DNA damage UV induced, secrete interleukin 10 (IL-10), which produces an immunosuppressive microenvironment that alters the local and systemic immune response. Locally, on the site exposed to UVR, the contact hypersensitivity reaction (CHS) is reduced. Hypersensitivity to a large variety of antigens has been observed in systemic immune response. On the other hand, immunosuppression may be a risk factor in the infections caused by microorganisms (Black *et al.*, 1997; Ichihashi *et al.*, 2003). Keratinocytes produced trans-urocanic acid (trans UCA), which participates in

the differentiation of the stratum corneum and contributes to the homeostasis of the upper layers of skin maintaining the pH. In the skin, UVR induce isomerization of trans-UCA to the cis-UCA (Adhami *et al.*, 2008). The cis-UCA has an immunosuppressive effect by altering the activity of the antigen presenting cells (APC), possibly through the secretion of IL-10. In the skin exposed to UVR have seen a decrease in the number of APC, therefore does not start the immune response. Interleukin 12 (IL-12) can reverse the suppressive effect of IL-10 (Matsumura and Ananthasawamy, 2004). There is ample experimental and clinical evidence to suggest that immune factors contribute to photocarcinogenesis. Chronically immunosuppressed patients living in regions of intense solar radiation have an exceptionally high risk of skin cancer (Adhami *et al.*, 2008).

Photocarcinogenesis

The development of skin cancer is a complex multistage phenomenon. Photocarcinogenesis involves several simultaneous and sequential events UVR induced that result in the development of skin cancer. The development of carcinoma depends on the time, the intensity and the wavelength at which the skin is exposed (Black *et al.*, 1997). UVR is a complete carcinogen because it induces the three stages of carcinogenesis: initiation, promotion and progression. The initiation is the first event in the process of photocarcinogenesis, is an indispensable and irreversible step in which the DNA damage altered gene expression of epidermal cells (Afaq *et al.*, 2005a). Tumor promotion is the process that involves clonal expansion of initiated cells that produce the pre-malignant and malignant lesions, essentially by alterations in signal transduction pathways. The promotion of damaged cells to a state preneoplastic lasts about 10 years. Finally, the

progression of carcinoma *in situ* and the conversion of the lesion into an invasive and potentially metastatic malignant tumor occur in one year (Surh, 1999; Stratton *et al.*, 2000; Matsumura and Ananthaswamy, 2004; Afaq *et al.*, 2005a).

Photoprotection

Exposure to UVR has several adverse effects on the skin. Actions recommended to prevent overexposure to UVR include: avoiding exposure to the sun, wear clothing that protects the neck, arms and legs, using hats and sunglasses; the use of sunscreens and blockers with a sun protection factor (SPF) of 15 or higher; to teach children to protect themselves from the sun; deliberately avoid tanning in tanning beds and examine the skin regularly to detect the presence of early cancers (Agarwal and Mukhtar, 1996; Kullavanijaya and Lim, 2005). Sunscreens are chemicals that can absorb UV light efficiently, are applied topically and protected from the adverse effects of sunlight, mainly erythema. Most of the commercial formulations contain several active ingredients for a broad SPF of 280 to 400 nm (UVB and UVA). The application of sunscreen before exposure to UV radiation prevents sunburn, DNA damage and skin cancer (Pinnell, 2003). However, sunscreens can induce side effects such as irritation, allergy, phototoxic reactions, affect the synthesis of vitamin D, generate ROS and act as photosensitizers. These primary prevention approaches have had limited success. Therefore, additional efforts are needed to prevent skin cancer (Kullavanijaya and Lim, 2005).

Photochemoprevention

Several studies have evaluated the protective effect of natural products against damage induced by UVR in cells, tissues,

animals and humans. Photochemoprevention is the use of synthetic or natural substances that prevent, delay or reverse the damage caused by UVR (Agarwal and Mukhtar, 1996; Surh, 1999; Stratton *et al.*, 2000; Afaq *et al.*, 2005a). Within this concept we can find a variety of polyphenolic compounds with antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory and antimutagenic properties. In general, photochemopreventive agents act on two levels: a) prevention of the damage caused by UVR and b) modulation of different cellular responses to UVR that can prevent, stop or correct tumor promotion and progression (Afaq *et al.*, 2005a; Adhami *et al.*, 2008).

The photochemoprevention involves substances capable of absorbing the UV and act as filters, prevent DNA damage and immunosuppression. In addition, polyphenolic compounds with antioxidant activities protect against photooxidative damage on DNA, lipids and proteins. On the other hand, exposure to UVR initiates a cascade of events that altered gene expression, which means the signal transduction involved in inflammation, apoptosis, immunosuppression, and cell proliferation. Photochemopreventive agents can act on molecular targets that modulate cellular processes such as the activation of the transcription factors as NF- κ B, AP-1, and several kinases like mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Afaq *et al.*, 2005a).

In recent years, epidemiological and experimental studies have focused on a wide variety of natural products that provide protection to the development of skin cancer because it can alter or correct a variety of cellular functions induced by the UVR. The use of natural products as photochemopreventive agents can contribute in reducing the risk of skin cancer in combination with changes in lifestyle, diet and products for skin care. This revision presents the main molecular mechanisms of various phytochemicals in the chemoprevention of skin cancer (Fig 1 and Table 1).

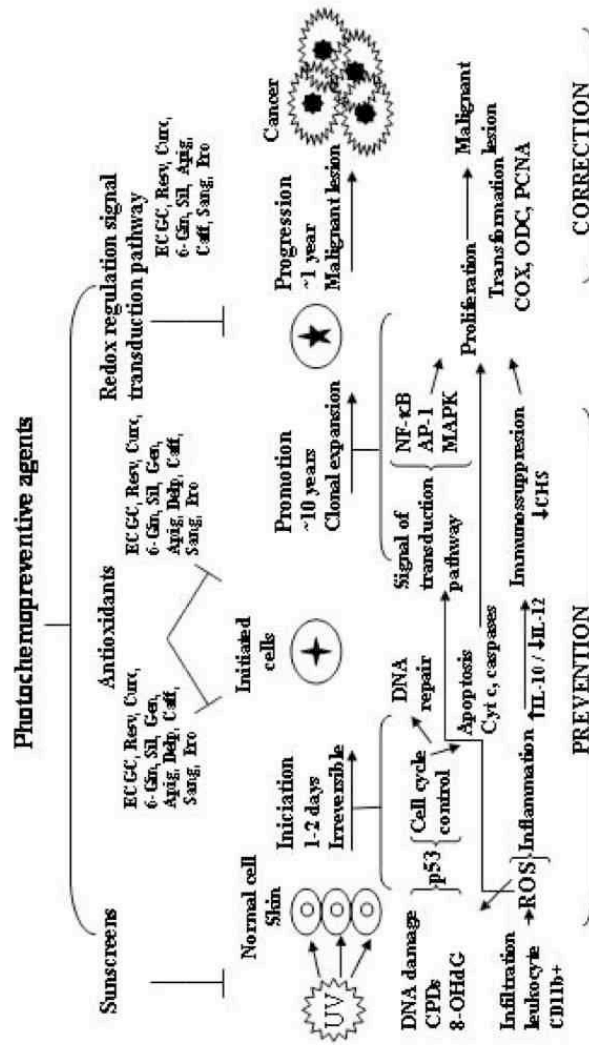
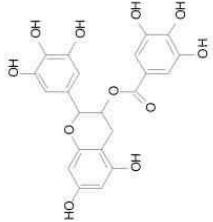
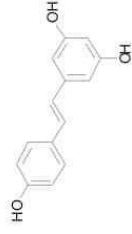

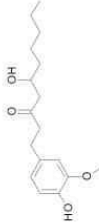
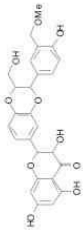
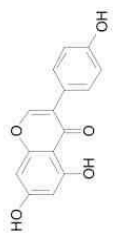
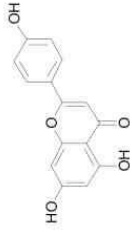
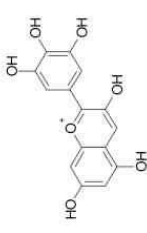


Fig 1. Schematic representation of the photocarcinogenesis in skin and molecular mechanisms of the photochemopreventive agents. †: up regulation; ‡: down-regulation; ↓: inhibition; CPDs: cyclobutane pyrimidine dimer; 8-OHdG: 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine; ROS: reactive oxygen species; Cyt c: cytochrome c; IL: interleukin; CHS: contact hypersensitivity; NF-κB: nuclear factor kappa; AP-1: activator protein-1; MAPK: mitogen activated protein kinase; COX: cyclooxygenase; ODC: ornithine decarboxylase; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; ECGC: epigallocatechin gallate; Resv: resveratrol; Cur: curcumin; 6-Gin: 6-gingerol; Sil: silymarin/silibinin; Gen: genistein; Apig: apigenin; Delc: delphinidin; Caff: caffeine; Sang: sanguinarine; Pro: proanthocyanidins.

Compound Source	Structure	Model	Target/Mechanism	Reference
EGCG Green tea <i>Camellia sinensis</i>		Balb/c <i>In vitro</i> C3H/HeN	↓ incidence, multiplicity, volume of tumors ↓LPO, ↓Protein oxidation Restoration GSH level, ↓ROS ↓ Infiltration CD11b+ cells ~ of cell signaling pathways; ↓NF-κB, ↓AP-1 ~ cytokine IL 10/IL 12, ↓ Immunosuppression, ↓Inflammation ↑ p53, ↑NER ~ Cell cycle	Ahmad and Mukhtar, 1999 Pinnell, 2003 Katiyar and Mukhtar, 2001 Afaq <i>et al.</i> , 2005a Matsumura and Anastawamy, 2004 Katiyar <i>et al.</i> , 2007 Lu <i>et al.</i> , 2000
Resveratrol		SKH-1 <i>In vitro</i> SKH-1 NHEK	Antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative properties ↓Edema, ↓H ₂ O ₂ , ↓infiltration of leukocytes, ↓ODC, ↓COX ↓ NF-κB	Dong, 2003 Afaq <i>et al.</i> , 2003 Adhami <i>et al.</i> , 2003
Curcumin <i>Curcuma longa</i>		CD-1 mice/TPA HEC cell A431 HaCat cell	↓COX, ↓ODC ↓Caspases, ↓Cytochrome c, ↓ oxidative stress, ~ Apoptosis ↓COX, ↓AP-1, ↑Caspases, ↑Cytochrome c, ~ Apoptosis	Ishizaki <i>et al.</i> , 1996 Oguro and Yoshida, 2001 Chang <i>et al.</i> , 2003 Cho <i>et al.</i> , 2005
Gingerol <i>Zingibe officinale</i>		JB6 cells HaCat cell SKH-1	↓ AP-1 ↓ ROS, ↓ caspases, ↓COX-2, ↓ NF-κB ↓ COX-2, ↓ NF-κB	Bode <i>et al.</i> , 2001 Kim <i>et al.</i> , 2007
Silymarin Flavonoids mix		SENECAR SKH-1	↓COX-2 ↓ Number of tumors	Agarwal <i>et al.</i> , 1994 Katiyar <i>et al.</i> , 1997

				<p>↓ Oxidative stress, ↓ LPO, ↓ ROS, Restoration GSH leve</p> <p>↓ IL-10, ↑ IL-12</p> <p>↓ ROS, ↓ Infiltration CD11b+</p>	<p>Svobodová <i>et al.</i>, 2007</p> <p>Meeran <i>et al.</i>, 2006</p> <p>Katiyar <i>et al.</i>, 2008</p>
				<p>↓ Tumor appearance, multiplicity, volume, Gu <i>et al.</i>, 2007</p> <p>↓ iNOS, ↓ COX-2, ↓ Cell proliferation</p> <p>↓ NF-κB,</p> <p>↓ CPDs, ↓ PCNA, p53</p> <p>↓ Apoptosis (pre-treatment)</p> <p>↓ Apoptosis (post-treatment)</p>	<p>Dhanalakshmi <i>et al.</i>, 2004</p> <p>Mallikarjuna <i>et al.</i>, 2004</p> <p>Mohan <i>et al.</i>, 2004</p>
				<p>Regulation of cell cycle</p> <p>↓ H₂O₂, ↓ LPO, ↓ 8-OHdG</p> <p>↓ Erythema, ↓ inflammation</p> <p>↓ Caspases</p> <p>↓ c-fos, ↓ c-jun</p> <p>Preserve proliferation ↑ NER</p>	<p>Barnes and Peterson, 1995</p> <p>Wei <i>et al.</i>, 2002</p> <p>Chan and Yu, 2002</p> <p>Wang <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Moore <i>et al.</i>, 2006</p>
				<p>↓ Cancer incidence, ↓ ODC</p> <p>~ Cell cycle</p> <p>Stabilisation of p53</p> <p>↓ COX-2 expression, modulation and RNAm stability</p> <p>↑ Apoptosis</p> <p>↑ Cytochrome c</p>	<p>Birt <i>et al.</i>, 1997</p> <p>Lepley <i>et al.</i>, 1996</p> <p>Mc Vean <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Tong <i>et al.</i>, 2007</p> <p>Abu-Yousif <i>et al.</i>, 2008</p>
				<p>~ MAPK, ~ NF-κB</p> <p>↓ LPO, ↓ PCNA,</p> <p>↓ 8-OHdG, ↓ caspases</p> <p>Apoptosis (Bax, Bcl 2), ↓ CPDs, ↓ 8-OHdG</p>	<p>Afaq <i>et al.</i>, 2005b</p> <p>Afaq <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>Silibinin</p> <p><i>Silybum marianum</i></p>		<p>SKH-1</p> <p>HEC cell A431</p>			
<p>Genistei</p> <p>Soy isoflavones</p>		<p>Tumor cells</p> <p>SKH-1</p> <p>Mice</p> <p>HEC cells</p> <p>A431</p> <p>SENECAR</p> <p>Reconstituted skin</p>			
<p>Apigenin</p> <p>Vascular plants</p>		<p>SKH-1</p> <p>C50, 308K, HL-60 cell line</p> <p>308K cells</p> <p>HaCat</p>			
<p>Pomegranate fruit extract</p> <p>Delphinidin</p> <p><i>Punica granatum</i></p>		<p>SKH-1</p>			

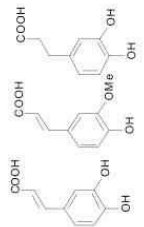
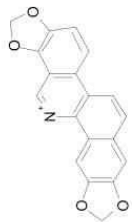
Caffeic acid Ferulic acid Dihydrocaffeic acid Caffeine		Human volunteers HaCat SKH-1	↓ Erythema ↓ Interleukin pro-inflammatory IL-6, IL-8 ↑ Apoptosis, ↑ p53, ↑ sunburn cells ↓ Tumor multiplicity ↑ Apoptosis (only in the tumor), ↓ Formation of tumor	Saija <i>et al.</i> , 2000 Poquet <i>et al.</i> , 2008 Lu <i>et al.</i> , 2000 Lu <i>et al.</i> , 2001 Conney <i>et al.</i> , 2007
Sanguinarine <i>Sanguinaria canadensis</i>		Cells lines HEC cells A431 HaCat SKH-1	↓ NF-κB ↓ Growth, survival, ↑ Apoptosis Anti-proliferative, ~ Apoptosis ↓ Edema, ↓ hyperplasia, ↓ infiltration of leukocytes, ODC, PCNA, H ₂ O ₂	Chaturdevi <i>et al.</i> , 1997 Ahsan <i>et al.</i> , 2007 Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2006 Ahsan <i>et al.</i> , 2007
Proanthocyanidins <i>Vitis vinifera</i>		SKH-1	↓ Incidence, multiplicity of tumors ↓ Oxidative stress, ↓ MAPK, ↓ NF-κB ↓ Immunosuppression	Mittal <i>et al.</i> , 2003 Mantenaad and Katiyar, 2006 Sharma <i>et al.</i> , 2006

Table 1. Molecular mechanisms of photochemopreventive agents. ↓: down-regulation; ↑: up-regulation; ~: modulation; ↓: inhibition; NHEK: Normal human epidermal keratinocytes; HEC: Human epidermoid carcinoma; LPO: lipid peroxidation; NF-κB: nuclear factor kappa; AP-1: activator protein-1; IL: interleukin; NER: nucleotide excision repair; ODC: ornithine decarboxylase; COX: cyclooxygenase; ROS: reactive oxygen species; CPDs: cyclobutane pyrimidine dimer; iNOS: inducible nitric oxide synthase; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; 8-OHdG: 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine; MAPK: mitogen activated protein kinase.

Epigallocatechin gallate (EGCG)

Epidemiological studies have shown that high consumption of green tea decreases the frequency of various types of malignancies, including skin cancer (Katiyar and Mukhtar, 1996). Green tea is a rich source of polyphenols (GTP), mainly of EGCG, as they constitute 30 to 35% of the dry weight of the leaf (Table 1). The GTP are mainly derived from catechin (Ahmad and Mukhtar, 1999). In studies with mice Balb/c it has been determined that both topical and oral administration of EGCG decrease the incidence, multiplicity and the volume of tumors induced by UV (Ahmad and Mukhtar, 1999; Katiyar *et al.*, 2001). The application of EGCG induces partial regression of papillomas in mice. Furthermore, chronic administration showed no visible signs of toxicity. Several studies in experimental models *in vitro* and *in vivo* indicated that the GTP prevents photocarcinogenesis through several molecular mechanisms (Katiyar *et al.*, 2007). EGCG acts as potent antioxidant and can scavenge ROS, as superoxide radicals, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and singlet oxygen (Pinnell, 2003; Adhami *et al.*, 2008).

The topical application of EGCG decreases the production of H_2O_2 and nitric oxide (NO) as well as the expression of NOS in epidermis and dermis in mice C3H/HeN. EGCG also protect human skin from oxidative stress induced by UV and to restore the level of glutathione (GSH) and antioxidant enzymes in the skin. In the same way, the EGCG pretreatment inhibits UVR-induced infiltration of inflammatory leukocytes, particularly $CD11b^+$ cells (a surface marker of monocytes/macrophages and neutrophils), these cells are the main producers of ROS in the skin (Katiyar and Mukhtar, 2001). It has been demonstrated that oxidative stress caused by exposure to UVR, active transcription factors such as NF- κ B and members of the complex AP-1, c-Fos and c-Jun. The GTP regulate signal transduction

in human keratinocytes, inhibit the expression of c-fos, the activity of AP-1 and modulate MAPK signaling and NF- κ B induced by UV (Afaq *et al.*, 2005a; Matsumura and Ananthaswamy, 2004). EGCG produces a balance in the relationship between cytokines IL-10/IL-12. This can be mediated by antigen presenting cells in the skin and lymph nodes or to block the infiltration of $CD11b^+$ cells that secrete IL-10 (Afaq *et al.*, 2005a; Katiyar *et al.*, 2007). This suggests that the application of EGCG on the skin reduces inflammation and inhibits the signals involved in cellular processes such as inflammation, proliferation and cell transformation that play an important role in the development of skin cancer.

Cutaneous overexposure to UVR produces direct damage to DNA (CPDs). CPDs have been implicated in UVR induced immunosuppression and initiation of photocarcinogenesis. The p53 tumor suppressor gene plays a decisive role in protecting cell from DNA damage. The increased level of p53 protein after DNA damage is also associated with enhanced apoptosis. The oral administration of GTP in hairless mice SKH-1 increases the number of cells positive for p53 (Lu *et al.*, 2000) and induces the DNA repair process (Katiyar *et al.* 2007). EGCG regulate cell cycle progression and induce apoptosis in p53-dependent transformed cells (Ichihashi *et al.*, 2003).

Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene)

Resveratrol is present in at least 72 species of plants and also in the red wine (Table 1). This compound possesses antiinflammatory, antiproliferative and antioxidant properties. It inhibits platelet aggregation and modulates the metabolism of lipids (Dong, 2003). Resveratrol is considered as a potential chemopreventive agent in various types of cancer, due to the impact of this compound in several cellular events related to the initiation, promotion and progres-

sion of tumors (Surh, 1999; Dong, 2003). Single topical application of resveratrol to SKH-1 hairless mice was found to result in significant inhibition of UVB mediated skin edema and generation of H_2O_2 as well as leukocyte infiltration in epidermis. The resveratrol treatment to mouse skin was also found to result in significant inhibition of UVB-mediated induction of COX enzyme and ODC activities and protein expression of ODC, which are well-established markers for tumor promotion. Resveratrol inhibits UVB-mediated increased level of lipid peroxidation, a marker of oxidative stress (Afaq *et al.*, 2003). Pre-treatment of normal human epidermal keratinocytes (NHEK) with resveratrol inhibited UVR-mediated activation of NF- κ B in dose and time dependent manner (Adhami *et al.*, 2003).

Curcumin

Curcumin (diferuloylmethane) is a yellow odorless pigment isolates from the rhizome of turmeric (*Curcuma longa* L.) (Table1). Curcumin possesses anti-inflammatory, anti-tumoral and antioxidant properties (Ammon and Wahl, 1991). The molecular basis of anticarcinogenic and chemopreventive effects of curcumin is attributed to its effect on several targets, including transcription factors, growth regulators, adhesion molecules, apoptotic genes, angiogenesis regulators and cellular signaling molecules (Aggarwal *et al.*, 2003). It has been found that topical application of curcumin in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-pretreated epidermis of CD-1 mice significantly inhibited UV-A induced ODC activity and ODC gene expression. The inhibitory effects of curcumin were attributed to its ability to scavenge ROS (Ishizaki *et al.*, 1996; Oguro and Yoshida, 2001). Curcumin can prevent UV irradiation-induced apoptotic changes in human epidermoid carcinoma A431 cells, including mitochondrial release of cytochrome

c, caspase-3 activation. Flow cytometric analysis using the cell permeable dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) as an indicator of ROS generation, revealed that the increase in intracellular oxidative stress caused by UV irradiation could be abolished by curcumin (Chan *et al.*, 2003). Treatment of curcumin and UVR synergistically induced apoptotic cell death in HaCaT cells through activation of caspase 8, 3 and 9 followed by released of cytochrome c. Treatment with curcumin strongly inhibited COX-2 mRNA and protein expression in UV-B irradiated HaCaT cell. Curcumin inhibited UVB-induced AP-1 transcriptional activation in HaCaT cells (Cho *et al.*, 2005).

[6]-Gingerol

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) one of the most heavily consumed dietary substances in the world; have been shown to inhibit tumor promotion in mouse skin (Katiyar *et al.*, 1996) (Table 1). The oleoresin from the root of ginger contains [6]-gingerol, the major pharmacologically active component. This compound has antibacterial, anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor activity (Shukla and Singh, 2007). It has been found to possess potent antioxidant activity as determined by inhibition of phospholipids peroxidation induced by $FeCl_3$ -ascorbate system (Aeschbach *et al.*, 1994). [6]-gingerol block EGF-induced cell transformation, inhibited EGF-induced AP-1 DNA binding activity in a concentration-dependent manner in JB6 cells (Bode *et al.*, 2001). *In vitro*, pre-treatment with gingerol reduced UVB-induced intracellular reactive oxygen species levels, activation of caspase 3, 8,-9, and Fas expression. It also reduced UVR-induced expression and transactivation of COX-2. Translocation of NF- κ B from cytosol to nucleus in HaCaT cells was inhibited by [6]-gingerol via suppression of I κ B α phosphorylation. Topical

application gingerol prior to UVB irradiation of hairless mice SKH-1, also inhibited the induction of COX-2 mRNA and protein, as well as NF- κ B translocation (Kim *et al.*, 2007). These results suggest that [6]-gingerol could be an effective therapeutic agent providing protection against UVB-induced skin disorders.

Silymarin and Silibinin

Silymarin is an extract of the milk thistle plant, *Silybum marianum* L. Silymarin consists of a mixture of 3 flavonoids found in the fruit, seeds, and leaves of the milk thistle plant: silibinin, silydianin, and silychristine (Table 1). Silibinin is the main component (70%-90%) and is thought to have the most biologic activity (Pinnell, 2003). Topical silymarin could almost completely inhibit the effect of TPA, a tumor promoter, from inducing ODC activity in SENCAR mice (Agarwal *et al.*, 1994). Topical silymarin was demonstrated to have a remarkable antitumor effect, the number of tumors induced in the skin of hairless mice SKH-1 by UVB irradiation was reduced by 92% (Katiyar *et al.*, 1997). Silymarin has strong antioxidant activity and prevented lipid peroxidation and scavenged ROS. The antioxidant and anticarcinogenic effects of silymarin in mouse models has been established, and silibinin has been shown to be the main constituent responsible for these effects. Treatment of irradiated HaCaT cells with silymarin resulted in concentration-dependent diminution of oxidative stress induced by UV-A. Silymarin application reduced GSH depletion, ROS production and lipid peroxidation in irradiated cells (Svobodová *et al.*, 2007). In addition, silymarin inhibited UVB-induced sunburn cell formation and apoptosis. Topical silymarin prevented the formation of pyrimidine dimers after UVB exposure to hairless mouse skin. Silymarin reduced the UV-B induced enhancement of the levels of the immuno-

supresor cytokine IL-10 in the skin, and increase de levels of IL-12 (Meeran *et al.*, 2006). C3H/HeN mice were irradiated with or without topical treatment of silymarin. Treatmen with the mix of flavonoides inhibited UV-induced oxidative stress through inhibition of infiltrating CD11b⁺ cells (Katiyar *et al.*, 2008).

Topical or dietary silibinin treatment caused protection against photocarcinogenesis in terms of delay in tumor appearance, multiplicity, and volume. Silibinin decreased inducible iNOS and (COX-2) levels. Simultaneously, silibinin also decreased UVB-caused increase in cell proliferation and microvessel density. This compound inhibited UVB-caused phosphorylation and nuclear translocation of NF- κ B DNA binding activity (Gu *et al.*, 2007). Dietary feeding of silibinin to hairless mice SKH-1 for 2 weeks before irradiation with UV-B resulted in a strong decrease in UV-B-induced CPDs positive cells and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Silibinin enhances UVB-induced p53 as a possible mechanism to protect skin epidermal cells from DNA damage and inhibit proliferation and apoptosis or sunburn cell formation (Dhanalakshmi *et al.*, 2004; Mallikarjuna *et al.*, 2004). Irradiation of human epidermoid carcinoma A431 cells with UVB resulted in a dose- and time-dependent increase in apoptosis. Silibinin pre-treatment, resulted in an increase in UVB-induced apoptosis, but its post-treatment caused a decrease in UVB-induced apoptosis. A similar pattern in the activation of caspases 9, 3, and 7 was observed with silibinin treatment. Further, silibinin treatment prior to or immediately after UVB exposure altered Bcl-2, Bax, Bak, and cytochrome c levels in mitochondria and cytosol in favor of or against apoptosis, respectively. Silibinin treatment prior to UVB also increased the activation of mitogen/stress activated protein kinases Erk1/2, JNK, and p38 kinase as compared to its post-treatment (Mohan *et al.*, 2004). Together, these results sug-

gest that silibinin has multiple targets in the cell to prevent UVB-induced skin carcinogenesis.

Soy isoflavones

Soybeans and their associated food products are a rich source of flavonoids called isoflavones (Table 1). The most plentiful isoflavones in soy are genistein and daidzein. Genistein have potent anticarcinogenic effects that are largely independent of their estrogenic activities (Bingham *et al.*, 1998). Genistein is a strong inhibitor of tyrosine protein kinases (TPK), which is necessary for regulation of cell division and topoisomerase II, and ribosomal S6 in the cell culture (Barnes and Peterson, 1995). Genistein is a potent antioxidant. Pretreatment of hairless mice with genistein prior to UV-B exposure inhibited UV-B induced H_2O_2 , lipid peroxy radicals and 8-OHdG in epidermis (Wei *et al.*, 2002). Genistein inhibited *in vitro* UV-induced DNA oxidation (Wei *et al.*, 1996). Genistein reduced erythema and histologic inflammation induced by PUVA in mouse skin. In addition, genistein inhibited UV-induced apoptotic changes, including caspase-3 and p21 activated kinase (AK) 2 activation in human epidermal carcinoma cells A431 (Chan and Yu, 2000). Topical administration of genistein before UV-B radiation reduced c-fos and c-jun expression in SENECA mouse skin in dose dependent manner (Wang *et al.*, 1998). In human reconstituted skin, genistein dose-dependently preserved cutaneous proliferation and repair mechanics as demonstrated by the preservation of proliferating cell populations with increasing genistein concentrations (Moore *et al.*, 2006). In conclusion, genistein presents compelling photoprotective efficacy and potently minimizes the detrimental effects of UVB irradiation in skin. Its capacity for regulating these events is likely to be attributable to the scavenging of reactive

oxygen species, the inhibition of oxidative and photodynamic damage to DNA.

Apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone)

Apigenin is a natural, plant flavonoid present in the leaves and stems of vascular plants, including fruits and vegetables (Table 1). It is relatively nontoxic and nonmutagenic in comparison with other flavonoids such as quercetin. Apigenin and other flavonoids are strong antioxidants which exert a number of effects on cell biology. Apigenin scavenge free radicals, which are involved in cell damage and tumor promotion. Apigenin treatment to murine skin resulted in inhibition of UV-B mediated induction of ODC activity as well as reduction in cancer incidence (Birt *et al.*, 1997). Initial studies examined the effects of apigenin on the cell cycle. DNA flow cytometric analysis indicated that culturing cells for 24 h in medium containing apigenin induced a reversible G2/M arrest in two mouse skin derived cell lines, C50 and 308, as well as in human HL-60 cells (Lepley *et al.*, 1996). Apigenin induced the level of p53 protein in mouse keratinocyte 308 cells. The half-life of p53 protein was found to be increased an average of 8-fold in apigenin-treated cells compared with vehicle-treated cells and increase the expression of p21/waf1. The mechanism of p53 protein stabilization and transactivational activity were by stimulating the p53-p21/waf1 response pathway (McVean *et al.*, 2000).

Apigenin inhibits UV-induced COX-2 expression is through modulation of USF transcriptional activity in the 5' upstream region of the COX-2 gene. Apigenin treatment also increased COX-2 mRNA stability. Two RNA-binding proteins, HuR and the T-cell-restricted intracellular antigen 1-related protein (TIAR) were associated with endogenous COX-2 mRNA in 308 keratinocytes, and apigenin treatment increased their localization to cell cytoplasm. Reduc-

tion of HuR levels by small interfering RNA inhibited apigenin-mediated stabilization of COX-2 mRNA. Cells expressing reduced TIAR showed marked resistance to apigenin's ability to inhibit UVB-induced COX-2 expression. Taken together, these results indicate that in addition to transcriptional regulation, another mechanism by which apigenin prevents COX-2 expression is through mediating TIAR suppression of translation (Tong *et al.*, 2007). Apigenin treatment enhanced UVB-induced apoptosis in HaCaT human keratinocyte cells, primary keratinocyte cultures isolated from human neonatal foreskin, and human organotypic keratinocyte cultures. When keratinocytes were exposed to UVB, apigenin treatment stimulated changes in Bax localization and increased the release of cytochrome c from the mitochondria compared with UVB exposure alone. Overexpression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and expression of a dominant-negative form of Fas-associated death domain led to a reduction in the ability of apigenin to enhance UVB-induced apoptosis. These results suggest that enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin treatment involves both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. The ability of apigenin to enhance UVB-induced apoptosis may explain, in part, the photochemopreventive effects (Abu-Yousif *et al.*, 2008).

Delphinidin

Pomegranate fruit extract (PFE) derived from the tree *Punica granatum* L. possesses strong antioxidant and antiinflammatory properties (Table 1). PFE contains anthocyanins, ellagitannins and hydrolyzable tannins. PFE inhibits UVB-mediated: phosphorylation of mitogen-activated protein kinase; activation of IKK α ; degradation and phosphorylation of I κ B α ; and nuclear translocation and phosphorylation of NF- κ B in normal human epidermal keratinocytes.

Among the six anthocyanidins present in pomegranate fruit extract, delphinidin is the most abundant and is known to be present in many other pigmented fruits and vegetables like berries, dark grapes, egg plant, tomato, carrot, purple sweet potatoes, red cabbage, and red onion (Afaq *et al.*, 2005b). The pretreatment of HaCaT cells with delphinidin protected against UV-B mediated decrease in cell viability and induction of apoptosis. Furthermore, pretreatment of HaCaT cells with delphinidin inhibited UV-B induced increase in lipid peroxidation; suppression of oxidative DNA damage (8-OHdG); decrease in PCNA expression; activation of caspases; increase in Bax; decrease in Bcl-2. Topical application of delphinidin to SKH-1 hairless mouse skin inhibited UVB-mediated apoptosis and markers of DNA damage such as CPDs and 8-OHdG. These results suggest that treatment of HaCaT cells and mouse skin with delphinidin inhibited UVB-mediated oxidative stress and reduced DNA damage, thereby protecting the cells from UVB-induced apoptosis (Afaq *et al.*, 2007).

Miscellaneous

Caffeic acid and ferulic acid are two hydroxycinnamic acid largely present in plant and also in vegetable foods, such as olives and olive oil. Topical application of olive oil before and after UV-B exposure protects against UV-induced oxidative stress and the immunosuppressive effect (Ichihashi *et al.*, 2003). Applied topically caffeic acid and ferulic acid protect against UV-B induced erythema in healthy human volunteers (Saija *et al.*, 2000). Dihydrocaffeic acid, a dietary constituent and a microbial metabolite of flavonoids, is an antioxidant and reduces the cytotoxicity and pro-inflammatory cytokine production (IL-6 and IL -8) in HaCaT cells, following UV radiation (Poquet *et al.*, 2008).

Studies have demonstrated that oral administration of caffeine to hairless mice

SKH-1 enhanced UV-induced p53-positive cells and apoptotic sunburn cells in epidermis (Lu *et al.*, 2000). Caffeine decreases the size and thickness of the dermal fat layer under tumors and may decrease tumor multiplicity (Lu *et al.*, 2001). Oral administration of a caffeine solution for 2 weeks enhanced UVB-induced increases in apoptosis in the epidermis, but these treatments had no effect in non-UVB treated normal epidermis. Topical applications of caffeine to mice previously treated with UVB for 20 weeks (high risk mice without tumors) inhibited the formation of tumors and stimulated apoptosis in the tumors but not in areas of the epidermis away from tumors. Caffeine has selective effect on apoptosis in DNA damaged tissues (Conney *et al.*, 2007).

Sanguinarine isolated from *Sanguinaria canadensis*, is a benzophenanthridine alkaloid (Table 1). It has been shown to possess antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties. Recently, one study suggested that sanguinarine suppresses the growth and survival of human epidermoid carcinoma cells. In addition, this agent has been shown to inhibit the NF- κ B (Chaturvedi *et al.*, 1997) by induction of apoptosis pathway (Ahmad *et al.*, 2000). Pretreatment of the HaCaT cells with sanguinarine caused a significant enhancement in the antiproliferative response of UVB. These responses on UVB and/or sanguinarine treatments were associated with decrease in Bcl-2 and Bcl-X and increase in Bax, Bid, and Bak protein levels. Furthermore, sanguinarine treatment was found to result in significant modulations in p53, and superoxide dismutase levels. The sanguinarine may protect skin cells from UVB-mediated damages via apoptotic elimination of damaged cells that escape programmed cell death (Reagan-Shaw *et al.*, 2006). Topical application of sanguinarine in hairless mice SKH-1 resulted in a significant decrease in UVB-mediated increases in skin edema, skin hyperplasia

and infiltration of leukocytes. Further, sanguinarine treatment also resulted in a significant decrease in UVB mediated generation of H₂O₂ and increases in the protein levels ODC and PCNA (Ahsan *et al.*, 2007).

The seeds of the grape (*Vitis vinifera*) are particularly rich source of proanthocyanidins, and that compounds represent the major type of polyphenols in red wine. Grape seed proanthocyanidins (GSPs) have been shown to be potent antioxidants and free radical scavengers. Furthermore, GSPs have been shown to have anti-carcinogenic activity in different cancer models including skin cancer. Dietary supplementation with GSPs in SKH-1 hairless mice is associated with a decrease of UVB-induced skin tumor development in terms of tumor incidence, tumor multiplicity, and a decrease in the malignant transformation of papillomas to carcinomas (Mittlal *et al.*, 2003). The chemopreventive effects of dietary GSPs are mediated through the attenuation of UV-induced: oxidative stress; activation of MAPK and NF- κ B signaling pathways (Mantena and Katiyar, 2006; Sharma *et al.*, 2007) as well as immunosuppression through alterations in immunoregulatory cytokine (Sharma *et al.*, 2006). Collectively, these studies indicate protective potential of GSPs against experimental photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice, and the possible mechanisms of action, suggest that dietary GSPs could be useful in the attenuation of the adverse UV-induced health effects in human skin (Katiyar, 2008).

CONCLUSION

The bulk of the research involving natural products and skin cancer has focused on the polyphenolics antioxidants. The general consensus was that antioxidants might play a role in modulating the initiation of the carcinogenesis process by protecting against DNA damage. Phytochemicals an-

tioxidants have been proven to be remarkably efficient in protecting the skin against UVR-induced photooxidative damage, and this photoprotective effect has been associated with their ability to quench free radical formation. However, antioxidants have more complex mechanisms through which they may prevent or modulate the process of photocarcinogenesis. Emerging findings suggest a variety of potential mechanisms of action of polyphenols in cytoprotection against oxidative stress, which may be independent of conventional antioxidant-reducing activities. Such mechanisms might entail the interaction of polyphenols with cell signaling and influence gene expression, with the consequent modulation of

specific enzymatic activities that drive the intracellular response against oxidative stress. The natural products constitute an important group of pharmacological agents capable of preventing the occurrence and reducing the severity of UVR induced skin diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support through grants 52485 CONACYT and internal grant of FES-Iztacala PAPCA-UNAM.

REFERENCES

- Abu-Yousif, A.O., Smith, K.A., Getsios, S., Green, K.J., Van Dross, R.T., Pelling, J.C. (2008) Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures. *Cancer Research* **68**: 3057-3065.
- Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology* **32**: 31-36.
- Adhami, V.M., Afaq, F., Ahmad, N. (2003) Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF- κ B in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia* **5**:74-82
- Adhami, V.M., Syed, D.N., Khan, N., Afaq, F. (2008) Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages. *Photochemistry and Photobiology* **84**: 489-500.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Ahmad, N. (2003) Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **186**: 28-37.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H. (2005a) Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research* **571**: 153-173.
- Afaq, F., Malik, A., Syed, D., Maes, D., Matsui, M.S., Mukhtar, H. (2005b) Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor κ B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology* **81**: 38-45.
- Afaq, F., Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.H., Khan, N., Zaid, M.Z., Mukhtar, H. (2007) Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT Keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology* **127**: 222-232.
- Agarwal, R., Katiyar, S.K., Lundgren, D.W., Mukhtar, H. (1994) Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice. *Carcinogenesis* **15**: 1099-1103.

- Agarwal, R., Mukhtar, H. (1996) Chemoprevention of photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology* **63**: 440-444.
- Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C. (2003) Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* **23**: 363-398.
- Ahmad, H., Mukhtar, H. (1999) Green tea polyphenols and cancer: Biologic mechanisms and practical implications. *Nutrition Reviews* **57**: 78-83.
- Ahmad, N., Gupta, S., Husain, M.M., Heiskanen, K.M., Mukhtar, H. (2000) Differential anti-proliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research* **6**: 1524-1528.
- Ahsan, H., Reagan-Shaw, S., Eggert, D.M., Tan, T.C., Afaq, F., Mukhtar, H., Ahmad, N. (2007) Protective effect of sanguinarine on ultraviolet B-mediated damages in SKH-1 hairless mouse skin: implications for prevention of skin cancer. *Photochemistry and Photobiology* **83**: 986-993.
- Ammond, H.P.T., Wahl, M.A. (1991) Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* **77**:1-7.
- Armstrong, B.K., Krickler, A. (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*: **63**: 8-18.
- Barnes, S., Peterson, T.G. (1995) Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **208**: 103-108.
- Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., Coward, A. (1998) Phytoestrogens where are we now? *British journal of nutrition* **79**: 393-406.
- Black, H.S., De Grujil, F.R., Forbes, P.D., Cleaver, J.E., Ananthaswamy, H.N., De Fabo, E.C., Ullrich, S.E. and Tyrrell, R.M. (1997) Photocarcinogenesis: An overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*: **40**: 29-47.
- Birt, D.F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P., Pinch, H.C. (1997) Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Research* **17**: 85-91.
- Bode, A.M., Ma, W.Y., Surh, Y.J., Dong, Z. (2001) Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. *Cancer Research* **61**: 850-853.
- Chan, W.H., Yu, J.S. (2000) Inhibition of UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermal carcinoma A431 cells by genistein. *Journal of Cellular Biochemistry* **78**: 73-84.
- Chan, W.H., Wu, C.C., and Yu, J.S. (2003) Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **90**: 327-338.
- Chaturvedi, M.M., Kumar, A., Darnay, B.G., Chainy, G.B., Agarwal, S., Aggarwal, B.B. (1997) Sanguinarine (pseudochelerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *Journal of Cellular Biochemistry* **272**: 30129-30134.
- Cho, J.W., Park, K., Kweon, G.R., Jang, B.C., Baek, W.K., Suh, M. H., Kim, C.W., Lee, K. S. and Suh, S. I. (2005) Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. *Experimental and Molecular Medicine* **37**: 186-192.
- Conney, A.H., Zhou, S., Lee, M.J., Xie, J.G., Yang, C.S., Lou, Y.R., Lu, Y. (2007) Stimulatory effect of oral administration of tea, coffee or caffeine on UVB-induced apoptosis in the epidermis of SKH-1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **224**: 209-213.
- De Grujil, F.R. (1999) Skin cancer and solar UV radiation. *European Journal of Cancer* **33**: 2003-2009.
- Dhanalakshmi, S., Mallikarjuna, G.U., Singh, R.P., Agarwal, R. (2004) Silibinin prevents UV

- radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice via decrease in thymine dimer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. *Carcinogenesis* **25**:1459-1465.
- Dong, Z. (2003) Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research* **523-524**: 145-160.
- Goettsch, W., Hurks, H.M., Garssen, J., Mommaas, A.M., Slob, W., Hoekman, J., Pierik, F., Roholl, P.J., Van Loveren, H. (1998) Comparative immunotoxicology of ultraviolet B exposure I. Effects of *in vitro* and *in situ* ultraviolet B exposure on the functional activity and morphology of Langerhans cells in the skin of different species. *British Journal of Dermatology* **139**: 230-238.
- Gu, M., Singh, R.P., Dhanalakshmi, S., Agarwal, C., Agarwal, R. (2007) Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Cancer Research* **67**: 3483-3491.
- Hemminki, K., Koskinen, M., Rajaniemi, H., Zhao, C. (2000) DNA adducts, mutations, and cancer. *Regulatory toxicology and pharmacology* **32**:264-75.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Biyo, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T. (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**:21-39.
- Ishizaki, C., Oguro, T., Yoshida, T., Wen, C.Q., Suekei, H., Iijima, M. (1996) Enhancing effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase induction and dermatitis evoked by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and its inhibition by curcumin in mouse skin. *Dermatology* **193**: 311-317.
- Katiyar, S.K. (2008) Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**: S71-S76.
- Katiyar, S.K., Afaq, F., Perez, A., Mukhtar, H. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* **22**: 287-294.
- Katiyar, S. K., Agarwal, R., Mukhtar, H. (1996) Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of *Zingiber officinale* rhizome. *Cancer Research* **56**: 1023-1030.
- Katiyar, S.K., Elmets, C.A., Katiyar, S.K. (2007) Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *Journal of nutritional biochemistry* **18**: 287-296.
- Katiyar, S.K., Korman, N.J., Mukhtar, H., Agarwal, R. (1997) Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *Journal of the National Cancer Institute* **89**:556-566.
- Katiyar, S. K., Meleth, S., Sharma, S.D. (2008) Silymarin, a flavonoid from milk thistle (*Silybum marianum* L.), inhibits UV-induced oxidative stress through targeting infiltrating CD11b+ cells in mouse skin. *Photochemistry and Photobiology* **84**:266-271.
- Katiyar, S.K., Mukhtar, H. (1996) Tea consumption and cancer. *World Review of Nutrition and Dietetics* **79**:154-184.
- Katiyar, S. K. Mukhtar, H. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. *Journal of Leukocyte Biology* **69**: 719-726.
- Kim, J.K., Kim, Y., Na, K.M., Surh, Y.J., Kim, T.Y. (2007) [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Research* **41**: 603-614.
- Kullavanijaya, P., Lim, H.W. (2005) Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology* **52**: 937-958.

- Lepley, D.M., Li, B., Birt, D.F., Pelling, J.C. (1996) The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis* **17**: 2367-2375.
- Lu, Y.P., Lou, Y.R., Li, X.H., Xie, J.G., Brash, D., Huang, M.T., Conney, A.H. (2000) Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21(WAF1/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. *Cancer Research* **60**: 4785-4791.
- Lu, Y.P., Lou, Y.R., Lin, Y., Shih, W.J., Huang, M.T., Yang, C.S., Conney, A.H. (2001) Inhibitory effects of orally administered green tea, black tea, and caffeine on skin carcinogenesis in mice previously treated with ultraviolet B light (high-risk mice): relationship to decreased tissue fat. *Cancer Research* **61**: 5002-5009.
- Mallikarjuna, G., Dhanalakshmi, S., Singh, R.P., Agarwal, C., Agarwal, R. (2004) Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. *Cancer Research* **64**: 6349-6356.
- Mantena, S.K., Katiyar, S.K. (2006) Grape seed proanthocyanidins inhibit UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radicals in Biology and Medicine* **40**:1603-1614.
- Marrot, L., Meunier, J.R. (2008) Skin DNA photodamage and its biological consequences. *Journal of the American Academy of Dermatology* **58**: S139-S148.
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H.N. (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* **195**: 298-308.
- McVean, M., Xiao, H., Isobe, K., Pelling, J.C. (2000) Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis* **21**:633-639.
- Meeran, S.M., Katiyar, S., Elmets, C.A., Katiyar, S.K. (2006) Silymarin inhibits UV radiation induced immunosuppression through augmentation of interleukin-12 in mice. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**:1660-1668.
- Melnikova, V.O., Ananthaswamy, H. (2005) Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research* **571**: 91-106.
- Mittal, A., Elmets, C.A., Katiyar, S.K. (2003) Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: Relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis* **24**: 1379-1388.
- Mohan, S., Dhanalakshmi, S., Mallikarjuna, G.U., Singh, R., Agarwal, R. (2004) Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**:183-189.
- Moore, J.O., Wang, Y., Stebbins, W.G., Gao, D., Zhou, X., Phelps, R., Lebwah, M., Wei, H. (2006) Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. *Carcinogenesis* **27**:1627-1635.
- Oguro, T. and Yoshida, T. (2001) Effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase and metallothionein gene expression in mouse skin. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* **17**: 71-78.
- Pinnell, S. (2003) Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology* **48**: 1-19.
- Poquet, L., Clifford, M.N., Williamson, G. (2008) Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**:196-204.
- Reagan-Shaw, S., Breur, J., Ahmad, N. (2006) Enhancement of UVB radiation-mediated apop-

- toxis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes. *Molecular cancer therapeutics* **5**: 418-429.
- RHNM, 2001. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>
- Sajja, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., Bonina, F. (2000) *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics* **199**:39-47.
- Sharma, S.D., Katiyar, S.K. (2006) Dietary grape-seed proanthocyanidins inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12. *Carcinogenesis* **27**:95-102.
- Sharma, S.D., Meeran, S.M., Katiyar, S.K. (2007) Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling *in vivo* SKH-1 hairless mice. *Molecular cancer therapeutics* **6**: 995-1005.
- Shukla, Y., Singh, M. (2007) Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 683-690.
- Stratton, S.P., Dorr, R.T., Alberts, D.S. (2000) The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. *European Journal of Cancer* **36**: 1292-1297.
- Surh, Y.J. (1999) Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal substances. *Mutation Research* **428**:305-327.
- Svobodová, A., Zdarilová, A., Walterová, D., Vostálová, J. (2007) Flavonolignans from *Silybum marianum* moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes. *Journal of Dermatological Science* **48**: 213-24.
- Tong, X., Van Dross, R.T., Abu-Yousif, A., Morrison, A.R., Pelling, J.C. (2007) Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. *Molecular and Cellular Biology* **27**:283-296.
- Wang, Y., Zhang, X.S., Lebwohl, M., Deleo, V., Wei, H.C. (1998) Inhibition of ultraviolet B (UVB)-induced c-Fos and c-Jun expression *in vivo* by a tyrosine kinase inhibitor genistein. *Carcinogenesis* **19**:649-654.
- Wei, H., Cai, Q., Rahn, R.O. (1996) Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis* **17**:73-77.
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y., Lebwohl, M. (2002) Inhibition of ultraviolet light induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Letters* **185**:21-29.