



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Lippia graveolens*
EN EL DESARROLLO DE CARCINOMAS CUTÁNEOS EN
RATONES SKH-1”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Sayíl Cruz Toscano

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Guillermo Avila Acevedo



Tlalnepantla, Estado de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimiento y dedicatorias

*A mi mamá Ma. Cristina a mi papá Andrés y mi hermana Zazil-
ña por su constante apoyo, e infinita paciencia y amor
incondicional. Las palabras no son suficientes para decirles cuanto
se los agradezco y los quiero.*

*A mis sobrinos Tona, Andy, Yummy e Itzaiana, ustedes son la
razón por la que quiero ser mejor cada día, aunque me saquen de
quicio todo el tiempo siempre serán mi fuente de inspiración.*

*A mis tías Irma, Juana y Conchita, mi padrino Jaime y mis
primos Itzel, Chery, Adriana y Giovanni por su constante apoyo y
comprensión.*

*A mis profesores Dra. Ana María García Bores, M. en C. Adriana
Montserrat Espinosa González, M. en C. Ma. del Rosario González
Valle y Dr. José Guillermo Avila Acevedo, por su guía, paciencia,
consejos y apoyo a lo largo de este trabajo.*

*A mis abuelitos Josefina Macías†, José Trinidad Toscano†, Rufina
Cruz y Roberto Cruz† por su cariño y fe.*

*A mis amigos y confidentes Edgar Hernández, Diana Verónica,
Mauricio Santiago, Aline Méndez y Gabriela Mahelet Lozada, por
su apoyo, consejos y todos los momentos que hemos pasado buenos
y malos. No importa a dónde nos lleve la vida siempre serán mis
mejores amigos.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al
Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación
Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM)*

Contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	4
3.1. Piel	4
3.1.1. Histología	4
3.1.1.1. Epidermis	5
3.1.1.2. Dermis	7
3.1.1.3. Hipodermis	9
3.1.2. Funciones de piel	9
3.1.3. Protección contra la RUV	10
3.2. Radiación solar y espectro electromagnético	10
3.2.1. Radiación ultravioleta	11
3.3. Efectos de la radiación ultravioleta	12
3.3.1. Efectos benéficos de la RUV	12
3.3.2. Efectos adversos de la RUV	12
3.3.3. Daños agudos y crónicos de la RUV sobre la piel	14
3.4. Neoplasia	15
3.4.1. Neoplasia benigna	16
3.4.2. Neoplasia maligna	16
3.5. Cáncer de piel	17
3.5.1. Carcinoma basocelular (CBC)	18
3.5.2. Carcinoma espinocelular (CEC)	19
3.5.3. El cáncer de piel en México	20
3.6. Fotoprotección	20
3.6.1. Filtros solares	21
3.7. <i>Lippia graveolens</i> Kunth	22
4. Justificación	24
4.1. Pregunta científica	24
5. Hipótesis	24
6. Objetivos	25
6.1. General	25
6.1.1. Particulares	25
7. Material y Métodos	26
7.1. Pruebas cualitativas para la detección de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i>	26

7.2. Modelo animal (Ratones SKH-1)	26
7.3. Irradiación	28
7.4. Procesamiento y diagnóstico histológico	28
7.5. Análisis estadísticos	33
8. Resultados y discusión	34
8.1. Pruebas cualitativas en el extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i>	34
8.2. Experimento crónico en ratones SKH-1 para el desarrollo de carcinomas cutáneos inducidos por la RUV	35
8.2.1. Monitoreo del peso corporal	35
8.2.2. Monitoreo de lesiones macroscópicas	36
8.3. Diagnóstico histológico	43
8.3.1. Grupo control negativo tratado con <i>Lippia graveolens</i>	44
8.3.2. Grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV	45
8.3.3. Grupo experimental tratado con <i>Lippia graveolens</i> y expuesto a la RUV	48
9. Conclusiones	52
10. Referencias	53

1. Resumen

La piel es el órgano más grande del ser humano se caracteriza por estar dividido en tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. Este protege contra la radiación ultravioleta (RUV) y sus daños agudos y crónicos. Los efectos crónicos provocan grandes daños sobre la estructura y función de la piel, que puede dar lugar al fotoenvejecimiento o fotocarcinogénesis. Por esta razón existe un gran interés en el estudio de sustancias naturales capaces de absorber la radiación solar por lo que pueden prevenir o revertir las alteraciones producidas por la RUV. *Lippia graveolens* es una planta rica en fenoles y flavonoides, sustancias capaces de absorber la RUV. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del extracto metanólico de *L. graveolens* en el desarrollo de carcinomas cutáneos en ratones SKH-1. Al extracto metanólico de *L. graveolens* se le identificaron la presencia de metabolitos secundarios mediante pruebas cualitativas detectando alcaloides, carbohidratos, fenoles y saponinas. Para la evaluación del efecto del extracto en el desarrollo de carcinomas cutáneos se formaron tres grupos de ratones SKH-1 con los siguientes tratamientos: etanol/UV, *L. graveolens*/UV y *L. graveolens*; los animales estuvieron expuestos a la RUV por un minuto cada tercer día durante 30 semanas. Durante el desarrollo del experimento se determinaron la incidencia y multiplicidad de lesiones. Al término de la irradiación los ratones fueron sacrificados y se les extirpó la piel para el diagnóstico histológico. Los resultados muestran que la aplicación tópica del extracto metanólico de *L. graveolens* retrasa y disminuye las lesiones provocadas por la exposición crónica a la RUV en ratones SKH-1. De acuerdo al diagnóstico histológico el extracto metanólico puede prevenir el cáncer de piel en ratones SKH-1 expuestos a RUV.

2. Introducción:

La piel es el órgano más grande que poseen los mamíferos, en un humano tiene una extensión aproximada de 1.85 m², con un grosor promedio de 2 mm y está dividida en tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (Navarrete-Franco 2003).

La epidermis se encarga de proteger contra el medio ambiente; está compuesta por tres tipos celulares principalmente: queratinocitos, corneocitos y melanocitos. La dermis es más gruesa que la epidermis, contiene folículos pilosos, glándulas sudoríparas, vasos sanguíneos, nervios y colágeno. La hipodermis está formada por colágeno y células adiposas, que conservan el calor corporal y poseen un efecto de amortiguación de choque mecánico (Arenas 1996; Navarrete-Franco 2003).

La piel es responsable de proteger a los seres vivos de los efectos de la radiación UV, la cual es de suma importancia debido a que se es el principal factor de riesgo de la mayoría de los cánceres de piel. La radiación ultravioleta (RUV) pertenece a la franja del espectro electromagnético con longitudes de onda entre 400 nm y 100 nm, se divide en tres: UVA (315 – 400 nm), UVB (280 - 315 nm) y UVC (\leq 280 nm) (Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998).

Las radiaciones UVA y UVB son los principales causantes del cáncer de piel. El grado de daño por la RUV depende de la intensidad y del tiempo que la piel ha estado expuesta, o si ésta protegida. Los efectos por la RUV pueden ser reconocidos en términos prácticos en agudos y crónicos (Gutiérrez-Vidrio 2003).

Los daños agudos provocados por lo exposición a la RUV incluyen la alteración de biomoléculas, cambios en el funcionamiento celular, estrés oxidativo, quemadura solar y alteraciones del sistema inmune. Cuando la exposición es crónica se tienen graves efectos sobre la estructura y función de la piel, lo que eventualmente puede dar lugar al fotoenvejecimiento o a la fotocarcinogénesis. Por esta razón se busca continuamente diferentes formas de protegernos contra la RUV, como los filtros solares (Berengust 2013; Pérez-Sánchez *et al* 2014).

Los filtros solares son sustancias químicas que absorben o repelen la RUV, se aplican tópicamente y protegen de los efectos adversos del Sol; sin embargo pueden ocasionar afectos secundarios como alergias o irritación. Por esta razón actualmente, existe un gran interés en el estudio de sustancias naturales que contengan propiedades antioxidantes y que pueden prevenir o revertir las alteraciones producidas por RUV (Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998).

Lippia graveolens o también conocido como “orégano mexicano” es usado comúnmente en la cocina como un condimento o hierba aromática y se ha reportado que es una planta rica en fenoles y flavonoides (Martínez-Rocha *et al* 2008) compuestos que por su estructura química tienen propiedades antioxidantes y fotoprotectoras.

3. Marco teórico

3.1. Piel

La piel es un órgano complejo que tiene como funciones delimitar el medio interno de un organismo, protegerlo contra los factores ambientales y traducir señales del ambiente externo. Este órgano en un humano promedio posee una extensión aproximada de 1.85 m², pesa alrededor de 4 kg, con un volumen de 4000 cm³ y un espesor de 2 mm; lo que es equivalente al 6% del peso corporal, más del doble del peso que el hígado o el cerebro. La piel presenta en su superficie más de 2.5 millones de orificios pilosebáceos y los llamados pliegues lonsángicos. Los anexos de la piel son el pelo corporal, el cuero cabelludo y las uñas (Arenas 1996; Amado 2001; Navarrete-Franco 2003) (Figura 1).

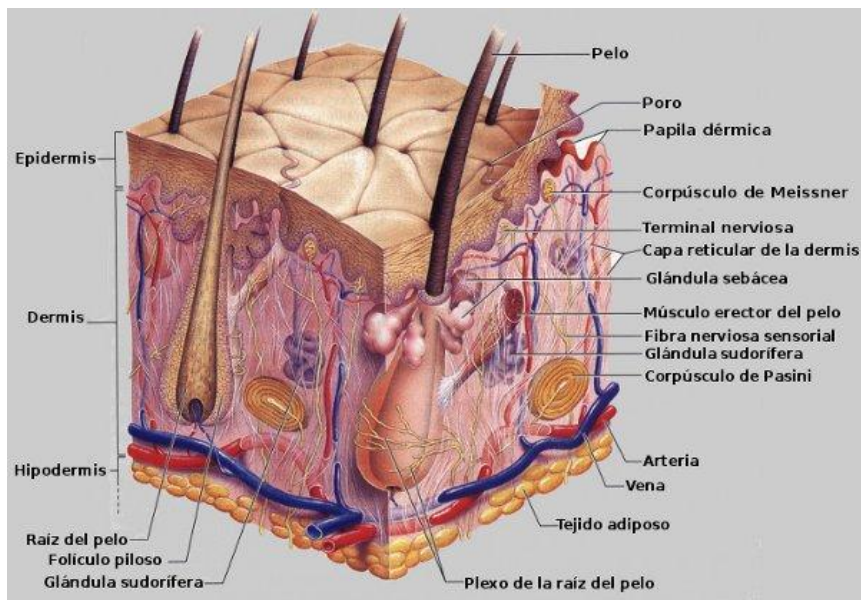


Figura 1. Esquema de la estructura de la piel

Tomado de: <http://www.sabelotodo.org/anatomia/imagenes/piel.jpg>

3.1.1. Histología

Desde el punto de vista histológico podemos distinguir tres de la piel capas: epidermis, la dermis y la hipodermis (Arenas 1996).

3.1.1.1. Epidermis

La capa más superficial de la piel es la epidermis. Está formada por un epitelio plano, estratificado, queratinizado, delgado con un espesor promedio de 0.2 mm. Su función principal es la de proteger las capas más profundas de la piel y los órganos internos contra el medio ambiente. Está formado por cinco estratos (Arenas 1996; Amado 2001).

1. Basal o germinativo.

El estrato basal o germinativo está constituido por una sola hilera de células cilíndricas basófilas, conformadas por: queratinocitos, melanocitos, células Langerhans y células Merkel. En este estrato se inicia la proliferación celular que dará lugar a las otras capas de la epidermis, éstas se unen entre sí por desmosomas; uniones de cohesión celular que permiten la unión entre queratinocitos adyacentes, y a la membrana basal por hemidesmosomas. Cada 5 a 10 queratinocitos se intercalan células dendríticas como los melanocitos y las células de Langerhans y no dendríticas o células Merkel (Figura 2) (Arenas 1996).

Los melanocitos derivados de las crestas neurales tienen como función principal la síntesis de la melanina en organelos llamados melanosomas. Se pueden relacionar con los queratinocitos a través de prolongaciones con alrededor de 35 a 45 células, a quienes le transfieren la melanina sintetizada (Arenas 1996; Lépori 2005).

La célula Langerhans tiene la función de captar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T inmunocompetentes. Proviene de la médula ósea y es parte sistema de macrófagos-mononucleares. La célula de Merkel forma parte del sistema celular endócrino difuso; funciona como mecanorreceptor y tiene relación con terminaciones nerviosas sensitivas (Arenas 1996; Amado 2001; Lépori 2005)

2. Espinosos o de Malpighi.

El estrato espinoso se compone de varias capas de células poliédricas, con apariencia espinosa debido a un mayor número de desmosomas, la función de este estrato es dar consistencia a la base de la epidermis y el inicio de la formación de la queratina (Arenas 1996).

3. Granuloso.

El estrato granuloso consta de células planas con granulaciones de queratohialina (precuroras de la queratina), a medida que los gránulos crecen cubren toda la célula, sus núcleos se desintegran, al igual que los organelos. Las células se aplanan y luego mueren, sin embargo siguen estrechamente unidas (Figura 2) (Arenas 1996).

4. Córneo.

Este estrato se compone por queratinocitos muertos llamados corneocitos que se caracterizan por ser células muertas aplanadas y sin núcleo que se desprenden continuamente a medida que los nuevos se forman. Están compuestas principalmente por queratina. Este estrato es una barrera para la luz, calor, bacterias, y a la pérdida de agua (Figura 2) (Arenas 1996; Amado 2001; Navarrete-Franco 2003).

5. Lúcido.

El estrato lúcido solo se presenta en piel gruesa como la de las palmas de las manos y plantas de los pies, está compuesto por eleídina; sustancia acidófila rica en grasas y proteínas con propiedades refractantes, se presenta como una capa homogénea y brillante (Arenas 1996).



Figura 2. Corte histológico de epidermis donde se observan sus diferentes estratos

Modificado de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/imagenes/epitelio-estrat-plano.jpg>

3.1.1.2. Dermis

La capa media de la piel es la dermis, la cual es más gruesa que la epidermis. Está constituida por tejido conjuntivo, que sostiene los vasos sanguíneos, nervios y anexos de la piel. Además posee estructuras que intervienen en complejas funciones relacionadas con el metabolismo, temperatura, defensa y cicatrización (Arenas 1996; Amado 2001).

La dermis está formada por tres clases de fibrillas, una sustancia fundamental y células. Las fibras más abundantes son las de colágena formadas por la proteína colágeno tipo I. Las fibras de colágena se mezclan con las fibras reticulares y elásticas, sin embargo estas se encuentran en menor proporción. La sustancia fundamental, está formada por mucopolisacáridos que sirven de medio de unión de las fibras, sostiene a las células ya que es el medio donde se realizan las funciones metabólicas de este tejido. En conjunto las fibras y la sustancia fundamental dan resistencia, cohesión y elasticidad a la piel (Arenas 1996; Amado 2001).

Las células que se encuentran en la dermis en escaso número generalmente son de varios tipos: fibroblastos, que producen las fibras de colágena, reticulares y la sustancia intersticial; histiocitos que corresponden a monocitos tisulares derivados del sistema reticuloendotelial con gran movilidad y poder fagocitario: mastocitos o células cebadas con granulaciones en su interior y productoras de histamina, heparina y otros mediadores de la inflamación así como células derivadas de la corriente sanguínea; escasas en condiciones normales: polimorfonucleares, eosinófilos, plasmocitos (Marks y Samman 1979; Arenas 1996; Amado 2001; Lépori 2005).

La dermis está organizada en dos regiones:

a) Región papilar

Esta región se constituye por tejido conectivo laxo, donde se ubican fibras de colágena (colágeno tipo I y III), elásticas, reticulares. En esta capa hay fibroblastos, mastocitos y macrófagos. En la región papilar hay muchas asas capilares que se ubican entre la epidermis y dermis. A este nivel se encuentran los corpúsculos de Meissner, que son terminaciones nerviosas encapsuladas, que se distribuyen en regiones de la piel

sensibles a la estimulación táctil. También se localizan los bulbos terminales de Krause que se cree reaccionan al frío (Arenas 1996; Amado 2001).

b) Región reticular

La región reticular es más gruesa que la capa papilar, está formada por tejido conectivo denso irregular de tal manera que hay fibras colágenas gruesas (Tipo I) densas que se hallan entrelazadas, además hay fibras reticulares y muchas fibras elásticas. Estas últimas son las que proporcionan la elasticidad a la piel. El intersticio entre los haces de fibras está ocupado por una matriz amorfa rica en dermatán-sulfato y otros glucosaminoglucanos. Además de fibroblastos, existen mastocitos, linfocitos, macrófagos y ocasionalmente células adiposas. En esta capa se encuentran glándulas sudoríparas, sebáceas y folículos pilosos; existen los músculos erectores del pelo, que se insertan en los folículos pilosos. A este nivel se encuentran los corpúsculos de Pacini y de Rufini, los primeros reaccionan a la presión y vibraciones y los segundos a las fuerzas tensionales (Figura 3) (Arenas 1996; Amado 2001).

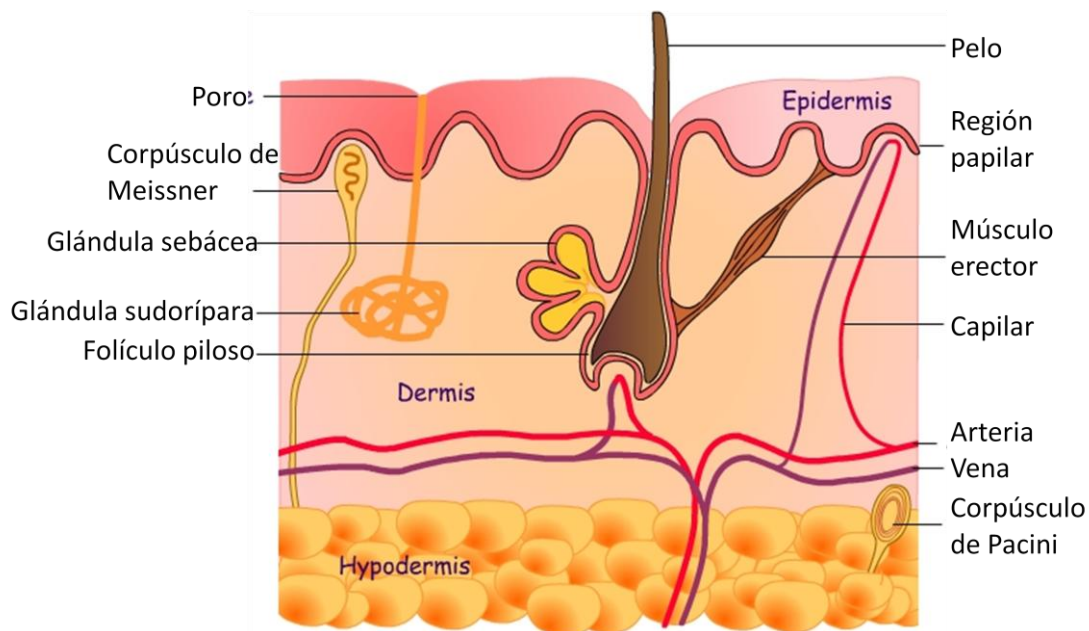


Figura 3. Esquema de piel donde se muestra la epidermis, dermis, hipodermis y sus componentes

Modificado de: http://d1cxesumcyia02.cloudfront.net/media/images/ap_58800-29__4ea744076e418.jpg

3.1.1.3. Hipodermis

Es el tejido subcutáneo que se localiza por debajo de la capa reticular de la dermis. Es un tejido conjuntivo conformado principalmente por células adiposas. La hipodermis permite el aislamiento térmico del cuerpo, donde las células adiposas tienden a acumularse y se forman almohadillas de grasa que se denominan pánículo adiposo (Marks y Samman 1967; Amado 2001).

3.1.2. Funciones de la piel

La piel no es solo una envoltura o un órgano inerte, es responsable de desempeñar diversas funciones indispensables para el organismo que están relacionadas con otros aparatos y sistemas. Cuando alguna de ellas se ve alterada pueden producirse cambios a nivel sistémico que puede conducir a la muerte, debido a que si la piel se daña más allá del 60%, no se puede vivir (Amado 2001; Arenas 1996).

Entre las funciones que posee la piel se encuentran (Arenas 1996; Amado 2001; Cabrera-Morales y López-Nevot 2006):

- a) Representa una barrera protectora contra la invasión de microorganismos y contra la acción de agentes mecánicos, químicos, térmicos y osmóticos.
- b) Regula la temperatura corporal y mantiene el equilibrio hídrico.
- c) Posee un pigmento, la melanina, encargado de conferirle color a la epidermis y por tanto proteger de la radiación ultravioleta, a los tejidos subyacentes.
- d) Reconocimiento de sensaciones como el tacto, calor, frío, presión, dolor, permitiéndole, así, interactuar con el medio ambiente y relacionarlo con el sistema nervioso central, debido a la inervación profusa de la dermis.
- e) Permite la absorción de algunas sustancias como los medicamentos tópicos, gracias a los vasos linfáticos y sanguíneos.
- f) Ciertas células integrantes de la epidermis (de Langerhans) y linfocitos que arriban a ella, tienen la capacidad de captar antígenos y transferirlos a células efectoras de la respuesta inmunológica, por lo tanto la piel es considerada como un órgano integrante del sistema inmunológico.

3.1.3. Protección contra la RUV

Todas las funciones de la piel son de gran importancia para el cuerpo, sin embargo la principal es la de protegernos contra todos los factores ambientales que pueden ser potencialmente dañinos, de estos factores al que nos exponemos con mayor frecuencia es la radiación ultravioleta (RUV). La piel posee dos barreras primarias contra la RUV, la queratina presente en el estrato córneo que refleja la luz y la melanina que absorbe la RUV (Marks y Samman 1979; Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998; Cabrera-Morales y López-Novot 2006; Kochevar *et al* 2009).

3.2. Radiación solar y Espectro electromagnético

El Sol es la estrella más cercana a la Tierra, nos provee de toda la luz y calor que llega a la superficie terrestre. Este astro emite constantemente radiación, que es generada por la reacción principal que se lleva a cabo en su interior: la fusión nuclear. Esta radiación se expande en todas direcciones y tan solo una pequeña parte llega a la Tierra (Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998; Maverakis *et al* 2010).

La luz y radiación que provienen del Sol, forman parte del Espectro Electromagnético. Este se divide en diferentes regiones según su frecuencia y longitud de onda. De acuerdo a la anterior se divide en: ondas de radio, ondas infrarrojas, luz visible, radiación ultravioleta (RUV), rayos X y rayos gama (Figura 4) (Requena-Rodríguez y Zúñiga-Román 2004; Fontal 2005; Fernández-Niello 2006).

Gran parte de estas radiaciones son desviadas por el magnetismo terrestre, ya sea reflejadas al espacio o absorbidas por los gases presentes en la atmosfera. Por lo que, de todo el espectro, solo la luz visible, los infrarrojos, ondas de radio y una parte de la RUV llegan a la corteza terrestre. Las proporciones de energía son diferentes en cada longitud de onda y pueden variar por otros factores como: hora del día (máxima intensidad entre las 10 y las 14 h.), estación del año (por la posición del eje de la tierra respecto a su inclinación), altitud, latitud, humedad y presencia de partículas en la atmosfera (Requena-Rodríguez y Zúñiga-Román 2004).

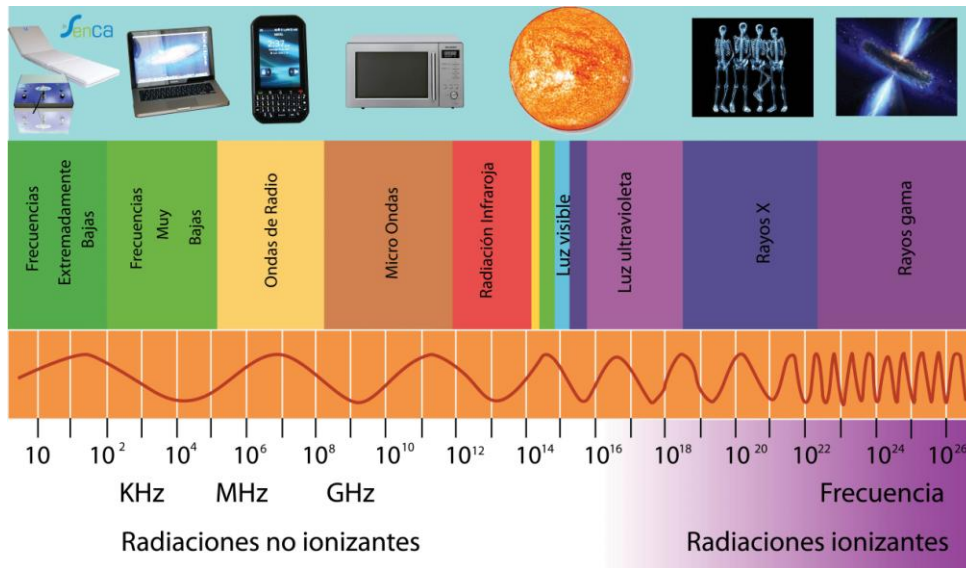


Figura 4. Espectro electromagnético y sus usos

Tomado de: <http://www.mimagnetoterapia.com/Espectro%20Tabloid.jpg>

3.2.1. Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (RUV), pertenece a la franja del espectro electromagnético con longitudes de onda entre 400 y 100 nm aproximadamente. Se extiende desde la parte violeta del espectro visible hasta la zona de rayos X. La principal característica de RUV es la posibilidad de producir excitaciones en los átomos, que provocan reacciones químicas. La RUV se divide en tres rangos de longitudes de onda UVA, UVB, UVC (Fontal 2005; Fernández-Niello 2006; Cabrera-Morales y López-Nevot 2006).

La UVC también llamada radiación germicida o de onda corta, se extiende en las longitudes menores a 280 nm; es la porción más energética del espectro, de forma que posee una importante acción bactericida. Sufre una fuerte dispersión al atravesar la atmósfera, por lo que no está presente a nivel del mar por lo que prácticamente no interacciona con la piel. Es empleada para la esterilización, el tratamiento de las micosis fúngicas y las úlceras de decúbito (Fontal 2005; Kochevar *et al* 2009).

La UVB o radiación ultravioleta media, se extiende entre los 280 a 315 nm; es más energética que UVA por lo que es responsable de quemaduras solares así como de reacciones irritantes que conducen a la formación de melanina y al desarrollo del bronceado, compone el 5 % de la RUV que llega a la corteza terrestre. Puede penetrar el

estrato córneo hasta la epidermis. Además, pueden causar daño directo al ADN, por lo que es el principal agente causal del cáncer de piel. La mayoría de las pantallas solares reflejan o absorben de modo eficiente esta longitud de onda, y la investigación del factor de protección solar (FPS) se basa en esta banda de frecuencia (Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998; Kochevar *et al* 2009).

La UVA abarca longitudes de onda entre 315 y 400 nm, también llamada RUV de onda larga, es la parte menos energética de las tres y compone el 95% de la RUV que llega a la superficie terrestre. La radiación UVA tiene importancia por su capacidad de penetrar hasta la dermis y causar reacciones de fotosensibilización, por lo que puede producir bronceado con un mínimo eritema cutáneo. Se emplea comercialmente para el bronceado de la piel. Sin embargo debido a la capacidad de la UVA de penetrar la epidermis hasta llegar a la dermis pueden dañar células provocando un envejecimiento acelerado. La UVA está principalmente asociada con daño a la piel a largo plazo, como arrugas, aunque también se cree que desempeñan un papel en ciertos cánceres de piel (Carrillo-Hernández 1998; Fontal 2005; Fernández-Niello 2006; Kochevar *et al* 2009).

3.3. Efectos de la radiación ultravioleta

Los rayos UVA y UVB son los principales causantes de daño solar en la piel. Debido a la capacidad que tiene la RUV de excitar a los átomos provocando reacciones químicas o de romper enlaces atómicos, de biomoléculas como lípidos proteínas o el ADN de las células. El grado de exposición a la RUV que una persona recibe depende de la intensidad de los rayos, del tiempo que se ha estado expuesto y de si se está protegido. La RUV tiene diversos efectos sobre la piel tanto benéficos como nocivos (Gutiérrez-Vidrio 2003; Cabrera-Morales y López-Nevot 2006; Pérez-Sánchez *et al* 2014).

3.3.1. Efectos benéficos de la RUV

La exposición moderada a la RUV, produce bienestar mental y general. Además de estar relacionada a ciertos efectos sobre la salud general humana como: la estimulación del flujo sanguíneo, formación de hemoglobina y la reducción de la presión sanguínea. Desempeña un papel vital en la síntesis de la vitamina D a través de la activación de del 7-hidrocolesterol, provitamina D presente en la epidermis. La vitamina D es esencial en la absorción del Ca en el intestino. La RUV ha demostrado ser muy útil al ser usada como tratamiento para diferentes tipos de enfermedades cutáneas como la psoriasis. La

exposición a la RUV de manera controlada puede ayudarnos en la producción de melanina y a originar un engrosamiento de la piel (Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998; Kochevar *et al* 2009; Maverakis *et al* 2010).

3.3.2. Efectos adversos de la RUV

La RUV tiene la energía suficiente para causar cambios químicos sobre las moléculas en la que incide, aquellas moléculas que son afectadas por RUV tienen en su estructura un enlace π , en forma de doble enlace conjugado que puedan presentar solapamiento de orbitales o dislocación electrónica. La RUV puede darle la energía necesaria para que un electrón pase a un orbital de mayor energía provocando que la molécula se mantenga excitada y reaccione fácilmente con otras, provocando la modificación de las biomoléculas (Maverakis *et al* 2010).

Cuando la RUV modifica, o excita las biomoléculas de la célula, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que provoca de forma indirecta estrés oxidativo. Por otro lado la incidencia de RUV en algunas ERO puede provocar la formación de especies más reactivas, un ejemplo es el H_2O_2 , quien al ser expuesta a RUV puede formar el radical hidroxilo. La respuesta celular normal ante el estrés oxidante son las enzimas antioxidantes, sin embargo algunas enzimas al ser expuestas por la RUV son fotooxidadas, lo cual reduce su capacidad catalítica (Katiyar 2008; González-Púmariega *et al* 2009; Cano-Gómez *et al* 2010; Pérez-Sánchez *et al* 2014).

Cuando la RUV llega al núcleo y daña el DNA, induce la formación de dos fotoproductos relevantes: los dímeros de pirimidina tipo cilobutano (CPDs), y 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PPs). Ambas lesiones forman deleciones o translocaciones de nucleótidos, constituyendo los “hot spots” o puntos de alta incidencia de mutaciones inducidas por la RUV. La respuesta celular normal a este daño es la reparación del DNA por la activación de algunos factores de transcripción como p53 o NF-kB que iniciarán los mecanismo de reparación o bien llevar a la célula a apoptosis si la lesión es irreparable. Sin embargo cuando el daño es demasiado puede provocar mutaciones en estos factores de transcripción y dar inicio al proceso de carcinogénesis (Kranen *et al* 2005; Cabrera-Morales y López-Nevot 2006; Xin Tong *et al* 2007; González-Púmariega *et al* 2009; Cano-Gómez *et al* 2010; Perde-Schrepler *et al* 2013).

3.3.3. Daños crónicos de la RUV sobre la piel

La RUV constituye una amenaza ambiental importante que puede ocasionar diversos daños en la piel los cuales pueden ser divididos en términos prácticos como agudos y crónicos. En los agudos se pueden ver reflejado a nivel tisular con la quemadura solar o eritema. Cuando la exposición es crónica se tienen graves efectos sobre la estructura y función de la piel, causando daños repetidos en las células epidérmicas, lo que eventualmente puede dar lugar al fotoenvejecimiento o a la fotocarcinogénesis (Cabrera-Morales y López-Nevot 2006; Xin Tong *et al* 2007; Cano-Gómez *et al* 2010).

El envejecimiento intrínseco es un proceso fisiológico en el que se produce un decaimiento del máximo funcionamiento y de la capacidad de reserva en todos los órganos, incluida la piel. En el fotoenvejecimiento se superponen los daños provocados por la exposición crónica a la RUV y el envejecimiento intrínseco, acelerando la mayoría de cambios cutáneos asociados con el tiempo (Cano-Gómez *et al* 2010; Pérez-Sánchez *et al* 2014).

La exposición solar crónica es la causa principal del envejecimiento prematuro de la piel o fotoenvejecimiento, que se caracteriza por elastosis, pigmentación irregular, rugosidad, flacidez, atrofia, arrugas finas y profundas, y neoplasias tanto benignas como malignas. Los radicales libres desempeñan un papel central en el curso del envejecimiento tanto intrínseco como extrínseco. Durante el proceso de envejecimiento intrínseco, los radicales libres se forman de manera natural a través del metabolismo humano normal, mientras que en el proceso de envejecimiento extrínseco, son producidos por factores exógenos, como la exposición a la RUV, el tabaquismo o el consumo de alcohol (Figura 5) (Cano-Gómez *et al* 2010; Berengust 2013; Pérez-Sánchez *et al* 2014).

La fotocarcinogénesis es la suma de una serie de eventos bioquímicos simultáneos y secuenciales que tienen como resultado final el desarrollo de neoplasias epidérmicas (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 la longitud de onda a la que se expone un individuo (Cano-Gómez *et al* 2010; Pérez-Sánchez *et al* 2014).



Figura 5. Fotografías de personas con fotoenvejecimiento avanzado (Izq) y moderado (Der)

Tomado de:
https://marinarodriguezdermatologia.files.wordpress.com/2011/06/fountain_of_youth_product_05.jpg

3.4. Neoplasia

La neoplasia; puede ser definida como una masa anormal de tejido cuyo crecimiento es excesivo e incontrolado con respecto al tejido normal; este crecimiento continúa aun después de interrumpir el estímulo que indujo el cambio. Estas células se caracterizan por la pérdida de la capacidad de respuesta a los controles normales del crecimiento y el crecimiento atípico de las mismas; además de competir con células y tejidos normales por espacio y nutrientes (Kumar *et al* 1999; Stevens *et al* 2003).

El proceso neoplásico posee múltiples pasos que comprenden (Figura 6): a) Iniciación, es la etapa donde se producen alteraciones genéticas que modifican el ADN y se fija la mutación; b) Promoción, es un proceso que genera la expansión clonal de las células iniciadas dando lugar a lesiones premalignas y malignas; y c) Progresión, es la etapa implica la conversión de lesiones a un tumor maligno potencialmente invasivo y metastásico. Desde el punto de vista clínico la neoplasia puede ser dividida en dos grupos: neoplasias benignas y neoplasias malignas (Kumar *et al* 1999; Stevens *et al* 2003; Kundoor *et al* 2007; Stricker y Kumar 2010).

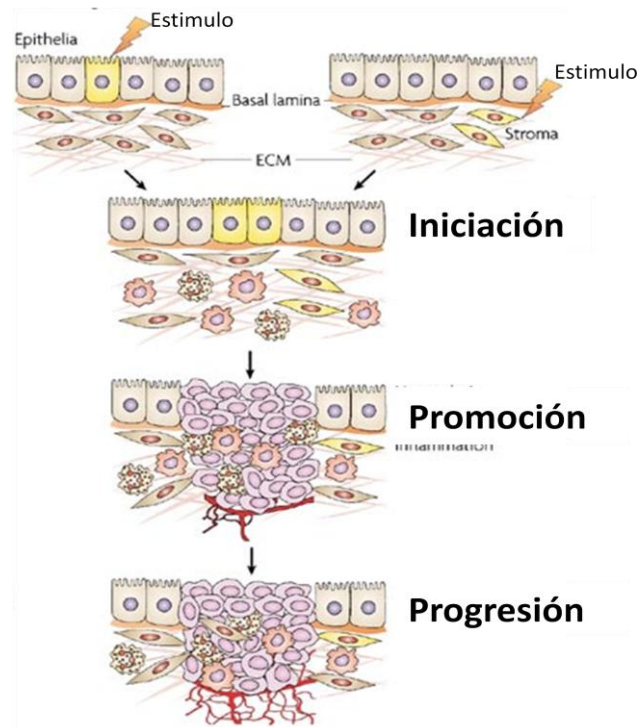


Figura 6. Etapas de la neoplasia

Tomado de: <http://nutritionaloncology.org/images/inflammationCarcinogenesis.jpg>

3.4.1. Neoplasias benignas

Un tumor es benigno cuando sus características microscópicas y macroscópicas pueden considerarse inócuas, lo cual implica que permanece localizado, no se propaga a otros sitios, y por lo tanto puede ser fácilmente extirpado. Estas neoplasias se caracterizan por crecer con lentitud, permanecen en su lugar de origen, y los márgenes del tumor están bien delimitados. Sin embargo pueden producir más de una sola masa localizada y ocasionar enfermedades (Cuadro 1) (Kumar *et al* 1999; Stevens *et al* 2003; Stricker y Kumar 2010).

3.4.2. Neoplasias malignas

El nombre genérico de los tumores malignos es cáncer; se caracterizan por dividirse, crecer con rapidez, y extenderse ampliamente, además pueden invadir y destruir células y tejidos adyacentes o propagarse a tejidos más lejanos (metástasis) y ocasionar la muerte. Sin embargo algunos tipos de cancer pueden ser diagnosticados de manera temprana y tratarse con éxito (Cuadro 1) (Kumar *et al* 1999; Stevens *et al* 2003; Stricker y Kumar 2010).

Cuadro 1. Comparación de tumores Benignos y Malignos

Fuente: Kumar *et al* 1999

Características	Benigno	Maligno
Diferenciación/anaplasia	Bien diferenciado; la estructura puede ser típica del tejido original	Cierta indiferenciación con anaplasia; la estructura con frecuencia es atípica
Tasa de crecimiento	En general progresiva y lenta; puede permanecer estacionario y regresar; las figuras mitóticas son raras y normales	Errática y puede ser lenta o rápida; la figuras mitóticas pueden ser abundante y anormales
Invasión local	En general con masas bien definidas y no infiltran tejidos vecinos	Invasión localmente, infiltra los tejidos normales vecinos
Metástasis	Ausente	Con frecuencia presentes; cuando mayor y menos diferenciado sea el tumor primario, son más probables las metástasis

3.5. Cáncer de piel

El cuerpo está compuesto por billones de células vivas, las cuales normalmente crecen, se dividen y mueren de manera ordenada, en una persona adulta, la mayoría sólo se dividen para remplazar aquellas desgastadas, las que están muriendo y las que han sido dañadas. El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada, existen muchos tipos de cáncer, y la mayoría se originan de células normales que están en constante división y expuestas a diferentes factores potencialmente dañinos. De entre los muchos canceres que existen el de piel es de los más frecuentes en el ser humano (Gutiérrez-Vidrio 2003; Lazar y Murphy 2010).

Los factores etiológicos implicados en el desarrollo del cáncer de piel son muchos y están relacionados entre sí. Participan factores endógenos como el tipo de piel, la genética y las lesiones preexistentes, y los factores exógenos donde destacan la latitud, la disminución de la capa de ozono y la exposición a la RUV; de los factores exógenos la exposición a la RUV es considerada la causa principal de la fotocarcinogénesis. La interacción de los factores endógenos y exógenos es compleja y por lo general actúa de manera conjunta, efectuando el sistema inmune, la actividad enzimática y el funcionamiento celular (Scheinfeld y De Leo 2006; Cano-Gómez *et al* 2010).

El cáncer de piel se le ha dividido en dos grandes grupos para su estudio: cáncer de piel tipo melanoma y no melanoma. El melanoma es una neoplasia relativamente frecuente que continúa siendo mortal si no se detecta en sus fases más precoces, se origina de los melanocitos y es el cáncer de piel más agresivo. El segundo grupo se califica en carcinoma basocelular o de células basales y al carcinoma epidermoide o de células escamosas. Existen otros tumores malignos en la piel como pueden ser carcinomas de glándulas sebáceas, sudoríparas, sarcomas o manifestaciones en piel de neoplasias internas pero son poco frecuentes (Gutiérrez-Vidrio 2003; Lazar y Murphy 2010; Lobos y Lobos 2011).

3.5.1. Carcinoma Basocelular (CBC)

El carcinoma basocelular (CBC) es el cáncer de piel más común de todos. Sus células muestran una morfología similar a las del estrato basal de la epidermis, de ahí su nombre. En términos generales se caracteriza por ser localmente invasivo, de crecimiento lento y escaso riesgo de metástasis. Sin embargo si no son tratados oportunamente o en forma adecuada la primera vez son capaces de provocar gran destrucción local. La mayoría de los CBC se localizan en zonas expuestas del cuerpo, principalmente en la cara y en el tronco, en menor medida en cuello, extremidades y genitales, no afecta palmas de pies y manos (Gutiérrez-Vidrio 2003; Lang y Maize 2006; Cabrera-Morales y López-Nevot 2006; Lazar y Murphy 2010; Lobos y Lobos 2011).



Figura 7. Fotografía de CBC (A) y su corte histológico (B)

Tomado de: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/patologia/fotos143-152/149.jpg>.

3.5.2. Carcinoma espinocelular (CEC)

También llamado epitelioma, espinocelular o carcinoma de células espinosas. Se trata de una neoplasia maligna derivada del estrato espinoso en la epidermis o sus anexos, con capacidad de producir metástasis a ganglios regionales u otros órganos. Tiene un crecimiento rápido y aparece con mucha frecuencia sobre lesiones precancerosas como las queratosis actínicas, úlceras crónicas, después de tratamientos con radiación ultravioleta). A diferencia del basocelular se puede presentar en genitales, mucosas, palmas y plantas. Esta variedad es el segundo más frecuentes en el cáncer de la piel. Predomina en personas de piel blanca que se exponen en forma importante a las radiaciones solares (Gutiérrez-Vidrio 2003; Nguyen y Yoon 2006; Cabrera-Morales y López-Nevot 2006; Lazar y Murphy 2010; Lobos y Lobos 2011).



Figura 8. Fotografía de un CEC (A) y su corte histológico (B).

Tomado de: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/patologia/fotos143-152/147.jpg>

3.5.3. El cáncer de piel en México

En la actualidad México cuenta con un subregistro de casos de cáncer de piel, ya que la mayoría de ellos no causan mortalidad y muchos son tratados sin estudio histopatológico confirmatorio. A pesar de esto, gracias al Registro Nacional de las Neoplasias en México se dio a conocer que el cáncer de piel en 2003 ocupó el primer lugar en hombres y en mujeres el tercer lugar. Desafortunadamente los pacientes con tumores en la piel en nuestro país acuden en etapas muy avanzadas, (sobre todo los melanomas) cuando ya no se puede ofrecer tratamiento, por lo que es importante que los médicos y público en general cuenten con conocimientos para detectar en forma temprana el cáncer de piel, ya que en general los carcinomas cutáneos son sencillos de reconocer y tiene la ventaja de estar a la vista, por lo que en un examen de rutina para cualquier enfermedad se pueden detectar. El médico debe revisar cuidadosamente el sistema cardiovascular, palpar el abdomen, y además debe examinar la piel. Debido a la

alta frecuencia que tiene el cáncer de piel tanto en México como en el mundo, los médicos recomiendan el uso de fotoprotectores (Gutiérrez-Vidrio 2003).

3.6. Fotoprotección

La fotoprotección hace referencia a las estrategias utilizadas para minimizar o evitar los daños provocados por la radiación solar. Existen diferentes agentes que afectan la cantidad de transmisión solar, entre los que se encuentran los factores naturales como la capa de ozono, nubes, niebla, además de los compuestos asociados a las actividades humanas como las partículas y contaminantes; factores naturales biológicos, como la epidermis, cromóforos y metabolitos secundarios; los agentes físicos, entre los que destacan la ropa, sombreros, gafas oscuras entre otros; por último podemos encontrar a los agentes químicos, que pueden tener un origen natural o sintético. Al uso de compuestos químicos de origen natural o sintético capaces de revertir, disminuir o prevenir los daños relacionados con la radiación se le denomina quimioprevención o quimioprotección (Kundoor *et al* 2007)

3.6.1. Filtros solares

Los filtros solares son sustancias químicas que absorben la RUV, se aplican tópicamente y protegen de los efectos adversos del Sol. La finalidad de los filtros solares es prevenir o disminuir los efectos perjudiciales de la radiación solar o colaborar en el bronceamiento de la piel sin ningún efecto doloroso. Según la intención de su aplicación pueden ser clasificados como (Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998):

1. Agentes preventivos de quemadura solar: se definen como filtros solares que absorben el 95% o más de la RUV dentro de los 290-320 nm (UVA y UVB).
2. Agentes bronceadores: son aquellos que absorben al menos el 85% de la RUV, producen un ligero bronceado transitorio, pueden producir eritema pero sin dolor.
3. Agentes bloqueadores opacos: su finalidad es la de proporcionar la máxima protección en forma de barrera física. Los agentes que se usan normalmente para este tipo son dióxido de titanio y óxido de zinc, que son capaces de reflejar toda la radiación visible y ultravioleta, por lo que evita o minimiza tanto la quemadura como el bronceado.

4. Preparados simulados: se usan para aquellos que desean mostrar una piel morena en un tiempo mínimo y con el menor dolor o trastorno posible, este grupo esencialmente broncean o promueven la síntesis de melanina.

El uso excesivo de los filtros solares puede ocasionar alergias o disminuir la producción de vitamina D, por lo que en la actualidad, existe un gran interés en el estudio y uso de sustancias naturales capaces de reflejar o absorber la RUV (Cancino-Rubí y Carrillo-Hernández 1998).

3.7. *Lippia graveolens* Kunth

Lippia graveolens o también conocido como “orégano mexicano” es un arbusto aromático pequeño, que pertenece a la familia de las Verbenaceas. Alcanza entre 1 a 3 m de altura con ramas pequeñas, tiene hojas opuestas con peciolo delgado de 2-20 mm de longitud, de lámina angosta ovada a oblonga o elíptica de 1-6.5 cm de largo y de 0.4-3.5 cm de ancho. Regularmente son dentadas en la base al ápice con dientes estrechamente aserrados, redondeados o subcortados en la base, a veces abruptamente agudos y ligeramente prolongados dentro del peciolo, reticulados rugosos o subulados y resinosos por arriba, con flores de color blanco o amarillento, axilares en espigas cortas, cónicas a cilíndricas de 4-15 mm de largo, por lo general agrupadas en fascículos de 2-4 en las axilas de las hojas, sobre péndulos de 2-15 mm de largo; brácteas comúnmente ordenadas en 4 hileras, persistentes, ovadas a suborbiculares de 2-3 mm de largo y hasta 3 mm de ancho; cáliz comprimido, inconspicuamente dentado, de 1-2 mm de largo, piloso y glandular; frutos en forma de capsulas (Rzedowski y Rzedowski 2002).

La distribución general de esta especie abarca Estados Unidos (sur de Texas), México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica. En México, *L. graveolens* se establece a lo largo del litoral del Golfo, la vertiente del Pacífico, en la península de Yucatán, en las depresiones y valles interiores (Balsas, Tehuacán, depresión de Chiapas, Istmo de Tehuantepec), en las zonas áridas de Tamaulipas e Hidalgo así como en el desierto Chihuahuense (Rzedowski y Rzedowski 2002).

El orégano mexicano es usualmente usado en la cocina como un condimento o hierba aromática, además de ser utilizado como medicina alternativa contra el dolor abdominal. El estudio de *L. graveolens* se ha limitado principalmente en su aceite esencial, por lo que las propiedades del extracto no son bien conocidas, sin embargo se

ha reportado que es una planta con una gran cantidad de fenoles y flavonoides compuestos a los que se les atribuye la capacidad de absorber la radiación UVA y UVB, con una gran capacidad antioxidante y un posible efecto antimutagénico (González-Güereca *et al* 2007; Martínez-Rocha *et al* 2008).

4. Justificación.

Debido al incremento en la incidencia del cáncer de piel a nivel mundial se buscan otras alternativas de protección contra la RUV, que es la principal causante de este padecimiento, se emplean desde medios físicos como la ropa, sombreros, gafas entre otros; hasta el uso de compuestos quimioprotectores capaces de reflejar y/o absorber la RUV. Sin embargo algunos de estos compuestos pueden ocasionar efectos secundarios sobre la piel como irritaciones o reacciones alérgicas, por lo que es necesario continuar la investigación de compuestos naturales con estas propiedades. Un ejemplo es *Lippia graveolens*, que posee fenoles y flavonoides, compuestos antioxidantes capaces de absorber la RUV.

4.1. Pregunta científica

¿*L. graveolens* puede prevenir el daño en la piel de ratones SKH-1 expuestos a la radiación UV de manera crónica?

5. Hipótesis.

Sí *L. graveolens* es una planta con metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides compuestos capaces de absorber la RUV y con propiedades antioxidantes, entonces el extracto metanólico de *L. graveolens* puede disminuir el daño provocado por la exposición crónica a la RUV en piel de ratones SKH-1 y prevenir el cáncer de piel.

6. Objetivos.

6.1. General.

Evaluar el efecto del extracto metanólico de *Lippia graveolens* en el desarrollo de carcinomas cutáneos en ratones SKH-1.

6.1.1. Particulares:

- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *L. graveolens* mediante pruebas colorimétricas.
- Inducir el daño cutáneo producido por el efecto de la exposición crónica a la RUV en ratones SKH-1 con y sin extracto metanólico de *L. graveolens*.
- Determinar la incidencia y multiplicidad de lesiones a nivel macroscópico en piel de ratones SKH-1 expuestos a RUV con y sin extracto de *L. graveolens*.
- Realizar un diagnóstico histológico en piel de ratones SKH-1 expuestos a RUV con y sin extracto de *L. graveolens*.

7. Material y métodos:

7.1. Pruebas cualitativas en el extracto metanólico de *L. graveolens*.

El extracto metanólico de *L. graveolens* fue proporcionado por el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI). Al extracto se le realizaron distintas técnicas cualitativas con el propósito de conocer la presencia de los tipos de metabolitos secundarios que presenta. Éstas fueron:

Alcaloides. Las técnicas para identificación de la presencia de alcaloides se basan en la capacidad de combinarse con yodo y metales pesados como bismuto o mercurio, para formar precipitados. En este trabajo se utilizó la técnica de Dragendorff (mercurio-tetrayoduro de potasio) la cual genera un precipitado naranja y Meyer (tetrayodo-bismuto-potacio) con un precipitado amarillo verdoso o blanco (Domínguez 1988; Arango-Acosta 2002).

Carbohidratos. Para la presencia de carbohidratos se usó la técnica de Molish. La cual se basa en la acción hidrolizante y deshidratante que ejerce el ácido sulfúrico sobre los carbohidratos con α -naftol, generando derivados de color púrpura (Domínguez 1988).

Fenoles. Para la presencia de fenoles se utilizó cloruro férrico. Esta técnica se basa en la quelación del grupo fenol con el cloruro férrico a través de un enlace iónico formado un quelato de color verde (Domínguez 1988; Sandoval 2015)

Saponinas. Para la identificación de saponinas se llevó a cabo la técnica de espuma, que consiste en agitar una solución acuosa de la muestra problema hasta obtener una espuma estable por un periodo superior a 1 min, como la obtenida al agitar una solución acuosa de un jabón (Domínguez 1988; Martínez-Martínez 2001).

7.2. Modelo animal (Ratones SKH-1)

En la mayoría de los estudios relacionados con el cáncer el modelo animal más empleado es el ratón, principalmente por su bajo costo y su tiempo de vida corto; además de ser genéticamente similares a los humanos, por lo que los mecanismos y genes implicados en el desarrollo de neoplasias son parecidos (Benavides *et al* 2009).

En este trabajo se utilizó el ratón de la cepa SKH-1 como modelo animal. Estos ratones tienen la particularidad de perder el pelo alrededor de las dos semanas posteriores de su nacimiento. Esta alopecia es consecuencia de una mutación autosómica recesiva en el alelo *hr*. Además de la ausencia de pelo, estos animales también presentan una piel delgada, falta de pigmentación por la ausencia de la melanina y diversos defectos en el sistema inmune, por lo que son más sensibles y pueden desarrollar lesiones provocadas por la exposición crónica a la RUV muy similares a las de la piel humana y en un tiempo más corto. Debido a estas características, el ratón SKH-1 es ideal como modelo para la evaluación de los efectos crónicos de la RUV y el uso de sustancias tópicas como antioxidante y fotoprotectores (Benavides *et al* 2009).

El experimento se realizó por parte del laboratorio de Fitoquímica ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en el Bioterio de la FES Iztacala en 18 ratones SKH-1 hembras de 6 a 8 semanas de edad. Los cuales después de su llegada fueron aclimatados por un periodo de dos semanas. Los ratones fueron mantenidos en condiciones de Bioterio en la FES Iztacala. El alojamiento fue en cajas de policarbonato de 20 X 30 cm, con un máximo de 5 individuos en cada una; agua y alimento *Har lad libitum* y se mantuvieron en una habitación con condiciones estériles con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a una temperatura de 23 a 25°C y una humedad relativa del 44-55 %.

Después de la aclimatación los animales se dividieron en 3 grupos.

1. Grupo control positivo con 10 ratones a los que se les aplicó el vehículo (etanol al 70%) tópicamente para ser irradiados posteriormente con una lámpara de UVB (60 mJ/cm²) durante 1 min.
2. Grupo control negativo con 3 ratones a los que se les aplicó tópicamente en la zona dorsal el extracto metanólico de *L. graveolens* a una concentración de 2 mg/cm².
3. Grupo experimental con 5 ratones a los que se les aplicó tópicamente en la zona dorsal el extracto metanólico de *L. graveolens* a una concentración de 2 mg/cm² para posteriormente ser irradiados con una lámpara de UVB (60 mJ/cm²) durante 1 min.

7.2. Irradiación

Los grupos control positivo y experimental fueron sometidos a una etapa de iniciación durante 10 días consecutivos de exposición a la RUV, posteriormente cada tercer día por un periodo de 30 semanas simulando el proceso de fotocarcinogénesis. Los animales se pesaron cada 15 días, con el propósito de monitorear cambios relacionados al peso y el experimento. Para la incidencia y multiplicidad de lesiones, se realizó un conteo por semana del número de lesiones, y se registró el diámetro de las lesiones superiores a 2 mm con ayuda de un vernier (Kundoor *et al* 2007).

Durante la etapa experimental los ratones fueron expuestos de manera crónica a una dosis mínima de RUV-B de 60 mJ/cm² que es el equivalente a lo que una persona está expuesta al realizar sus actividades cotidianas, que se estima es de 50-100 mJ/cm². Por lo que la radiación utilizada es la óptima para investigaciones orientadas al estudio de la fotoprotección (Benavides *et al* 2009; Cano-Gómez *et al* 2010).

7.4. Procesamiento y diagnóstico histológico

Terminadas las 30 semanas de irradiación los animales fueron sacrificados (del grupo 1 solo 5 individuos fueron sacrificados) mediante asfixia en una cámara de CO₂, y se tomaron muestras de piel de la zona dorsal de 1 cm² aproximadamente las cuales se calsificaron en: área con lesión aparente y área sin lesión aparente; así se obtuvieron un total de 30 muestras. Estas fueron fijadas durante 24 hrs en paraformaldehído al 2 % disuelto en PBS 0.1M a un pH de 7 y deshidratadas con etanol de grado creciente, aclaradas con xilol e incluidas en parafina, de acuerdo a la técnica histológica de rutina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 µm con ayuda de un micrótomo de rotación en el laboratorio 1 de Histología en el edificio de Morfofisiología en la FES Iztacala. Los cortes histológicos obtenidos se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina, y tricrómica de Masson. Se obtuvieron un total de 60 laminillas.

La tinción de hematoxilina-eosina es considerada general y de rutina para la descripción básica de los tejidos y el diagnóstico patológico. La hematoxilina tiñe de azul a morado los ácidos nucleicos, por otro lado la eosina tiñe las proteínas de color rosa, por lo que en un corte los núcleos se tiñeran de azul, la fibras musculares de rosa intenso, y el

citoplasma junto con los eritrocitos de rosa claro (Altamirano-Quintero *et al* 2005; Montalvo-Arenas 2010).

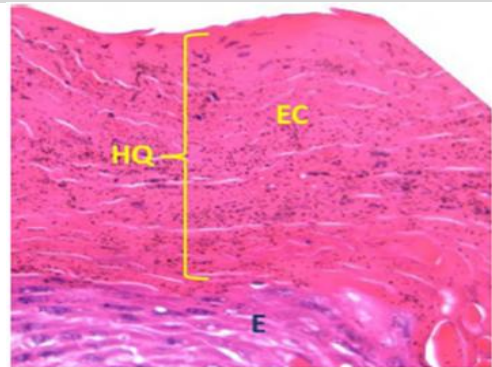
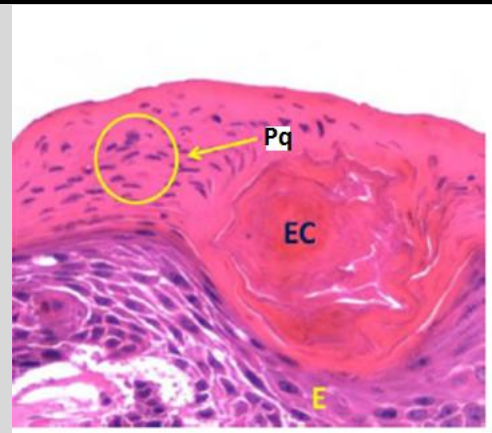
La tinción tricrómica resalta las fibras colágeno del tejido conjuntivo, contienen un colorante nuclear, un colorante para fibras y otro que tiñe citoplasma. En un corte histológico se ven los núcleos negros, las fibras musculares rojo y el colágeno azul (Montalvo-Arenas 2010).

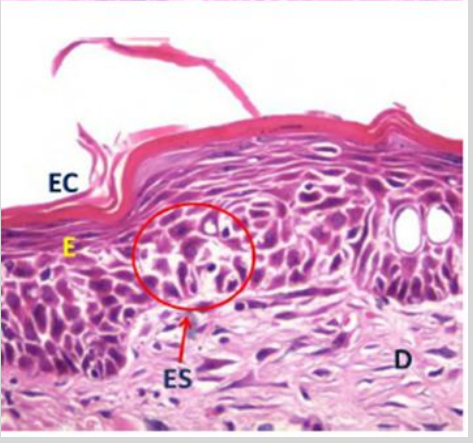
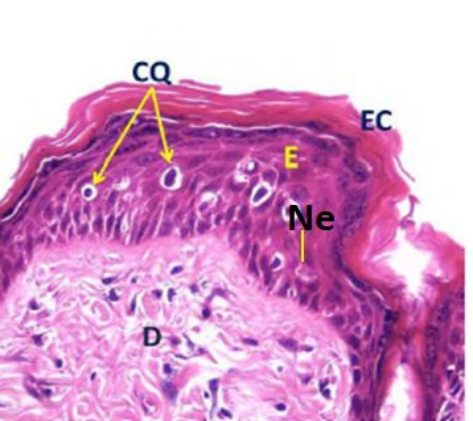
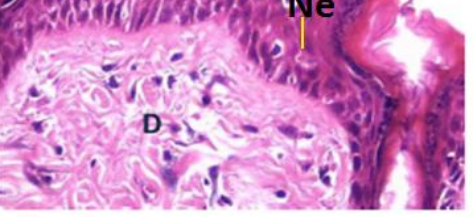

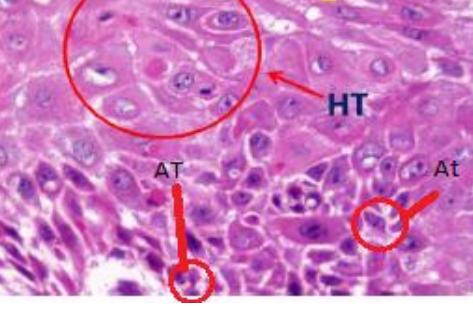
Las laminillas obtenidas fueron observadas en microscopio óptico Leica®DM500 para el diagnóstico histológico, se determinaron los cambios presentes a nivel de epidermis y dermis. Se describieron las características de cada grupo, identificando la presencia o ausencia de los daños crónicos relacionados a la exposición de la RUV, determinando el grado (leve, moderado o severo), la extensión (focal, multifocal o difusa) y progresión (agudo o crónico) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Daños histológicos evaluados en la piel de los ratones SKH-1, ocasionados por exposición crónica de la RUV. EC-estrato córneo, E-epidermis, D-dermis, H-hipodermis, PQ-perla de queratina, VS-vaso sanguíneo, Hq-hiperqueratosis, Es-espongiosis, CQ-células de quemadura, Ne-necrosis, HT-hipertrofia, At-atrofia, Hp-hiperplasia, Pl-pleomorfismo, Ds-displasia, Ed-edema, IF-infiltrado inflamatorio, HM-hemorragia, Cg-congestión (Kumar *et al* 1999; Stevens *et al* 2003).

Imágenes tomadas de: Martínez-Bailón 2012

Tejido	Daño	Identificación
Epidermis	Paraqueratosis (Pq)	Presencia de núcleos en el estrato córneo
	Hiperqueratosis (Hq)	Aumento en el estrato córneo



<p>Espangiosis (Es)</p>	<p>Edema intra epidérmico. Se observa la separación de células.</p>	
<p>Apoptosis (células de quemadura) (CQ)</p>	<p>Células redondas con núcleos picnóticos, contraídos y citoplasma eosinófilo</p>	
<p>Necrosis (Ne)</p>	<p>Muerte celular con pérdida de la integridad de la membrana</p>	
<p>Hipertrofia (Ht)</p>	<p>Aumento del tamaño de las células y del tejido</p>	
<p>Atrofia (At)</p>	<p>Adelgazamiento por disminución del tamaño o número celular con pérdida de sustancia celular</p>	

Hiperplasia (Hp)

Aumento del número de capas en la epidermis por proliferación celular

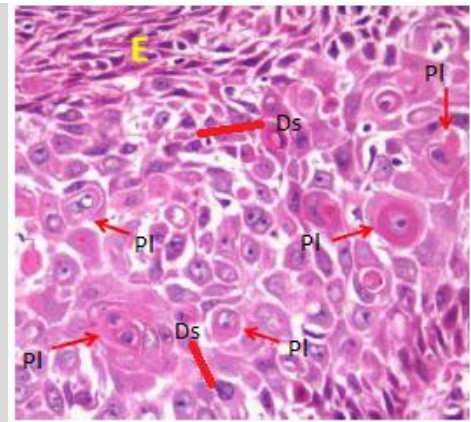


Pleomorfismo (Pl)

Células y/o núcleos que presentan una variedad en su forma o tamaño

Displasia (Ds)

Anormalidad en el aspecto de las células debido a alteraciones en el proceso de maduración de las mismas.



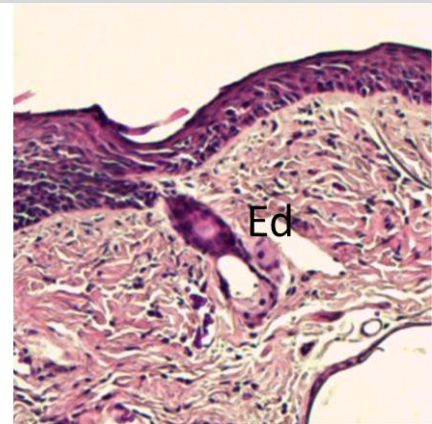
Neoplasia (Neo)

Aumento de células anormales consecuencia del proceso de la carcinogénesis

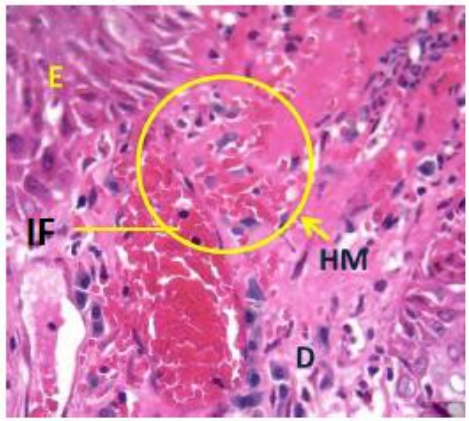
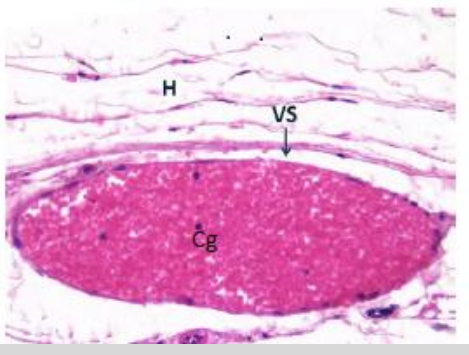


Edema (Ed)

Acumulación de líquido en el intersticio



Extravasación de

Hemorragia (HM)	eritrocitos a la dermis	
Infiltrados inflamatorios (IF)	Presencia de neutrófilos y macrófagos	
Congestión de vasos sanguíneos (Cg)	Acumulación de eritrocitos en vasos sanguíneos	

7.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la medición del peso corporal quincenal de los ratones, el número de lesiones presentes y el área de lesión, fueron procesados mediante el análisis de varianza de dos factores (ANOVA de dos factores), y comparación de medias de Tukey con la ayuda del paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 21, utilizando una $p \leq 0.05$. La incidencia y multiplicidad de lesiones y daños histológicos se expresa en términos de frecuencia.

8. Resultados y discusión.

8.1. Pruebas cualitativas para la detección de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *L. graveolens*.

Todas las pruebas cualitativas realizadas en el extracto metanólico de *L. graveolens* fueron positivas (Cuadro 3), por lo que se puede decir que el extracto posee alcaloides, fenoles, carbohidratos y saponinas. Stashenko y colaboradores en el 2013 realizaron un análisis fitoquímico del extracto de distintas especies del género *Lippia sp.* Describieron 11 flavonoides como antioxidantes de importancia resaltando para *L. graveolens* la presencia de quercetina, naringenina, luteolina y pinocembrina. Estos compuestos son altamente antioxidantes y capaces de absorber la RUV.

Por otro lado, Gonzalez Güereca y colaboradores en el 2007 reportaron que el orégano mexicano es rico en flavonas, favonoles y flavonoides resaltando el flavonol kaempferol y las flavonas isokaempferido y pilosina. Estos compuestos no habían sido reportados anteriormente para el extracto de esta planta. En el mismo año Ling-Ze y colaboradores encontraron 20 flavonoides individuales en el extracto de *L. graveolens*. Además de catalogar la planta como saludable recomendando su ingesta de manera regular. Sin embargo, no solo flavonoides y fenoles se han reportado para el orégano de monte, en 1998 Rastrelli *et al* reportaron 10 tipos de glucósidos irinoides. En el 2010 Maldonado y colaboradores encontraron 3 nuevos triterpenos y catalogaron la planta como posible antiinflamatorio.

La mayoría de los trabajos relacionados con *L. graveolens* se centran principalmente en el aceite esencial por su capacidad antioxidante sin embargo Martínez Rocha y colaboradores en 2008 reportaron que el carvacrol, el timol y el cimeno compuestos principales en el aceite esencial no se encuentran en el extracto metanólico del orégano mexicano y que la composición principal del extracto es de fenoles y flavonoides; sin embargo aún así mostro una alta capacidad antioxidante. También realizaron pruebas de toxicidad y como antimutagénico, en donde *L. graveolens* no mostro ser tóxica y obtuvo una eficiencia del 39% como antimutagénico por lo que se recomendó su posible uso como tal.

Cuadro 3. Resultados de las pruebas cualitativas realizadas en el extracto metanólico de *L. graveolens*.

Metabolito	Técnica	Resultado
Alcaloides	Dragendorf	Positivo
	Meyer	Positivo
Carbohidratos	Molish	Positivo
Fenoles	Cloruro férrico	Positivo
Saponinas	Espuma	Positivo

8.2. Experimento crónico en ratones SKH-1 para el desarrollo de carcinomas cutáneos inducidos por RUV

8.2.1. Monitoreo del peso corporal

El estado del peso corporal fue monitoreado de manera regular a lo largo del experimento, donde se observó un aumento continuó en el peso durante las 30 semanas. Con un peso inicial promedio de 21.66 g para el grupo control positivo, 19.37 g para el grupo control negativo y 21.4 g para el grupo experimental. Al final del experimento los pesos alcanzaron 27.47 g, 28.5 g y 29.16 g respectivamente (Figura 9).

El análisis de varianza no presentó diferencias significativas entre los grupos. Kundoor y colaboradores en el 2007 reportaron que la exposición a la RUV no afecta el desarrollo de los ratones por lo que el aumento de peso es gradual y sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales y controles.

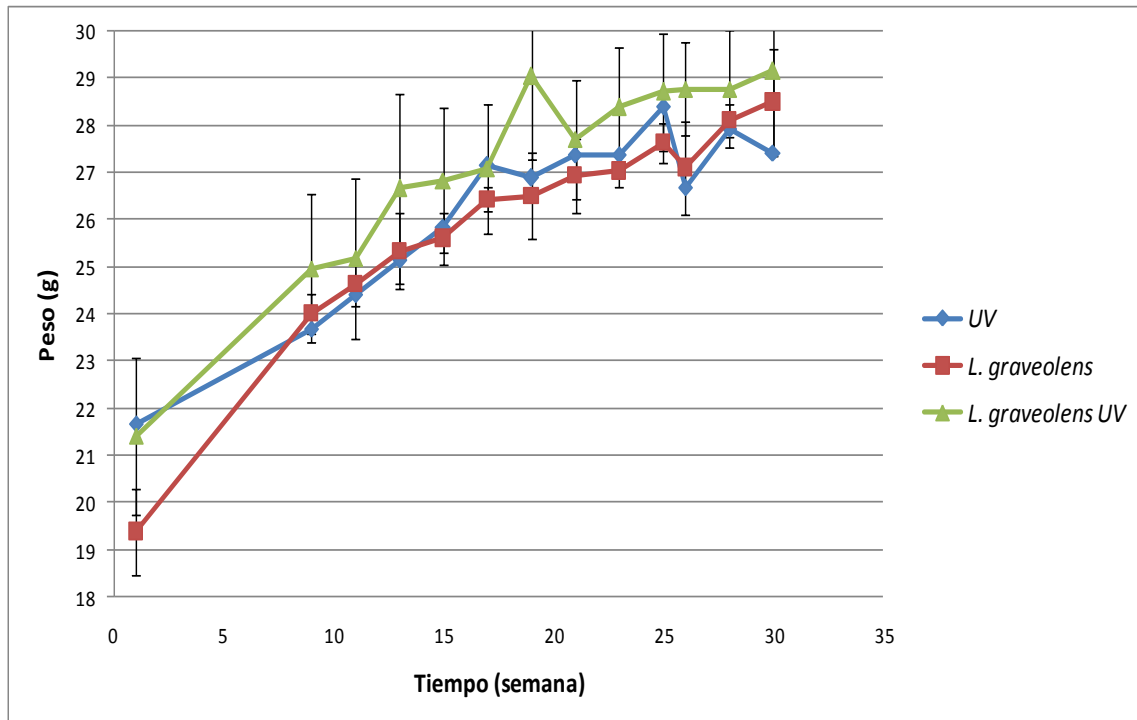


Figura 9. Promedio del peso corporal por grupo tomado cada 15 días durante 30 semanas.

8.2.2. Monitoreo de lesiones macroscópicas

Las lesiones cutáneas comenzaron a ser visibles en el grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV a partir de la semana 16, sin embargo se comenzó la cuantificación de lesiones hasta la semana 18, debido a que en este periodo eran más evidentes. En cuanto a las lesiones en el grupo experimental tratado con el extracto metanólico de *L. graveolens* y expuesto a RUV fueron observadas y registradas en la semana 19.

La incidencia es el número de individuos que presentaron lesiones a lo largo del experimento, desde el registro y hasta el término de la semana 30 fue del 100% en el grupo control positivo, y en el grupo experimental comenzó con 40% y alcanzó el 80% al final del experimento (Cuadro 4 y Figura 10).

La incidencia y aparición de lesiones ya se ha reportado para estos animales anteriormente, Kundoor *et al* en el 2007, quienes registraron que la aparición de lesiones se presentó en la semana 14 y 15, con incidencia al principio de 80% y

alcanzando el 100% para la semana 17, además reportaron para el término del experimento entre 18 y 20 tumores en promedio por ratón.

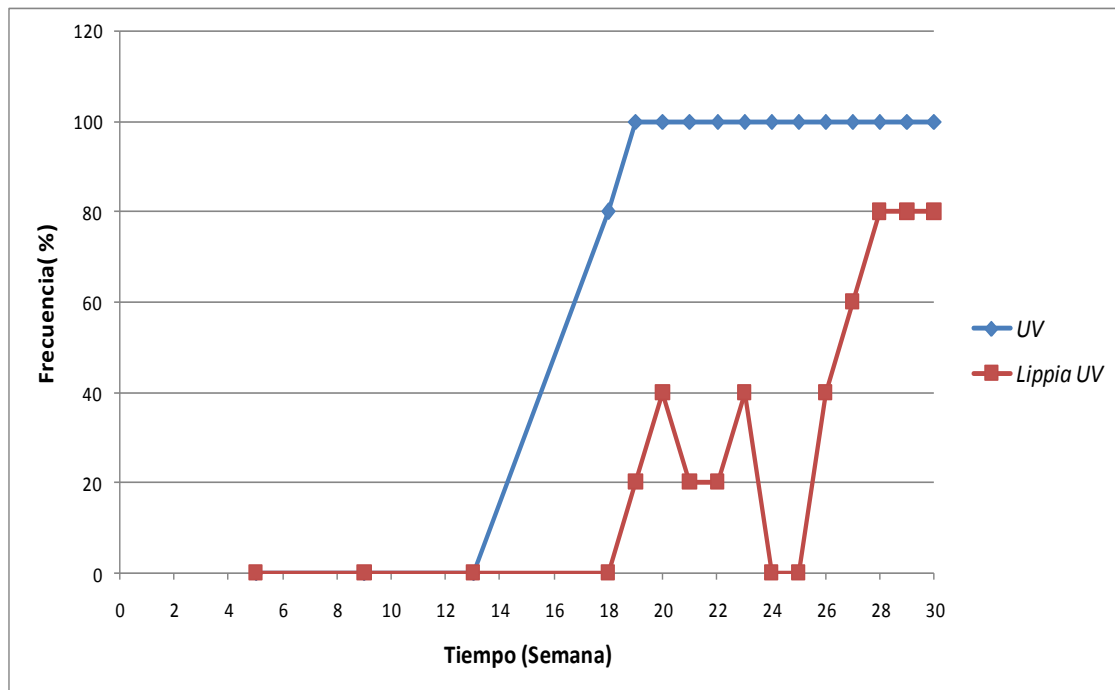


Figura 10. Incidencia de lesiones durante el experimento.

La multiplicidad que es el número de lesiones por individuo, el promedio al inicio del registro fue de 2.4 por ratón en el grupo control positivo y para el grupo experimental de 0, y al término del experimento alcanzaron 28.1 y 1.2 respectivamente (Cuadro 4 y Figura 11). El análisis de varianza de dos factores para la multiplicidad mostró diferencias significativas entre ambos grupos. De acuerdo a estos resultados el extracto de *L. graveolens*, puede ayudar a retrasar la aparición de lesiones y disminuir significativamente el número de ellas, provocadas por la exposición crónica a RUV.

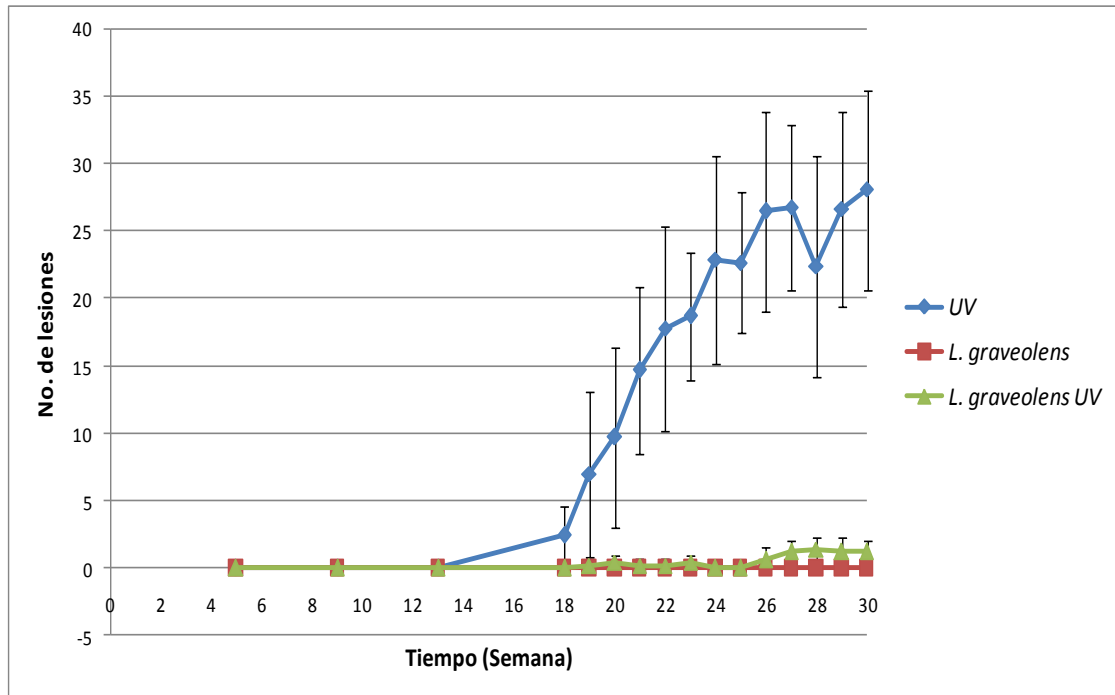


Figura 11. Promedio por semana del número de lesiones por ratón durante el desarrollo del experimento.

Cuadro 4. Incidencia (I) y multiplicidad (M) de lesiones en ratones SKH-1.

Tiempo (Semanas)	<i>L. graveolens</i>		Etanol/UV		<i>L. graveolens</i> /UV	
	I	M	I	M	I	M
18	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	2.4	0/5 (0%)	0
19	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	7	1/5 (20%)	0.2
20	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	9.7	2/5 (40%)	0.4
21	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	14.7	1/5 (20%)	0.2
22	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	17.8	1/5 (20%)	0.2
23	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	18.7	2/5 (40%)	0.4
24	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	22.9	0/5 (0%)	0
25	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	22.7	0/5 (0%)	0
26	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	26.5	2/5 (40%)	0.6
27	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	26.8	3/5 (60%)	1.2
28	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	22.4	4/5 (80%)	1.4
29	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	26.7	4/5 (80%)	1.2
30	0/3 (0)	0	10/10 (100%)	28.1	4/5 (80%)	1.2

Macroscópicamente la mayoría de las lesiones inducidas por la exposición crónica a la RUV en el grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV, presentaron dos formas principales: la primera es una elevación de la piel de color rojo y en las lesiones de gran tamaño se observó hiperqueratosis que forman un hundimiento en su centro, la segunda se presenta como una depresión de color rojo similar a una “costra” (Figura 12). Las lesiones fueron divididas en dos tipos: lesiones menores y mayores a 2 mm. De aquellas superiores a 2 mm se tomó el diámetro y el área de cada una y se sumó para obtener el área total afectada. En promedio por ratón el área alcanzo 91.96 mm² al final del experimento (Figura 13). Por otro lado todas las lesiones observadas en el grupo experimental, presentaron una forma similar: una elevación de color rojo tenue (Figura 14). Todas las lesiones fueron menores a 2 mm por lo que no se cuantificó el área total afectada para este grupo. En cuanto al grupo control negativo que solo fue tratado con *L. graveolens* no presentó ninguna lesión (Figura 15).

La mayoría de las lesiones en los dos grupos se encontraron principalmente en la parte dorsal, sin embargo algunas se presentaron en la cabeza. Durante el experimento el número y diámetro de lesiones no fue constante, algunas desaparecieron o disminuyeron su tamaño. Se ha reportado que las lesiones pueden remitir en etapas tempranas, lo que puede deberse a un aumentó en la reaparición de los daños al ADN (Gallagher *et al* 1984).

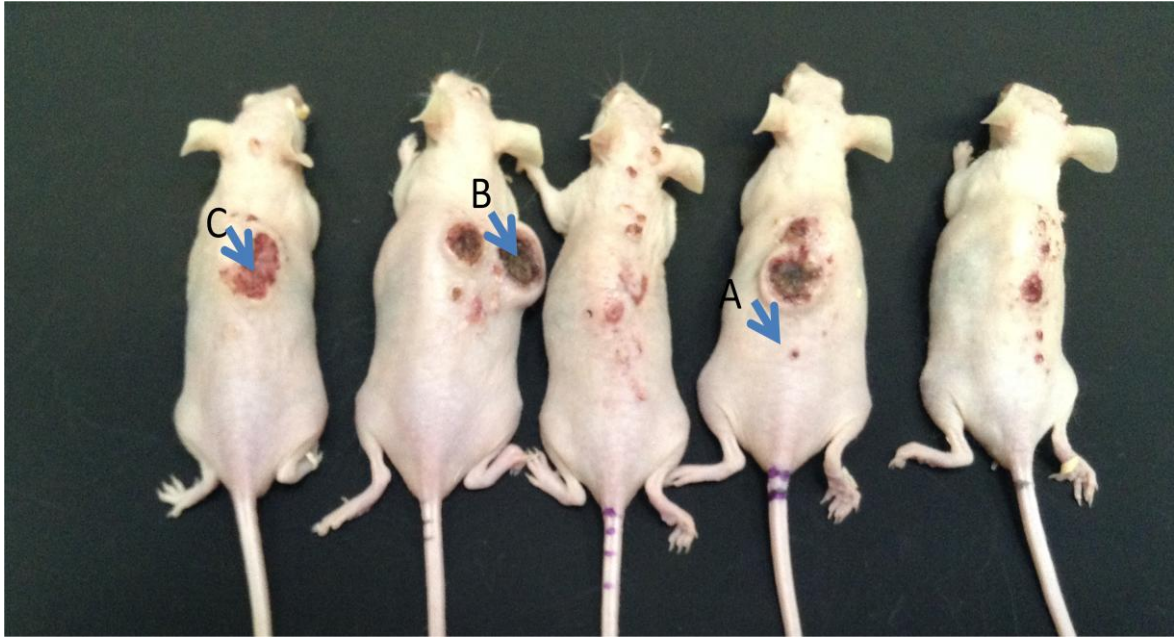


Figura 12. Grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV. Se observan los tipos de lesiones. A. elevación de la piel B. elevación de la piel con hiperqueratosis C. lesión con forma de “Costra”.

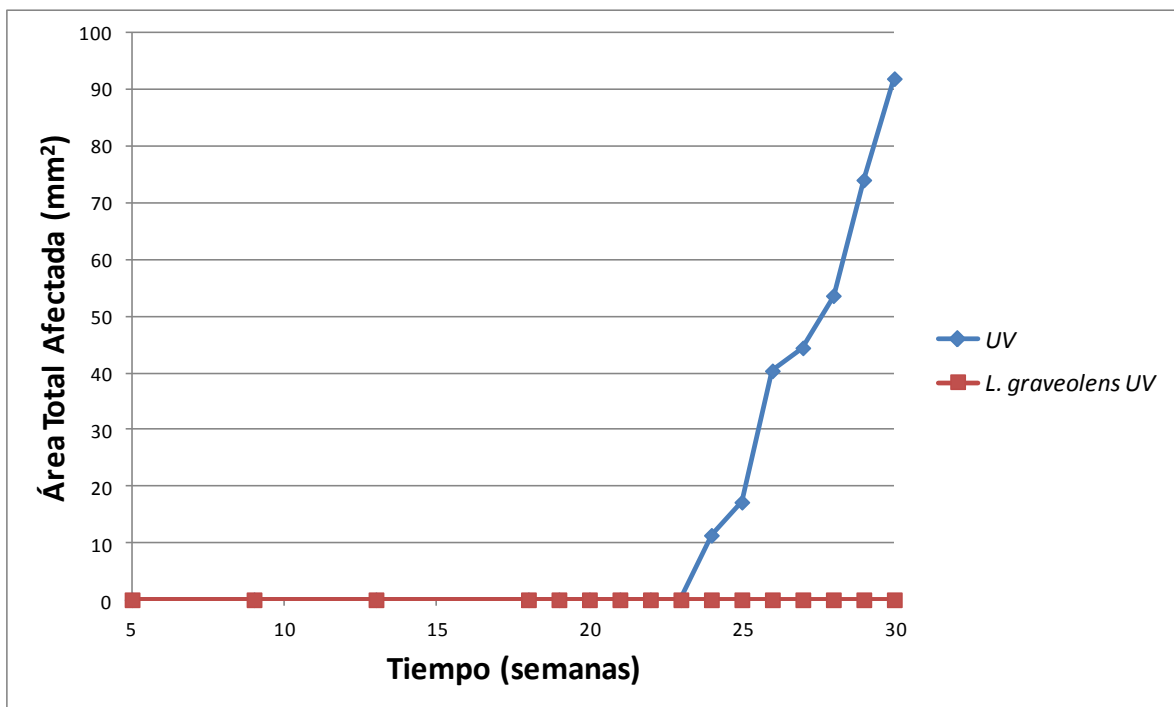


Figura 13. Promedio por ratón de área total afectada expresada en mm².



Figura 14. Grupo experimental tratado con *L. graveolens* y expuesto a RUV. Se observan lesiones pequeñas (Flechas).



Figura 15. Grupo tratado con extracto metanólico de *L. graveolens*. Presenta piel normal.

De acuerdo a lo descrito por Gallagher y colaboradores en 1984 las lesiones observadas inferiores a 2 mm son clasificadas como pápulas. Las pápulas se describen como elevaciones de la piel que se forman a partir de la epidermis inferiores 1 mm de diámetro, muestran un color rojo y pueden ser de tipo benigno, maligno o inflamatorio. El resto de las lesiones son descritas como tumor exofítico, poseen un diámetro superior a 1 mm y se ha reportado que en su mayoría corresponden a CBC. Los papilomas se han descrito como lesiones premalignas, mientras que los tumores en especial CBC son considerados invasivos (Benavides *et al* 2009)

El vehículo utilizado para disolver el extracto de *L. graveolens* fue etanol ya que no presenta efectos perjudiciales en los tejidos y es un solvente orgánico, por lo que es usado en distintas industrias como la farmacéutica, cosmética y gastronómica. El etanol como cualquier xenobiótico es metabolizado y eliminado a través de tres diferentes vías: alcohol deshidrogenasa (ADH), sistema microsomal etanol-oxidante, y a través de la catalasa. La piel tiene una alta capacidad de eliminación de alcohol debido a que posee la mayor reserva de ADH (la principal forma de eliminación del etanol) extrahepática por lo que su epidérmico no ocasiona efectos secundarios graves (Lieber *et al* 1987; Sanchis-Fortea *et al* 1999; Aragón *et al* 2002; Brand y Jendrzewski 2008).

8.3. Diagnóstico Histológico

La piel normal del ratón SKH-1, presentan de 3 a 6 capas con poca distinción entre los estratos basal y espinoso en la epidermis, el estrato granuloso y córneo normalmente sólo se pueden observar como una delgada capa. A nivel histológico, poseen dos estructuras características, el utrículo y quiste dérmico. El utrículo es una estructura revestida por epitelio ampuliforme hiperqueratósica, conectado a la superficie de la piel, parece surgir del infundíbulo del eje del pelo. El quiste dérmico se encuentra en la dermis profunda y no está conectado a la epidermis suprayacente, está revestido por epitelio queratinizado y puede contener sebocitos en la pared, deriva de la atrofia de folículo piloso y la glándula sebácea. Estos quistes crecen con forme al tiempo por lo que ratones adultos de 30 semanas de edad presentan quistes relativamente grandes (Figura 16) (Gallagher *et al* 1984; Benavides *et al* 2009).

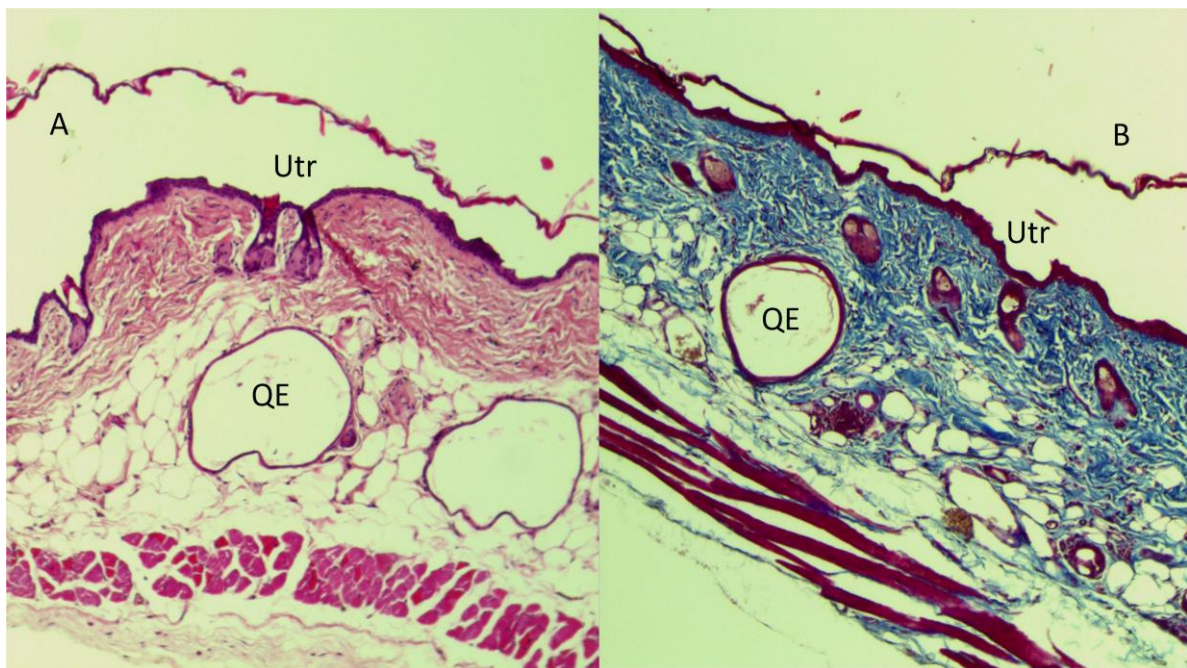


Figura 16. Corte histológico de piel de ratón SKH-1 del grupo control negativo tratado con *L. graveolens*. A. Tinción Hematoxilina-Eosina B. Tinción tricrómica de Masson. A 100X. Utr-utrículo QE-quiste epidérmico

8.3.1. Grupo control negativo tratado con *L. graveolens*

Los ratones del grupo control negativo tratados con el extracto metanólico de *L. graveolens*, no presentaron grandes cambios a lo reportado para la piel normal de estos individuos. Presentaron entre 4 y 6 capas de células en la epidermis, con una capa de células delgada de estrato granuloso y un estrato córneo normal. La epidermis presenta menos quistes dérmicos y relativamente más pequeños de los que se esperaría para estos ratones (Figura 17). Esto puede estar relacionado con el retraso del envejecimiento natural, por la presencia de los compuestos antioxidantes de *L. graveolens*. Se ha reportado que el uso de antioxidantes puede retrasar el envejecimiento natural de la piel aún expuesta a la radiación solar (Cano-Gómez *et al* 2010; Pérez-Sánchez *et al* 2014).



Figura 17. Corte histológico de piel de ratón SKH-1 del grupo control tratado con *L. graveolens*. Tinción Hematoxilina-Eosina a 100X. EC-estrato córneo, E-epidermis, D-dermis, H- hipodermis, Utr-utrículo QE-quiste epidérmico.

8.3.2. Grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV

Las muestras del grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV. Se clasificaron para su diagnóstico en muestras con lesión aparente y sin lesión aparente.

En las muestras sin lesión aparente se presentaron alteraciones en epidermis como espongiosis moderada multifocal y difusa, hiperplasia moderada multifocal e hipertrofia focal leve; ambas lesiones con atrofia celular leve o moderada. Por otro lado, la dermis presentó edema leve en las zonas dañadas con presencia de infiltrados inflamatorios como macrófagos y neutrófilos, algunos con zonas de congestión leve multifocal y difusa (Figura 18A). Por lo que a pesar de ser una zona que simple vista no se observa una lesión aparente si hay daños típicos por la exposición crónica a la RUV.

En las muestras con lesión aparente se presentaron neoplasias severas, difusa, avanzadas con zonas de angiogénesis e invasión hacia la dermis e hipodermis parcial o total, con queratosis actínica en las zonas aledañas al tumor. Estas neoplasias fueron diagnosticadas como CBC, por la presencia de células atípicas pleomórficas originadas del estrato basal características de este tipo de carcinoma de acuerdo a lo reportado por Herrera y colaboradores en 2007. En otras, se observó queratosis actínica severa multifocal y difusa que es una lesión precancerosa (Figura 18 y 19). La queratosis actínica es una lesión precancerosa, histológicamente se observa como un hiperplasia con una ligera invasión en dermis, en forma de proyecciones similares a dedos con algunas células atípicas; este tipo de lesión es reversible si el estímulo que la provocó cesa (Figura 18B) (Stevens *et al* 2003; Callen 2006).

En las muestras con CBC, se llegó a observar invasión al músculo (Figura 19A). Se ha reportado que el daño por RUV se concentra principalmente en la epidermis y dermis, por lo que en los ratones SKH-1 la RUV puede llegar a zonas más profundas y dañar el músculo.

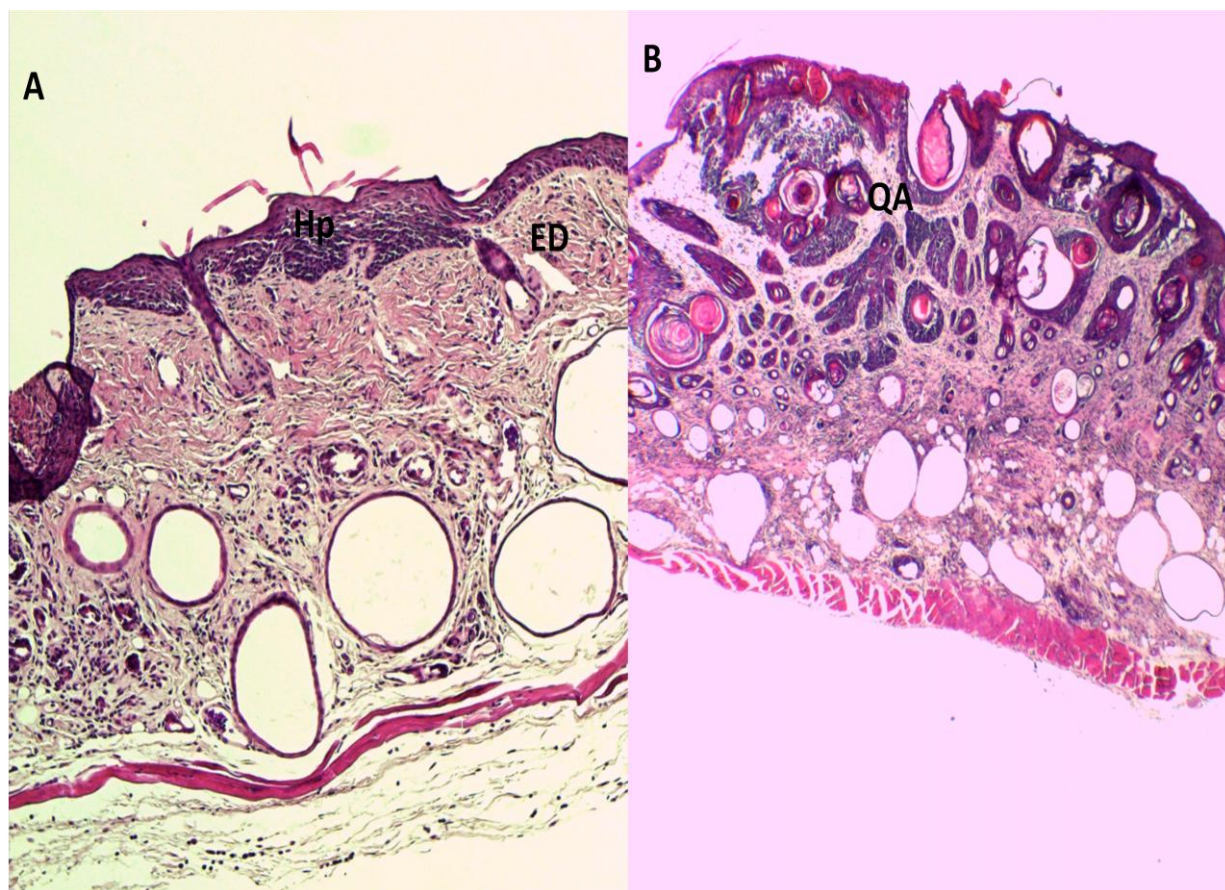


Figura 18. Cortes histológicos del grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV. A) Corte de zona sin lesión aparente se observa hiperplasia (Hp) con espongiosis y presencia de edema (ED). B) Queratosis actínica (QA). Tinción Hematoxilina-Eosina a 100X y 40X

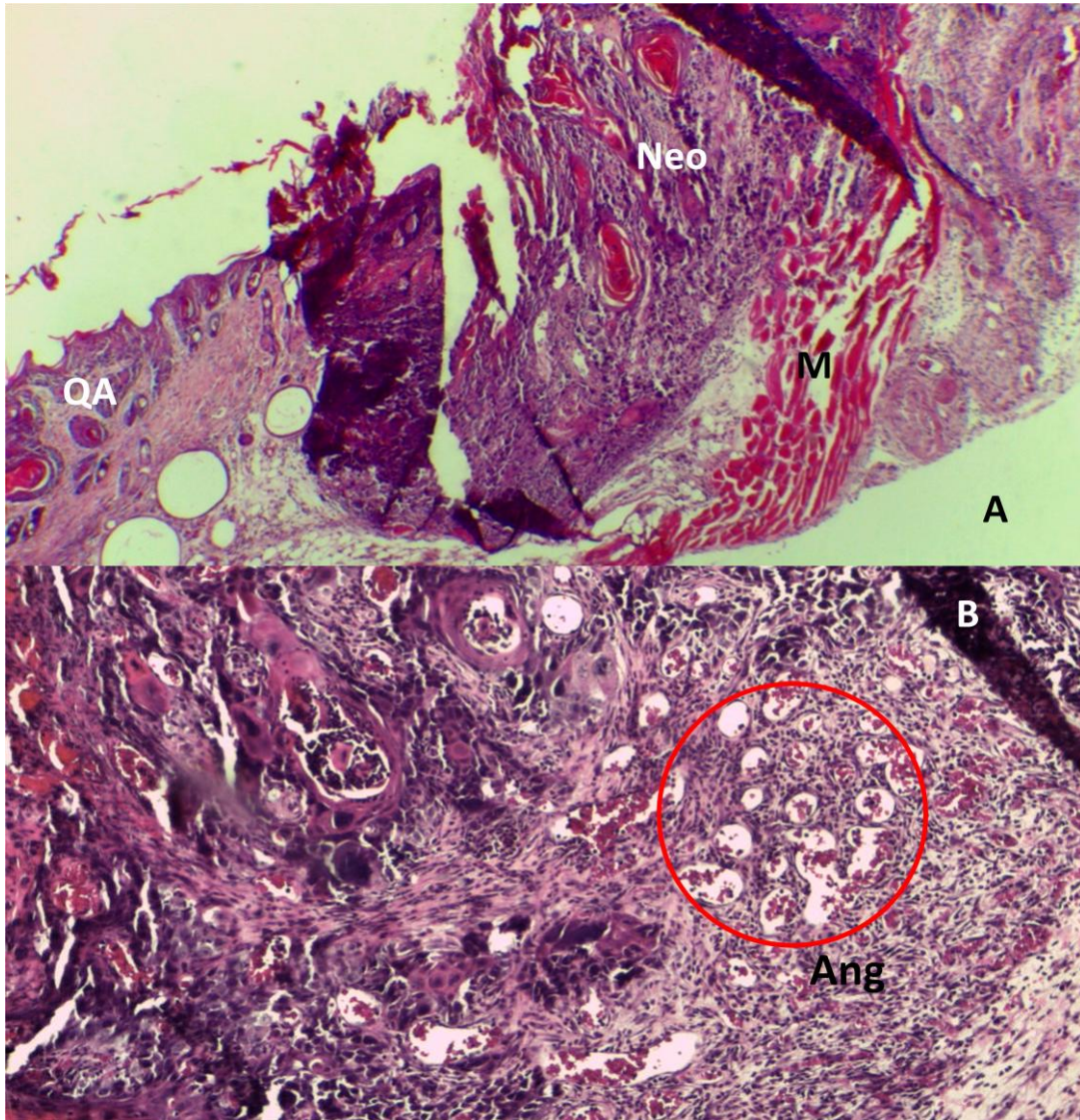


Figura 19. Cortes histológicos del grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV. A) Se observa una neoplasia (Neo) invadiendo al músculo (M) y con queratosis actínica (QA) en las zonas aledañas. B) Se observa neoplasia con angiogénesis (Ang).

Tinción Hematoxilina-Eosina a 40X y 100X.

En grupo control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV, se observó que las lesiones con mayor frecuencia fueron: la presencia de infiltrados inflamatorios, edema y atrofia celular con el 57.14%, 50% y 42.86% respectivamente con una incidencia del 80% cada una. Por otro lado la hiperplasia, queratosis actínica y neoplasia, presentaron el 35.71% de frecuencia de las muestras con una incidencia del 60% para hiperplasia y el 80% para queratosis actínica y neoplasia (Figura 21 y 22). Esto es debido a que en las muestras con hiperplasia, queratosis actínica o neoplasia presentaban edema, infiltrados y atrofia lo cual explica porque fueron las lesiones con mayor incidencia y frecuencia.

8.3.3. Grupo experimental tratado con extracto metanólico de *L. graveolens* y expuesto a RUV

Los ratones del grupo experimental presentaron pocas alteraciones macroscópicas y microscópicas. En las muestras sin lesión aparente se observó que en la epidermis la lesión más frecuente fue la hiperplasia de manera leve focal y en algunos casos multifocal, en las zonas hiperplásicas se presentó espongiosis con atrofia o hipertrofia todas de manera leve; por otro lado en la dermis se presentó edema leve focal con presencia de infiltrados inflamatorios principalmente neutrófilos (Figura 20A).

En las muestras con lesión aparente el principal daño fue la hiperplasia y en los casos más severos se observó queratosis actínica leve y focalizada (Figura 20 B y C). Sin embargo se detectaron zonas con prolongaciones epidérmicas con hiperplasia, y presencia de dermis dentro ellas, estas prolongaciones se diagnosticaron por su parecido histológico y clínico con acrocordones (Figura 20D).

De acuerdo a Moreno y colaboradores en 2007. Los acrocordones no son verdaderas neoplasias, se consideran hiperplasias localizadas en tejido dérmico, cuando son más grandes o péndulas, con el tiempo se cargan de adipocitos. Clínicamente es una lesión única o, a menudo, múltiple en forma de pequeña elongación filiforme blanda al tacto, del color de la piel o ligeramente pigmentada. En la superficie se observa una epidermis normal o discretamente hiperplásica, el eje central está compuesto por tejido conectivo dérmico laxo con vasos prominentes y ocasionalmente células inflamatorias. En 2013 Matamoros de María y Campos reporta estas prolongaciones en ratones SKH-1 llamándolos pólipos fibroepiteliales, estos pólipos los reporta en todos los grupos, por lo que no son provocados por la RUV.

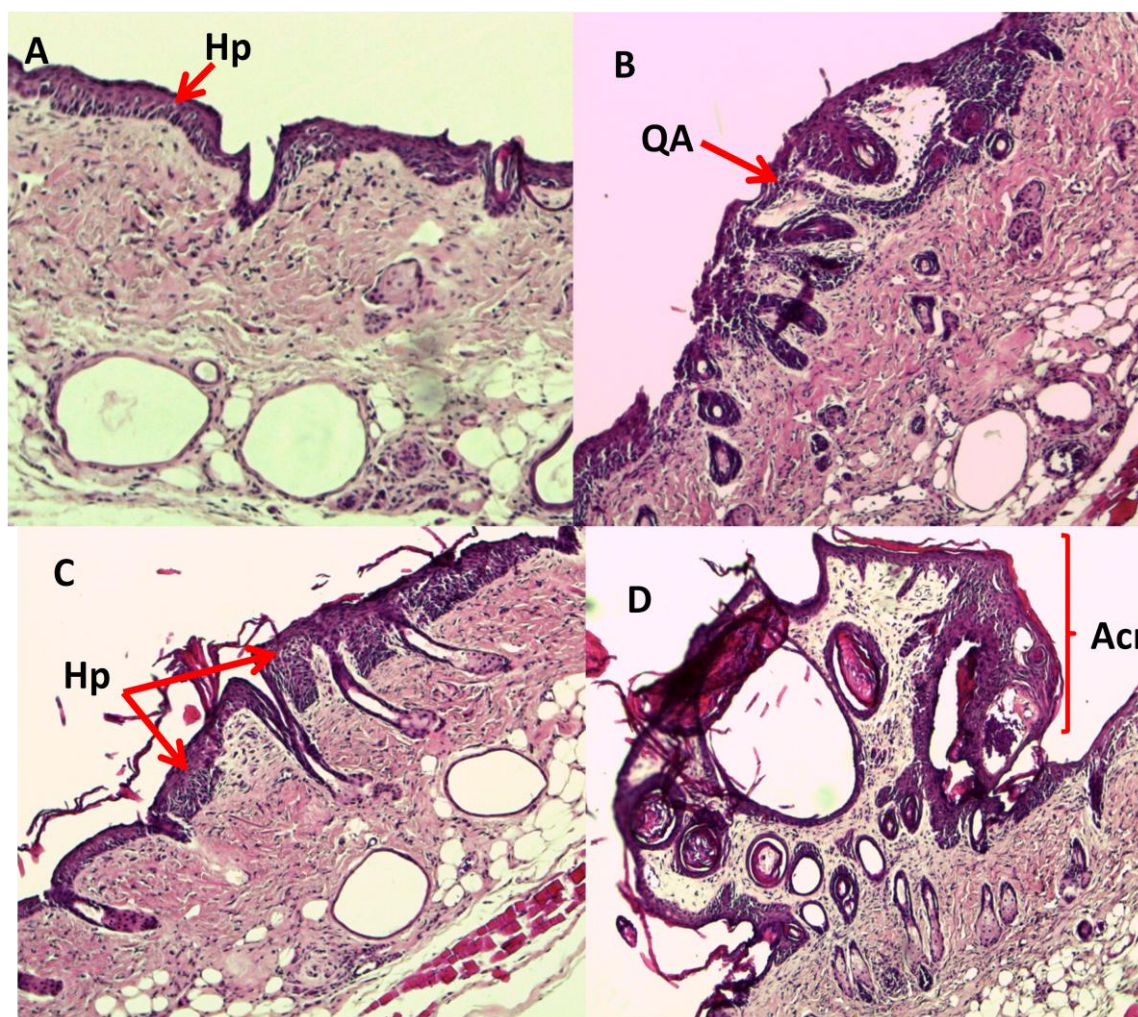


Figura 20. Cortes histológicos de piel de ratón SKH-1 del grupo experimental tratado con extracto metanólico de *L. graveolens* y expuesto a RUV. Zona con lesión aparente. A) Epidermis con hiperplasia leve (Hp). Zona con lesión aparente. B) Epidermis con queratosis actínica leve (QA). C) Epidermis con hiperplasia leve (Hp). D) Epidermis con acrocordon (Acr). Tinción Hematoxilina-Eosina a 100X.

En el grupo experimental tratado con el extracto metanólico de *L. graveolens* y expuesto a RUV, las lesiones con mayor frecuencia fueron la hiperplasia con 69.23% con una incidencia del 100%, la atrofia y el edema cada una 23.08% con una incidencia del 60% y la queratosis actínica 7.69% con incidencia de 20% (Figura 21 y 22). La alta incidencia de hipertrofia es debido a que en las muestras con y sin lesión aparente fue la lesión más frecuente, acompañada ocasionalmente con edema o atrofia. Los resultados en el diagnóstico muestran una diferencia entre los grupos experimental y control positivo, por lo que se puede decir que el extracto metanólico de *L. graveolens*, puede absorber la RUV y protege de manera significativa contra esta, disminuyendo los daños y previniendo el cáncer de piel.

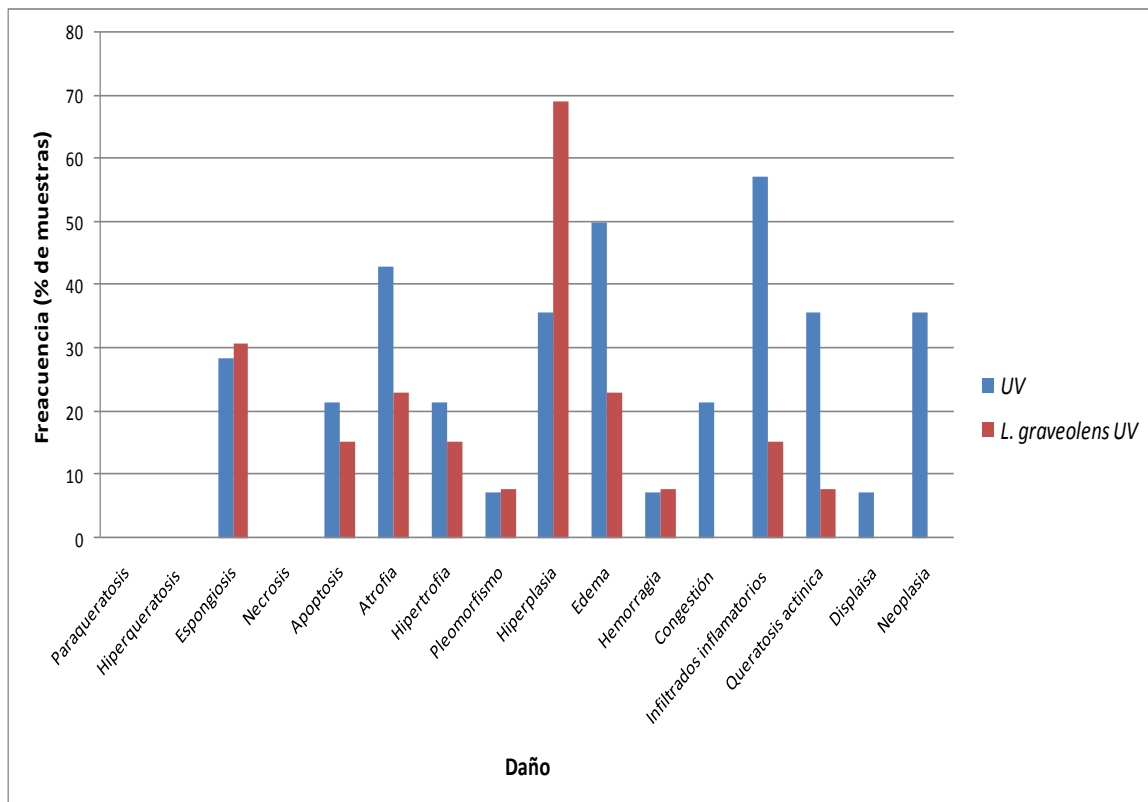


Figura 21. Comparación de la frecuencia de los tipos de lesiones presentes en las muestras de los grupos control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV y el experimental tratado con *L. graveolens* y expuesto a la RUV.

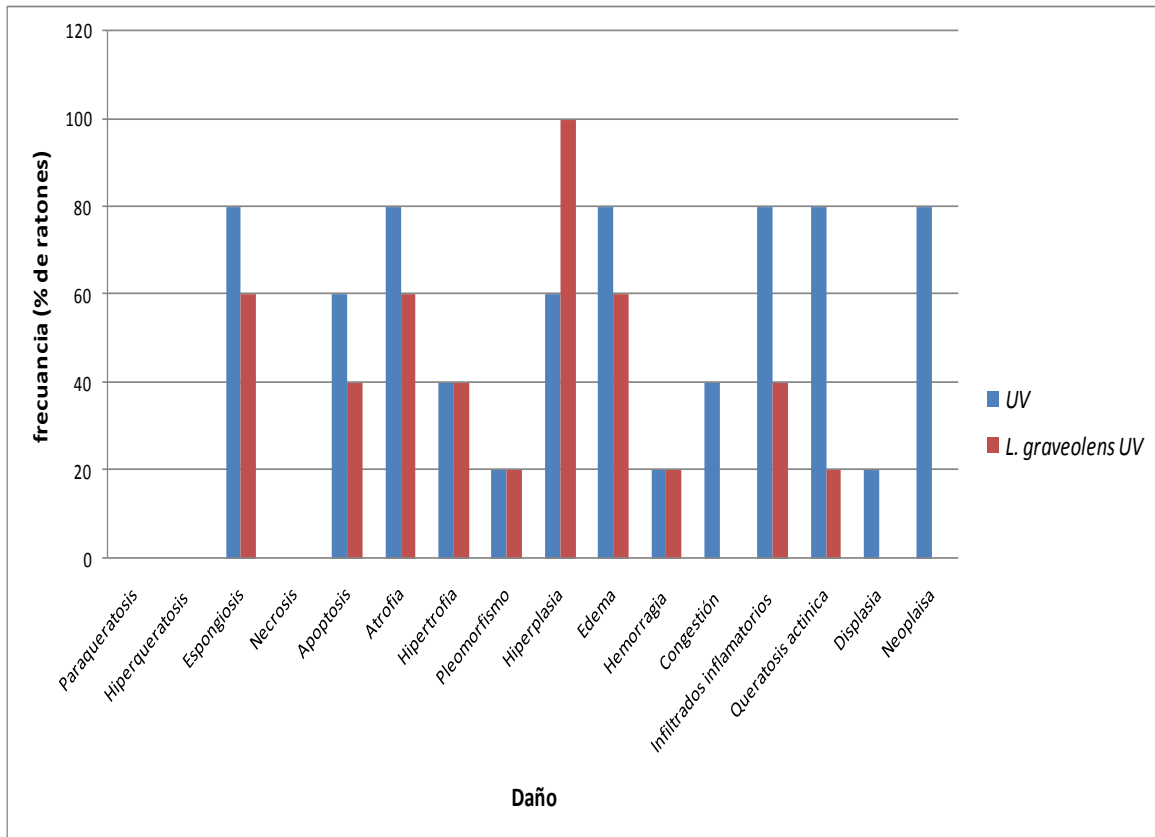


Figura 22. Comparación de la frecuencia de los tipos de lesiones presentes en los ratones de los grupos control positivo tratado con etanol y expuesto a la RUV y el experimental tratado con *L. graveolens* y expuesto a la RUV.

En 2012 Martínez Bailón realizó una evaluación del verbascósido como fotoprotector contra el desarrollo de carcinomas cutáneos en ratones SKH-1 expuestos a RUV. Para el aislamiento del verbascósido utilizó el extracto metanólico de *Buddleja cordata*. En dicho trabajo reportó que los ratones tratados con verbascósido y expuestos a RUV presentaron en promedio 2.1 lesiones por ratón al final del experimento. Este promedio relativamente mayor al del grupo experimental tratado con el extracto de *L. graveolens* y expuestos a RUV que fue de 1.2 lesiones por ratón. Sin embargo, en el diagnóstico histológico reportó que el grupo tratado con verbascósido y expuesto a RUV, el 46% de las lesiones fueron diagnosticadas como carcinoma espinocelular (CEC) y el 17% como lesiones precancerosas. Por otro lado, en el grupo experimental tratado con el extracto de *L. graveolens* y expuesto a RUV, no se reportaron carcinomas y solo el 7.69% como lesiones precancerosas. Por lo que el uso del extracto metanólico de *L. graveolens* como fotoprotector puede prevenir el cáncer de piel más eficientemente que compuestos como el verbascósido.

9. Conclusiones:

- El extracto metanólico de *L. graveolens* presenta: alcaloides, carbohidratos, fenoles y saponinas.
- La exposición crónica a la RUV no afecta el peso de los ratones SKH-1
- El extracto metanólico de *L. graveolens* aplicado de forma tópica retrasa la aparición de lesiones provocadas por la exposición crónica a la RUV en ratones SKH-1.
- El extracto metanólico de *L. graveolens* disminuyó la incidencia en un 20% y en un 96% el número de lesiones provocados por la exposición crónica a la RUV en ratones SKH-1.
- El extracto metanólico de *L. graveolens* redujo el área de las lesiones provocadas por la exposición crónica a la RUV en ratones SKH-1.
- El uso tópico del extracto metanólico de *L. graveolens* como fotoprotector puede prevenir el cáncer de piel en los ratones SKH-1 expuestos a RUV de manera crónica.

10. Referencias

Altamirano-Quintero A., Arrollo-Villegas J.J., Bravo-Ojeda J.J., Franco-Calderón P.M., Franco-Reyes U., Jasso-Herrera O., Velázquez-Rodríguez S., 2005, Practica 2: Técnica Histológica y Hematoxilina-Eosina, Universidad Autónoma Chupingo, Departamento de Zootecnia, consultado el 01-05-2015 en http://www.emagister.com/uploads_user_home/Comunidad_Emagister_7322_hema.pdf

Amado S, 2001. Lecciones de dermatología. 14ª edición, Méndez Editores. México. 783pp.

Aragón C., Miquel M., Correa M., Sánchez-Segura C., 2002, Alcohol y metabolismo humano, Revista Adicciones 14(1):23-42.

Arango-Acosta G.J., 2002, Alcaloides y compuestos nitrogenados, Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica, Medellín, 88pp. Consultado el 01-05-2015 en <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides2001.pdf>.

Arenas R, 1996, Atlas de dermatología: diagnóstico y tratamiento, 2ª Edición, Mc Graw Hill Irteramericana, México, 642p.

Benavides F., Oberyszyn T.M., Van Buskirk A. M., Reeved V. E., Kusewitt D. F., 2009, The hairless mouse in skin research, Journal Dermatology Science 53(1): 10–18.

Berengust G., 2013, Fotoenvejecimiento Fotocarcinogénesis, Andromaco, Revista Dosis. Consultado el 01-05-2015 en http://revistadosis.com.ar/pdf/andromaco_m3.pdf.

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.

Cabrera-Morales C. M., López-Nevot M. A., 2006, Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel, Revista Oncología 29 (7):291-298.

Callen Jeffrey P., 2006, Posibles precursores de neoplasias epidérmicas queratinocíticas, En: Rigel D.S., Friedman R.J., Dzubow L.M., Reintgen D.S., Bystry J-C, y Marks R., 2006, Cancer de Piel, Editorial Elsevier, España, 93-100pp.

Cancino-Rubí M., Carrillo-Hernández J. L., 1998, Efectos de la radiación solar y filtros solares sobre la piel, Fac. Quim. 55pp.

Cano-Gómez A., Gómez-García F.J., Álvarez-Sánchez N., Sánchez-Pedreño P., Ortega V., 2010, Modelo de fotocarcinogenesis cutánea en ratones SKH-1 por radiación ultravioleta, Revista Española de Patología 43(4):191–195.

Domínguez X. A., 1988, Métodos de investigación fitoquímica, Editorial Limusa, México, p 53.

Fernández-Niello J., 2006, Colección Ciencia Joven 16: El universo de las radiaciones, Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, 83pp.

Fontal B., 2005, El espectro electromagnético y sus aplicaciones, Editorial: Reproducción, Venezuela, 151pp.

Gallagher C.H., Path F.R.C., Canfield P.J., Greenoak G.E., Reeve V.E., 1994, Characterization and histogenesis of tumors in the hairless mouse produced by low-dosage incremental ultraviolet radiation, The Journal of Investigative Dermatology 83:169-174.

González-Güereca M. C., Soto-Hernández M., Kite G., Martínez-Vázquez M., 2007, Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano Mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer), Revista Fitotecnia Mexicana 30(1): 43-49.

González-Púmariega M., Tamayo M.V., Sánchez-Lamar A., 2009, La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana, Revista Theoria 18(2):69-80.

Gutiérrez-Vidrio R. M., 2003, Cáncer de piel, Revista de la Facultad de Medicina UNAM, 46(4):166-171.

Herrera E., Matilla A., Herrera-Acosta E., 2007, Tema 11. Carcinoma basocelular. En: Herrera C.E., Rodríguez P.J.L., Dermatología: correlación clínico-patológica, Area Científica Menarini, Madrid, 57-61pp.

Katiyar Santosh K., 2008, Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system, *Molecular Nutrition and Food Research* 52(1): S71–S76.

Kochevar E.I., Taylor R.C., Krutman J., 2009, Fundamentos de fotobiología y fotoimmunología cutáneas. En: Wolf K., Goldsmith A.L., Katz I.S., Gilchrest A.B., Paller S.A., Leffell J.D. (Eds). *Fitzpatrick, Dermatología en Medicina Generar. Tomo 2. 7a Edición. Medica Panamericana. España, 797-809 pp.*

Kranen H.J., Westerman A., Berg R.J.W., Krama N., Kreijl C.F., Wester P.W., y Gruijl F.R., 2005, Dose-dependent effects of UVB-induced skin carcinogenesis in hairless p53 knockout mice, *Mutation Research* 571:81–90.

Kumar V., Contran R.S., Robbins S.L., 1999, *Patología Humana, 6ª edición, McGRAW-HILL Interamericana, México, 836pp.*

Kundoor V., Zhang X., Bommareddy A., Khalifa S., Fahmy H., y Dwivedi C., 2007, Chemopreventive effects of sarcotriol on ultraviolet b-induced skin tumor development in SKH-1 hairless Mice, *Marine Drugs* 5:197-207.

Lang P.G., Maize J.C., 2006, Carcinoma basocelular, En: Rigel D.S., Friedman R.J., Dzubow L.M., Reintgen D.S., Bystryrn J-C, Marks R., 2006, *Cancer de Piel, Elsevier, España, 101-132pp.*

Lazar A.J.F., Murphy G.F., 2010, La piel, En: Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Aster J.C., 2010, *Patología estructural y funcional, Elsevier Saunder, 8va edición, España, 1165-1204pp.*

Lépori L.R., 2005, *La piel, Miniatlas, Buenos Aires-Argentina, 203pp.*

Lieber C.S., Baraona E., Leo M.A., Garro A., 1987, Metabolism and metabolic effects of ethanol, including interaction with drugs, carcinogens and nutrition, *Mutation Research* 186:201-233.

Lobos B. P., Lobos S. A., 2011, Cáncer de piel no-melanoma, *Revista Médica Clínica las Condes*, 22(6):737-748.

Long-Ze Lin, Mukhopadhyay S., Robbins R. J., Harnly J. M., 2007, Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis, *Journal of Food Composition and Analysis* 20:361–369.

Maldonado E., Díaz-Arumir H., Toscano R. A., Martínez M., 2010, Lupane triterpenes with a δ -lactone at ring E, from *Lippia mexicana*, *Journal Nature Product* 73, 1969-1972.

Marks R., Samman P.D., 1979, *Manual de Dermatología*, Editorial Medica y Técnicas, S.A., España, 605pp.

Martínez-Bailón C., 2012, Efecto quimioprotector del verbascósido en el desarrollo de neoplasias en la piel de ratones SKH-1, Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México, 114 pp.

Martínez-Martínez A., 2001, Saponinas esteroides, Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica, Medellín, 22pp. Consultado el 01-05-2015 en <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf>.

Martínez-Rocha A., Puga R., Hernández-Sandoval L., Loarca-Piña G., Mendoza S., 2008, Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth), *Plant Foods for Human Nutrition* 63(1):1–5.

Matamoros de María y Campos D. R., 2013, Estudio del efecto fotoprotector *in vivo* y antioxidante *in vitro* de Tepozán (*Buddleja cordata*), Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México, 78pp.

Maverakis E., Miyamura Y., Michael P. Bowen M.P., Correa G., Ono Y., Goodarzi H., 2010, Light, including ultraviolet, *Journal of Autoimmunity* 34:J247-J257.

Montalvo-Arenas C. E., 2010, Técnica Histológica, consultado el 01-05-2015 en http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/3_tecnica_histologica.pdf.

Moreno D.A., Bordas X., Jucglá A., 2007, Tema 55: Fibroma de péndulo y acrocordones. En: Herrera C.E., y Rodríguez P.J.L., *Dermatología: correlación clínico-patológica*, Area Científica Menarini, Madrid, 229-231pp.

Navarrete-Franco G., 2003, Histología de la piel, Revista de la Facultad de Medicina UNAM 46(4):130-133.

Nguyen T.H., Yoon J., 2006, Carcinoma epidermoide, En: Rigel D.S., Friedman R.J., Dzubow L.M., Reintgen D.S., Bystry J-C, y Marks R., 2006, Cancer de Piel, Elsevier, España, 133-150pp.

Perde-Schrepler M., Chereches G., Brie I, Tatomir C., Postescu I., Soran L. y Filip A., 2013, Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 118:16–21.

Pérez-Sánchez A., Barraión-Catalán E., Caturla N., Castillo J., Benavente-García O., Alcaraz M., Micol V., 2014, Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 136:12–18.

Rastrelli L., Caceres A., Morales C., F., Aquino R., 1998, Iridoids from *Lippia graveolens*, Phytochemistry 49(6): 1829-1832.

Requena-Rodríguez A., Zúñiga-Román J., 2004, Espectroscopía, Pearson Prentice Hall, España, 37-41p.

Rzedowzki J., Rzedowski G.C., 2002. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Familia Verbenaceae, Instituto de Ecología, Centro Regional de Bajío A.C., Michoacán Méx., 78-79pp.

Sanchis-Fortea M., Cuevas-Badenes J., Sanchis-Arnau M. A., 1999, Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo, Revista Adicciones 11(2):115-126.

Sandoval G. Ma. C. S., Identificación y Caracterización de Alcoholes y Fenoles, Química Orgánica II (1413), consultado en 12-05-2015 en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/practicass6a8CoordinadoraDraSandoval_21489.pdf.

Scheinfeld N.; De Leo V.A., 2006, Factores etiológicos en el cáncer de piel: ambientales y biológicos, En: Rigel D.S., Friedman R.J., Dzubow L.M., Reintgen D.S., Bystryn J-C, y Marks R., 2006, Cancer de Piel, Editorial Elsevier, España, 61-70pp.

Stashenko E. E., Martinez R. J., Cala P. M., Duran C. D., Caballero D., 2013, Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants, Journal Separation Science 36:192–202.

Stevens A., Lowe J.S., Young B., 2003, Wheater Histopatología Básica: Atlas y texto a color, 4ª edición, Elsevier, Madrid España, 295pp.

Stricker T.P., Kumar V., 2010, Neoplasia, En: Kumar V., Abbas A. K., Fausto N. y Aster J.C., 2010, Patología estructural y funcional, Elsevier Saunder, 8va edición, España, 259-330pp.

Wang Zhi-Yuan, Huang Mou-Tuan, Ferraro T., 1992, Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of skh-1 mice, Cancer Research. 52:1162-1170.
<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/patologia/fotos143-152/147.jpg>

Xin Tong, Van Dross R. T., Abu-Yousif A., Morrison A. R., y Pelling J.C., 2007, Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mrna stabilization and translational inhibition, Molecular and Cellular Biochemistry 27(1):283–296.

Figura 1. Consultado el 01-05-2015 en <http://www.sabelotodo.org/anatomia/imagenes/piel.jpg>.

Figura 2. Consultado el 01-05-2015 en <http://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/imagenes/epitelio-estrat-plano.jpg>

Figura 3. Consultado el 01-05-2015 en http://d1cxesumcyia02.cloudfront.net/media/images/ap_58800-29__4ea744076e418.jpg

Figura 4. Consultado el 01-05-2015 en <http://www.mimagnetoterapia.com/Espectro%20Tabloid.jpg>

Figura 5. Consultado el 01-05-2015 en

https://marinarodriguezdermatologia.files.wordpress.com/2011/06/fountain_of_youth_product_05.jpg

Figura 6. Consultado el 01-05-2015 en

<http://nutritionaloncology.org/images/inflammationCarcinogenesis.jpg>

Figura 7. Consultado el 01-05-2015 en

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/patologia/fotos143-152/149.jpg>.

Figura 8. Consultado el 01-05-2015 en

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/patologia/fotos143-152/147.jpg>