



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO PRESENTA
FUENTES ROMO CINDY ASTRED

EFFECTO PROTECTOR DEL VERBASCÓSIDO SOBRE EL DAÑO
INDUCIDO EN LA PIEL POR LUZ ULTRAVIOLETA DE RATONES SKH-1

ASESORA DE TESIS
DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

NOVIEMBRE DEL 2011



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.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a la UNAM, la casa máxima de estudios, de la cual me siento orgullosamente satisfecha por brindarme la oportunidad de cursar esta carrera tan maravillosa, que me deja tantas enseñanzas, experiencias y momentos inolvidables que quedaran marcados por el resto de mi vida, en mi corazón y en mis pensamientos.

A la FES Iztacala y toda la comunidad que la conforman, pues en ella encontré un segundo hogar y sé que tendré las puertas abiertas hoy y siempre.

Al laboratorio de fitoquímica de la UBIPRO y al equipo que lo conforma, destacando al Dr. José Guillermo Avila Acevedo, gracias por brindar cada día una sonrisa y siempre ver las cosas tan positivamente.

A la Dra. Ana María García Bores, a quien no solo considero la mejor directora de tesis, sino también a un gran ser humano, pues no solo colaboró con gran parte de mi formación, dejando muy marcado en mi su destacado profesionalismo, pues no olvidare las miles de revisiones de este trabajo, que sé que fueron para una mejor preparación. Gracias por que también me brindo parte de su sabiduría en las cosas diarias de la vida. Por su tiempo y dedicación gracias.

Al Laboratorio I de la Unidad de Morfofisiología y Función de la FES Iztacala, UNAM.

Al Laboratorio de Microscopia de la FES Iztacala, UNAM.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala, UNAM.

Este trabajo contó con el apoyo del proyecto DGAPA, PAPIIT IN213309.

DEDICATORIAS

A Dios

Por permitirme realizar una parte de mi proyecto de vida. Por darme la fortaleza, sabiduría y salud día a día. Que esta carrera sea para honra y gloria del Señor.

A mis padres Javier y Gloria

Gracias por estar en los momentos más felices, más duros y difíciles de mi vida, pero sobre todo por formar gran parte de este proyecto tan importante y por ser el estímulo para seguir en este camino, sean cuales sean las circunstancias. Sin importar las dificultades fueron los principales promotores para continuar con este sueño que hoy estoy viendo hecho realidad, los amo como no tienen idea y siempre les estaré grandemente agradecida por su apoyo.

A Carlitos

Por ser una de las bendiciones más grandes que Dios me dio y la motivación que día a día me impulsa a seguir adelante, por la sonrisa que pinta en mi cara con una pequeña parte de su vida y por todos los momentos que ha pasado junto a mí. Gracias Carlitos porque sin ti no sería lo mismo esta satisfacción tan grande que siento.

A Lule

Gracias por ser mi compañero, por estar conmigo en todas las circunstancias de mi vida, por apoyarme y por ser al igual que Carlitos el motor que me impulsa a seguir adelante día a día.

A mi hermana Dafne

Gracias por el apoyo que siempre me has brindado, por tu tiempo y amor, por demostrarme que la edad no tiene nada que ver con la madurez, por las palabras que has dejado en mi vida que quedan marcadas para siempre en mi corazón.

A mi familia y amigos

Gracias a todos los que contribuyeron en este proyecto, motivando día a día con sus palabras de aliento, a mi tío Rodrigo a mi tía Erika y a mi prima Diana que compartieron parte de esta experiencia conmigo. A mi abuelita y a todos aquellos que no por no mencionar son menos importantes. A la Fam. Lule, destacando a Lety, gracias por tu apoyo y sabiduría que compartiste conmigo. Finalmente a mis amigos, Cynthia Castillo porque Dios te usa grandemente en mi vida, Jaz por enseñarme a luchar por mis ideales, Maribel por tu incondicional amistad y finalmente a mi mejor amiga Sandy, quien compartió conmigo este camino, quien vio las luchas, batallas y victorias que implican un sueño, pero sobre todo gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas.

No tengo palabras para decir a todos ustedes gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de figuras	2
Resumen	3
Introducción	4
Estructura y desarrollo de la piel	4
La epidermis	5
La dermis	8
Vasculatura cutánea	11
Nervios y receptores de la piel	11
La hipodermis	12
Funciones de la piel	12
El espectro electromagnético	13
La radiación ultravioleta	13
Efectos agudos y crónicos de la RUV en la piel	14
Daños a nivel histológico	14
Fotoprotección	17
Fotoquimiopreención	17
Justificación	20
Hipótesis	20
Objetivos Generales	20
Objetivos Particulares	20
Metodología	20
Resultados y Discusión	23
Conclusiones	46
Apéndice	47
Referencias	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Capas que forman la piel	4
Figura 2. Constituyentes de la epidermis	6
Figura 3. Componentes de la dermis	9
Figura 4. Espectro electromagnético	13
Figura 5. Estructura química del verbascósido	18
Figura 6. Corte histológico del grupo testigo	24
Figura 7. Corte histológico del grupo testigo	25
Figura 8. Corte histológico del grupo etanol	27
Figura 9. Corte histológico del grupo etanol	28
Figura 10. Corte histológico del grupo UV-etanol	30
Figura 11. Corte histológico del grupo UV-etanol	31
Figura 12. Corte histológico del grupo UV-etanol	32
Figura 13. Corte histológico del grupo UV-etanol	33
Figura 14. Corte histológico del grupo UV-etanol	34
Figura 15. Corte histológico del grupo UV-etanol	35
Figura 16. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol ...	36
Figura 17. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol ...	37
Figura 18. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol ...	38
Figura 19. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol ...	39
Figura 20. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol+UV	40
Figura 21. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol+UV	41
Figura 22. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol+UV	42
Figura 23. Corte histológico del grupo verbascósido-etanol+UV	43

RESUMEN

La piel es el órgano más externo del cuerpo y se divide en epidermis, dermis e hipodermis. Éste órgano actúa como barrera de defensa contra contaminantes y agentes externos como la radiación ultravioleta. La exposición a la luz UV puede causar diversos padecimientos cutáneos. Las sustancias de origen natural, como los polifenoles y compuestos como el verbascósido, han sido estudiadas por sus propiedades fotoprotectoras, los cuales son moléculas que actúan como cromóforos en la RUV. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto fotoprotector del verbascósido contra los daños ocasionados por la radiación UV sobre la piel de ratones SKH-1 de manera aguda. Los ratones fueron irradiados con luz UV-B (312 nm) por un lapso de 45 s cada tercer día durante 2 semanas. Los tratamientos (testigos, verbascósido y etanol irradiados y sin irradiación) se aplicaron 10 minutos antes de la exposición a la luz UV. Los ratones se sacrificaron y se tomaron muestras de la piel para su observación histológica, en las cuales se determinaron los daños ocasionados por la luz UV tales como hiperplasia, hipertrofia, y atrofia, entre otros. Los resultados fueron los siguientes: el grupo testigo presentó las características de la piel normal, además de presentar quistes sebáceos en la dermis. La epidermis presentó de 4 a 6 capas celulares, mientras que la dermis la conforman fibras de colágeno y fibrocitos, también se notó la presencia de quistes. El grupo al que solamente se le aplicó el vehículo presentó espongiosis, apoptosis e hipertrofia en la epidermis. En las muestras que fueron tratadas con verbascósido sin irradiación se observó espongiosis, apoptosis, hiperplasia y atrofia en la epidermis, así como congestión en la dermis. Mientras que en las muestras de piel de los ratones irradiados con luz UV se encontraron daños tales como espongiosis, apoptosis, hiperplasia, hipertrofia y atrofia en la epidermis; en la dermis edema y congestión. El grupo irradiado y que se le aplicó el verbascósido presentó espongiosis, apoptosis, hiperplasia, hipertrofia y atrofia en epidermis y congestión en dermis pero en menor grado que en las irradiadas. Se concluye que el grupo que fue irradiado y protegido con verbascósido presentó los daños en menor grado que los que fueron irradiados sin protección, por lo tanto se remarca el poder del verbascósido como fotoprotector.

INTRODUCCIÓN

Estructura y desarrollo de la piel

La piel es el mayor órgano del cuerpo. Está formado de un epitelio (la epidermis), una matriz de tejido conectivo (la dermis) y tejido adiposo conocido como hipodermis que se observa en la figura 1 (Holbrook y Wolf, 2001).

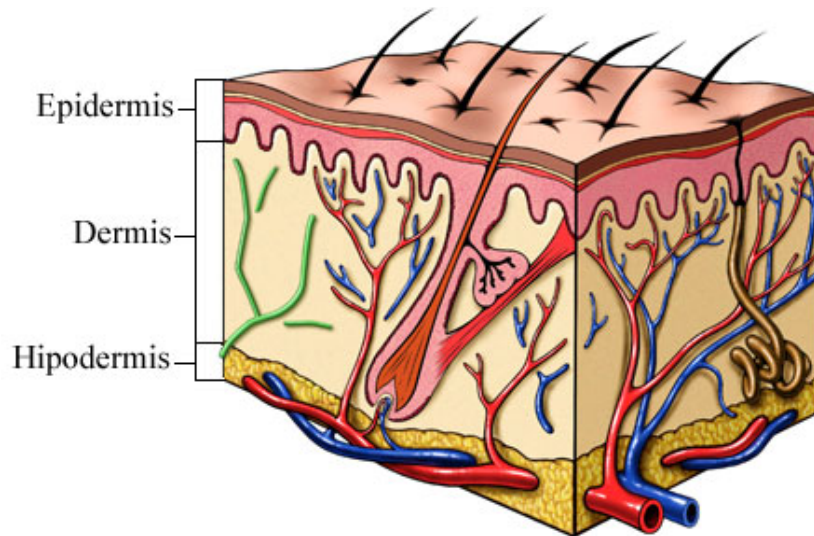


Figura 1. Capas que forman la piel.

<http://livingmybeauty.wordpress.com/tag/como-tener-una-piel-perfecta/>

La piel se desarrolla a partir del ectodermo superficial, del mesodermo dermatómico y del mesénquima de la placa lateral. La primera "piel", aparece a las 4 semanas de desarrollo, es una epidermis de una sola capa y una dermis mesenquimatosa delgada. Durante los meses siguientes se desarrolla en forma gradual y progresiva, de manera que al final del segundo trimestre de gestación, la epidermis es un epitelio escamoso estratificado queratinizado y la dermis es una zona densa y gruesa de tejido conectivo entrelazado con vasos sanguíneos y nervios. No obstante la dermis alcanza su estructura definitiva después que la epidermis. También debe sufrir un aumento sustancial del volumen y la maduración de los componentes del tejido conectivo después del nacimiento para ser equivalente a la del adulto (Holbrook y Wolff, 2001).

La epidermis

La epidermis es un epitelio pavimentoso estratificado en renovación constante, que se queratiniza y da origen a estructuras derivadas (pelo, uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas) denominadas anexos. Tiene un espesor aproximado de 0.4 a 1.5 mm, en comparación con el espesor total de la piel de 1.5 a 4 mm (Haake y Holbrook, 2001).

Capas de la epidermis

La epidermis posee diferentes estratos dependiendo del tipo celular o del aspecto de las células que los componen (Figura 2), los cuales son:

- A) Estrato basal. Contiene queratinocitos de ubicación basal con actividad mitótica, que se fijan a las estructuras de la zona de la membrana basal y dan origen a las células de las capas más superficiales. Las células basales contienen filamentos de queratina organizados en haces finos alrededor del núcleo y están conectadas por hemidesmosomas (uniones entre las células basales y la lámina basal) y desmosomas (uniones entre queratinocitos adyacentes) (Holbrook y Wolff, 2001).

- B) Estrato espinoso. Se denomina así por la apariencia de espinas en los márgenes celulares. La membrana plasmática entre estas uniones con frecuencia se contrae por las fijaciones durante el procesamiento del tejido. Las células de todas las capas espinosas contienen haces conspicuos de filamentos de queratina. Estos se asocian periféricamente con desmosomas y se organizan concéntricamente alrededor del núcleo (Holbrook y Wolff, 2001).

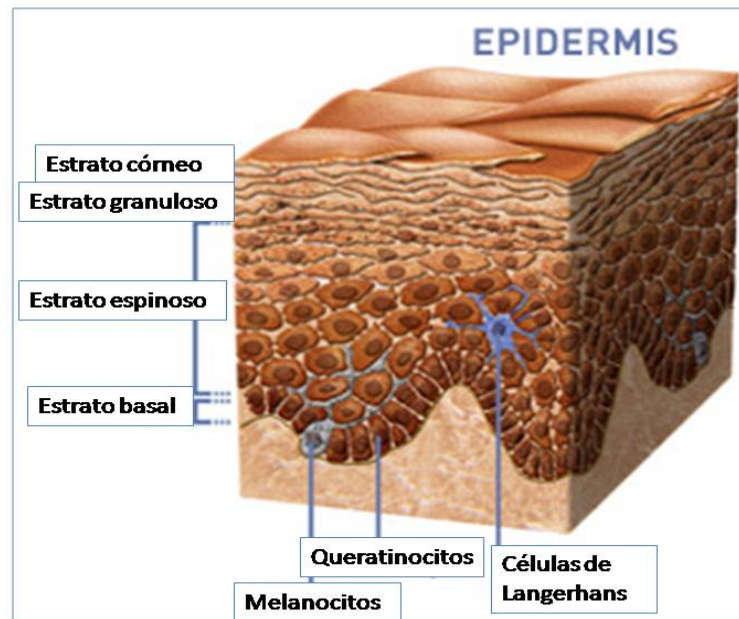


Figura 2. Constituyentes de la epidermis.

<http://www.bioderma.com/es/a-la-escucha-de-tu-piel/la-piel-es-un-organo.html>

- C) Estrato granuloso. Las células de la capa granular se denominan así por su aspecto al ser observadas con microscopio óptico. Se distinguen gránulos basófilos en una o dos capas de células aplanadas por encima del estrato espinoso. Estos son los gránulos de queratohialina, estructuras importantes asociadas con la diferenciación epidérmica (Holbrook y Wolff, 2001).
- D) Estrato córneo. La transición completa desde una célula granular a una cornificada se acompaña por la pérdida del 45% al 86% del peso seco de la célula. La célula cornificada resultante proporciona la barrera principal de la piel. Sin las capas de estas células que colectivamente forman el estrato córneo la epidermis sería similar a una membrana mucosa. La célula cornificada es la de mayor tamaño de la epidermis. Es aplanada y de forma poliédrica, su forma y características superficiales parecen estar adaptadas para mantener la integridad de la capa aunque permitiendo la descamación. Las células están unidas por desmosomas

modificados, se superponen en sus márgenes laterales y se entrelazan con células de capas profundas o superficiales por canales y muescas en la superficie (Holbrook y Wolff, 2001).

Células de la epidermis

Estas células migran hacia la epidermis durante el desarrollo, y en la vida postnatal desempeñan funciones específicas asociadas con la protección de la piel y el individuo (Holbrook y Wolff, 2001).

- A) Queratinocitos. El queratinocito es una célula derivada del ectodermo que constituye al menos un 80% de la población total de células de la epidermis. Contienen en si citoplasma filamentos intermedios de queratina y forman desmosomas. Cumplen como mínimo un papel estructural (citoesquelético). Están organizados en varias capas denominadas según su propiedad estructural o actividad funcional de las células incluidas (Haake y Holbrook, 2001).

- B) Melanocitos. Los melanocitos son células que sintetizan el pigmento de la piel, la melanina. Se encuentran intercalados entre las células basales a intervalos inespecíficos, aunque se cree que están relacionados con un número determinado de queratinocitos como una unidad epidérmica de melanina. Los melanocitos se reconocen en el microscopio óptico por su citoplasma pálido, núcleo oval y a menudo por el color intrínseco de los melanosomas que contienen pigmento. Los melanocitos conservan la capacidad de dividirse en la epidermis a una velocidad acorde con el recambio de queratinocitos. El melanosoma es el organelo distintivo del melanocito. Los melanosomas son transferidos a los queratinocitos. Como consecuencia, el pigmento se distribuye por toda la capa basal y, en menor medida, por las capas superficiales. La melanina protege la piel absorbiendo y diseminando la radiación potencialmente perjudicial (Holbrook y Wolff, 2001).

- C) Células de Merkel. Son células inmigrantes que se localizan entre los queratinocitos basales en regiones particulares del organismo. Se encuentran en la piel lampiña de los dedos, labios, regiones de la

cavidad oral, la raíz externa del folículo piloso y se acumulan en estructuras especializadas denominadas discos táctiles o cúpulas del tacto. Como otras células distintas de los queratinocitos, las células de Merkel tienen un citoplasma que se tiñe ligeramente. El núcleo es lobulado. Las células de Merkel proyectan espinas citoplasmáticas hacia los queratinocitos, los cuales deforman sus márgenes y se unen a ellas a través de los desmosomas (Holbrook y Wolff, 2001).

D) Células de Langerhans. Estas son células dendríticas de la epidermis que no forman uniones con ninguna de las células adyacentes. Están presentes entre las células de las capas granular, espinosa y basal en número y distribución razonablemente constantes para una región corporal determinada. Este tipo celular representa hasta el 4% de la población celular epidérmica total (Holbrook y Wolff, 2001). Las células de Langerhans se originan en la médula ósea y son funcionalmente e inmunológicamente relacionadas con los macrófagos (Murphy, 1997).

La dermis

La dermis es un sistema integrado de tejido conectivo fibroso, filamentoso, amorfo que aloja las redes nerviosas y vasculares, anexos derivados de la epidermis, fibroblastos, macrófagos, mastocitos y otras células transportadas por la sangre, como linfocitos, células plasmáticas y otros leucocitos que ingresan en la dermis en respuesta a diferentes estímulos. La dermis constituye la mayor masa de la piel y le aporta elasticidad y resistencia a la tracción. Protege al cuerpo contra lesiones mecánicas, colabora en la regulación térmica e incluye receptores de estímulos sensitivos (Haake y Holbrook, 2001).

La dermis está organizada en región papilar y reticular (Figura 3). La dermis papilar es proximal a la epidermis, se amolda a sus contornos y tiene aproximadamente el mismo espesor, mientras que la dermis reticular representa el mayor volumen y peso de la dermis, esta se extiende desde la región papilar profunda hasta la hipodermis. El límite entre la dermis papilar y la dermis reticular está definido por un plexo subpapilar horizontal de arteriolas y vénulas poscapilares (Holbrook y Wolff, 2001).

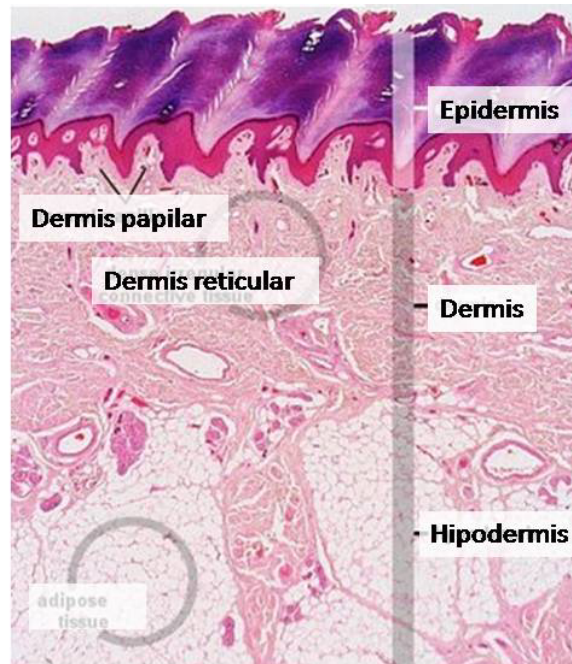


Figura 3. Componentes de la dermis.

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/integumentary/integum.htm>

Capas de la dermis

- A) Dermis papilar. La dermis papilar se caracteriza por pequeños haces de fibrillas de colágena de pequeño diámetro y fibras elásticas de oxitalano. Comúnmente en la dermis papilar normal, no se encuentran fibras elásticas maduras, pero si son comunes en la piel de pacientes con ciertas enfermedades hereditarias del tejido conectivo, en la piel envejecida y en la piel con deterioro actínico. Tiene un elevado contenido de colágeno tipo III. Las características estructurales de la matriz permiten que la piel asimile impactos. La dermis papilar tiene alta densidad de fibroblastos que proliferan rápidamente, y presentan una tasa más alta de actividad metabólica que la dermis reticular (Haake y Holbrook, 2001).
- B) Dermis reticular. La dermis reticular está compuesta fundamentalmente por fibrillas de colágena de gran diámetro, organizadas en grandes fibras entrelazadas. En torno de los haces de fibras de colágena, fibras

elásticas maduras en forma de banda y ramificadas componen una superestructura (Haake y Holbrook, 2001).

Células de la dermis

Los fibroblastos, macrófagos y mastocitos son células propias de la dermis; se encuentran en mayor densidad en la piel normal en la región papilar y rodeando los vasos, pero también se observan en la dermis reticular, donde se encuentran en los intersticios que quedan entre los haces de fibras de colágeno (Holbrook y Wolff, 2001).

- A) Fibroblasto. Es una célula de origen mesenquimático que migra por el tejido y es responsable de la síntesis y degradación de las proteínas fibrosas y no fibrosas de la matriz de tejido conectivo. Se ha demostrado que el mismo fibroblasto es capaz de sintetizar más de un tipo de colágeno y elastina simultáneamente (Holbrook y Wolff, 2001).

- B) Macrófagos. Derivan de precursores celulares de la médula ósea. Se diferencian en monocitos en la sangre para posteriormente convertirse en macrófagos, los cuales ya no tienen capacidad de división. Tienen como función presentar antígenos a las células linfoides como parte de la respuesta inmune, además de fagocitar partículas o patógenos que invaden la dermis, también sintetizan y secretan interleucina I, factores de crecimiento, prostaglandinas e interferon (Holbrook y Wolff, 2001).

- C) Mastocitos. Son células secretorias especializadas presentes en la epidermis pero halladas con mayor frecuencia alrededor de los vasos del plexo subpapilar y en la grasa subcutánea. Se identifican fácilmente en el estudio histológico por los gránulos citoplasmáticos intensamente teñidos y abundantes. En conjunto producen mediadores vasoactivos, que estimulan la contracción del músculo liso o son quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos (Holbrook y Wolff, 2001).

Constituyentes fibrosos de la dermis

La colágena y las fibras elásticas son los componentes conectivos en la dermis. La colágena, constituye aproximadamente el 75% del peso seco de la piel y proporciona fuerza de tensión y elasticidad. Las propiedades mecánicas dependen de las proteínas fibrosas y de una organización entrelazada normal de las haces de fibras de colágeno. Alrededor del 80% al 85% de la colágena en la dermis adulta corresponde al tipo I y del 15% al 20% es del tipo III. Las fibras de colágeno (tipos I y III) se organizan conforme una jerarquía estructural. Las fibras de colágeno tipo I son de gran diámetro (aprox. 100 nm) y se organizan en haces de fibras grandes y gruesas que proporcionan fuerza de tensión pero permiten la flexibilidad. Las fibras conectivas elásticas también se ensamblan en una red continua por toda la dermis. Las fibras elásticas devuelven a la piel su configuración normal cuando ésta es estirada o deformada (Holbrook y Wolff, 2001).

Vasculatura cutánea

La piel está estrictamente irrigada por una red vascular que consiste en canales de distribución, colectores y plexos microcirculatorios de la dermis papilar y apéndices epidérmicos (Holbrook y Wolff, 2001).

Los lechos de la microcirculación en la piel incluyen arteriolas, arteriolas terminales, esfínteres precapilares, capilares arteriales y venosos, vénulas poscapilares y vénulas colectoras. Los vasos aportan nutrición a los tejidos, pero, para la piel como un todo, la abundancia de vasos supera lo necesario para satisfacer sus requerimientos metabólicos. La vasculatura también está implicada en la regulación de la temperatura, la presión arterial, la reparación de heridas y numerosos fenómenos inmunológicos (Haake y Holbrook, 2001).

Nervios y receptores de la piel

Los nervios sensoriales en general inervan segmentariamente la piel (dermatomas), pero los límites son imprecisos y se observa inervación superpuesta en cualquier área determinada. Son grandes ramas cutáneas mielinizadas de nervios músculo-cutáneos que se originan segmentariamente

en los nervios espinales. Las terminaciones nerviosas libres son en particular comunes en la dermis papilar inmediatamente por debajo de la epidermis; la lámina basal de la fibra debe emerger con la lámina densa de la zona de la membrana basal (Holbrook y Wolff, 2001).

La hipodermis

El límite entre la dermis reticular profunda y la hipodermis es brusco por la transición entre el tejido conectivo predominantemente fibroso y el tejido adiposo. Puede estar acentuado por el límite creado por los vasos de un plexo horizontal profundo. Los folículos pilosos de crecimiento activo se extienden a través de este límite hacia la grasa subcutánea y las glándulas sudoríparas apócrinas y ecrinas normalmente se encuentran confinadas en esta zona. El tejido de la hipodermis aísla el cuerpo, sirve como reserva energética, actúa como una almohadilla protectora y permite el desplazamiento de la piel sobre las estructuras subyacentes (Holbrook y Wolff, 2001).

Células de la hipodermis

Las células primarias en la hipodermis son los adipocitos derivados del mesénquima. Están organizadas en lóbulos separados por tabiques de tejido conectivo fibroso. Dentro de los tabiques hay nervios y vasos linfáticos, que se extienden de manera abundante en la región (Haake y Holbrook, 2001).

Funciones de la piel

La piel cumple funciones esenciales como delimitar el medio interno y externo de un organismo, proveer información inmunológica, participar en la homeostasis, para la regulación de la temperatura corporal y la pérdida de agua, transmitir información sensitiva acerca del ambiente, desempeñar funciones endócrinas ya que secreta hormonas e interviene en la excreción de las glándulas sudoríparas, ecrinas y apócrinas de las glándulas sebáceas y finalmente como la principal barrera de protección contra agentes químicos, biológicos y del ambiente, como la radiación solar (Ross, 2008).

El espectro electromagnético

La radiación solar impacta constantemente la corteza de la Tierra con aproximadamente 50% de la luz visible (400-800 nm), 40% de radiación infrarroja (RI 800-1700 nm) y 10% de radiación ultravioleta (RUV 10-400 nm) como se ve en la figura 4 (Avila et al., 2005).

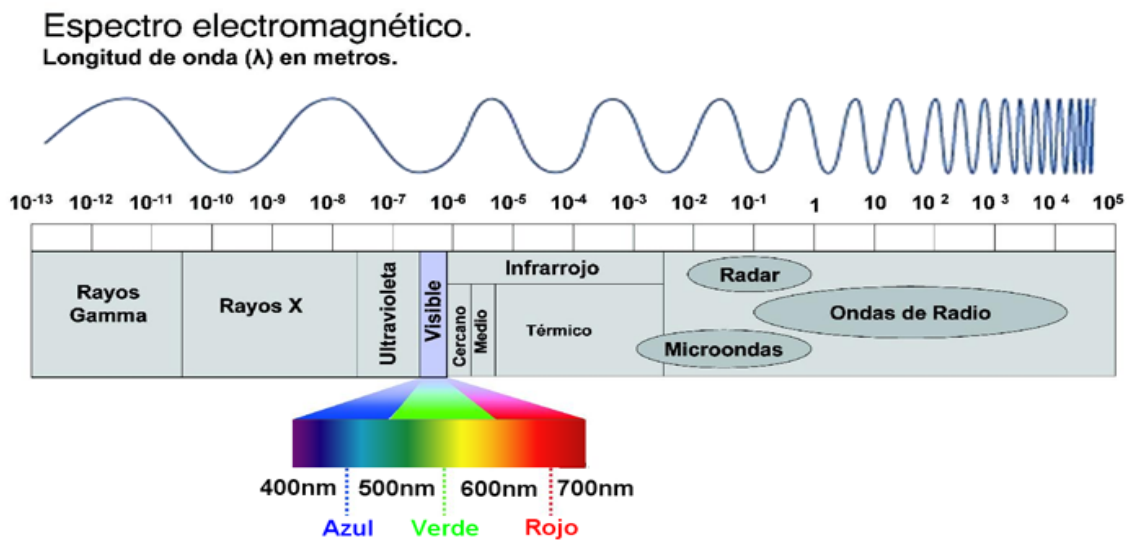


Figura 4. Espectro electromagnético.

<http://cs-fs-primero.blogspot.com/2011/04/espectro-electromagnetico.html>

La radiación ultravioleta

La RUV se divide dependiendo de la longitud de onda, UVC (270-290 nm), UVB (290-320 nm) y UVA, la cual se subdivide en UVA2 (320-340 nm) y UVA1 (340-400 nm). La radiación UVC es absorbida por la capa de ozono por lo tanto no impacta a los organismos. La cantidad de radiación de UVB y UVA que llega a la Tierra depende de la latitud, la altitud, las estaciones, el clima, la nubosidad y la capa de ozono. La RUV llega con mayor intensidad durante el día de 10 AM a 4 PM. Debido a que los rayos UVA son de mayor longitud de onda en comparación con los UVB, son menos afectados por la altitud o la atmósfera.

La radiación UVA comparada con la UVB, puede penetrar más profundamente a través de la piel pues este tipo de radiación llega hasta la dermis (Goettsch et al., 1998; De Gruijil, 1999).

Efectos agudos de la exposición de la RUV en la piel

La exposición excesiva a la radiación solar, especialmente la luz UV puede causar diversos padecimientos cutáneos (García y Avila, 2008).

La respuesta aguda de la piel humana a la radiación UVB incluye eritema, edema, pigmentación oscura seguida por el bronceado retrasado o tardío y el engrosamiento de la epidermis y la dermis (Goettsch et al., 1998; De Gruijil, 1999).

Cuando la RUV induce eritema, éste inicia aproximadamente 4 horas después de la exposición y continua entre las 8-24 h, alcanzando su pico máximo a las 24 h y después se desvanece en un día en las personas de tez blanca y mayores de 60 años; sin embargo puede ser persistente y a veces dura por semanas (Goettsch et al., 1998; De Gruijil, 1999).

El edema es un aumento de líquido en los espacios tisulares intersticiales. Se reconoce como una inflamación celular sutil y separación de los elementos de la matriz extracelular, puede ser difuso o puede ser relativamente más localizado en las zonas de mayor presión hidrostática (Robbins et al., 1998).

Daños agudos y crónicos a nivel histológico

Los efectos agudos de la radiación UVA y UVB son de vida corta y reversibles. Histológicamente incluyen congestión, pigmentación y lesión en las células de Langerhans y queratinocitos de la epidermis. La cinética y mediadores químicos de estas reacciones difieren en la respuesta a los rayos UVA y UVB. Dependiendo de la intensidad y duración de la exposición, la congestión, edema e inflamación aguda están mediados por la liberación de histamina por los mastocitos de la dermis, por la síntesis de los metabolitos del ácido araquidónico y por la producción de citocinas proinflamatorias, que producen la

oxidación de la melanina provocando un oscurecimiento transitorio e inmediato, especialmente en los individuos de piel más oscura. El bronceado inducido por los rayos UVA y UVB se debe a un aumento retardado en el número de melanocitos, el alargamiento y extensión de proyecciones dendríticas, y la transferencia de melanina a los queratinocitos. El bronceado inducido por los UVB protege contra las exposiciones subsecuentes mientras que el bronceado inducido por los UVA proporciona una protección limitada. Los rayos UVA y UVB afectan las células de Langerhans y por ello reducen el procesamiento de antígenos que se introducen a través de la epidermis. Los rayos UVB causan apoptosis incontrolada en los queratinocitos en la epidermis, dando lugar a células disqueratóticas o células de quemadura (Robbins et al., 1998).

Dentro de los daños celulares provocados por la exposición a la RUV se incluyen: hiperplasia, hipertrofia, atrofia y metaplasia. La hiperplasia es un incremento en el número de células, dando lugar habitualmente a un aumento del volumen del órgano o tejido, mientras que la hipertrofia se refiere al aumento en el tamaño de las células, por lo que da un mayor volumen en el tamaño del órgano. La atrofia es la disminución en el tamaño de la célula por pérdida de sustancia celular y representa una forma de respuesta adaptativa y puede culminar en la muerte celular. La metaplasia es un cambio reversible por el cual una célula diferenciada (epitelial o mesenquimal) se sustituye por otro tipo celular. Puede representar una sustitución adaptativa de células que son sensibles al estrés por tipos celulares mejor capacitados para soportar el ambiente adverso (Robbins et al., 1998).

Dentro de los efectos crónicos de la radiación UVB se encuentran el fotoenvejecimiento, la inmunosupresión, la carcinogénesis y el cáncer de piel (Goettsch et al., 1998; De Grujil, 1999).

En la piel, el fotoenvejecimiento a simple vista se presenta como resequedad, con profundas arrugas, la piel es inelástica, correosa y telangiectásica, a menudo con pigmentación irregular, pecas y lesiones lentiginosas. La elastosis es el signo histopatológico más característico de la piel fotoenvejecida, ha sido

identificado mediante inmunohistoquímica como agregados de elastina, que tiene un aspecto de manojos finos en la piel protegida del sol (Parrish, 2001).

El espectro de acción en el fotoenvejecimiento humano no ha sido claramente determinado, por lo tanto la contribución relativa de los diferentes tipos de luz del espectro electromagnético es desconocida. En modelos animales se han hecho estudios con un tipo de longitud de onda determinado, por ejemplo en la piel de roedores, se puede producir una condición similar a la elastosis por irradiación intensa prolongada, predominantemente UVB o UVA (Yaar, 2007).

La inmunosupresión es originada tanto por la radiación UVB como por la UVA, las cuales pueden interactuar para incrementar los niveles de supresión. Existen un número de mediadores celulares diferentes con varios niveles de importancia, dependiendo bajo qué condiciones se encuentren. Se ha reconocido que los queratinocitos producen una gran cantidad de mediadores solubles, incluyendo inmunoestimuladores y citocinas pro-inflamatorias, esto puede ser inducido por la RUV. Los mediadores inmunosupresores derivados de queratinocitos inducidos por la RUV pueden entrar en la circulación e inhibir una reacción inmune en la piel y en los nódulos linfáticos de la piel o de áreas que no necesariamente están expuestas a la RUV, explicando el fenómeno de inmunosupresión (Schwartz y Halliday, 2007).

El primer paso para el desarrollo de cáncer de piel es la exposición a la RUV en la etapa de iniciación. Los eventos que ocurren entre la exposición a la radiación ultravioleta y el desarrollo del cáncer son numerosos (etapas de promoción y progresión). El cáncer abarca un amplio espectro de entidades causadas por el fracaso de los controles que en condiciones normales gobiernan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células. Las células que experimentan una transformación maligna escapan a los controles normales del crecimiento, invaden los tejidos circundantes y, por último, pueden migrar a otros sitios del organismo para establecer tumores secundarios. De acuerdo con el tejido en que se originan y el estadio en que se encuentran las células en el momento de la transformación, el cáncer puede

crecer con lentitud o con mayor rapidez, puede tener un potencial metastático escaso o ser muy agresivo (Delves et. al., 2006).

Fotoprotección

La fotoprotección incluye los diversos agentes que existen para proteger la piel contra los daños de la radiación solar, ya sea por mecanismos internos del propio organismo o agentes externos. Entre los agentes que afectan la transmisión de luz ultravioleta a la piel se incluyen agentes ambientales (ozono, contaminación, nubes, niebla), moléculas biológicas (cromóforos epidérmicos), agentes físicos (ropa, sombreros, maquillaje, gafas de sol), agentes fotoprotectores químicos, que pueden modular el efecto de la luz UV sobre el cuerpo (filtros solares y antioxidantes) (Prisana y Henry, 2005).

Para prevenir las reacciones perjudiciales inducidas por la luz, es esencial el uso de filtros solares y medidas fotoprotectoras que incluyen: evitar exponerse al sol entre las 10 AM a 3 PM, el uso de ropa protectora como amplios sombreros de ala ancha, usar sombrillas y la aplicación tópica de sustancias químicas para la piel que actúan como fotoprotectores químicos o físicos pues absorben, dispersan o reflejan la radiación que incide sobre la piel (Mukhtar, 1992).

Hoy en día los agentes fotoprotectores se dividen en dos categorías: tópicos y orales. Los tópicos a su vez están diferenciados en físicos y químicos. Los fotoprotectores químicos son preparaciones incoloras que son usadas tópicamente y actúan sobre una región de absorción de la luz UV. Cuando se aplican apropiadamente, modifican las propiedades ópticas de la piel y previenen efectos nocivos de la radiación UVB y UVA (Mukhtar, 1992).

Fotoquimiopreención

Dentro de los agentes que se han utilizado por su eficacia como protectores solares naturales debido a su absorción de rayos ultravioleta y su poder antioxidante se encuentran las sustancias naturales que son extraídas de plantas y se han utilizado recientemente como un recurso potencial por dichas propiedades (Avila et al., 2005).

Entre las sustancias naturales que son utilizadas por sus propiedades antioxidantes se encuentran: el ascorbato (vitamina C), el glutatión reducido (GSH), el α -tocoferol (vitamina E), los carotenoides, las poliaminas, los flavonoides y los polifenoles (Cruteau et al., 2000). Dentro de los polifenoles están los fenilpropanoides, que en su estructura tienen un anillo aromático el cual tiene adjunto una cadena de tres carbonos, son derivados biosintéticos del aminoácido aromático fenilalanina y contienen uno o más residuos de C_6-C_3 (Figura 5) y esto les proporciona la propiedad de absorber la energía de los fotones de las radiaciones UV. Este tipo de compuestos son aislados de tejidos vegetales (Harborne y Baxter, 1993).

El verbascósido (Figura 5) pertenece al grupo de los fenilpropanoides, presente en varias plantas como *Buddleja scordioides* y *Budleja globosa*, entre otras al cual se le atribuyen propiedades como hipertensivo, antihepatotóxico y antiinflamatorio (Deepak et al., 1999).

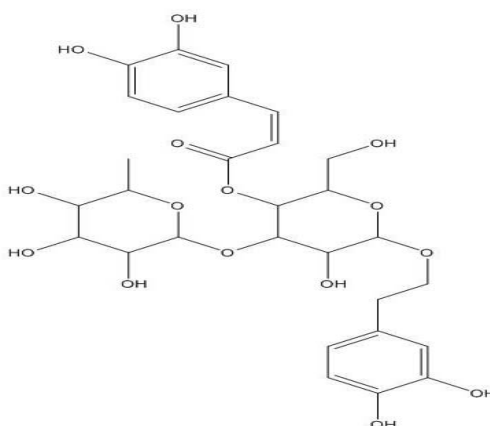


Figura 5. Estructura química del verbascósido.

Avila y colaboradores (2005) estudiaron las propiedades fotoprotectoras en piel de cuyos del extracto metanólico de *Budleja scordioides*, del verbascósido y la linarina, aislados de la planta. Los autores observaron que éstas sustancias tienen un efecto fotoprotector contra la luz UV reduciendo significativamente la muerte celular inducida por UV en un modelo usando la bacteria *E. coli*.

También encontraron que el verbascósido es un buen protector solar ya que su valor de FPS es superior a 15.

Backhouse y colaboradores (2008) evaluaron las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antioxidantes de *Buddleja globosa*. Usaron una secuencia de hexano, diclorometano y metanol para obtener los extractos por el método de fraccionamiento y encontraron verbascósido al 1.8%. La actividad analgésica fue evaluada comparando el número de contorsiones del grupo con tratamiento al cual se les aplicó ácido acético y de los testigos a los cuales sólo se les aplicó el vehículo. Se utilizó naproxeno sódico como referencia y mostró un 70.0% de efecto analgésico a dosis de 12.5 mg/Kg. Las propiedades antiinflamatorias se estudiaron en cuyos, a los cuales se les indujo edema en la pata y la oreja. El extracto fue aplicado de manera oral y tópica. Usaron el naproxeno sódico como referencia 4 mg/Kg y con un efecto antiinflamatorio de 54.6%. Por último, las propiedades antioxidantes se midieron por la actividad de anión superóxido, peroxidación lipídica y la inhibición de la actividad de xantina oxidasa. Se evaluaron los radicales libres por extractos y fracciones purificadas por espectrometría de 517 nm por decoloración en los extractos de metanol. Concluyeron que el verbascósido es el responsable de dichas propiedades.

Funes y colaboradores (2009) evaluaron la capacidad antioxidante del extracto de *Lemon verbena*, el cual fue evaluado con el método de espectrometría de masa acoplado a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-ESI-MS/MS) encontrando varios fenil propanoides: martinósido, un fenil propanoide metoxilado, iso verbascósido y verbascósido, siendo éste último el más abundante; y tres flavonas glucosiladas: luteolina-7-diglucoronido, apigenina-7-diglucoronido y crisoriol-7-diglucoronido. La actividad antioxidante del extracto fue caracterizada por diferentes métodos. El extracto mostró actividad en ambientes lipofílicos e inhibición en el ensayo de lipoperoxidación. También fue administrado de manera oral a los ratones y el verbascósido fue el único metabolito secundario detectado en las muestras de plasma por lo que se propone como el principal compuesto bioactivo en este ensayo.

JUSTIFICACIÓN

La piel es un órgano que tiene como función principal actuar como barrera de protección contra agentes químicos, biológicos y ambientales. Dentro de los últimos se encuentra la radiación solar. La exposición excesiva a ésta, especialmente a la luz UV puede causar diversos padecimientos cutáneos tanto agudos como crónicos. Las sustancias naturales extraídas de plantas se han considerado como un recurso potencial por su eficacia como protectores solares debido a su absorción de radiación ultravioleta y su poder antioxidante. El verbascósido es una sustancia natural, del cual se han estudiado sus propiedades fotoprotectoras, antiinflamatorias y su capacidad antioxidante. Sin embargo, aún no se determina el potencial fotoprotector sobre la piel en ratones SKH-1 irradiados con luz UV.

HIPÓTESIS

Al aplicar tópicamente a la piel de los ratones SKH-1 el verbascósido tendrá un efecto fotoprotector y provocará una reducción en los daños histológicos ocasionados por la exposición a la RUV de manera aguda.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto protector del verbascósido contra los daños ocasionados por la exposición a la radiación UV a nivel histológico en la piel de ratones SKH-1 de manera aguda.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratones hembra SKH-1 de 6 a 8 semanas de edad obtenidos de Charles River. Los ratones se aclimataron al menos una semana antes de realizar los experimentos y 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 a una humedad relativa del 45-55% en el bioterio de la FES Iztacala.

Los ratones se clasificaron en cinco grupos (tabla 1).

Tratamiento	No. Animales
Grupo 1. Testigo (sin ninguna manipulación)	3
Grupo 2. Control Vehículo (etanol)	3
Grupo 3. Vehículo + UV	6
Grupo 4. Verbascosido+ Vehículo + RUV	5
Grupo 5. Verbascosido + Vehículo	5

Tabla 1. Tratamientos, control y testigo de los diferentes grupos de ratones SKH-1

Los tratamientos se aplicaron tópicamente en la zona dorsal 10 minutos antes de llevar a cabo la irradiación.

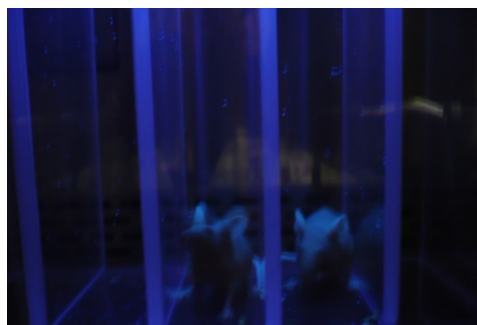
Los ratones se colocaron en cajas de acrílico especiales para la irradiación a 15 cm de separación de la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La energía de irradiación a esta distancia fue de 6.0 mJ/cm^2 (intensidad de campo 130 watt/m^2) calculada con un radiómetro (Spectroline DM-300HA). Las lámparas fueron sistemáticamente alternadas para compensar o minimizar cambios en el flujo de las mismas. El tiempo de irradiación fue de 45 s. Los animales se expusieron a la RUV cada tercer día durante 15 días (9 exposiciones) (García, 2010).



Mantenimiento de los ratones SKH-1



Cámaras de irradiación



Los ratones fueron sacrificados en cámaras de CO₂ 24 h después de la última exposición a la RUV y se tomaron las muestras de piel de la zona dorsal de cada uno. Las muestras de piel se fijaron durante 24 h en paraformaldehído al 2% en PBS (0.1M pH7.2), posteriormente se deshidrataron e incluyeron en parafina. Se obtuvieron tres laminillas de cada muestra con un mínimo de 4 cortes cada una, de 5 µm, dando un total de 60 cortes.

Las muestras fueron teñidas por la técnica de hematoxilina y eosina. Posteriormente se observaron los cortes histológicos en microscopio óptico para determinar los daños histológicos causados por la RUV en la piel a nivel de epidermis, evaluando la presencia de paraqueratosis, espongirosis, apoptosis, necrosis, hiperplasia, hipertrofia y atrofia; mientras que en la dermis se valoró la presencia de edema, hemorragia, infiltrado inflamatorio y necrosis (Robbins et al., 1998), los cuales se definen en la tabla 2. Por último las muestras fueron fotografiadas. También se evaluó el nivel de daño que presentaron, grado (leve, moderado y severo), extensión (focal, multifocal y difuso) y curso (agudo y/o crónico).

TEJIDO	DAÑO	DEFINICIÓN
EPIDERMIS	Paraqueratosis	Alteración de la queratinización, en la que desaparece el estrato granuloso y persisten los núcleos en el estrato córneo.
	Células de quemadura	Los queratinocitos en la epidermis se programan para morir (apoptosis).
	Espongiosis	Edema en la epidermis
	Necrosis	Muerte celular por una lesión irreversible
	Hiperplasia	Aumento en el número de células
	Hipertrofia	Aumento en el tamaño de las células y/o en el tejido
	Atrofia	Disminución en el número de células y/o tejido por pérdida de sustancia celular
DERMIS	Edema	Acumulación de líquido en el intersticio o en las cavidades serosas
	Congestión de vasos	Saturación de eritrocitos en los vasos sanguíneos
	Hemorragia	Extravasación de sangre debido a la rotura de los vasos
	Infiltrados inflamatorios	Polimorfos nucleares (neutrófilos y macrófagos) que se presentan por el proceso inflamatorio dependiendo si el daño es agudo y/o crónico

Tabla 2. Daños histológicos ocasionados por luz solar (Robbins et al., 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grupo 1

El testigo denotó las siguientes características:

En general los ratones presentaron de 4 a 6 capas en la epidermis, que incluyen estrato basal, espinoso y granuloso; además de observarse estrato córneo (Figura 6). Al igual que en la literatura citada la piel de los testigos presentó las características que se describen para la piel normal.

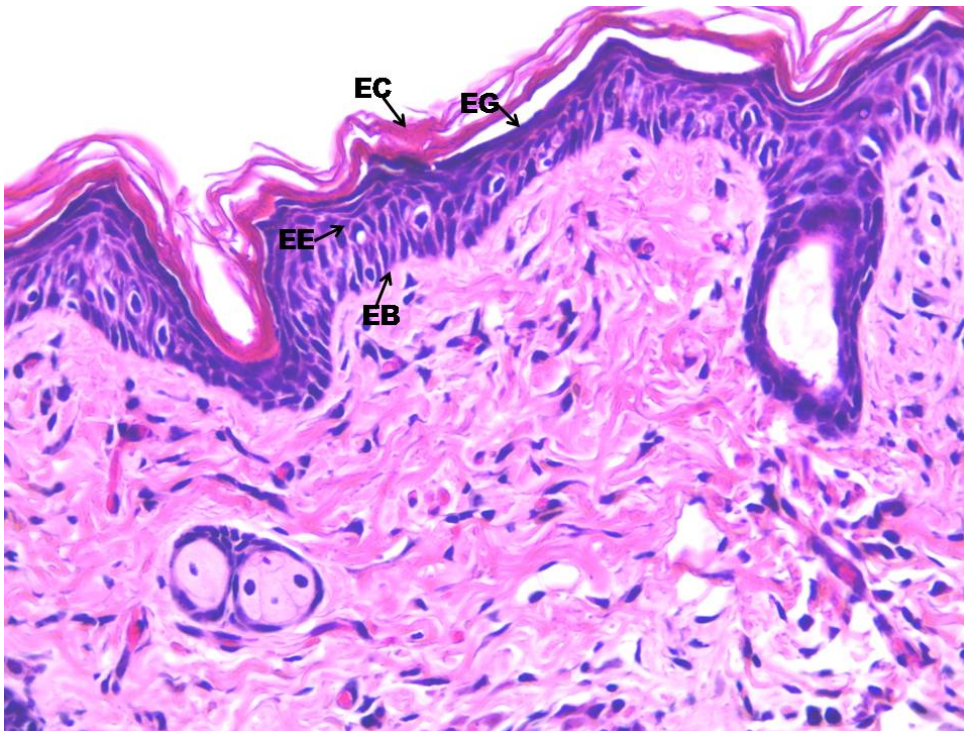


Fig. 6 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo testigo. Simbología: EB: Estrato basal, EC: Estrato córneo, EE: Estrato espinoso y EG: Estrato granuloso. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Dermis

Se pudo observar en la dermis de los ratones que se divide en reticular y papilar (Figura 7), y se observaron fibroblastos; así como la presencia de algunos folículos pilosos y glándulas sebáceas.

La literatura menciona que la dermis reticular se compone fundamentalmente por colágena tipo I y se identifica por los haces agregados más gruesos de colágena con menor número de espacios interfibrosos. La dermis papilar tiene un elevado contenido de colágena tipo III y se caracteriza por el entrelazamiento de fibras finas de colágeno y amplios espacios interfibrilares (Parker, 2000).

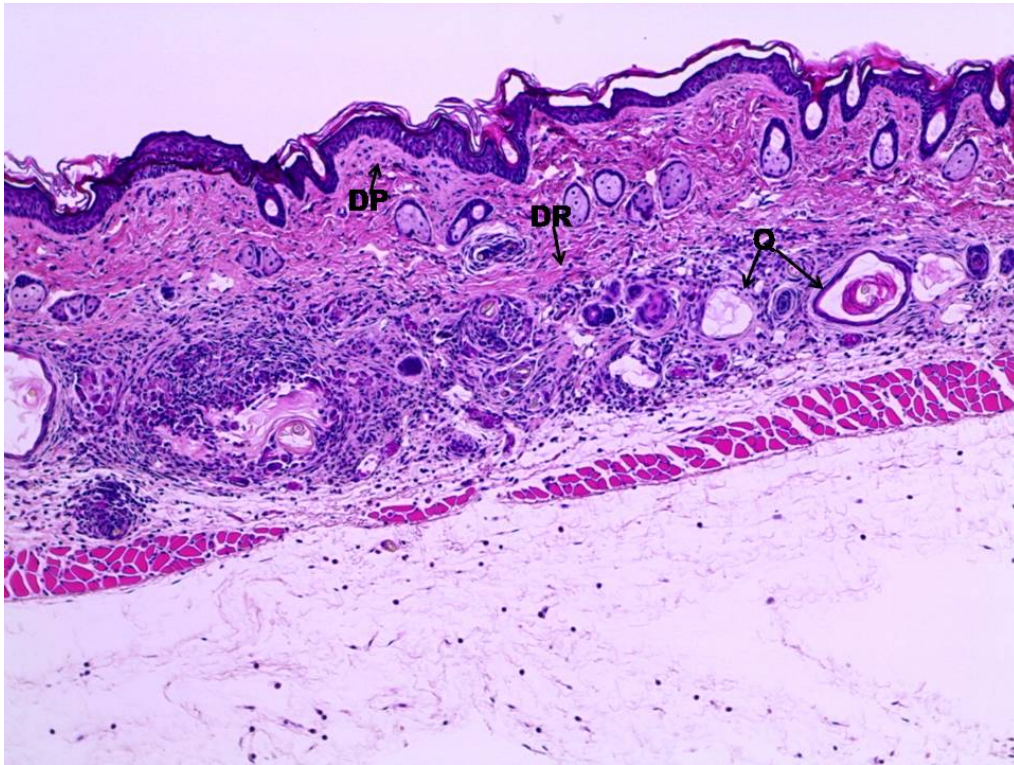


Fig. 7 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo testigo. Simbología: DP: Dermis papilar, DR: Dermis reticular y Q: Quistes. Aumento original 100x en tinción hematoxilina-eosina.

En la dermis de los ratones SKH-1 (testigos) se encontraron quistes sebáceos (Figura 7). Éste fenómeno se debe a una mutación espontánea que presentan los ratones y que se manifiesta a las seis semanas de desarrollo. Montagna y colaboradores (1952) describen que cerca de los dos meses de edad estos animales comienzan a tener agregados celulares sebáceos que posteriormente se transforman en quistes, que envejecen y se llenan de láminas concéntricas de queratina, disminuyendo el número de células sebáceas en la periferia. También se observó congestión leve y focal. Crew y colaboradores (1932) reportaron que la dermis se encuentra saturada de quistes, por lo tanto al haber muerte celular se desencadena la respuesta inflamatoria lo que acompaña la congestión en respuesta a éste estímulo, por lo que se podría considerar que es debido a dicha mutación.

Grupo 2

Los ratones a los cuales se les aplicó el vehículo (etanol) presentaron las siguientes características:

En la epidermis se observaron de 4 a 6 capas celulares. En cuanto a los daños se encontró espongiosis (Figura 8) leve focal.

El etanol puede provocar cambios en la piel y afectar su función como barrera mediante la inducción del estrés oxidativo. Brand y Jendrzewski (2008) evaluaron el papel del etanol en el estrés oxidativo sobre la piel de ratas. Los animales fueron tratados con etanol al 36% durante doce semanas, a las cuales se midieron los cambios en el flujo sanguíneo con láser Doppler (LDV), además de los daños a la barrera de la piel a través de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y los cambios en el contenido de humedad de la piel. Las ratas fueron sacrificadas y el daño en la piel fue analizado por la actividad de aldehído deshidrogenasa y la peroxidación lipídica (LPO). Los resultados mostraron que la peroxidación lipídica aumentó significativamente después de la exposición continua de etanol. Relacionado el trabajo de estos autores con los daños encontrados en los ratones SKH-1, podría explicarse que la LPO ocasiona daños y por lo tanto la presencia de espongiosis es debido a la alteración de la membrana celular al aplicar el vehículo como consecuencia de la alteración que ocasiona la LPO.

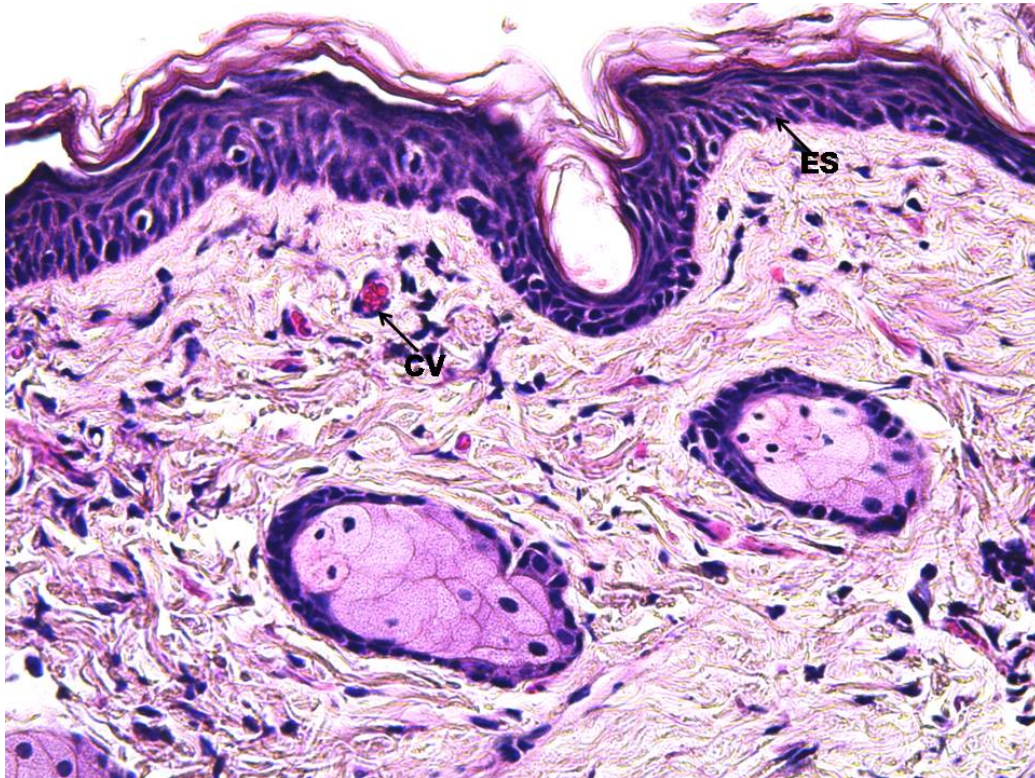


Fig. 8 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo etanol. Simbología: ES: Espongiosis, CV: Congestión. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

En la epidermis se encontraron células apoptóticas, también llamadas de quemadura (Figura 9). Las células que entran en apoptosis se caracterizan por una reducción del volumen de su citoplasma, el núcleo se vuelve picnótico y puede desaparecer de manera prematura (Parrish, 2001). Aunado a esto se encontró hipertrofia del estrato granuloso leve focal. Normalmente una célula está limitada a una función y estructura de acuerdo a sus procesos metabólicos, diferenciación y especialización encontrándose en un estado de equilibrio conocido como homeostasis. La alteración de estos procesos por agentes externos como sustancias da lugar a adaptaciones celulares fisiológicas y morfológicas, esto puede consistir en un aumento en el tamaño de las células individuales, conocido como hipertrofia. Si se sobrepasan los límites de ésta respuesta y la célula sufre una lesión celular irreversible ocurre la muerte celular programada y controlada internamente, conocida como apoptosis (Robbins, et al., 1998). Al aplicar etanol como vehículo a estos ratones, la piel detecta un agente externo, por lo cual podría alterar este equilibrio mencionado y por lo tanto dar lugar a los daños encontrados.

Neuman y colaboradores (2002) evaluaron la apoptosis ocasionada por el etanol en células humanas neonatales (A431) de piel cultivadas. Utilizaron células de la epidermis a las cuales se les aplicaron tres concentraciones de etanol por diferentes periodos de tiempo. El tratamiento de células expuestas con 40 y 100 mM de etanol mostraron un aumento de la liberación de citocinas proinflamatorias. Las células tratadas con etanol examinadas por microscopía electrónica mostraron organelos dañados, cromatina condensada y cuerpos apoptóticos. De acuerdo a estos autores y los daños encontrados en el presente trabajo en los ratones a los que se les aplicó tópicamente el etanol, se podría considerar que incluso a bajas concentraciones, puede inducir daños en las células de la piel y probablemente incremente el proceso de apoptosis en comparación a lo encontrado en la piel de los ratones del grupo testigo.

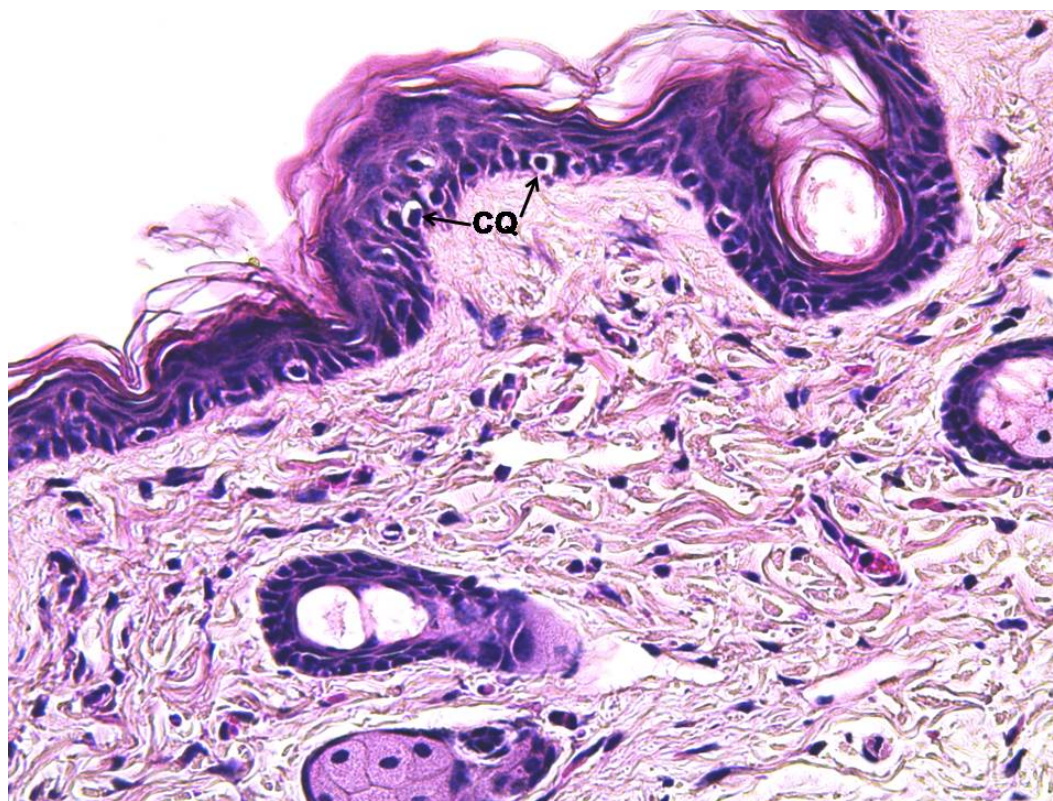


Fig. 9 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo etanol. Simbología: CQ: Células de quemadura. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

En la dermis también se encontró edema leve focal. Singh y Singh (2000) estudiaron el efecto de la inyección del carburante 8 (JP-8), el cual contenía etanol como principal componente, en relación a los cambios en el estrato córneo desde el punto de vista bioquímico (cantidad de lípidos y proteínas),

macroscópicos y microscópicos *in vitro* piel porcina. Los resultados mostraron una mayor pérdida de lípidos y proteínas de las capas del estrato córneo, además de inflamación epidérmica, dérmica y desarrollo de tejido de granulación. Concluyeron que el carburante que contenía principalmente etanol puede dar lugar a irritación de la piel y a toxicidad cutánea *in vivo*. Además de lo anterior, un disolvente como el etanol, elimina el material intercelular, lo que ocasiona alteración de la barrera cutánea (Scheuplein y Blank, 1971). Se sabe que el etanol y sus derivados son potentes vasodilatadores (Neuman et. al., 2002) por lo cual se podría explicar el desarrollo de edema en este grupo, ya que de acuerdo a lo reportado, esta sustancia genera inflamación presentándose edema como parte del proceso, además de concordar con lo reportado por Scheuplein y Blank quienes encontraron inflamación dérmica y el edema es la parte vascular más notoria de este proceso.

Grupo 3

Los ratones que fueron expuestos a la RUV y se les aplicó el vehículo se observaron diversos daños. En la epidermis se presentó atrofia moderada difusa (Figura 10), encontrándose de 1 a 2 capas celulares en el epitelio. La atrofia es la disminución en el tamaño de la célula o en el número de capas por pérdida de sustancia celular, puede representar una forma de respuesta adaptativa y culminar en la muerte celular (Robbins et al., 1998). De acuerdo a lo reportado con los daños producidos por la exposición a la radiación ultravioleta (Elder et al, 1997) se sabe que ésta ocasiona una epidermis irregular con atrofia en algunas áreas, por lo que esto podría explicar la zonas de hipertrofia en ciertas partes de la membrana y a la vez atrofia en otras.

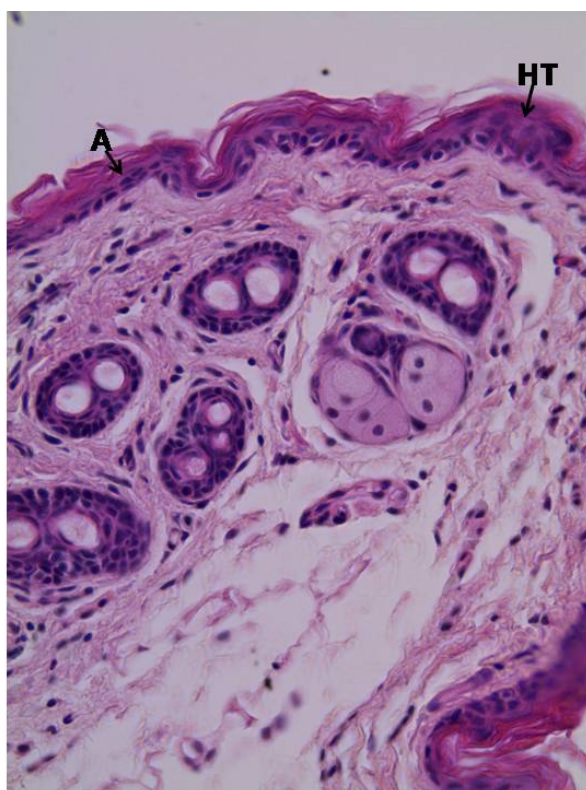


Fig. 10 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo UV-etanol. Simbología: A: Atrofia e HT: Hipertrófia. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Otro de los daños que mostraron los ratones en la epidermis fue espongiosis leve multifocal. La espongiosis es conocida como edema intraepidérmico y esta reportado como otro de los daños ocasionados por la RUV (Robbins, et al. 1998) por lo cual era de esperarse que el daño se presentara en este grupo.

Por otra parte, en la piel de los ratones irradiados se observó en el estrato granuloso hipertrofia leve focal (Figura 10). La hipertrofia se refiere al aumento en el tamaño o grosor de las células, por lo que se produce un aumento en el tamaño del órgano. Estos animales también presentaron hiperplasia en la epidermis, moderada multifocal, pues se encontraron de 8 a 9 capas celulares (Figura 11). La hiperplasia es un incremento en el número de células, dando lugar habitualmente a un mayor volumen del órgano o tejido. La exposición a UVB provoca engrosamiento de la epidermis y en mucho menor grado de la dermis, lo que induce más tolerancia a la irradiación. Ésta respuesta se debe a un incremento de la actividad mitótica cutánea, en particular epidérmica, asociada con un aumento de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, inmediatamente después de la irradiación, por lo que hay una depresión transitoria de esta actividad (Robbins et al., 1998). La hiperplasia que

presentaron en la piel los ratones expuestos a la RUV, se podría atribuir tanto a este engrosamiento que se menciona en la literatura producido por el incremento en la mitosis de los queratinocitos, pero también a la hipertrofia observada en el estrato granuloso.

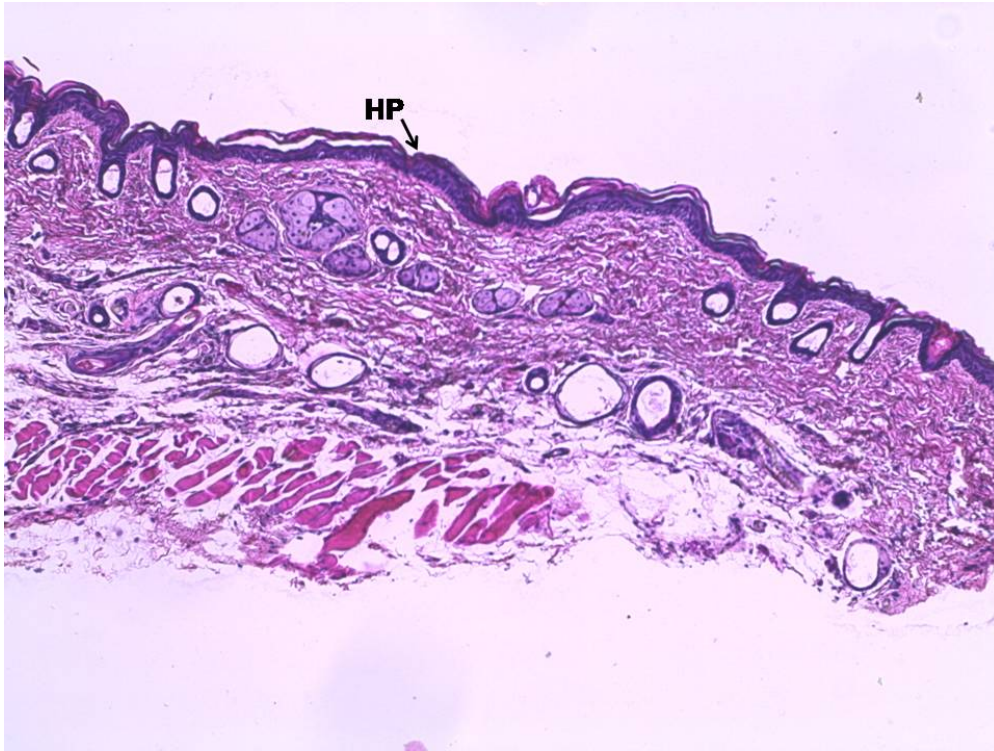


Fig. 11 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo UV-etanol Simbología: HP: Hiperplasia. Aumento original 100x en tinción hematoxilina-eosina.

En la epidermis también se observó la presencia de papilas leve focal (Figura 12). Esto puede presentarse como resultado de la hiperplasia, ya que ésta ocasiona el plegamiento de la piel. Otro de los daños ocasionados por la quemadura solar es la hiperqueratosis lenticular que se caracteriza por la formación de papilas en la periferia de la epidermis (Elder, et. al., 1997) por lo cual también podría reflejarse esta descripción del daño en los ratones de este grupo.

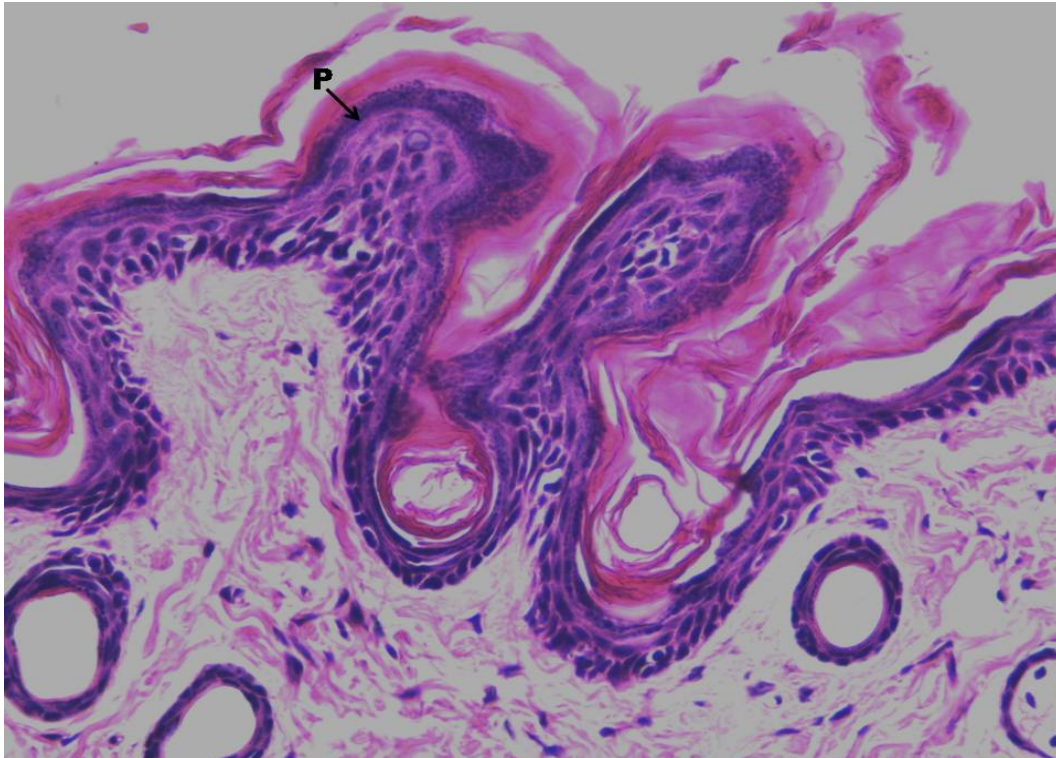


Fig. 12 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo UV-etanol Simbología: P: Papilas. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Finalmente, en la epidermis de los ratones expuestos a la RUV, se encontraron células de quemadura (Figura 13). Las células de quemadura son queratinocitos en la epidermis que se programan para morir por apoptosis. Típicamente la radiación UVB induce células de quemadura solar en la epidermis las cuales aparecen 30 minutos posteriores a la exposición y alcanzan su número máximo 24 horas más tarde. El citoplasma de las células afectadas se torna hialino y a menudo adquiere eosinofilia en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, mientras que el núcleo es picnótico y puede desaparecer de manera prematura. Se considera que la transformación directa de los daños inducidos en el ADN como la generación de los dímeros cíclicos de pirimidina o por el daño indirecto producido al ADN como el causado por las especies reactivas del oxígeno (Mc Gregor y Hawk, 2001).

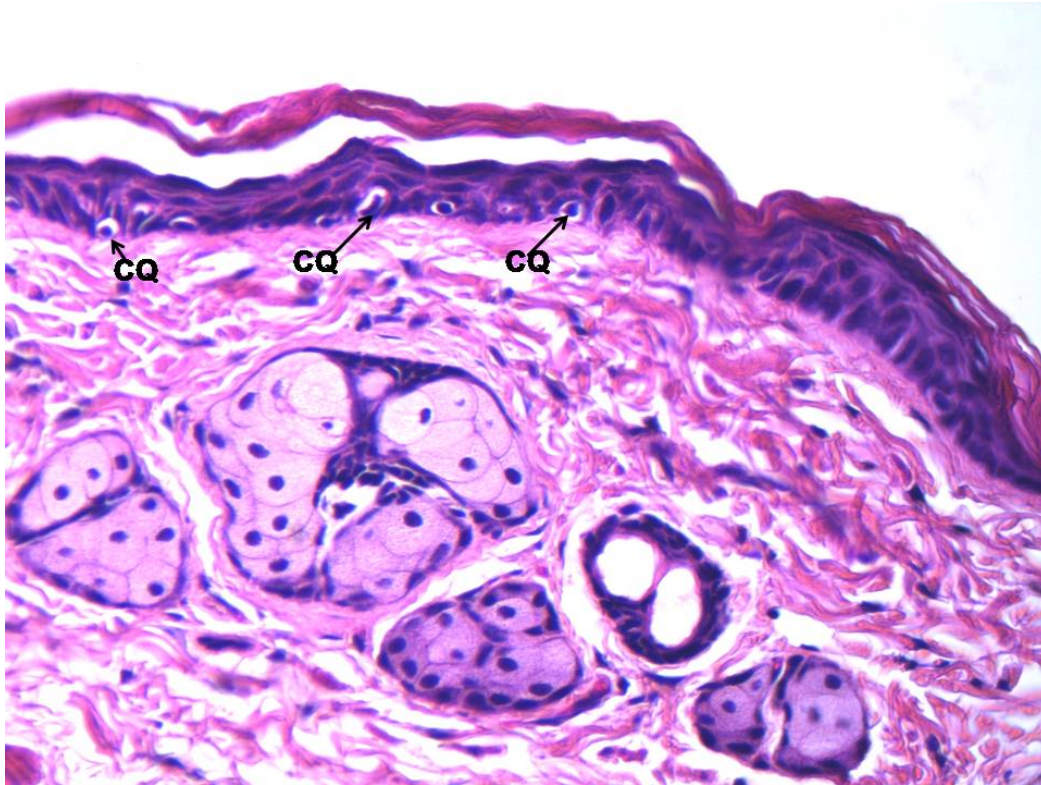


Fig. 13 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo UV-etanol. Simbología: CQ: Células de quemadura. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

En la dermis de los animales del grupo irradiado se encontró edema leve focal (Figura 14), e infiltrado inflamatorio. El edema es un derrame de líquido rico en proteínas, su presencia en este grupo es debido a al proceso inflamatorio que se genera, primeramente se da la vasodilatación y se inducen varios mediadores, dando lugar al edema como parte de la respuesta inflamatoria más notable a la RUV. Ésta tiene la finalidad de destruir o diluir el agente agresor que puede ser tanto estímulos externos, como irradiación y endógenos como daño de algún tipo celular (Parrish, 2001).

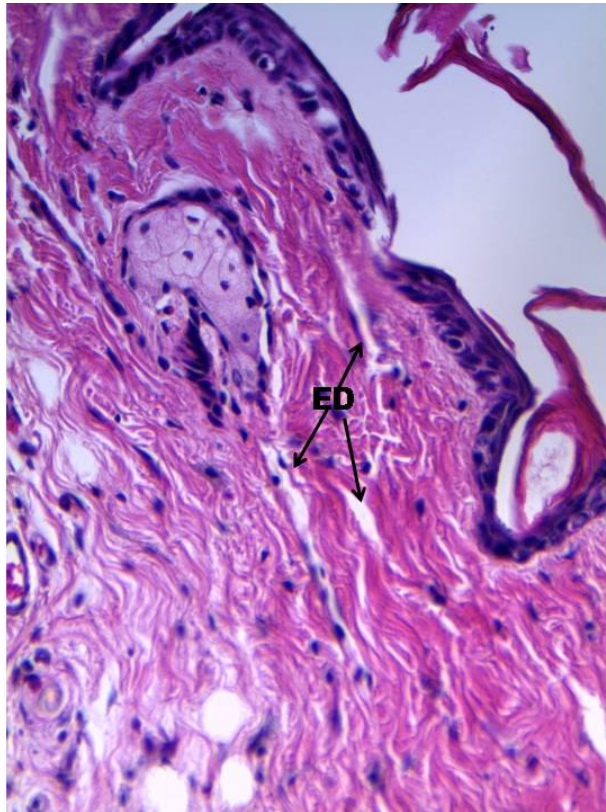


Fig. 14 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo UV-etanol Simbología: ED: Edema. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Otro daño encontrado en la dermis de los ratones irradiados fue congestión (Figura 15) severa difusa. Al igual que el edema, la congestión es parte de la respuesta inflamatoria que desencadena la RUV. Primeramente ocurre una alteración en el calibre vascular que da lugar a un aumento en el flujo sanguíneo, lo que explica el daño en los vasos sanguíneos. Habitualmente la congestión y el edema ocurren juntos, principalmente porque la primera puede producir edema por una mayor transudación de líquido (Robbins et al., 1998).

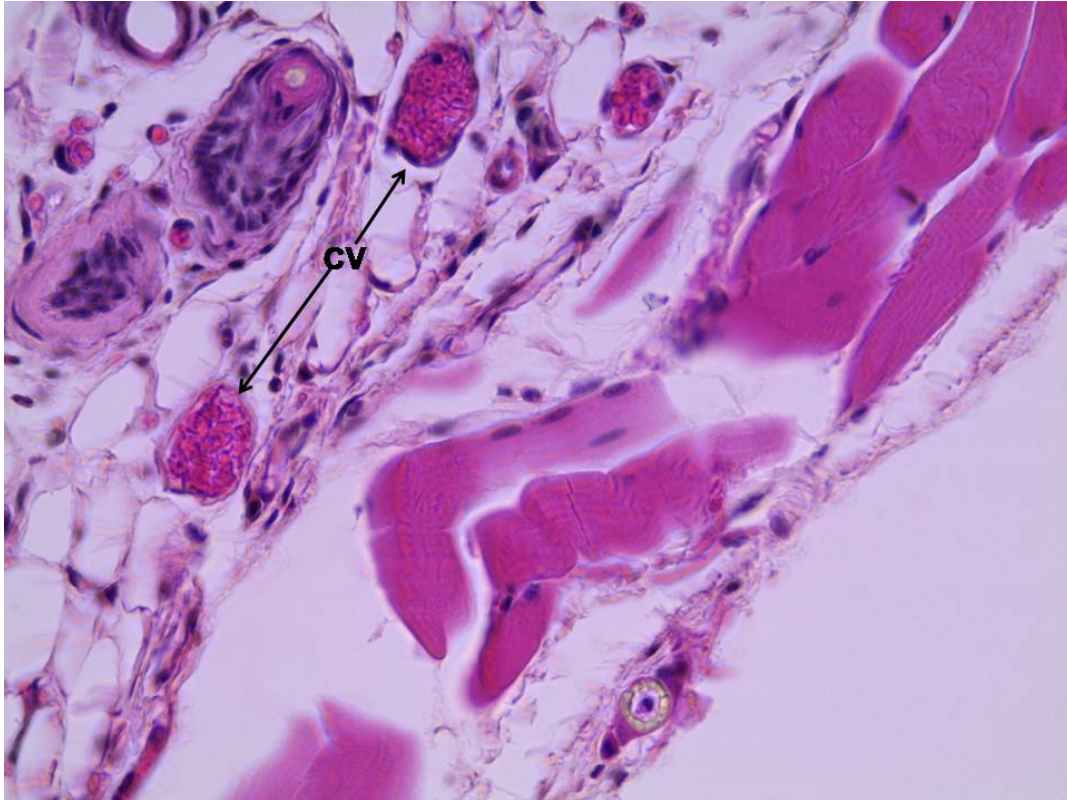


Fig. 15 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo UV-etanol. Simbología: CV: Congestión. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Grupo 4

Los ratones a los que se les aplicó el verbascósido tópicamente y no fueron irradiados presentaron el siguiente diagnóstico:

En la epidermis se encontraron zonas de atrofia leve multifocal (Figura 16). Varios estudios han señalado la relación entre la actividad biológica de los compuestos fenólicos con su afinidad y distribución con los lípidos de membrana. Estos compuestos promueven significativamente la perturbación sobre los fosfolípidos, lo que sugiere un cambio asociado a la membrana y su actividad (Yang et al., 2001). Dentro de estos, el verbascósido ha sido relacionado con varios procesos de señalización de la célula, aunque las bases de estos efectos aun no están muy claros (Sheng et al., 2002; Koo et al., 2006). Posiblemente al verse alterados los fosfolípidos de la membrana y por consecuencia algunos procesos de señalización relacionados con ésta, pudo

alterarse el proceso de mitosis y presentarse una disminución en el número de células de la epidermis, reflejándose como atrofia en la piel de los ratones SKH-1.

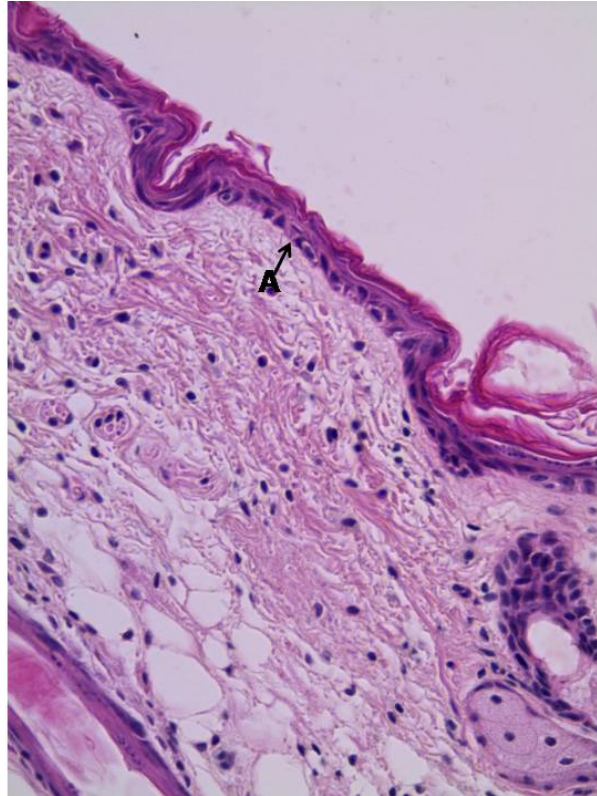


Fig. 16 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo verbascósido-etanol. Simbología:
A: Atrofia. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

A diferencia de lo anterior en otras zonas se encontró hiperplasia leve multifocal con 7 a 8 capas celulares (Figura 17).

Existen evidencias biofísicas que sugieren que los lípidos del estrato córneo son la primera barrera contra la pérdida de agua. Estos tienen un papel muy importante en las funciones de barrera del estrato córneo (Scheuplein y Blank, 1971) ya que junto con las proteínas participan en la estructura intracelular del estrato. Así, la extracción o pérdida de lípidos producido probablemente por la aplicación del tópica del verbascósido en los ratones, pudo eliminar la pretransición de los fosfolípidos y ocasionar desórdenes en las funciones de la piel, como la barrera ante agentes externos tanto físicos, químicos como biológicos, generando vulnerabilidad contra sustancias externas que pueden ser tóxicas (Lazo et al., 1995). Por lo tanto, existe la posibilidad de que el

verbascósido afecte la estructura de la piel y también se pudieron alterar otros procesos celulares que generen hiperplasia, la cual puede actuar como un mecanismo de defensa hacia agentes externos.

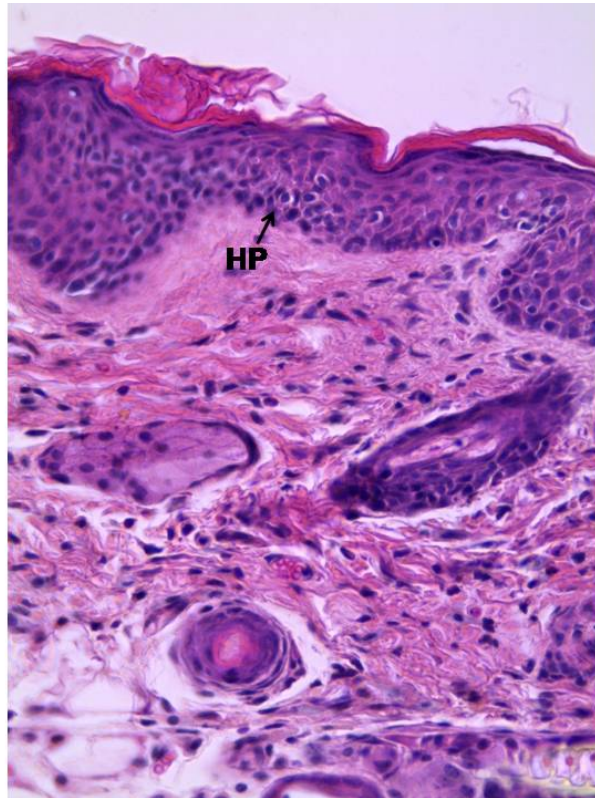


Fig. 17 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo verbascósido-etanol. Simbología: HP: Hiperplasia. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

En la piel de los ratones a los que se les aplicó tópicamente el verbascósido disuelto en etanol, también se observó hipertrofia del estrato granuloso y la formación de papilas en epidermis (Figura 18) ambos leve focal.

Funes y colaboradores (2010) evaluaron el efecto del verbascósido, sobre un modelo de fosfolípidos de membrana. Ellos determinaron las características espectroscópicas del verbascósido y el coeficiente de partición de fosfolípidos en agua y la posible ubicación del verbascósido por el método de fluorescencia. Por último estudiaron el efecto del fenilpropanoide sobre las propiedades termotrópicas del modelo de membranas integrado por fosfolípidos aniónicos o zwitterionicos mediante el método de calorimetría de barrido diferencial (CBD), además realizaron una combinación del CBD,

espectroscopía de fluorescencia, valoración de anisotropía de pH, así como los estudios del tamaño de partículas para determinar los efectos del verbascósido en los fosfolípidos. Encontraron que el verbascósido es un antioxidante hidrofílico, ya que mostró una afinidad significativa por los fosfolípidos con carga negativa, que pueden ser responsables de sus efectos en la estructura de la membrana y perturbarla. Por otra parte, al parecer el verbascósido ubica su ácido caféico en el interior de las membranas y también promovió un aumento de la curvatura de la vesícula, así como una disminución del tamaño de partícula de vesículas unilamelares. La interacción del verbascósido con la carga negativa del grupo fosfato y sus efectos sobre las propiedades físicas de la membrana pueden contribuir a explicar algunos aspectos de su actividad biológica como la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica en modelos de membrana así como la contribución de los lípidos en su capacidad antioxidante. Pero por otra parte este artículo nos podría ayudar a entender la presencia de hipertrofia en éste grupo, ya que se encontró un incremento en el tamaño de las vesículas multilamelares, las cuales contenían grandes cantidades de verbascósido.

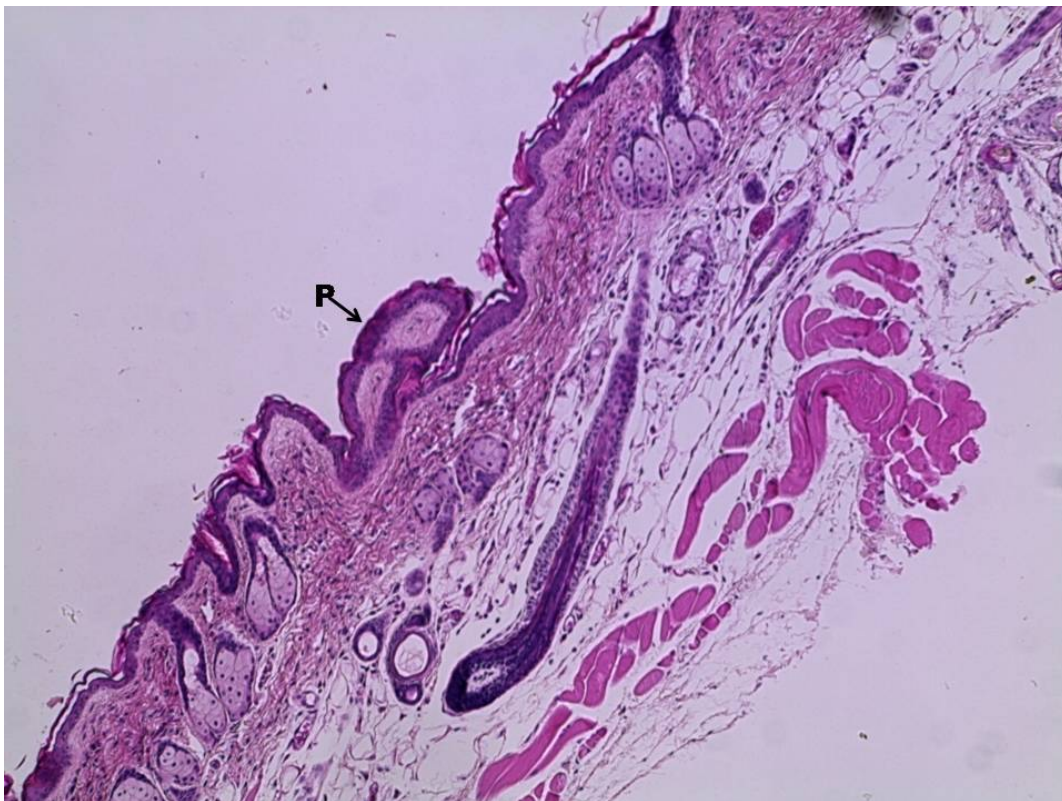


Fig. 18 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo verbascósido-etanol. Simbología: P: Papilas. Aumento original 100x en tinción hematoxilina-eosina.

Continuando con la observación, en la epidermis también se detectó espongiosis moderada focal. Elder y colaboradores (1997) describieron que existen múltiples agentes que afectan la piel (externos o internos), como es el uso de ciertas sustancias las cuales ocasionan daños histológicos, tales como espongiosis.

Finalmente, también se encontraron células de quemadura en la epidermis. De acuerdo a la literatura citada anteriormente, Neuman y colaboradores (2002) señalaron que las células tratadas con etanol examinadas por microscopía electrónica mostraron organelos dañados, cromatina condensada y cuerpos apoptóticos. Por lo tanto podríamos contribuir que la presencia de células de quemadura posiblemente sería por el uso del etano como vehículo utilizado en el tratamiento.

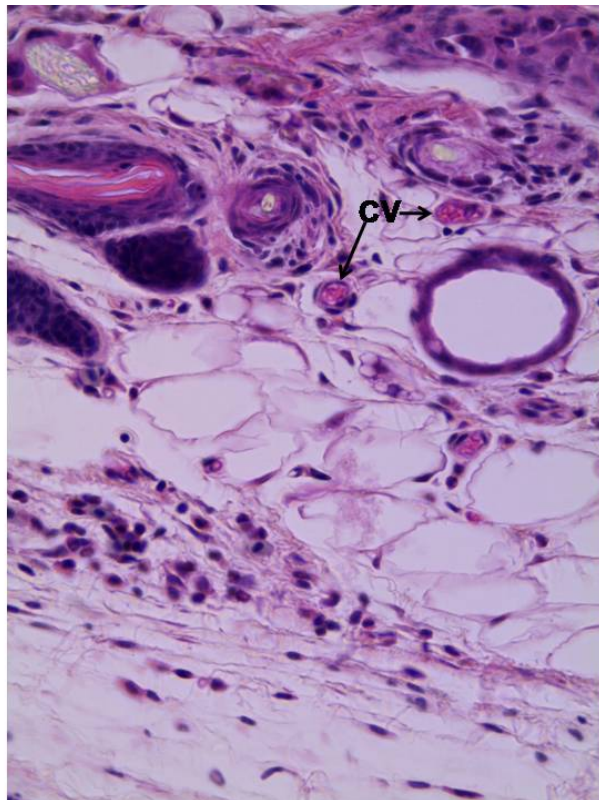


Fig. 19 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo Verbascósido-etanol. Simbología: CV: Congestión. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Dermis

En la dermis de los ratones del grupo 4 se presentó congestión leve multifocal (Figura 19).

Avila y colaboradores (2005) estudiaron las propiedades fotoprotectoras de *Budleja scordioides* en cuyos a los cuales se les aplicó un extracto metanólico y encontraron que los animales mostraron alteraciones vasculares inflamatorias, por lo que se podría explicar que estos daños presentados son debidos al vehículo utilizado, que según lo ya reportado anteriormente ocasiona cierta irritación en la piel.

Grupo 5

En los animales que fueron irradiados con RUV y se les aplicó tópicamente al verbascósido como fotoprotector, se observaron las siguientes características:

En la epidermis se observó atrofia leve focal, a diferencia del grupo que no fue protegido que se encontró con una extensión multifocal, por lo cual se podría ver como primera evidencia que este tuvo una disminución en dicho daño. También se encontró espongiosis leve multifocal (Figura 20).

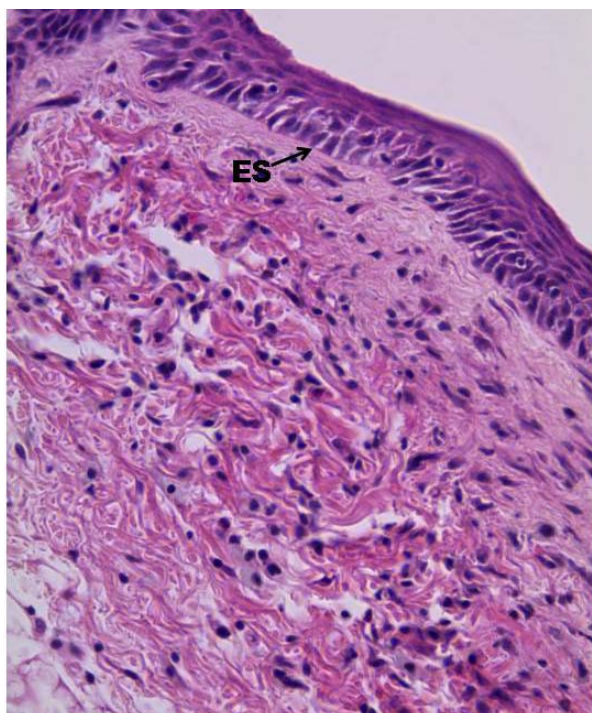


Fig. 20 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo verbascósido-etanol+UV. Simbología: ES: Espongiosis. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Por otra parte, en la piel de los ratones expuestos a la RUV y proegidos con verbascósido se encontró hiperplasia leve multifocal (Figura 21). Así como hipertrofia del estrato granuloso leve focal (Figura 22) y la formación de papilas leve focal.

El primer paso para la iniciación de una reacción fotobiológica cutánea es la absorción de energía de RUV por una molécula específica o cromóforo en la piel. Esta energía puede entonces producir ya sea un daño fotoquímico directo o un daño oxidativo indirecto de biomoléculas estratégicas como el DNA y proteínas (McGregor y Hawk, 2001) por lo que estos daños afectan la membrana y podrían ocasionar un efecto en la membrana celular como hiperplasia.

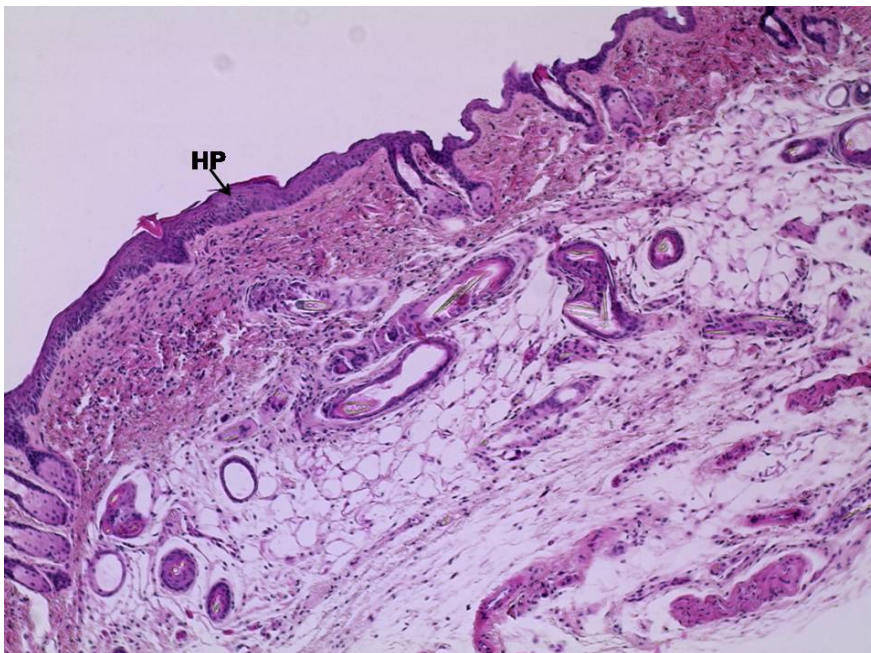


Fig. 21 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo verbascósido-etanol+UV. Simbología: HP: Hiperplasia. Aumento original 100x en tinción hematoxilina-eosina.

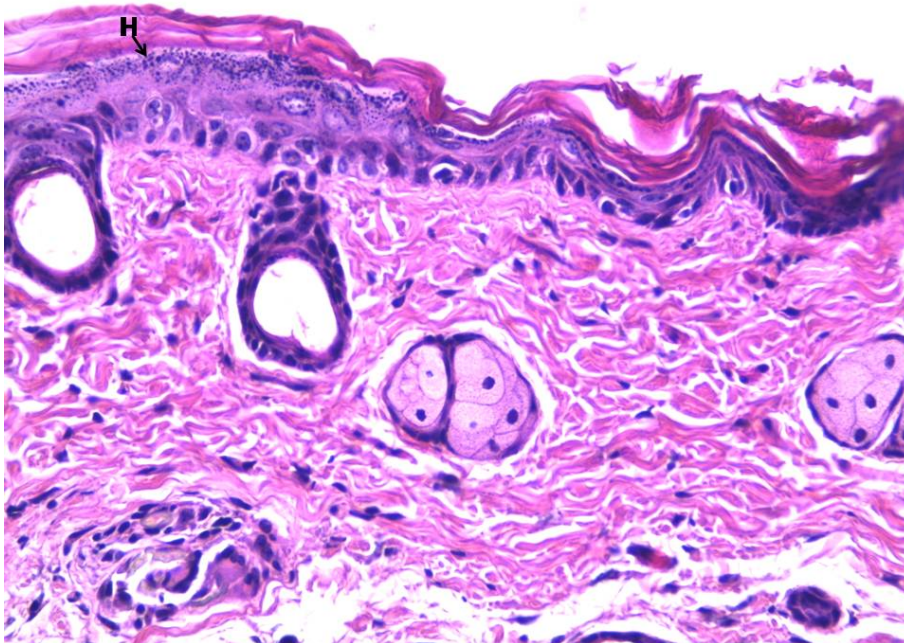


Fig. 22 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo verbascósido-etanol+UV. Simbología: H: Hipertrofia. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

La luz solar provoca efectos agudos y puede determinar reacciones adversas a ciertos fármacos. En el primer paso la radiación es absorbida por moléculas de la piel como ADN y proteínas, denominadas cromóforos, una vez que se absorbe las moléculas cromóforas entran a un estado excitado y la energía lo convierte en un fotoproducto, el cual desencadena procesos bioquímicos complejos como: la reparación enzimática, la generación de flujo de iones, inducción de procesos genéticos e iniciación de la reparación de ADN, por lo tanto también los fotoproductos ocasionan alteraciones celulares tales como hiperplasia e hipertrofia (Mc Gregor y Hawk, 2001).

Finalmente, en epidermis se encontraron células de quemadura (Figura 23), éstas en menor cantidad que en el grupo de los ratones que fueron irradiados y no protegidos, por lo cual se podría ver una disminución en este daño. Las células de quemadura son queratinocitos que sufrieron apoptosis como resultado de la exposición a la RUV por un daño irreversible que sufrió el ADN o algún cromóforo (Laethem, et al., 2005).

La RUV genera un incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS). Éstas tienen efectos nocivos en las biomoléculas, pues causan daño al ADN, proteínas, lípidos y otros componentes celulares, además de afectar procesos celulares. Pero existen mecanismos antioxidantes en las células que actúan para mitigar este daño oxidativo, algunos son internos, encabezados por las enzimas, tales como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, entre otras. También existen mecanismos externos, compuestos como los polifenoles que pueden inactivar a las ROS. Estos compuestos derivan de las plantas y un ejemplo es el verbascósido. Esta molécula se compone de un fenil propanoide, dos azúcares y un fenil etanoide. Tienen propiedades antioxidantes por la presencia de los grupos hidroxilo como sustituyentes de su estructura aromática, la cual le da la capacidad de atrapar radicales libres. Algunos antioxidantes son moléculas orgánicas producidas por las plantas en respuesta a estímulos tales como la radiación. Estos tienen la capacidad de de inhibir los daños que se desencadenan por dichos estímulos (Marti-Mestres, et al., 2007). A pesar de que a los animales a los cuales se les aplicó el verbascósido presentaron los daños reportados para quemadura solar, en estos ratones se encontraron en un menor grado y curso, por lo tanto se podría considerar que el verbascósido disminuye los daños que ocasiona la radiación ultravioleta.

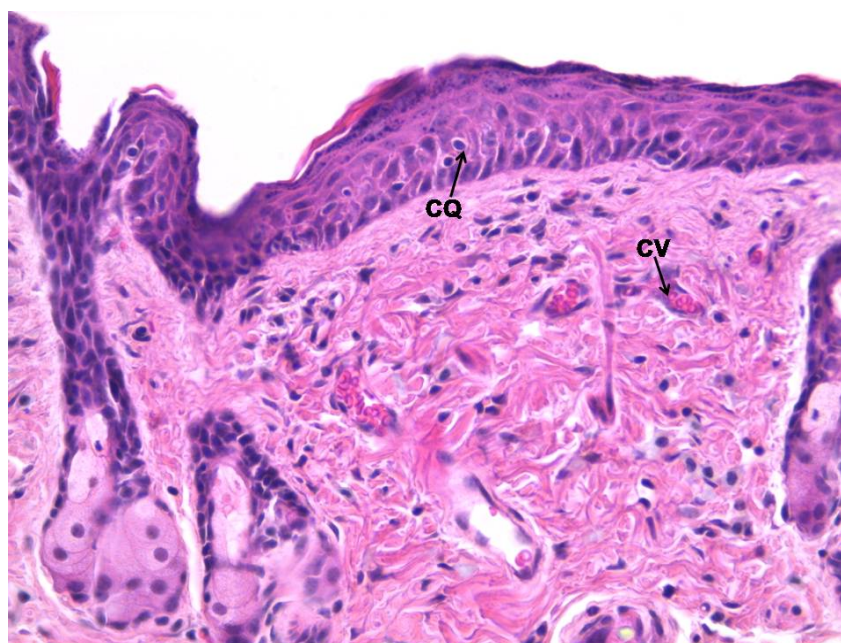


Fig. 23 Corte histológico de piel de ratón SKH-1 grupo verbascósido-etanol+UV. Simbología: CQ: Células de quemadura, CV: Congestión de vasos. Aumento original 400x en tinción hematoxilina-eosina.

Recientemente se ha comprobado que el verbascósido y el extracto de *Lemon verbena* tienen una potente capacidad antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica en los sistemas de modelos de membrana, además la posición del verbascósido en estos modelos podrían ser los responsables de su capacidad para atrapar radicales libres (Funes et al., 2009). Esto puede ayudar a entender el efecto de éste compuesto sobre las propiedades físicas de la membrana y la contribución de las propiedades antioxidantes en los lípidos y por lo tanto explicar los cambios que ocurren cuando el compuesto comienza actuar sobre la membrana celular.

Por otra parte, en la dermis se observó congestión leve focal, estas alteraciones fueron considerablemente menores a las presentes en las muestras de piel de ratón que fueron irradiados y no protegidos.

En general, las muestras de la piel de los ratones que fueron irradiados y a las cuales se les aplicó el tratamiento (verbascósido-vehículo) presentaron los daños en menor proporción en comparación con la piel de los ratones expuestos a la RUV sin protección. Esta disminución concuerda con lo reportado por Avila y colaboradores (2005) quienes demostraron en cuyos que el verbascósido tiene un FPS superior a 15. Por otra parte Backhouse y colaboradores (2008) evaluaron las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antioxidantes de *Buddleja globosa*, encontrando al verbascósido en mayor concentración en el extracto. Estas propiedades explican la disminución en los daños ocasionados por la RUV, en respuesta al verbascósido.

En la siguiente tabla se observan todos los grupos tratados, los testigos y los experimentales y se muestra un resumen de los daños histológicos generados de cada uno de ellos, así como su grado y extensión.

Lesiones cutáneas	Testigo	Etanol-vehículo	Etanol-UV	Verbascósido-etanol	Verbascósido-etanol-UV
Epidermis Paraqueratosis					
Esgongiosis		Leve Focal	Leve Multifocal	Moderada Focal	Leve Multifocal
Apoptosis (células de quemadura)		Leve Focal	Leve Multifocal	Leve Focal	Leve Focal
Necrosis					
Hiperplasia			Moderada Multifocal	Leve Multifocal	Leve Multifocal
Hipertrofia		Leve Focal	Leve Focal	Leve Focal	Leve Focal
Atrofia			Moderada Difusa	Leve Multifocal	Leve Focal
Dermis Edema			Leve Focal		
Congestión	Leve Focal		Severa Difusa	Leve Multifocal	Leve Focal
Hemorragia					
Infiltrado inflamatorio			Leve Focal		

Tabla 3. Resultados de los daños a nivel histológico que presentaron los grupos, mostrando el grado en que se presentó (leve, moderado o grave) y la extensión (focal, multifocal y generalizado).

CONCLUSIONES

1. La piel de los ratones del grupo testigo presentó las características descritas para la piel normal, además de observarse quistes sebáceos en la dermis que en esta cepa de ratones es debido a una mutación espontánea en el alelo hr.
2. Al grupo al que se le aplicó el vehículo (etanol) presentó espongiosis, apoptosis e hipertrofia en la epidermis, en todos los casos leve y focal.
3. La exposición de los ratones a la RUV mostraron los daños reportados para quemadura solar, en epidermis se presentó atrofia moderada focal, hiperplasia moderada multifocal, hipertrofia leve focal, espongiosis leve multifocal y apoptosis; en dermis se encontró edema leve focal y finalmente congestión severa y focal.
4. La aplicación tópica del verbascósido a los ratones ocasionó en la epidermis espongiosis moderada multifocal, hiperplasia y atrofia leve multifocal; mientras que en la dermis congestión leve multifocal.
5. La aplicación tópica del verbascósido disminuye los daños reportados para la RUV.

APÉNDICE

TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA

DESPARAFINAR

1. Xilol - 5 min
2. Xilol - 5 min

HIDRATAR

3. Alcohol etílico absoluto - 3 min
4. Alcohol etílico al 96% - 3 min
5. Alcohol etílico al 90% - 3 min
6. Alcohol etílico al 80% - 3 min
7. Alcohol etílico al 70% - 3 min
8. Agua corriente – 3 min

TINCIÓN NUCLEAR

9. Hematoxilina de Harris – 5 a 7 min
10. Agua corriente – lavar (hasta quitar exceso de colorante)

DIFERENCIAR

11. Alcohol ácido al 1% - paso rápido
12. Agua corriente – lavar

VIRAR

13. Agua amoniacal - hasta virar a azul
14. Agua corriente – lavar

TINCIÓN CITOPLÁSMICA

15. Eosina – 3-5 min

DESHIDRATAR

16. Alcohol etílico al 96% - 30 s
17. Alcohol etílico absoluto – 3 min
18. Alcohol etílico absoluto -- 5 min

ACLARAR

19. Xilol - 5 min
20. Xilol - 5 min
21. Montar con resina

RESULTADOS

- Núcleo - azul
- Nucleolo - azul
- Citoplasma - rosa
- Fibras musculares - rosa intenso
- Eritrocitos – rosa
- Tejido conectivo - rosa intenso

SOLUCIONES

ALCOHOL ETÍLICO AL 90%

Alcohol etílico al 96% _____	94 mL
Agua destilada _____	6 mL

ALCOHOL ETÍLICO AL 80%

Alcohol etílico al 96% _____	84 mL
Agua destilada _____	16 mL

ALCOHOL ETÍLICO AL 70%

Alcohol etílico al 96% _____	74 mL
Agua destilada _____	26 mL

HEMATOXILINA DE HARRIS

Cristales de hematoxilina _____	5.0 g
Alcohol etílico absoluto _____	50.0 mL
Alumbre de amonio o potasio _____	100.0 g
Oxido rojo de mercurio _____	2.5 g
Llevar con agua destilada a _____	1000.0 mL

Disolver la hematoxilina en el alcohol etílico, aparte poner a calentar el agua y agregarle el alumbre de potasio hasta disolver, separarlo del calor y mezclar las dos soluciones. Volver a calentar las dos soluciones juntas y dejarlas hasta ebullición (1 min como máximo), quitar lo más rápido posible del calor y agregar el oxido de mercurio lentamente, calentar nuevamente hasta hervir, la solución debe quedar de color púrpura oscuro, retirar del fuego e inmediatamente enfriar bajo el chorro del agua, hasta que esté a temperatura ambiente.

Por cada 100 mL de solución agregar de 2-4 mL de ácido acético glacial. Filtrar y usar.

SOLUCIÓN STOCK DE EOSINA ALCOHÓLICA

Eosina Y _____	10 g
Llevar con alcohol etílico al 96% a _____	1000 mL

SOLUCIÓN DE TRABAJO

Sol Stock de eosina alcohólica _____	125 mL
Alcohol etílico al 96% _____	375 mL
Ácido acético glacial _____	3 mL

ALCOHOL ÁCIDO AL 1%

Alcohol etílico al 70% _____	99 mL
Acido clorhídrico _____	1 mL

AGUA AMONIACAL al 2%

Agua corriente _____ 98 mL

Hidróxido de amonio 28% _____ 2 mL

REFERENCIAS

Avila, J. G., Castañeda, C. 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.

Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodriguez, J., Delporte, C. 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Budleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 263-269.

Brand, R. M., Jendrzewski, J. L. 2008. Chronic ethanol ingestion alters xenobiotic absorption through the skin: Potential role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 46:1940–1948.

Crew, F.A.E., Mirskaia, L. 1932. The character “hairless” in the mouse. *Journal of Genetics*. 25(1): 17-24.

Cruteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. Natural products (Secondary metabolites) In: Buchanan, B. B., Grisse, W., Jones, R. L. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 4ª edición. American Society of Plants Physiologists Rockville, Maryland. USA. 1190-1191.

Deepak, M., Umashankar D. C., Handa, S. S. 1999. Verbascoside a promising phenylpropanoid. *Indian Drugs*. 36:336–345.

Delves, P.J., Seamus, J.M., Burton, D. R., Roitt, I. M. 2006. *Inmunología*. 11ª edición. Panamericana. Buenos Aires. 426-453 pp.

De Grujil, F. R. 1998. Dose time dependency of tumor formation by chronic UV exposure. *Photochemistry Photobiology*. 46:53-62.

Elder, D., Elenitsas, R., Jaworsky, C. 1997. Lever's Histopathology of the skin. 8a edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA. 305-315 pp.

Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A. 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. Food Chemistry. 117: 589-598.

García, B., A. 2010. Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidantes de *Yucca periculosa Baker*. Tesis de doctorado. FES-Iztacala. UNAM. México. 195 pp.

García, B., Avila, G. 2008. Natural products: molecular mechanisms in the photochemoprevention of skin cancer. Revista Latinoamericana de Química. 36(3):83-102.

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.

Haake, A., R., Holbrook, K. A. 2001. Estructura y función de la piel. En: Orkin, Milton, O., Howard, I. M., Mark, V. D. (Eds). Dermatología. El manual moderno. México. 3-17 pp.

Harborne, J. B., Baxter, H. 1993. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor & Francis. Washington. 472-473 pp.

Holbrook, K. A., Wolff, K. 2001. Estructura y desarrollo de la piel. En: Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. N., Austen, K. F. Dermatología en medicina general. 5ª edición. Panamericana. Buenos Aires. 199-237pp.

Koo, K. A., Kim, S. H., Oh, T. H., Kim, Y. C. 2006. Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Life Science*. 79: 709-716 pp.

Laethem, A., V., Claerhout, S., Garmynb, M., 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.

Lazo, N. D., Maine, J. G., Downing, D. T. 1995. Lipids are covalently attached to rigid corneocyt protein envelopes existing predominantly as sheets: a solid-state nuclear magnetic resonance study. *Journal Investigation Dermatology*. 105: 301.

McGregor, J., M., Hawk, J., L., M. 2001. Efectos agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. N., Austen, K. F. *Dermatología en medicina general*. 5ª edición. Panamericana. Buenos Aires. 1639-1665 pp.

Marti-Mestres, G., Mestres, J. P., Bres, J., Martin, S., Ramos, J., Vian, L. 2007. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. *International Journal of Pharmaceutics*. 331:139–144.

Montagna, W., B., Chase, H., B., Melaragno, H., P. 1952. The skin of hairless mice I. The formation of cysts and the distribution of lipids. *Journal Investigation Dermatology*. 19(1):83-94.

Mukhtar, H. 1992. *Pharmacology of the skin*. CRC Impresiones. Estados Unidos. 231-238 pp.

Murphy, G. F. 1997. Histology of the skin. In: Elder, D., Elenitsas, R., Jaworsky, C., Johnson, B. *Lever’s Histopathology of the skin*. 8ª edición. Lippincott-Raven. New York, 5-50 pp.

Neuman, M., G. Haber, J., A., Malkiwiez, I., M., Cameron, R., G. Katz, G., G. Shear, N., H. 2002. Ethanol signals for apoptosis in cultured skin cells. *Alcohol* 26:179–190.

Parker. 2000. Estructura y función de la piel. En: Orkin, Milton, O., Howard, I. M., Mark, V. D. (Eds). Dermatología. El manual moderno. México. 3-17 pp.

Parrish, J. A., 2001. Fotomedicina, pasado, presente y futuro. En: Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. N., Austen, K. F. (Eds). Dermatología en medicina general. 3ª edición. Panamericana. Buenos Aires. 1700-1790 pp.

Prisana, K. Henry, W. 2005. Photoprotection. Journal Academic of Dermatology. 52(6):937-958.

Robbins, S., R., S., Cotran, V., Kumar, T. Collins. 1998. Patología estructural y funcional. 6ª edición. Mc Graw Hill. EUA. 767 pp.

Ross, M. H., Pawlina, W. 2008. Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5ª edición. Panamericana. Buenos Aires. 480-516 pp.

Sheng, G.Q., Zhang, J.R., Pu, X.P., Ma, J., Li, C.L., 2002. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. Journal Pharmacology. 451:119–124.

Scheuplein, R. J., Balnk, I. 1971. Permeability of the skin. Physiology. Rev. 51(4): 702-747.

Schwartz, T., Halliday, G. M. 2007. Photoimmunology. In: Lim, H. W., Hönigsmann, H., Hawk, J. L. M. (Eds). Photodermatology. Informa healthcare. New York. 55-74 pp.

Singh, S., Singh, J. 2000. Dermal toxicity: effect of jet propellant-8 fuel exposure on the biophysical, macroscopic and microscopic properties of porcine skin. Environmental Toxicology and Pharmacology 10:123–131.

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. 91-106 pp.

Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F. 2001. Estmation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. Anal. Science. 17: 599-604.

Páginas web consultadas para figuras:

Figura 1. Fecha de consulta 25/05/2011.

<http://livingmybeauty.wordpress.com/tag/como-tener-una-piel-perfecta/>

Figura 2. Fecha de consulta 25/05/2011.

<http://www.google.com.mx/imgres?imgurl=http://www.bioderma.com/>

Figura 3. Fecha de consulta 25/05/2011.

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/integumentary/integum.htm>

Figura 4. Fecha de consulta 25/05/2011.

<http://cs-fs-primero.blogspot.com/2011/04/espectro-electromagnetico.html>