



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOQUIMIOPROTECTOR DEL VERBASCÓSIDO  
EN RATONES SKH-1 IRRADIADOS CON LUZ ULTRAVIOLETA”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ADRIANA MONTSERRAT ESPINOSA GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**DR. RICARDO REYES CHILPA**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO.**

**AGOSTO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de mayo de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ESPINOSA GONZÁLEZ ADRIANA MONTSERRAT**, con número de cuenta **97555188**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOQUIMIOPROTECTOR DEL VERBASCÓSIDO EN RATONES SKH-1 IRRADIADOS CON LUZ ULTRAVIOLETA"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO**:

Presidente: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASCENCIA  
Vocal: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
Suplente: DR. ROBERTO EDUARDO LÓPEZ URRUTIA  
Suplente: DR. RICARDO REYES CHILPA

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de junio de 2016.

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

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

## **Agradecimientos**

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo. CVU: 48978

A los proyectos: PAPIIT-DGAPA-UNAM. IN219612 y PAPCA 2013/54

**A mi director de tesis:**

**Dr. Guillermo Avila Acevedo, gracias.**

**A mi comité tutor por todas las aportaciones realizadas a este trabajo:**

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Dr. Diego Julio Arenas Aranda. In memoriam

## **Agradecimientos**

### **A mis revisores por las observaciones y comentarios a esta tesis:**

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Dr. Carlos Pérez-Plasencia

Dr. Eduardo López Urrutia

A la **FES Iztacala**, UNAM por ser mi segunda casa.

A mis compañeros y amigos del **Laboratorio de Bioquímica Molecular**, UBIPRO. En especial a la **Biol. Claudia Verónica Granados Hernández** por todo su apoyo en la realización de las electroforesis. A todos gracias por compartir su conocimiento.

A los profesores **José del Carmen Benítez-Flores** y **María del Rosario González-Valle** del Laboratorio de Histopatología, de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala, por todo el apoyo en la realización y análisis de las muestras histológicas. Gracias por tan cálidos momentos.

Al **Bioterio** de la FES Iztacala, por el apoyo en la realización de este trabajo.

A la **Jefatura de Carrera de Biología: Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado**.

A mis compañeros, colegas y amigos del laboratorio de **Fitoquímica** por su apoyo en los experimentos y por tan gratos momentos en especial: **Dra. Ana María García Bores, Cecilia, Erick, Sra. Bety, Sebas, y Karen**.

Al **Dr. Elías Piedra Ibarra** por el préstamo del equipo para realizar parte de este trabajo y al **M. en C. Juan Alberto Ponciano Gómez** por la asesoría.

**Dra. Eva Ramón Gallegos** y **Dr. Julio García Cordero**, gracias por el apoyo en su laboratorio.

A la **M. En C. Verónica García Castillo** por todo su asesoría y dirección en la realización de las pruebas de toxicidad.

A la **M. en C. Socorro Sánchez Correa** y al **Biol. Segio González Vázquez del Mercado** por el apoyo en la realización de las electroforesis de este trabajo.

A **María Elena Noriega Salceda**, por todas las correcciones.

Dra. **Felicitas Küster Wunderlich**, Gracias.

Dra. **Dafne**, Gracias.

**Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras**, gracias por su apoyo permanente en este camino, por su amistad y paciencia.

A mis amigos: **Coco, Sergio y Graciela**: Gracias por darme tanto de ustedes.

**A mi mamá: Martha y hermanas: Maricela y Viridiana**, gracias por sus porras eternas, por su apoyo, por sus noches, por ser mi familia.

A todos aquellos que siempre me apoyaron.

A Bruno, por su tiempo y  
amor.

A Miguel, por su apoyo  
incondicional.

Por que juntos nunca paremos de  
reír.

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no  
podrá comprender su tiranía.”*  
Frankenstein. Mary Shelley

<b>Índice</b>	<b>Pag.</b>
Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	III
Lista de abreviaturas.....	VI
<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Marco teórico.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. La piel.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1 Constitución química y anatómica.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.2 Embriogénesis.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.3 Histología.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.3.1 Epidermis.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.3.2 Tipos celulares de la epidermis.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.3.3 Unión dermoepidérmica o lámina basal.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3.4 Dermis.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.3.5 Tipos celulares y fibras de la dermis.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3.6 Anexos cutáneos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.3.7 Hipodermis.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.4 Funciones de la piel.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.4.1 Función protectora hacia la luz solar.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Radiación solar.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1 Radiación ultravioleta (RUV).....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2 Interacción de la RUV con la piel.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3 Efectos a las biomoléculas por la RUV.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.4 Efectos agudos y crónicos en la piel por RUV.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4.1 Efectos agudos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4.2 Efectos crónicos.....</b>	<b>47</b>

3.3 Modelos de estudio en fotoprotección.....	57
3.3.1 Ratones SKH-1.....	58
3.3.2 Cultivos celulares.....	59
3.3.3 Análisis de curvas de disociación de alta resolución (PCR-HRM).....	61
3.4 Fotoprotección.....	63
3.4.1 Fotoprotección con sustancias de origen natural.....	65
3.5 Género <i>Buddleja</i> .....	69
3.5.1 <i>Buddleja cordata</i> H. B. K.....	70
3.5.1.1 Verbascósido.....	74
4. Justificación.....	76
5. Hipótesis.....	77
6. Objetivos.....	78
6.1 Objetivo General.....	78
6.2 Objetivos particulares.....	78
7. Estrategia metodológica.....	79
7.1 Primera etapa.....	81
7.2 Segunda etapa.....	83
7.3 Tercera etapa.....	88
7.4 Cuarta etapa.....	98
8. Resultados y discusión.....	106
8.1 Resultados y discusión de la primera etapa.....	106
8.1.1 Obtención del extracto metanólico de <i>Buddleja cordata</i> .....	106
8.1.2 Determinación de los máximos de absorción ( $\lambda_{max}$ ) en la región UV del EMBC.....	109
8.1.3 Aislamiento e identificación del verbascósido.....	111
8.2 Resultados y discusión de la segunda etapa.....	115
8.2.1 Determinación de citotoxicidad y viabilidad del EMBC y del verbascósido en la línea celular HaCaT.....	115

8.2.2 Prueba de fotoprotección en la línea celular HaCaT irradiada con RUV.....	117
8.2.3 Determinación de apoptosis por citometría de flujo.....	123
8.3 Resultados y discusión de la tercera etapa.....	132
8.3.1 Determinación de penetración del EMBC y del verbascósido en piel de ratones SKH-1.....	132
8.3.2 Experimento agudo de fotoprotección con ratones SKH-1.....	133
8.3.2.1 Evaluación de la presencia de eritema.....	133
8.3.2.2 Análisis histológico del experimento agudo.....	135
8.3.3 Análisis histológico del experimento de exposición crónica a la RUV.....	152
8.4 Resultados y discusión de la cuarta etapa.....	170
8.4.1 Expresión diferencial de proteínas.....	170
8.4.2 Análisis de curvas de disociación de alta resolución (PCR-HRM).....	180
9. Conclusiones.....	186
10. Referencias bibliográficas.....	188
11. Apéndice.....	220

### **Índice de tablas.**

- Tabla 1. Origen embrionario de la piel.
- Tabla 2. Capas que conforman a la piel.
- Tabla 3. Funciones de la piel.
- Tabla 4. Clasificación de los tipos de piel de acuerdo con la sensibilidad a una sola exposición a la luz solar.
- Tabla 5. Unidades definidas para la medición de la radiación electromagnética.
- Tabla 6. Daños histológicos observados en la piel por la formación de eritema causado por luz ultravioleta.
- Tabla 7. Algunas sustancias estudiadas en la fotoprotección.
- Tabla 8. Concentraciones de verbascósido utilizadas en los experimentos de toxicidad y fotoprotección en cultivos celulares HaCaT.
- Tabla 9. Grupos control y experimentales utilizados en los ensayos agudo y crónico.
- Tabla 10. Tinciones realizadas para las muestras histológicas de los experimentos agudo y crónico.
- Tabla 11. Daños histológicos evaluados en la piel de los ratones SKH-1, ocasionados por exposición aguda a RUV.
- Tabla 12. Daños histológicos evaluados en la piel de los ratones SKH-1, ocasionados por exposición crónica a RUV.
- Tabla 13. Muestras de piel utilizadas para la expresión diferencial de proteínas.
- Tabla 14. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para regiones específicas de p53.
- Tabla 15. Condiciones de amplificación.
- Tabla 16. Secuencias, tamaño y regiones de los amplicones para PCR-HRM.
- Tabla 17. Mezcla de reacción utilizada para el PCR-HRM.
- Tabla 18. Programa de temperatura utilizado para el análisis de PCR-HRM.
- Tabla 19. Diseño experimental y número de muestras utilizadas para PCR-HRM.
- Tabla 20. Características generales del verbascósido obtenido a partir del EMBC.

- Tabla 21. Resultados de la prueba de penetración en piel del EMBC y del verbascósido.
- Tabla 22. Tratamientos del experimento agudo y número de muestras obtenidas para el estudio histológico.
- Tabla 23. Tratamientos del experimento crónico y número de muestras obtenidas para el estudio histológico.
- Tabla 23. Correlación macroscópica y microscópica de las lesiones presentadas en el ensayo crónico en los ratones SKH-1.
- Tabla 24. Consideraciones histológicas para el diagnóstico del experimento crónico.
- Tabla 25. Pesos moleculares obtenidos de las electroforesis unidimensionales.
- Tabla 26. PMr, pI, proteína identificada y patrón de expresión diferencial.

## Índice de figuras.

- Figura 1. Estructura de la piel.
- Figura 2. Estratos que conforman la epidermis.
- Figura 3. Estructura de los melanocitos y distribución de la melanina.
- Figura 4. Estructura de la unión dermoepidérmica.
- Figura 5. Estructura y tipos celulares de la dermis.
- Figura 6. Esquema general de la hipodermis y los adipocitos.
- Figura 7. Funciones de la piel.
- Figura 8. Interacción de la radiación solar con la piel.
- Figura 9. Espectro electromagnético emitido por el Sol.
- Figura 10. Energía solar que llega a la superficie terrestre.
- Figura 11. Penetración de la REM en la piel.
- Figura 11. Absorción de fotones de luz por las moléculas de la piel.
- Figura 12. Proceso de respuesta de las células de la piel a la RUV.
- Figura 13. Absorción de fotones de luz por las moléculas.
- Figura 14. Formación de fotoproductos por efecto de la UVB.
- Figura 15. Efecto de la RUV en el proceso de bronceado.
- Figura 16. Inmunidad y daños en la piel por la RUV.
- Figura 17. Formación de eritema por efecto de la RUV.
- Figura 18. Fotoenvejecimiento y carcinogénesis por efecto de la RUV.
- Figura 19. Proceso de carcinogénesis.
- Figura 20. Función de p53.
- Figura 21. Sitios de alta incidencia de mutaciones en p53 y P53.
- Figura 22. *Buddleja cordata*.
- Figura 23. Tepozán.
- Figura 24. Estructura química del verbascósido y características asociadas a la fotoprotección.
- Figura 25. Estrategia metodológica.
- Figura 26. Panorama general de los experimentos agudo y crónico con ratones SKH-1.
- Figura 27. Sacrificio y toma de muestras de la piel de los ratones SKH-1.

- Figura 28. Estructuras básicas que conforman a los polifenoles.
- Figura 29. Picos máximos de absorción de *B. cordata*.
- Figura 30. Distribución y presencia del verbascósido en el reino vegetal.
- Figura 31. Biosíntesis propuesta para el verbascósido.
- Figura 32. Porcentaje de viabilidad de células HaCaT, después de 24 horas de exposición a las sustancias.
- Figura 33. Experimento de fotoprotección y resultados de la técnica MTT.
- Figura 34. Agentes naturales y su habilidad de inhibir o reducir los efectos adversos de la RUV.
- Figura 35. Resultados de citometría de flujo (apoptosis).
- Figura 36. Porcentajes de células en apoptosis.
- Figura 37. Porcentajes de células en necrosis.
- Figura 38. Porcentajes de células viables.
- Figura 39. Valores colorimétricos relacionados con eritema.
- Figura 40. Ratones del ensayo agudo previo y posterior al sacrificio para la toma de muestras.
- Figura 41. Gráfica de daños relacionados a la presencia de eritema en el experimento agudo.
- Figura 42. Cortes histológicos del experimento agudo. Grupo Testigo.
- Figura 43. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Grupo control negativo.
- Figura 44. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Grupo EMBC.
- Figura 45. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Grupo Verbascósido.
- Figura 46. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Grupo C+.
- Figura 47. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Grupo Verbascósido+UV.
- Figura 48. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Grupo EMBC+UV.

- Figura 49. Peso de los ratones durante el experimento crónico.
- Figura 50. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo Testigo.
- Figura 51. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo C-.
- Figura 52. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo EMBC.
- Figura 53. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo Verbascósido.
- Figura 54. Diagnóstico histológico de las lesiones observadas macroscópicamente.
- Figura 55. Incidencia y multiplicidad de tumores en la piel de ratones SKH-1 durante el ensayo crónico.
- Figura 56. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo C+.
- Figura 57. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo Verbascósido+ UV.
- Figura 58. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo EMBC+UV.
- Figura 59. Geles de poliacrilamida de los grupos C-, C+, EMBC y verbascósido.
- Figura 60. Geles de electroforesis 2D.
- Figura 61. Geles de electroforesis 2D diferenciales
- Figura 62. Gráfica de PCR-HRM. Temperatura contra fluorescencia.
- Figura 63. Gráfica de Tm de PCR-HRM. Normalizada
- Figura 64. Gráfica de PCR-HRM. Normalizada
- Figura 65. Análisis estadístico de PCR-HRM

## Lista de abreviaturas.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
C	Control
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CC	Cromatografía en columna
CCB	Carcinoma de células basales o basocelular
CCE	Carcinoma de células escamosas o espinocelular
CCF	Cromatografía en capa fina
CM	Cáncer melanómico
cm <sup>2</sup>	centímetros cuadrados
CNM	Cáncer no melanómico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMBC	Extracto metanólico de <i>Buddleja cordata</i>
EMBC+RUV	Extracto metanólico de <i>Buddleja cordata</i> irradiado con radiación ultravioleta
EP	Epidermis
g	Gramo
G-C	Guanina-Citosina
h	Hora
H y E	Hematoxilina y eosina
HaCaT	Queratinocitos humanos inmortalizados
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRM	Análisis de alta resolución de fusión
J	Joul
Kg	Kilogramo
M	Tinción tricrómica de Mason
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramo por mililitro
min	Minuto
mJ	mili Joul
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5,-dimetiazol-2-il)-2,5- bromo difeniltetrazolio
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
p53	Gen p 53
P53	Proteína P53

PAS	Perclorid acid Shiff (inglés)
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Concentración de iones hidrógeno
REM	Radiación electromagnética
RGB	Siglas en inglés de red, green, blue, en español: rojo, verde y azul
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer (inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
RUV	Radiación ultravioleta
RUV-B	Radiación ultravioleta tipo B
SFB	Suero fetal bovino
T <sub>m</sub>	Temperatura media de alineación
UV	Ultra violeta
UV-B	Ultra violeta tipo B
V	Verbascósido
V+RUV	Verbascósido e irradiado con radiación ultravioleta
λ <sub>max</sub>	Longitud de onda máxima
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micro molar

### **Abreviaturas histológicas**

A	Atrofia
AN	Angiogénesis
AP	Apoptosis
AT	Atrofia
CM	Células en mitosis
CP	Células pleomórficas
D	Dermis
DP	Dermis papilar
DR	Dermis reticular
EC	Estrato córneo
ED	Edema
EP	Epidermis
ER	Eritrocitos

ES	Espongiosis
F	Folículo piloso
GS	Glándula sebácea
H	Hipodermis
HP	Hiperplasia
HQ	Hiperqueratosis
HT	Hipertrofia
M	Mastocitos
MB	Membrana basal
N	Necrosis
NE	Neutrófilos
NP	Núcleos picnóticos
PE	Perlas de queratina
PQ	Paraqueratosis
Q	Quiste
QU	Queratinocitos
VS	Vaso sanguíneo
FC	Fibras de colágena

## 1. Resumen

La piel es el órgano más grande del cuerpo y una de sus funciones es proteger a los organismos de diversos agentes ambientales, como la radiación ultravioleta (RUV) que es uno de los principales factores etiológicos implicados en el desarrollo de cáncer de piel. Las estrategias para reducir los efectos adversos de la RUV incluyen el uso de sustancias fotoprotectoras de origen vegetal como el verbascósido, que es un glucósido fenil propanoide obtenido de diversas especies vegetales, entre las que destaca el género *Buddleja*.

Después de obtener el extracto metanólico de *B. cordata* y aislar el verbascósido, se evaluaron los efectos citotóxicos y fotoprotectores de ambos en la línea celular HaCaT. Posteriormente se evaluó el efecto fotoprotector de ambas sustancias en piel de ratones SKH-1 irradiados con RUV de forma aguda (una sola dosis de RUV) y crónica (seis meses de exposición a RUV). Los compuestos se aplicaron de forma tópica en el dorso de los ratones previo a ser expuestos a la RUV. Las zonas expuestas se valoraron macroscópicamente y microscópicamente. La cantidad de EMBC y de verbascósido que penetraron el estrato córneo de los ratones se evaluó por medio de la técnica *in vivo* de extracción con cinta. Por último, se llevaron a cabo experimentos para determinar el patrón diferencial de proteínas y la identificación de mutaciones en regiones conocidas de p53 por efecto de la RUV.

Los experimentos con células HaCaT demostraron que tanto el EMBC como el verbascósido no son sustancias citotóxicas y presentaron efecto fotoprotector contra la RUV.

El experimento de fotoprotección agudo con ratones SKH-1, mostró que el 100% de los ratones no protegidos y que fueron irradiados tuvieron signos de eritema de forma macroscópica y un proceso inflamatorio en el ámbito microscópico. Los ratones protegidos con EMBC y/o verbascósido presentaron características de piel normal, tanto macroscópica como microscópicamente. En el experimento crónico los ratones irradiados con RUV sin protección presentaron fotoenvejecimiento y neoplasias malignas. En los animales a los que se aplicó el EMBC o el verbascósido previo a la RUV, la presencia de lesiones disminuyó un 66% y 60%

respectivamente. En ambos tratamientos sólo una lesión se diagnosticó como neoplasia maligna.

A nivel molecular se demostró que existe un patrón característico de proteínas cuando la piel no se expone a la RUV. Este patrón desaparece en el grupo sin protección e irradiado, y se recupera parcialmente en las muestras de piel que fueron protegidas con las sustancias, lo cual indica que existe una expresión diferencial de proteínas. El análisis de curvas de alta resolución (PCR-HRM) mostró que existen variaciones significativas entre las  $T_m$  de los grupos sin protección a la RUV y aquellos protegidos o no irradiados, lo cual indica que existió una disminución en el número de mutaciones causadas por la RUV, a lo largo de las regiones del gen p53 analizadas.

La aplicación tópica del verbascósido y del EMBC en la piel de ratones SKH-1 previo a ser expuestos a la RUV, tuvo un efecto fotoprotector ya que disminuyeron los daños histológicos y moleculares ocasionados por ésta. Se sugiere que ambos compuestos pueden prevenir los daños a nivel tisular y molecular por la exposición a la RUV de forma aguda y crónica.

## 1. Abstract

Ultraviolet radiation (RUV) is involved in both sunburn and the development of skin cancer, which is a high incidence disease worldwide. Strategies to reduce these effects include the use of photoprotective substances. The aim of this work was to investigate the photoprotective effect of verbascoside isolated from the methanolic extract of *Buddleja cordata* (EMBC).

Cytotoxicity of the compounds was evaluated in a HaCaT cell cultures through MTT and flow cytometry; the results showed that that BCME and verbascoside are not cytotoxic.

A photoprotection assay was performed on SKH-1 mice exposed to acute and chronic UV-B radiation and protected with verbascoside or EMBC. The mice dorsal area was evaluated macroscopically and microscopically for histological diagnosis. Verbascoiside and EMBC penetration into mouse skin was investigated *in vivo* by the tape stripping method. After acute RUV-B exposure, 100% of irradiated mice that had been protected with verbascoside or EMBC showed no signs of sunburn or inflammatory processes. Chronic exposure, 100% of unprotected mice showed skin carcinomas; in contrast, lesions in mice topically treated with either BCME or verbascoside, decreased by 90%.

At the molecular level, a characteristic pattern of proteins was found when the skin was not exposed to RUV; after irradiation his pattern disappears in the unprotected and group, and was partially recovered in samples from protected skin, which indicates a differential protein expression. PCR-HRM analysis also showed that there are significant differences in the dissociation curves ( $T_m$ ), among unprotected and protected groups, suggesting decrease in the number of mutations caused by RUV throughout the analyzed regions of the p53 gene.

In conclusion these results prove that EMBC or verbascoside may potentially prevent photodamage on mice's skin after acute or chronic UVR exposure.

## **2. Introducción.**

La piel es el órgano más grande del cuerpo y una de sus funciones es ser una barrera de protección contra diversos factores físicos, ambientales y biológicos potencialmente dañinos para los organismos (Randhawa et al., 2013). Uno de estos factores es la radiación ultravioleta (RUV) que proviene del Sol y llega a la superficie terrestre. La RUV se divide, según su longitud de onda, en UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) y UVA (320-400nm). Las longitudes de onda menores a 280 nm (UVC) no llegan a la superficie terrestre y sólo la alcanzan la UVA (≈95%) y la UVB (≈5%). Estas radiaciones interactúan con las moléculas que conforman la piel, principalmente con aquellas que en su estructura presentan sistemas de ligaduras conjugadas, ya que absorben la RUV. A estas sustancias se les denomina cromóforos (Maverakis et al., 2010). Cuando los cromóforos absorben la energía entran en un estado de excitación que puede generar un cambio químico en la estructura de la molécula (Grujil el al., 2001).

La exposición a la RUV se puede dividir en aguda (una sola exposición) y crónica; en consecuencia se distinguen dos tipos de efectos por acción de la RUV en la piel, que del mismo modo se consideran agudos y crónicos. Estos dependerán de la longitud de onda, la penetración en la piel y, sobre todo, del tiempo de exposición a la RUV (Kullavanijaya y Lim, 2005).

Los efectos agudos incluyen: fotodermatitis, inmunosupresión, hiperplasia y quemadura solar (QS) que implica eritema, edema, formación de vesículas y dolor; posteriormente aparece la descamación y desprendimiento de la piel. Por lo tanto, la QS se asocia con los signos clásicos de la inflamación: enrojecimiento, calor, dolor y tumefacción (Kullavanijaya y Lim, 2005; Tedesco et al., 1997).

Los efectos crónicos asociados a la RUV son el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis. El primero se caracteriza por la reducción de los niveles de colágeno, degradación de la red elástica y la pérdida de hidratación. A este conjunto de fenómenos se le conoce como elastosis (Uitto, 2008). El proceso de fotocarcinogénesis es un fenómeno complejo que implica tres etapas distintas: iniciación, promoción y progresión. Cada una de ellas está mediada por diversos cambios celulares, bioquímicos y moleculares que inician con alteraciones

genéticas y la fijación de la mutación, alteraciones del ciclo celular que llevarán a la formación de un tumor maligno, invasivo y potencialmente metastásico (Afaq et al., 2005; Matsumara y Ananthaswamy, 2004).

El cáncer de piel se puede diferenciar en función del tipo celular implicado: los melanomas (CM), cuando las células transformadas son melanocitos y es considerado el más agresivo; y los no melanómicos (CNM), en los que el tumor se origina en los queratinocitos. El CNM se divide en dos tipos: carcinomas de células basales (CCB) y de células escamosas (CCE). Ambos presentan bajas tasas de mortalidad y de metástasis, pero son los más frecuentes y pueden dar lugar a la destrucción del tejido adyacente (Hong et al., 2008; Afaq y Mukhtar, 2006).

En los últimos años, algunos compuestos de origen natural y sintético han ganado una considerable atención como agentes fotoprotectores. La utilización de filtros solares preparados o suplementados a partir de productos naturales es una opción para el cuidado de la piel que evita, e incluso repara, el posible daño ocasionado por la RUV (Afaq, 2011).

Se ha demostrado que algunas sustancias producidas por las plantas -como los fenilpropanoides- tienen la capacidad de absorber la RUV debido a los grupos cromóforos presentes en sus estructuras químicas (Kostyuk et al, 2008). Un ejemplo de posible fotoprotector vegetal es el verbascósido, compuesto aislado de diferentes plantas, entre las que destaca el género *Buddleja* (Adedapo et al., 2009; Avila et al., 2005).

Se han reportado diversas actividades biológicas del verbascósido, entre las que destacan la antioxidante y la fotoprotectora. Debido a su estructura este compuesto absorbe luz en la región de la RUV, por lo que es considerado un cromóforo a ésta (Kostyuk et al, 2008; Avila et al., 2005; Esposito et al., 2010; Kostyuk et al., 2013; Alipieva et al., 2014).

En este trabajo se evaluó el posible efecto citotóxico del extracto metanólico *Buddleja cordata* (EMBC) y de uno de sus compuestos, el verbascósido en la línea celular HaCat. Se diagnosticó la actividad fotoprotectora de las sustancias, tanto por exposición aguda como crónica a la UV-B en piel de ratones SKH-1, y se

determinó si existe un patrón diferencial de proteínas con electroforesis 2D y de mutaciones en regiones conocidas del gen p53 por medio de PCR-HRM, para finalmente correlacionar todos los resultados e identificar si el EMBC y el verbascósido presentaron propiedades fotoprotectoras y la capacidad de disminuir o inhibir los daños histológicos y moleculares producidos por la RUV.

### **3. Marco Teórico.**

#### **3.1 La piel.**

La piel es un órgano de protección que recubre órganos y tejidos y puede ser el sitio en que se expresan enfermedades internas. Desempeña una amplia variedad de funciones, incluyendo la protección frente a agresiones externas, la termorregulación, la impermeabilización, la absorción de la radiación ultravioleta, la producción de vitamina D, la protección contra microorganismos patógenos, la defensa inmunológica y la detección de estímulos sensoriales (Arenas, 2013; Ferrándiz, 2009).

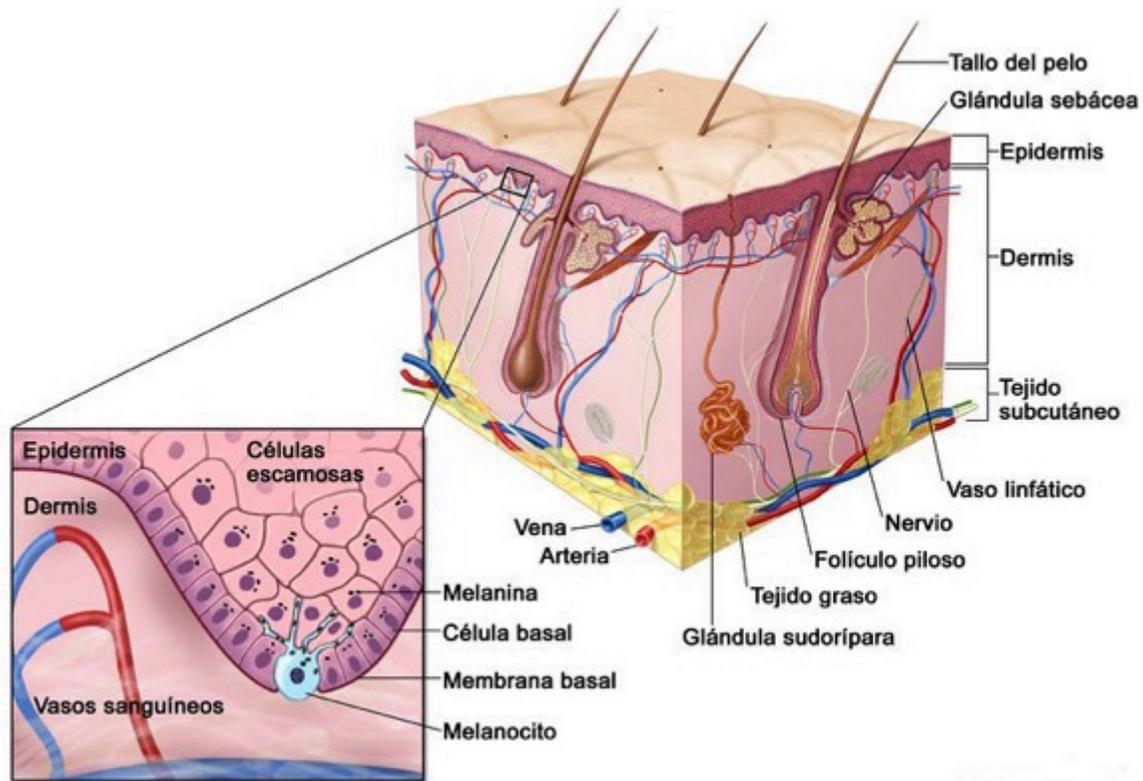
##### **3.1.1 Constitución química y anatómica.**

La piel está conformada en un 70% de agua; minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro; carbohidratos como la glucosa; lípidos de los que sobresale el colesterol; proteínas como colágeno y queratina (Arenas, 2013).

Un individuo promedio está cubierto de 1.85 m<sup>2</sup> de piel, que pesa alrededor de 4 Kg y un volumen de 4000 cm<sup>3</sup> con un espesor promedio de 2.2 mm, lo cual equivale al 6% del peso corporal. La piel presenta más de 2.5 millones de orificios pilocebáceos, los pliegues losángicos, y en las palmas y plantas las crestas epidérmicas, llamadas dermatoglifos, que permanecen invariables toda la vida. Las faneras o anexos de piel son el pelo corporal, la piel cabelluda y las uñas. La piel es más gruesa en palmas y plantas, más fina en pliegues y más gruesa en el hombre que en la mujer (Magaña y Magaña, 2003; Iglesias et al., 2004).

La piel está constituida por varios componentes tisulares que se interconectan anatómicamente e interactúan funcionalmente; estos son epiteliales, mesenquimáticos (tejido conectivo laxo rico en colágeno y fibroblastos), glandulares y neurovasculares, por lo que la piel es mucho más que una envoltura inerte del cuerpo. Puede impedir que se produzca daño en los tejidos subyacentes causado por estímulos externos como las radiaciones ultravioleta en virtud del pigmento que contiene (melanina), así como de fuerzas mecánicas, por el tejido adiposo y conectivo que actúan como una almohadilla sobre los músculos y huesos (Rodón et al., 2001).

La piel humana no es homogénea y está formada desde el punto de vista embrionario por tres capas. La más externa y visible es la epidermis, posteriormente se encuentra la dermis y finalmente la hipodermis o tejido celular subcutáneo (Ferrándiz, 2009) (Fig. 1).



**Figura 1.** Estructura de la piel (imagen recuperada de: INC).

### **3.1.2 Embriogénesis.**

Desde el punto de vista embrionario, la piel se deriva del ectodermo y del mesodermo. Del ectodermo se origina la epidermis y los anexos cutáneos. Por su parte, del mesodermo se origina el tejido conjuntivo de la dermis, como las fibras de colágena, los fibroblastos, el músculo piloerector, vasos sanguíneos, células de Langerhans, mastocitos e histiocitos. Los nervios y los melanocitos se consideran de origen neuroectodérmico al derivar de la cresta neural (Amado, 2001; Ferrándiz, 2009; Arenas 2013) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Origen embrionario de los componentes de la piel.

<b>Ectodermo</b>	<b>Mesodermo</b>
Epidermis	Dermis
Queratinocito	Fibras de colágena, elásticas y reticulares
Folículo piloso	Células de Langerhans
Glándulas sebáceas	Músculo erector del pelo
Glándulas sudoríparas	Vasos sanguíneos
Uñas	Fibroblastos, mastocitos, histiocitos
	Células de Merkel (origen incierto)
	Melanocito (cresta neural, origen neuroectodérmico)
	Nervios (origen neuroectodérmico)

### 3.1.3 Histología.

Aunque todos los elementos de la piel varían según su topografía, en promedio en un centímetro cuadrado de piel encontramos cinco folículos pilosos, quince glándulas sebáceas, cien sudoríparas, cuatro metros de nervios, un metro de vasos sanguíneos, y con respecto a los melanocitos, estos varían en número dependiendo de la zona del cuerpo (Magaña y Magaña, 2003).

La piel puede dividirse en tres capas desde el punto de vista histológico: epidermis, dermis e hipodermis o tejido celular subcutáneo. Cada una de ellas está formada por diferentes tipos celulares, estratos y anexos cutáneos. Bajo la hipodermis se encuentran la aponeurosis, vainas tendinosas y los huesos (Iglesias et al., 2004; Arenas, 2013) (Fig. 1). La tabla 2 muestra las diferentes capas y estratos en las que se divide a la piel:

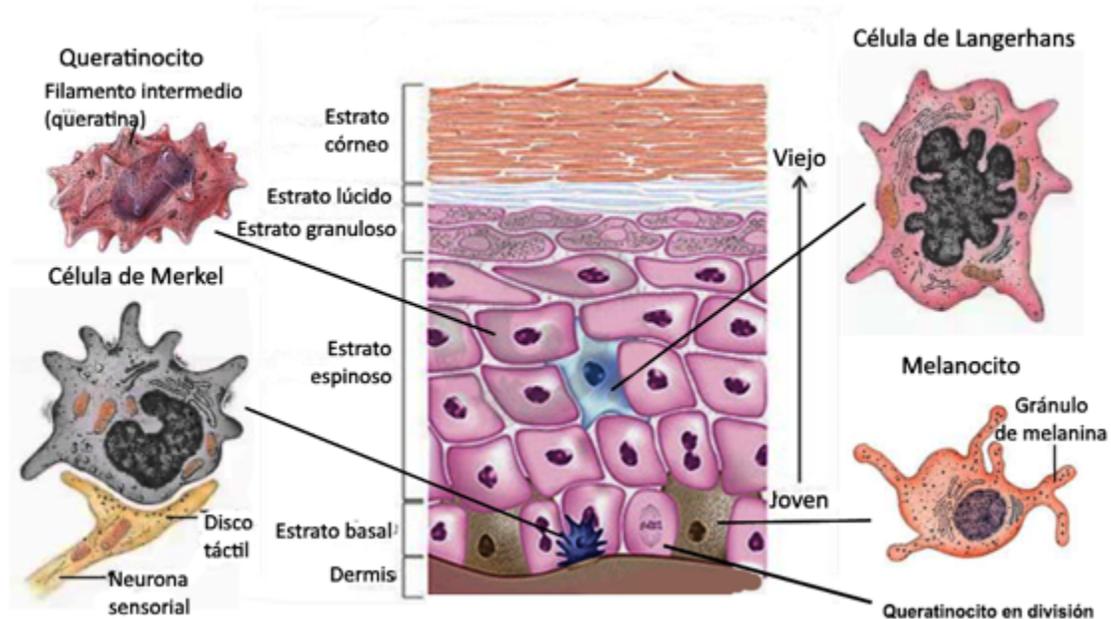
**Tabla 2. Capas en las que se divide la piel desde el punto de vista histológico (Arenas 2013).**

<b>Capa de la piel</b>	<b>Estrato</b>
<b>Epidermis</b>	Córneo
	Granuloso
	Espinoso o de Malpighi
	Basal o germinativo
<b>Lámina basal</b>	
<b>Dermis</b>	Papilar
	Reticular
	Profunda
<b>Hipodermis</b>	

### **3.1.3.1 Epidermis.**

La epidermis es el epitelio escamoso plano poliestratificado queratinizado que cubre completamente la superficie corporal. Su grosor varía de 0.4 a 1.5 mm y puede ser considerada como la capa más dinámica del organismo, el cual recibe soporte y nutrición a través de la dermis. Histológicamente, la epidermis consta de cuatro tipos celulares: los queratinocitos, que es el tipo celular más abundante; los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans.

Este órgano presenta cuatro estratos claramente diferenciados formados por los queratinocitos epidérmicos y son: el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo. Además, en algunas partes del cuerpo -como palmas y plantas- se presenta el estrato lúcido, situado entre el estrato granuloso y el córneo. Cabe mencionar que estos estratos son el resultado de la diferenciación de queratinocitos desde el estrato basal hasta el estrato córneo, donde se encuentran finalmente diferenciados o muertos (Magaña y Magaña, 2003; Chu et al., 2013) (Fig. 2).



**Figura 2. Estratos que conforman a la epidermis. Se pueden diferenciar los diferentes estratos y formas celulares. (Recuperado de: ISSN 2386-7671).**

**a) Estrato basal o germinativo.**

El estrato basal o germinativo está formado por una sola hilera de células cuboidales, unidas entre sí por desmosomas, sobre los que se insertan los tonofilamentos de queratina. Se encuentra sobre la membrana basal unida a ella por hemidesmosomas. Los queratinocitos presentan un solo núcleo con cromatina dispersa, por lo que el nucléolo puede ser visible. Es la capa germinativa de la epidermis, por lo que aproximadamente el 50% de la población celular se encuentra en división (Iglesias et al., 2004; Ferrándiz, 2009) (Fig. 2).

**b) Estrato espinoso o de Malpighi.**

El estrato espinoso presenta de 3 a 10 hileras de células poligonales que se van aplanando hacia la superficie. Estas capas de queratinocitos están unidas entre sí por desmosomas y se denominan así por el aspecto que presentan estas uniones. Después del estrato basal es la siguiente capa hacia la superficie y contiene a las células en proceso de crecimiento que inician con la síntesis de queratina. El estrato espinoso contiene, además, estructuras ovales laminadas que se conocen

como gránulos lamelares o cuerpos de Odland (Arenas, 2013; Chu, et al., 2013) (Fig. 2).

#### **c) Estrato granuloso.**

El estrato granuloso se compone de 1 a 4 hileras de células aplanadas, que debido al proceso de queratinización presentan gránulos de queratohialina, consistentes en partículas amorfas no recubiertas de membrana precursoras de la queratina. Conforme los gránulos crecen las células se vuelven planas y mueren, pero se mantienen estrechamente unidas (Iglesias et al., 2004) (Fig. 2).

#### **d) Estrato lúcido**

El estrato lúcido sólo se presenta en piel muy gruesa, como la de palmas de las manos y plantas de los pies. Está formado por células planas y muertas con citoplasma claro de apariencia homogénea (Amado, 2001).

#### **e) Estrato córneo.**

El estrato córneo se compone de 15 a 25 células aplanadas y desprovistas de núcleos; presenta restos celulares aplanados, fusiformes, compuestos principalmente de queratina en forma de tonofibrillas embebidas en una matriz amorfa y se caracterizan por el engrosamiento de la membrana citoplasmática. A estas células plenamente diferenciadas se les conoce como corneocitos. Los espacios intercelulares contienen un material lipídico, derivado probablemente de los cuerpos de Odland, que funciona como cemento intercelular. Los tonofilamentos y los gránulos de queratohialina están compuestos en su mayoría por proteínas ricas en histidina (profilagrinas), mientras que los cuerpos de Odland contienen grandes cantidades de lípidos y enzimas. Este estrato confiere a la piel protección mecánica y es una barrera contra los microorganismos, la pérdida de agua y la penetración de sustancias nocivas provenientes del medio ambiente (Chu et al., 2013; Ferrándiz, 2009) (Fig. 2).

### **3.1.3.2 Tipos celulares de la epidermis.**

#### **a) Queratinocitos.**

El queratinocito es la célula fundamental epidérmica, y representa el 80% de las células que componen la epidermis. Se denominan así por los filamentos de queratina, que agrupados en haces (tonofilamentos), llenan completamente el citoplasma de las células en los estratos más superficiales de la piel. Los queratinocitos tienen diversas funciones, entre las que destacan la protectora y la inmunitaria, pues son capaces de sintetizar varias citosinas como IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF) en respuesta a diversos estímulos (Iglesias et al., 2004).

La epidermis se regenera mediante una población de células con gran actividad mitótica situada en la capa basal. Los queratinocitos basales son células cilíndricas o cuboideas dispuestas en una sola hilera que asientan en una sola membrana basal. Estas células tienen el citoplasma basófilo con núcleo grande y nucléolo evidente. Su citoplasma contiene pigmento melánico traspasado de los melanocitos vecinos. Solo el 17% de las células basales tienen capacidad de división, constituyendo la población activa, pero estas no se distribuyen de manera uniforme, sino que se localizan fundamentalmente en los extremos de las crestas y son menos numerosas sobre las papilas dérmicas. En el proceso de maduración, estas células se hacen más grandes y eosinófilas, adquieren más citoplasma, aumentan sus filamentos intracitoplasmáticos, se aplanan y se orientan paralelamente a la superficie. En los estratos epidérmicos más superficiales los queratinocitos maduran hasta adquirir gránulos basófilos en el citoplasma y los gránulos de queratohialina característicos de la capa granular (Ferrándiz, 2009) (Fig. 2).

La diferenciación celular de los queratinocitos termina en el estrato córneo con la muerte celular y la queratinización, formando los corneocitos y culminando con la descamación de la superficie cutánea. Todo el proceso tiene lugar en aproximadamente dos meses (Iglesias et al., 2004; Chu et al., 2009).

## **b) Células de Merkel**

Las células de Merkel se encuentran presentes en la capa basal de la epidermis, especialmente en los labios, la cavidad oral, la vaina epitelial externa del folículo piloso y forman parte de los llamados discos táctiles de la dermis. En la epidermis se asocian con terminaciones nerviosas intraepidérmicas y en la dermis se encuentran vinculadas con las células de Schwann correspondientes a fibras mielínicas implicadas en la percepción táctil (Ferrándiz, 2009).

Las células de Merkel no se distinguen en las preparaciones histológicas habituales, por lo que sus características se han descrito mediante microscopía electrónica. Presentan un citoplasma escaso, uniones desmosómicas con los queratinocitos vecinos y núcleo invaginado. En el citoplasma existen filamentos de citoqueratina situados en el área perinuclear y gránulos densos rodeados de membrana. Estos gránulos, de características neurosecretoras, suelen verse en uno de los polos de la célula, que a veces está en contacto con un axón. La presencia de citoqueratinas apoya el origen epitelial de estas células, lo cual es discutido. La función de las células de Merkel está relacionada con los mecanorreceptores, aunque en el ser humano parecen contribuir poco a la capacidad sensorial (Iglesias et al., 2004; Chu, et al., 2013) (Fig. 2).

## **c) Células de Langerhans**

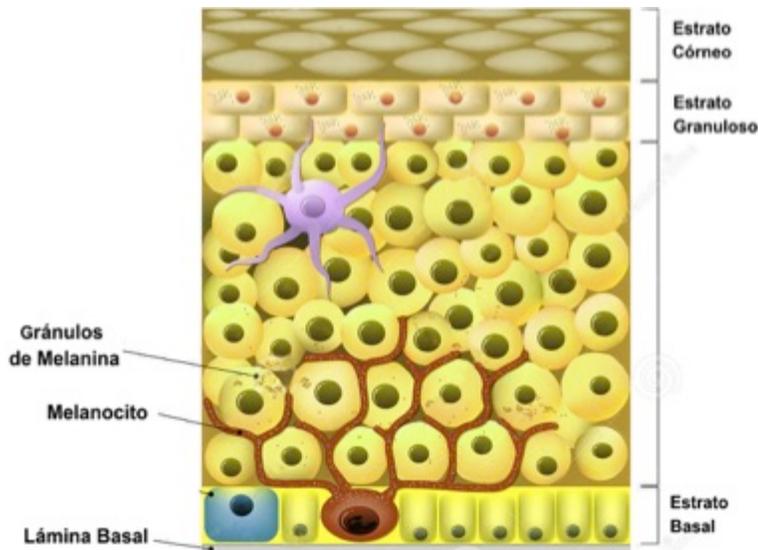
Las células de Langerhas representan del 2 al 8% de la epidermis. Son de tipo dendrítico y están presentes en las capas suprabasales de la epidermis, aunque también pueden encontrarse en la dermis. Presentan una forma irregular con largas prolongaciones dendríticas que se extienden entre los queratinocitos. Tienen un papel fundamental como células presentadoras del antígeno a los linfocitos T en la respuesta inmunológica cutánea y se identifican mediante tinciones inmunohistoquímicas por la presencia de ATPasa y con técnicas que permiten detectar la presencia de las proteínas CD1a, CD4, HLA-DR, receptores para IgG y para los componentes C3 del sistema de complemento inmune. En microscopía electrónica se pueden distinguir de los queratinocitos por carecer de

desmosomas y tonofilamentos; y de los melanocitos, por no presentar melanosomas (Chu et al., 2013; Modlin et al., 2013).

Las células de Langerhans presentan un núcleo lobulado y un citoplasma claro que contiene los gránulos de Birbeck en forma de bastones o raquetas. Las funciones de estas células se ven disminuidas por la exposición a la RUV. (Ferrándiz, 2009; Chu et al., 2013) (Fig. 2).

#### **d) Melanocitos**

Los melanocitos son células dendríticas derivadas de la cresta neural que se localizan exclusivamente a lo largo de la capa basal de la epidermis. Los melanocitos aparecen como células claras a la tinción con hematoxilina-eosina; se distinguen por su núcleo ovalado, denso e hipercromático rodeado de un halo claro y su citoplasma contiene melanina, que se identifica mediante técnicas de tinción argéntica, como la reacción de Fontana-Masson o mediante la reacción de la dioxifenilalanina (DOPA). Los gránulos de melanina se transfieren mediante los procesos dendríticos a los queratinocitos adyacentes, donde son fagocitados activamente. El conjunto de queratinocitos relacionado con un melanocito se denomina unidad melanocitaria epidérmica, y la proporción es constante: un melanocito por cada cuatro o diez queratinocitos basales. Además de servir como colorante de la piel y el pelo, la melanina protege a los queratinocitos de la epidermis y las estructuras subyacentes de la acción de la radiación ultravioleta. En microscopio electrónico se puede observar que los melanocitos carecen de tonofilamentos y desmosomas y que su citoplasma contiene unos gránulos electrodensos característicos llamados melanosomas, en los que se lleva a cabo la síntesis de melanina. Los melanosomas son ricos en tirosina y se originan en el aparato de Golgi. Tienen una morfología oval y una estructura interna laminada en las primeras fases de su formación que deja de evidenciarse con la acumulación de pigmento en los melanosomas maduros (Amado, 2001; Iglesias et al., 2004; Ferrándiz, 2009; Young y Yaar, 2013) (Fig. 3).



**Figura 3. Estructura de los melanocitos y distribución de la melanina.**

La síntesis de melanina es un proceso complejo mediado por la tirosinasa para la conversión de la tirosina en dioxifenilalanina (DOPA) y posteriormente en melanina. Existen dos tipos de pigmentos melánicos en el ser humano: la eumelanina que es de color marrón o negro e insoluble y la feomelanina de color amarillo o rojo, contiene azufre y es soluble. La función de la melanina es proteger de los efectos dañinos de las radiaciones ultravioleta, controla la síntesis de vitamina D y la termorregulación local (Amado, 2001; Park y Yaar, 2013).

El color de la piel no depende del número de melanocitos, sino de la cantidad, tamaño y distribución de los melanosomas acumulados en el citoplasma de los queratinocitos. Con la edad va disminuyendo la población de melanocitos y por lo tanto aumenta el riesgo de los daños producidos por la radiación ultravioleta, como la carcinogénesis actínica (Iglesias et al., 2004; Ferrándiz, 2009).

#### **e) Estructuras de unión: Desmosomas**

Las células epidérmicas están unidas entre sí mediante desmosomas, que están constituidos por diferentes componentes: filamentos de queratina, plaquitas y desmogleínas. La adhesión en la epidermis depende en gran parte de los desmosomas, cuya morfología distintiva fue definida mediante microscopía

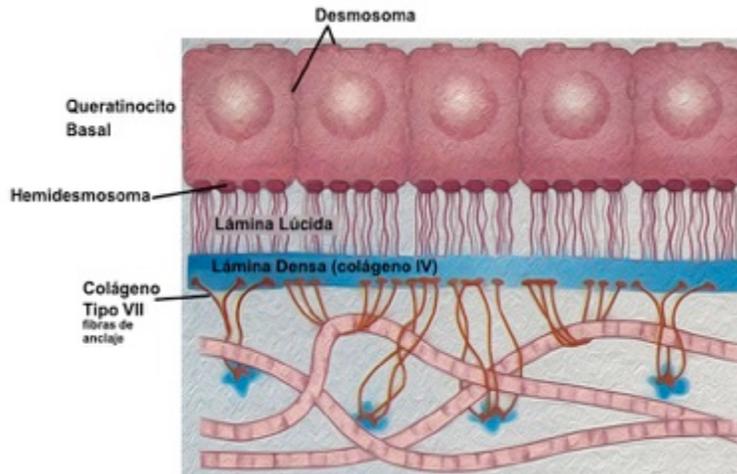
electrónica. Las membranas plasmáticas de las células adyacentes están separadas por una estructura denominada desmoglea, mientras que en el lado citoplasmático de la membrana existen placas densas en las que se insertan los tonofilamentos, formando un asa que interconecta los desmosomas y contribuye a mantener la integridad estructural de los queratinocitos a pesar de las agresiones mecánicas del ambiente (Ferrándiz, 2009) (Fig. 4).

### **3.1.3.3 Unión dermoepidérmica o lámina basal.**

La unión dermoepidérmica tiene un grosor aproximado de 100 nm y es la región que se encuentra entre la epidermis y la dermis generando la cohesión y la resistencia a las fuerzas de tracción cutánea. También determina la polaridad del crecimiento, dirige la organización del citoesqueleto en las células basales, produce señales de desarrollo y cumple funciones de barrera semipermeable. Con el microscopio electrónico la unión dermoepidérmica se ve constituida por cuatro zonas: 1) la membrana citoplasmática de las células basales, 2) la lámina lúcida, 3) la lámina basal y 4) la zona fibrosa o lámina densa. En las células basales se observan los hemidesmosomas, que unen a la epidermis a la lámina densa a través de los filamentos de anclaje. La lámina densa está compuesta por colágeno tipo IV y se une a la dermis mediante fibras de anclaje constituidas por colágeno tipo VII (Iglesias et al., 2004; Chu et al., 2013) (Fig. 4).

La membrana basal propiamente dicha se tiñe mediante la técnica de ácido periódico de Schiff (PAS), lo que permite la visualización en microscopía óptica, pero en microscopía electrónica se aprecian las cuatro zonas.

En la unión dermoepidérmica se ha identificado un gran número de moléculas como los antígenos de penfigoide ampollar BP230 y BP180, cuya interacción contribuye al anclaje del citoesqueleto de queratina a la superficie celular en el hemidesmosoma (Chu et al., 2013) (Fig 4).



**Figura 4. Estructura de la unión dermoepidérmica. (Modificado de Iglesias et al., 2004).**

### **3.1.3.4 Dermis.**

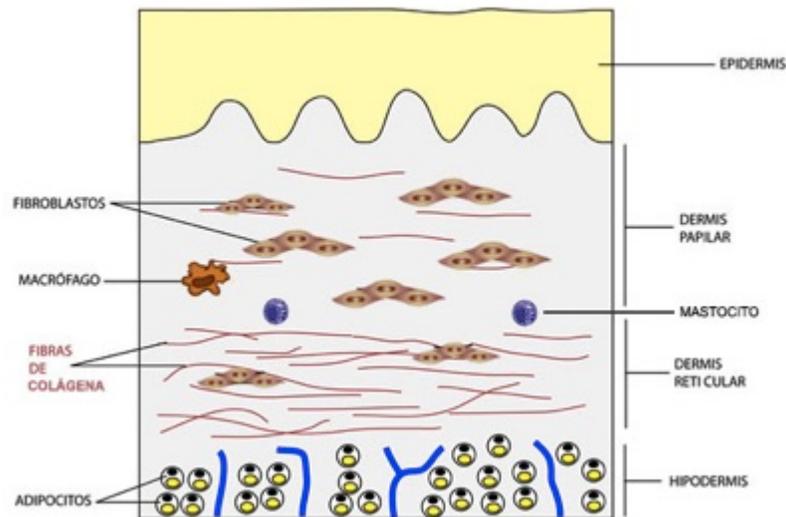
La dermis es la estructura de soporte de la piel. Es un tejido de tipo fibroelástico constituido por fibras de colágena (tipo I y III), fibras elásticas, fibras reticulares, sustancia fundamental (compuesta principalmente de mucopolisacáridos) y presenta varios tipos celulares: los fibroblastos -el componente celular principal- células inflamatorias, como histiocitos, mastocitos, polimorfonucleares, eosinófilos y plasmocitos. El espesor de la dermis es de 10 a 30 veces mayor que la epidermis, pues en ella se encuentran los anexos cutáneos, vasos y nervios (Magaña y Magaña, 2003; Chu et al., 2013) (Fig. 5).

La dermis brinda soporte, plegabilidad, elasticidad y resistencia a la tracción; protege al cuerpo de las agresiones mecánicas; fija el agua; participa en la regulación térmica y tiene receptores de estímulos sensitivos. Se pueden distinguir dos capas en la dermis: la dermis papilar y la dermis reticular diferenciadas por la organización del tejido conjuntivo, la densidad celular y los patrones nerviosos y vasculares (Arenas, 2013; Chu et al., 2013) (Fig. 5).

#### **a) Dermis papilar.**

La dermis papilar comprende la región subepidérmica que rodea a los anexos (dermis parianexial) y su espesor no supera el doble de la epidermis. Microscópicamente las fibras elásticas (de elastina) son delgadas y

perpendiculares a la superficie cutánea y hay abundantes capilares. En la dermis papilar se encuentra colágeno tipo I y algunas fibras del tipo III y las fibras elásticas se identifican mediante técnicas especiales de tinción (Ferrándiz, 2009; Chu et al., 2013) (Fig. 5).



**Figura 5. Estructura y tipos celulares de la dermis. Dermis papilar y dermis reticular. (Modificado de Ferrándiz, 2009).**

### **b) Dermis reticular.**

La dermis reticular es llamada así por la disposición entrelazada de las fibras de colágeno, que representa un 75% del peso seco de la piel y le proporciona resistencia a la tensión y elasticidad. Los colágenos más abundantes son el tipo I, con un 80 al 90%, que forma fibras más gruesas, más profundas, dispuestas apretadamente y paralelas a la superficie cutánea; el tipo III, con un 8 al 12%, y el tipo V que representa menos del 5% del colágeno total de la dermis (Magaña y Magaña, 2003; Iglesias et al., 2004; Ferrándiz, 2009; Arenas, 2013; Chu et al., 2013) (Fig. 5).

### **3.1.3.5 Tipos celulares y fibras de la dermis.**

#### **a) Tipos celulares.**

El componente celular principal de la dermis es el fibroblasto, responsable de la síntesis y degradación de elementos fibrosos de la dermis como el colágeno y la elastina. Los fibroblastos presentan forma alargada, de bordes distinguibles, núcleos fusiformes, situados entre los haces de colágeno. Otro tipo celular son los monocitos y macrófagos, que pueden ser fijos y libres. Este tipo celular fagocita y participa en funciones inmunitarias presentando antígenos a los linfocitos. En cantidad mucho menor se encuentran las células de Langerhans, que al igual que en la epidermis tienen función inmunitaria. Alrededor de los vasos se pueden observar mastocitos, células que participan en fenómenos inflamatorios mediante la liberación de mediadores químicos como la histamina y heparina, presentes en su citoplasma y que pueden observarse con la tinción de Giemsa. Por último y en menor número, se encuentran los polimorfos nucleares, eosinófilos y plasmocitos (Amado, 2001; Iglesias et al., 2004; Chu et al, 2013) (Fig. 5).

#### **b) Colágeno**

El colágeno es una proteína sintetizada por el fibroblasto. Existen 17 diferentes tipos de colágeno en relación con la morfología, la composición de aminoácidos y las propiedades físicas. En la dermis se encuentra principalmente el de tipo I, tipo III y en menor medida la de tipo IV, V y VI. El colágeno tipo III se identifica sólo con tinciones argirófilas y se encuentra situado inmediatamente por debajo de la membrana basal epidérmica. El colágeno tipo VI está asociado con las fibrillas y se encuentra en el espacio interfibrilar. El colágeno tipo IV es exclusivo de la membrana basal, los vasos y los apéndices de la epidermis. El colágeno tipo VII forma fibras de anclaje a nivel de la unión dermoepidérmica. Son las fibras que predominan en la vida fetal y pueden aumentar en los adultos en condiciones patológicas (Iglesias et al., 2004; Ferrándiz, 2009; Chu et al., 2013).

#### **b) Fibras elásticas.**

La red de fibras elásticas representa del 2 al 4% de los constituyentes de la dermis. Está compuesta por tres tipos de fibras: oxitalán, elaunina y elastina

dispuestas en tres capas interconectadas. Las fibras de oxitalán se sitúan en la dermis papilar, de forma perpendicular a la unión dermoepidérmica. Las fibras de elaunina se encuentran en la dermis papilar, que corre paralelo a la unión dermoepidérmica. Las de elastina están situadas en la dermis reticular y forman una estructura tridimensional que se extiende hacia abajo hasta el tejido subcutáneo (Iglesias et al., 2004).

### **c) Sustancia fundamental**

La sustancia fundamental de la dermis rellena los espacios entre fibras y células. Está compuesta principalmente por mucopolisacáridos, agua, sales y glucoproteínas. Los mucopolisacáridos mantienen el balance de sal y agua de la dermis. Son de tipo ácido, predominantemente ácido hialurónico, y en menor medida condroitín sulfato y dermatán sulfato. En preparaciones histológicas habituales la sustancia fundamental aparece como espacios vacíos entre los haces de colágeno. Para poder verla se necesitan tinciones especiales como la de hierro coloidal y el azul de alcian (Iglesias et al., 2004; Ferrándiz, 2009).

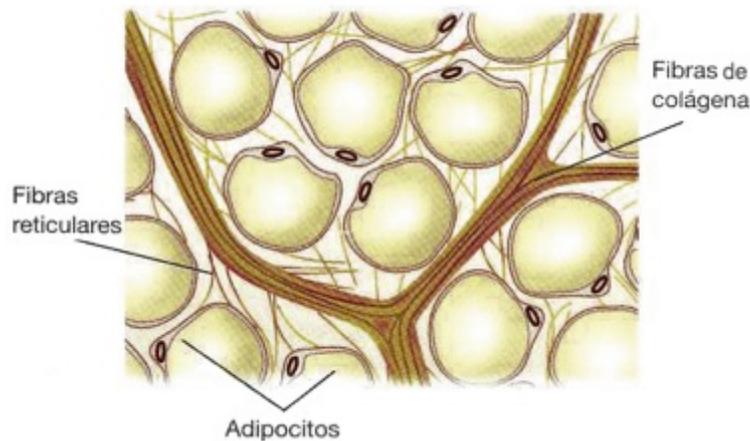
#### **3.1.3.6 Anexos cutáneos.**

Los anexos cutáneos se originan de células epidérmicas de la capa basal que se introducen en la dermis. Comprenden a los folículos pilosos, glándulas sudoríparas, sebáceas, ecrinas y apócrinas; vasos, nervios y uñas. La unidad papilar está compuesta por el folículo piloso, el músculo erector del pelo, la glándula sebácea y, cuando está presente, la glándula apócrina (Iglesias et al., 2004, Ferrándiz, 2009).

#### **3.1.3.7 Hipodermis.**

La hipodermis, también conocida como tejido subcutáneo, está formada por lóbulos de tejido adiposo maduro de forma redonda con el núcleo desplazado a la periferia separados por “tabiques” conjuntivos finos que forman los septos interlobulares. Los septos interlobulares son una continuación del tejido conjuntivo de la dermis reticular y por ello presentan vasos y nervios. El tipo celular característico son los adipocitos y cuando maduran son células de acumulación de

lípidos cuyo núcleo se encuentra comprimido contra la membrana citoplasmática. (Iglesias et al., 2004; Chu et al., 2013; Magaña y Magaña, 2003) (Fig. 6).



**Figura 6. Esquema general de la hipodermis y los adipocitos.**

La función principal de la hipodermis es la de ser aislante térmico y reserva energética. La hipodermis se extiende desde la dermis reticular hasta la parte muscular superficial. El grosor y la distribución del tejido adiposo varía enormemente en función de la edad, el sexo, la localización corporal y el estado de nutrición (Iglesias et al., 2004).

### **3.1.4 Funciones de la piel.**

#### **a) Función de sensibilidad**

La piel es el principal órgano sensitivo del cuerpo a través de receptores para el tacto, la presión, el dolor y la temperatura (Iglesias et al., 2004) (Fig. 7).

#### **b) Función de termorregulación**

La pérdida de calor está favorecida por la evaporación del sudor e incremento del flujo sanguíneo de la red vascular de la dermis. Los pelos y el tejido adiposo subcutáneo dificultan esa pérdida (Iglesias et al., 2004).

#### **c) Función metabólica**

El tejido subcutáneo adiposo constituye un gran almacén de energía, principalmente en forma de triacilglicéridos. La vitamina D se metaboliza en la

epidermis. En la función metabólica se debe considerar la producción tanto de queratina, melanina y sudor, como la formación de sebo (Iglesias et al., 2004).

#### d) Función protectora

La piel es el órgano con mayor exposición a una amplia variedad de factores físicos, químicos y biológicos. Por lo tanto, representa la primera barrera contra las agresiones del ambiente y mantiene la integridad del cuerpo. Su superficie, relativamente impermeable, evita la deshidratación y actúa como barrera física frente a la invasión de microorganismos. Cuando alguno de sus componentes o funciones se ven alterados, se producen cambios a nivel sistémico que pueden ocasionar la muerte, ya que no se puede sobrevivir con más de un 60% de daño en la piel. La piel debe proteger contra traumas, penetración de microbios, agentes tóxicos, radiaciones electromagnéticas, fluctuaciones de temperatura y pérdida de fluidos (Magaña y Magaña, 2003; Chu, 2013) (Fig. 7) (Tabla 3).

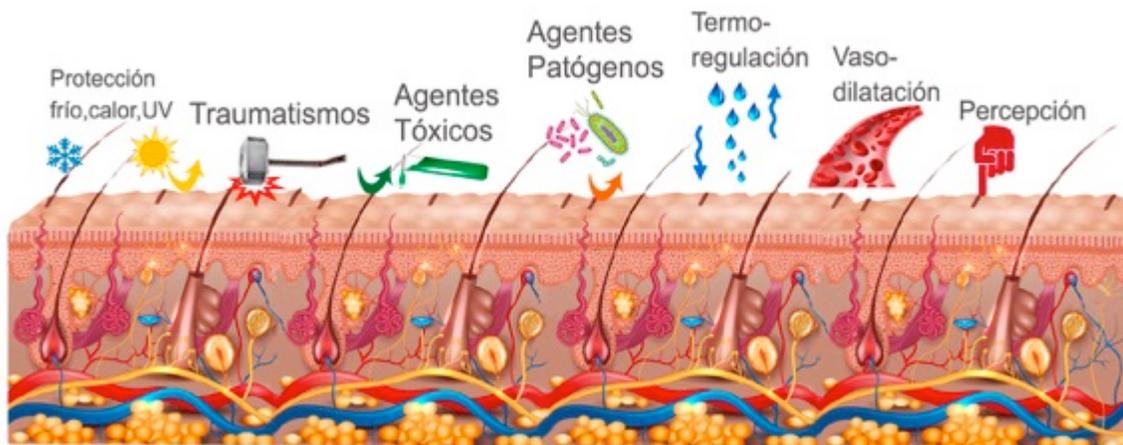


Figura 7. Funciones de la piel.

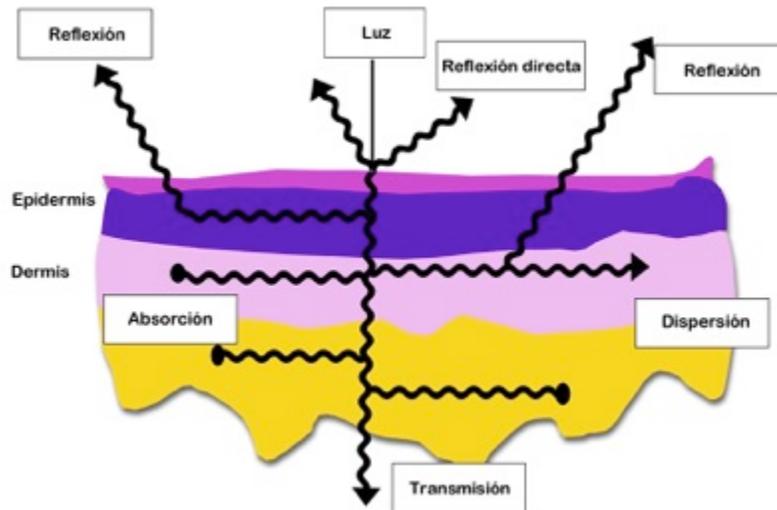
**Tabla 3. Funciones de la piel (Chu, 2013)**

<b>Función</b>	<b>Capa de tejido</b>
<b>Barrera de permeabilidad</b>	Epidermis
<b>Protección contra patógenos</b>	Epidermis, dermis
<b>Termorregulación</b>	Epidermis, dermis e hipodermis
<b>Sensibilidad</b>	Epidermis, dermis e hipodermis
<b>Protección contra radiación ultravioleta</b>	Epidermis
<b>Reparación/regeneración de heridas</b>	Epidermis, dermis
<b>Aspecto físico</b>	Epidermis, dermis, hipodermis

#### **3.1.4.1 Función protectora hacia la luz solar.**

La luz proveniente del Sol, principalmente la radiación ultravioleta (RUV), es considerada por sus efectos nocivos como el estímulo físico de mayor riesgo para el desarrollo de una amplia variedad de efectos nocivos, como la quemadura solar, la inmunosupresión, el fotoenvejecimiento y hasta el cáncer de piel. Sin embargo, no todas las reacciones inducidas por la RUV son nocivas, ya que psicológicamente brinda una sensación de bienestar, permite la regulación del ciclo circadiano y ayuda en la síntesis de vitamina D a partir del 7-dehidrocolesterol (Chu, 2013, Maverakis, 2010).

Para hacer frente a los efectos nocivos de la RUV las células de la piel disponen de diversos mecanismos y presentan dos barreras de protección inicial: la queratina del estrato córneo y la melanina de los melanocitos. De forma inicial se presenta un incremento en la actividad mitótica de las células de la epidermis. Este incremento en la proliferación y diferenciación celular dará como resultado el aumento del espesor del estrato córneo y ayudará a la dispersión de la trayectoria de la luz y por lo tanto, sólo una porción de RUV se transmitirá a las células vulnerables de la capa basal, y la pequeña parte que penetre será capturada por las moléculas denominadas cromóforos, capaces de absorber la energía lumínica (Maverakis et al., 2010; Kullavanijaya y Lim, 2005; Chu et al., 2013) (Fig. 8).



**Figura 8. Interacción de la radiación solar con la piel. Imagen recuperada y modificada de ELSEVIER**

Diversas moléculas de la piel se pueden considerar cromóforos, pero quizá la más importante en relación con la protección contra la RUV es la melanina, cromóforo capaz de disipar la energía en forma de calor inofensivo. La melanina es sintetizada dentro de los melanocitos y se libera a través de los melanosomas, los cuales se transfieren a los queratinocitos para proporcionarles una mayor protección, ya que son capaces de reorganizarse alrededor del núcleo y así proteger la integridad de los ácidos nucleicos (Fig. 3). La presencia de melanocitos en la piel está íntimamente relacionada con los tipos de piel. El cuadro 4 muestra la clasificación realizada por Fitzpatrick, diseñada en un inicio para determinar el grado de riesgo de contraer cáncer de piel en individuos blancos. Sin embargo, ha sido actualizada con el fin de incorporar todos los tipos étnicos y raciales; actualmente se toman en cuenta otros factores para identificar el tipo de piel, como la raza, etnia, tendencia a la hiperpigmentación y la historia médica de cada persona (Maverakis et al., 2010; Kullavanijaya y Lim, 2005; Reddy et al., 2013).

**Tabla 4. Clasificación de la piel según Fitzpatrick de acuerdo con la sensibilidad presentada después de una sola exposición a la luz solar.**

<b>Tipo de piel</b>	<b>Color de la piel</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Respuesta pigmentaria</b>
<b>I</b>	Blanca con pecas y ojos claros	Muy sensible	Siempre enrojece, nunca se broncea
<b>II</b>	Blanca, pelo rubio o rojo, ojos claros	Muy sensible	Siempre enrojece, rara vez se broncea
<b>III</b>	Blanca	Sensible	Enrojece moderadamente, bronceado uniforme
<b>IV</b>	Blanca o café claro, ojos y pelo oscuros	Moderadamente sensible	Enrojece poco, bronceado café
<b>V</b>	Café-Morena	Mínimamente sensible	Enrojece rara vez, bronceado oscuro
<b>VI</b>	Negro	Insensible	Nunca enrojece

El color de la piel es el resultado del espectro de luz incidente y de su absorción y reflexión por los cromóforos cutáneos. En gran medida está determinado por la cantidad de melanina, su tipo (relación entre eumelanina, negra-marrón y feomelanina, roja-amarilla), su distribución intracelular y su ubicación dentro de las capas de la piel. El número de melanocitos en una zona determinada de la piel es similar en todos los individuos. Los pigmentos vasculares oxihemoglobina y desoxihemoglobina también tienen un papel en el color observado, junto con el flujo de sangre capilar, los pigmentos de la dieta, como el caroteno y licopeno, el colágeno, el espectro de luz ambiental, la reflexión, refracción y absorción de la luz por parte de la piel, así como la transparencia del estrato córneo y la epidermis. Factores endocrinológicos, inflamatorios, nerviosos y farmacológicos también influyen en el color de la piel (Reddy et al., 2013).

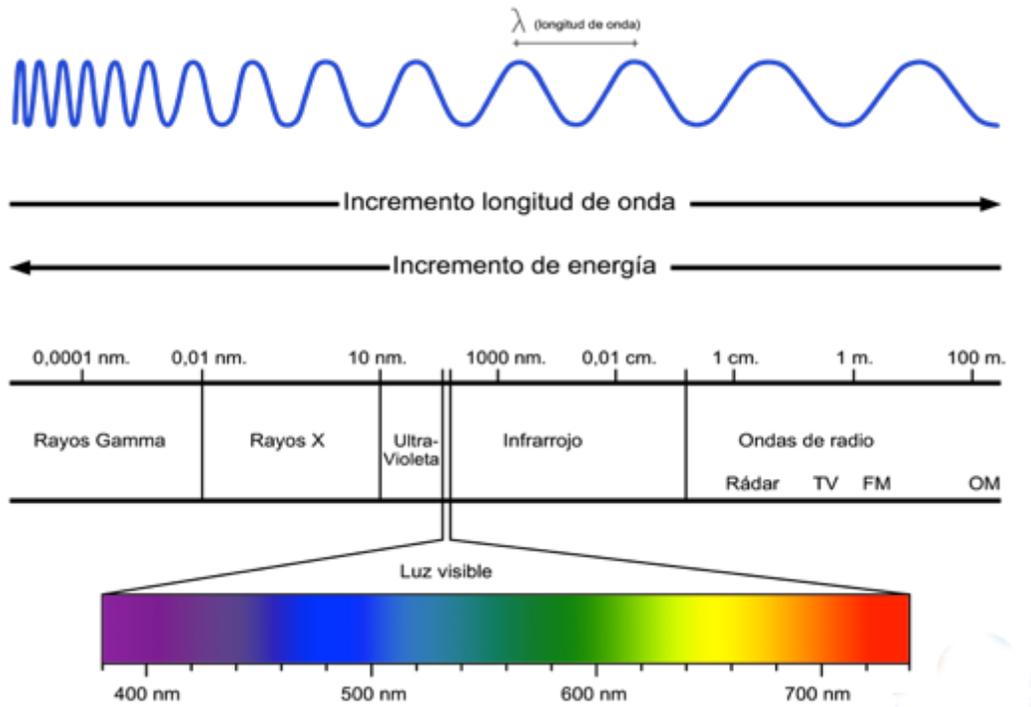
El tamaño y la distribución de los melanosomas varían en la piel de diferentes colores. En la piel oscura los melanosomas son generalmente grandes y se dispersan en los queratinocitos. En las pieles blancas son más pequeños y se agrupan dentro de la membrana. En la piel asiática se encuentra una combinación

de ambos melanosomas. La melanina también se degrada más lentamente en la piel de color. La mayor cantidad de melanina brinda una mayor fotoprotección natural, debido a la mayor absorción de fotones, pero también aumenta el riesgo de trastornos pigmentarios. Por lo general en cortes histológicos, la piel blanca y de color son iguales, exceptuando las diferencias en la melanina. Aún es tema de estudio si existen diferencias genéticamente determinadas asociadas con el color de la piel (Reddy et al., 2013; Young y Yaar; 2013).

La síntesis de melanina está bien estudiada y se sabe que tres enzimas son claves para que se lleve a cabo: 1) la fenilalanina hidroxilasa, que cataliza la conversión de fenilalanina a tirosina; 2) la tirosinasa, que induce la hidroxilación de la tirosina y la producción de o-quinonas; por último 3) la tirosina hidroxilasa, que utiliza la tirosina para formar la L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) dentro de los melanosomas (Baldea et al., 2009; Young y Yaar; 2013).

### **3.2 Radiación solar**

El Sol es una masa de materia gaseosa compuesta principalmente de 72% de hidrógeno y 27% de helio. Dentro del Sol se llevan a cabo reacciones de fusión y fisión nuclear para formar otros elementos. Estas reacciones producen una enorme cantidad de energía que es liberada al espacio en forma de radiación electromagnética. La luz solar está conformada básicamente por el espectro de luz ultravioleta (200 a 400 nm), luz visible (400 a 700 nm) e infrarroja (760 a 1800 nm), aunque también encontramos longitudes de onda corta (ionizantes) y onda larga (microondas y radio). De toda esta energía solar, sólo dos tercios llegan a la Tierra debido a las modificaciones que sufre en la atmósfera. La energía incidente en la superficie terrestre, en su mayor parte está por encima de los 300 nm, por lo que se encuentra en el rango de luz visible e infrarroja, y sólo una pequeña porción corresponde a la radiación ultravioleta (RUV). La cantidad de energía solar que llega a la superficie terrestre varía significativamente con la altitud, latitud, hora del día, época del año, nubosidad y localización geográfica (Kochevar et al., 2013; Kullavanijaya et al., 2005; Maverakis et al., 2010; Afaq, 2011) (Fig. 9).



**Figura 9. Espectro electromagnético emitido por el Sol.**

La radiación electromagnética (REM) puede ser considerada como un conjunto de ondas compuesta de campos eléctricos y magnéticos oscilantes que forman un ángulo recto entre sí y con respecto a la dirección de propagación. En consecuencia, se le puede describir por su frecuencia (número de oscilaciones por segundo) o por su longitud de onda (distancia recorrida por oscilación). La frecuencia y la longitud de onda mantienen una relación inversamente proporcional (Kochevar et al., 2013).

Las REM también pueden describirse como una corriente de paquetes de energía separados entre sí, conocidos como cuantos o fotones. La cantidad de energía de un fotón es directamente proporcional a la frecuencia de la radiación, e inversamente proporcional a su longitud de onda, según lo expresa la ley de Planck:  $E=hc/\lambda$ , en donde  $E$ = energía del fotón en Joules (J),  $h$ = constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34}$  J/seg),  $c$ = velocidad de la luz ( $3 \times 10^8$  m/s) y  $\lambda$ = longitud de onda en metros. Esta relación indica que la energía del fotón aumenta cuando la

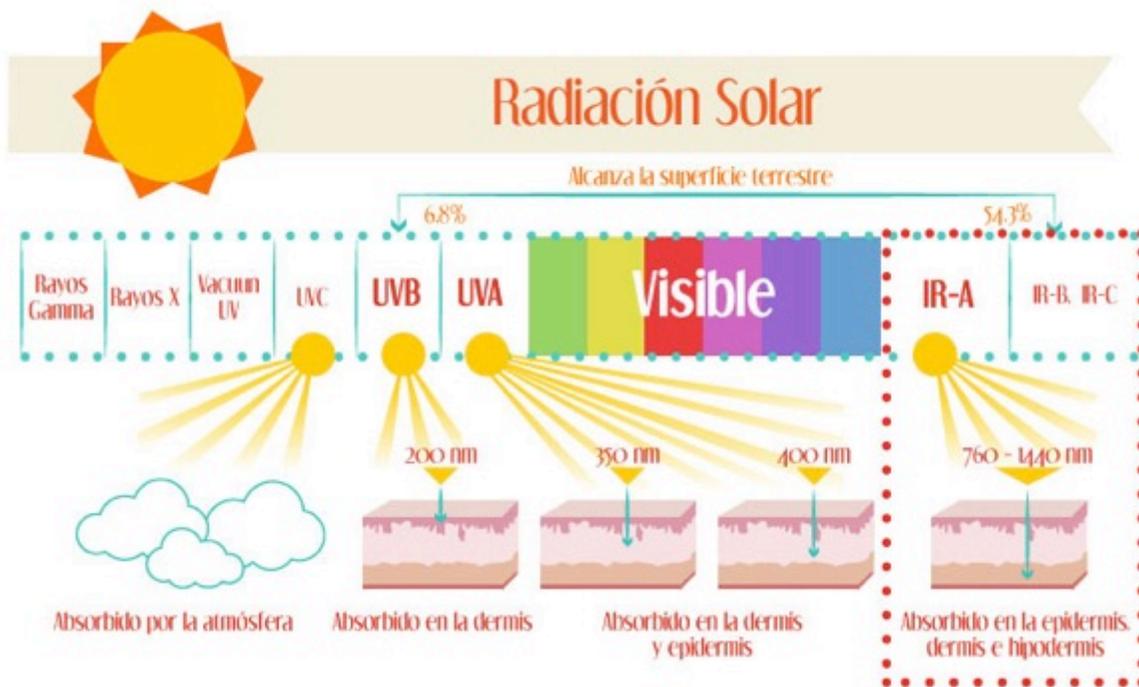
longitud de onda es más corta y disminuye cuando esta es más larga (Fig. 9). Las unidades definidas para la REM se muestran en la tabla 5 (Kochevar et al., 2013; Walker et al., 2005; Linden y Lim, 2006).

**Tabla 5. Unidades definidas para la medición de la REM.**

<b>Unidad</b>	<b>Medida</b>	<b>Símbolo</b>
<b>Energía</b>	Julio	J
<b>Potencia</b>	Watio	W=J/s
<b>Irradiación o dosis de irradiación</b>	Irradiancia	W/cm <sup>2</sup>
<b>Dosis de exposición</b>	Irradiancia por tiempo	J/cm <sup>2</sup> X s
<b>Irradiancia espectral</b>	Energía por unidad de superficie emitida por alguna fuente luminosa	J/cm <sup>2</sup> X s

### **3.2.1 Radiación ultravioleta (RUV).**

Los rayos o radiación ultravioleta (RUV) se definen como aquellas longitudes de onda que van de los 200 a los 400 nm. A su vez, se subdividen en UVA, UVB y UVC. La luz UVA comprende la longitud de onda entre los 320 y los 400 nm, y se subdivide en UVAI (340 a 400 nm) y UVAIL (320 a 340 nm); los UVB, entre los 280 y los 320nm, y los UVC, entre los 200 y 290 nm. La luz UVC que emite el sol es absorbida por la atmósfera, de modo que no alcanza la superficie terrestre y por consiguiente, no tiene relevancia médica. Sin embargo, existen fuentes artificiales que pueden generar riesgos a la salud (Kullavanijaya et al., 2005; Afaq y Mukhtar, 2006; Maverakis et al., 2010; Afaq, 2011; Kochevar et al., 2009) (Fig. 10).



**Figura 10. Energía solar que llega a la superficie terrestre.**

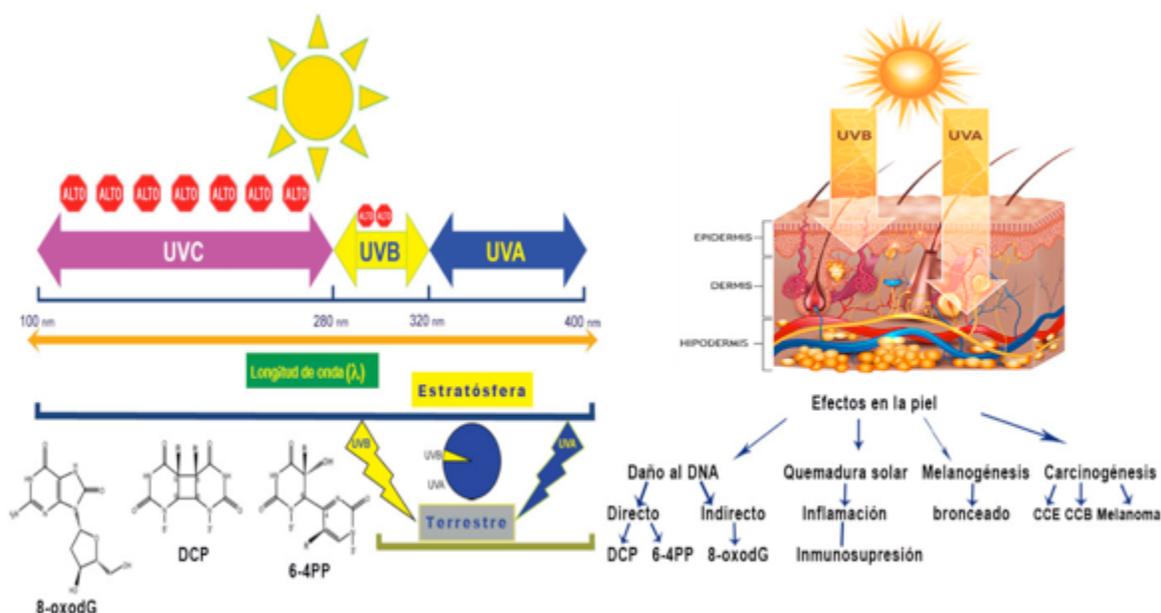
La cantidad o intensidad de RUV que llega a la superficie terrestre varía significativamente con la altitud, hora del día, época del año y localización geográfica. La RUV del medio día está compuesta por un 95% de UVA y un 5% de UVB. En un día promedio un 65% de toda la RUV alcanza la superficie de la tierra entre las 10 h de la mañana y las 2 h de la tarde, que es cuando el sol se encuentra en la posición más elevada. Según la región geográfica y la estación, se ha estimado que el sol produce entre 2 y 6 mW/cm<sup>2</sup> de RUV entre los 290 y 400 nm. La filtración de las longitudes de onda menores a 290 nm (UVC) por el ozono es de suma importancia debido a que son muy nocivas para las plantas y animales. Por lo tanto, las variaciones en el grosor de la capa de ozono en el Polo Sur por diversas actividades humanas relacionadas con la liberación de fluorocarbonos ha dado como consecuencia un incremento en la cantidad de RUV que llega a la Tierra, de ahí la importancia de llevar a cabo las restricciones establecidas en el protocolo de Montreal sobre sustancias que contribuyen a la disminución de la capa de ozono. Es importante mencionar que en los últimos años se creó una escala de riesgos asociados a las radiaciones solares, la cual

toma en cuenta factores como altitud, latitud y nubosidad. La escala va del 1 al 15 y un nivel de radiación por arriba del 10 se considera de alto riesgo para la sobreexposición solar establecida. (Kullavanijaya et al., 2005; Cabrera y López, 2006; Linden y Lim, 2006; Afaq y Mukhtar, 2006; Afaq, 2011; Kochevar et al., 2013).

### **3.2.2 Interacción de la RUV con la piel.**

Cuando la RUV llega a la superficie de la piel sufre una serie de cambios antes de producir un efecto biológico. Una parte vuelve a ser emitida por reflexión y dispersión, otra es absorbida por los cromóforos en diversas capas y una tercera parte es transmitida hacia dentro de la piel, hasta que se disipa la energía del rayo incidente (Kochevar et al., 2013) (Fig. 8 y 11). La porción de luz que es absorbida por las moléculas denominadas cromóforos presentes en los tejidos es la más importante. Las longitudes de onda específicas absorbidas por cada molécula (espectro de absorción) caracterizan la estructura de la molécula (es decir, la disposición de los núcleos y los electrones). Sólo la radiación absorbida por los cromóforos puede desencadenar reacciones biológicas. Las longitudes de onda asociadas con una máxima probabilidad de absorción se denominan máximos de absorción ( $\lambda_{\max}$ ). Muchas de las moléculas que absorben dentro del rango de la UVB, en realidad presentan  $\lambda_{\max}$  en longitudes de onda más cortas dentro del espectro de la UVC. Estas moléculas incluyen las bases de purina y pirimidina del ADN y del ARN ( $\lambda_{\max}=260$  nm); muchos cromóforos cutáneos, como la hemoglobina, absorben la UVA. La melanina absorbe todo el espectro de RUV, visible y una parte del infrarrojo, por lo que no tiene una  $\lambda_{\max}$  determinada. Cuando los fotones de luz UV y visible alcanzan la superficie de la piel, tiene lugar una serie de procesos con el fin de transformar la energía de la radiación en una respuesta observable. Primero, la radiación debe penetrar hasta un nivel adecuado de la piel para ser absorbida por los cromóforos. Posteriormente los cromóforos se convierten en nuevas moléculas llamadas fotoproductos, mediante reacciones fotoquímicas. Los fotoproductos estimulan la transducción de señales celulares que provocan cambios bioquímicos que culminan en efectos celulares, como la proliferación celular, la secreción de citocinas y la apoptosis, que son

responsables de las respuestas observadas en la piel (Kochevar et al., 2013) (Fig. 12).



**Figura 11. Penetración de la RUV en la piel y sus efectos por la interacción con biomoléculas.**



**Figura 12. Proceso general de la RUV desde que incide a la piel y genera una respuesta (Kochevar et al., 2009).**

Después de absorber la energía de un fotón, el cromóforo se encuentra en un estado excitado, antes de reaccionar con las moléculas vecinas. Los productos de

estas reacciones inician procesos de transducción de señales que causan las reacciones observadas en la piel (Kochevar et al., 2013).

En condiciones normales, las moléculas se encuentran en un estado basal y presentan una distribución de electrones determinada alrededor de los núcleos de sus átomos. Cuando una molécula en estado basal absorbe un foton de energía pasa a un estado electrónico excitado. Según los principios de la mecánica cuántica, sólo pueden existir ciertas brechas de energía entre estados electrónicos. En consecuencia, una molécula sólo puede absorber fotones en presencia de ciertos tipos de energía; este fenómeno determina la existencia de un espectro de absorción único para cada molécula.

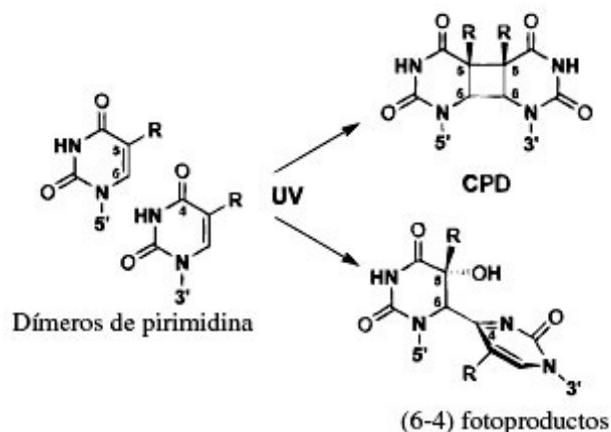
Una molécula permanece en el estado excitado durante muy poco tiempo; a ese lapso se le conoce como estado excitado singulete y dura algunos nanosegundos. La molécula puede regresar al estado basal emitiendo luz en forma de fluorescencia o liberando energía como calor mediante el proceso de conversión interna. Por otro lado, el estado singulete puede experimentar una reacción química para formar un fotoproducto, o puede pasar a un estado de excitación de energía más baja, conocido como estado excitado triplete mediante el proceso denominado cruce entre sistemas. Los estados excitados singulete y triplete difieren en los espines de un par de electrones en un orbital. El estado excitado triplete puede durar un tiempo más prolongado (microsegundos), puede emitir luz en forma de fosforescencia, experimentar una reacción química o regresar al estado singulete mediante el proceso de cruce entre sistemas (Kochevar et al., 2013; Brown et al., 2009) (Fig. 12 y 13).



La absorción de UVB por el ADN lleva a la formación de fotoproductos característicos de la epidermis humana: los dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC o CDPs) y los fotoproductos de pirimidina 6-4 pirimidona (6-4 PP), después de la exposición suberimatosas o erimatosas (Fig. 11 y 14). Ambas lesiones se forman exclusivamente en dímeros de pirimidinas adyacentes, constituyendo los "hot spots" o puntos frecuentes de mutaciones inducidas por RUV, las cuales pueden llevar a un proceso de carcinogénesis cutánea (Vink y Roza, 2001; Ichihashi et al., 2003; Gruijl, 2000; Schwarz et al., 2007; Maverakis et al., 2010; Afaq, 2011) (Fig. 14).

Además, numerosas reacciones cutáneas asociadas al EEM comienzan en el momento en que el cromóforo en estado excitado transfiere su energía al oxígeno molecular para formar una nueva molécula llamada oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), o bien transfiere un electrón para crear un anión superóxido. Estas formas de oxígeno reaccionan con moléculas celulares, lo que a menudo induce la transducción de señales intracelulares responsables de la inflamación asociada con las quemaduras solares y con la fototoxicidad (Kochevar et al., 2013).

Por lo tanto, la interacción de la RUV con los cromóforos de la piel puede causar diversos niveles de respuesta de tipo molecular, bioquímico, celular y tisular, como la inflamación, formación de eritema, pigmentación inmediata, melanogénesis e inmunosupresión, mutagénesis y a largo plazo fotoenvejecimiento y cáncer de piel (Vink y Roza, 2001; Afaq et al., 2005; Kullavanijaya et al., 2005; Scheinfeld y De Leo, 2006; Cabrera y López, 2006; Afaq y Mukhtar, 2006; Afaq, 2011).



**Figura 14. Formación de fotoproductos por efecto de la UVB (Sarkany, 2011)**

### 3.2.4 Efectos agudos y crónicos en la piel provocados por la RUV.

En términos prácticos los diversos efectos de la radiación UV en la piel se pueden dividir en agudos y crónicos y dependerán de la longitud de onda, penetración en la piel y tiempo de exposición. Por lo tanto, diferentes longitudes de onda dentro de las subdivisiones que se han otorgado a la RUV, pueden causar respuestas biológicas sumamente variables. La UVA penetra más profundamente las capas que conforman la piel, llegando hasta la dermis profunda para ser absorbida en un 75% por los melanocitos de la capa basal de la epidermis, lo que lleva a la producción de eritema, pigmentación inmediata y melanogénesis retardada, y por último daño al tejido conectivo y elastosis solar. En cambio, sólo el 5% de RUV es de tipo UVB, y a pesar de que un 70% de esta es absorbida por el estrato córneo, se considera la energía solar más perjudicial ya que es responsable directa del eritema, fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis. (Kochevar et al., 2013; Afaq et al., 2005; Kullavanijaya et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Maverakis et al., 2010; Cabrera y López, 2006; Afaq y Mukhtar, 2006) (Fig. 10 y 11).

#### 3.2.4.1 Efectos Agudos.

En los efectos agudos podemos encontrar algunos de tipo inmediato y de beneficio para la piel, como son la síntesis de vitamina D en la epidermis, sensación de bienestar, calor y el bronceado o pigmentación inmediata donde los

rayos UV son los responsables. Al mismo tiempo, encontramos efectos no benéficos como el eritema y la quemadura solar, la fotodermatosis y la inmunosupresión (Kochevar et al., 2013).

#### **a) Bronceado.**

El bronceado tiene como principal factor ambiental a la RUV y se puede dividir en inmediato y tardío.

El espectro de acción para el bronceado y el eritema es similar, sin embargo las longitudes de onda de luz UVB son más eficaces para generar eritema en los individuos de piel blanca, mientras que la UVA es más eficiente para la pigmentación en individuos de piel oscura. Por lo tanto, los mecanismos de síntesis de melanina son diferentes dependiendo del tipo de RUV a la que se exponga (Walker et al., 2005; Kullavanijaya et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Kochevar et al., 2009; Maverakis et al., 2010).

#### **1. Bronceado inmediato**

Existen dos tipos de pigmentación: la melanogénesis verdadera, conocida como bronceado tardío, y el oscurecimiento pigmentario inmediato (OPI). El OPI es de color grisáceo y se observa inmediatamente a la exposición a la RUV, pero es de tipo transitorio, inducido por la radiación visible y los UVA y se debe a la fotooxidación de la melanina y la redistribución de los melanosomas melanocíticos a partir de la porción perinuclear hacia el interior de las dendritas periféricas y la melanina es transferida de forma rápida a los queratinocitos dispuesta a modo de gorro nuclear. El OPI sirve para proteger zonas delicadas, aunque no disminuye claramente la sensibilidad del eritema solar. Puede ser evidente en 5 o 10 min después de la exposición solar y durar por varias horas (Walker et al 2005; Kullavanijaya et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Maverakis et al., 2010; Yamaguchi et al., 2007) (Fig 15).

## **2. Bronceado tardío**

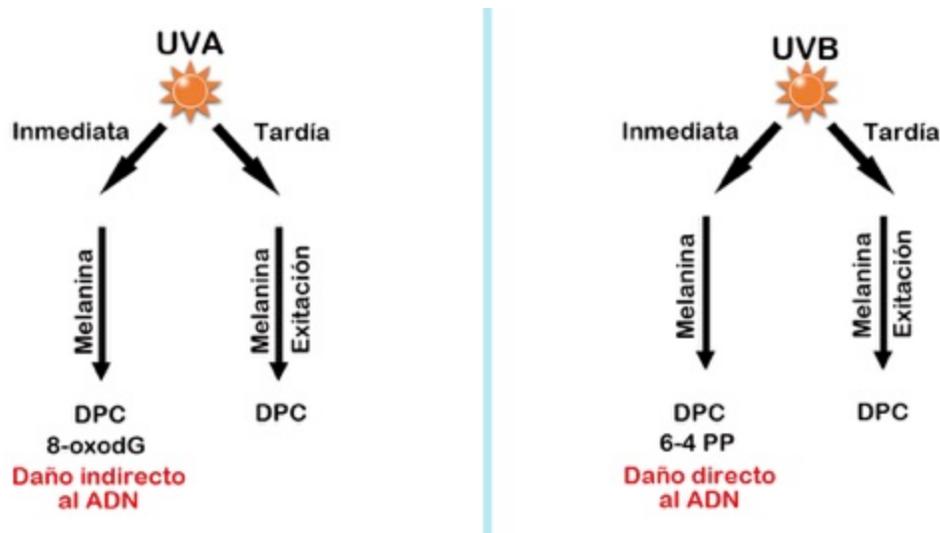
El bronceado tardío se presenta por la exposición a luz UVA y UVB y resulta en el aumento de la formación de melanina epidérmica. Este pigmento se hace visible unos días después de la exposición a RUV y dura hasta 3 semanas (Walker et al., 2005; Kullavanijaya et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Maverakis et al., 2010) (Fig. 15).

El bronceado tardío puede durar de días a semanas y se inicia entre las 24 y 72 h después de la exposición. La tonalidad que presenta es más cobriza y aparece tras la exposición mayor a la dosis Eritematosa mínima (DEM) media. Se alcanza tras la producción de nueva melanina por los melanocitos y su transferencia a los queratinocitos. La cantidad total de nueva melanina formada dependerá de factores genéticos. Hay un aumento en el tamaño de los melanosomas y de la actividad enzimática de los melanocitos. Se activan los melanocitos quiescentes y son reclutados para la división celular. La pigmentación tardía eleva al doble el umbral de eritema. Aún no se conoce el estímulo directo que causa esta activación metabólica en los melanocitos, pero es posible que se relacione con el daño celular o una activación directa de las enzimas que intervienen en la formación de melanina a partir de tirosina. Además, se cree que está relacionado con los sistemas de reparación del ADN (Kullavanijaya et al., 2005; Walker et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Maverakis et al., 2010; Young y Yaar, 2013) (Fig. 15).

El bronceado tardío por UVB se asocia con el aumento de actividad y el número de melanocitos. En general una sola exposición a la RUV aumenta la actividad, y dosis repetidas incrementan el número de melanocitos debido a que los queratinocitos liberarán melanocortina y hormona estimuladora de melanocitos. Además, la actividad de la tirosinasa, la tirosin hidroxilasa y la DOPA también se incrementa, así como la expresión del factor de transcripción de microftalmia (MITIF) implicado en la pigmentación. Las dendritas se alargan y ramifican y los melanosomas aumentan de tamaño y número. Además, los queratinocitos aumentan la capacidad de absorción de melanosomas. Esto puede generar pecas pequeñas en individuos de piel clara, mientras que las exposiciones únicas y

prolongadas producirán una quemadura severa que generará pecas grandes (Yamaguchi et al., 2007; Walker et al 2005; Kullavanijaya et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Maverakis et al., 2010).

Por lo tanto, los melanocitos juegan un papel importante en la respuesta y protección de la piel contra la RUV y su alteración puede producir efectos nocivos como el cáncer de piel melanómico conocido por su agresividad.



**Figura 15. Efecto de la RUV en el proceso de bronceado. UVA: radiación ultravioleta A; UVB: radiación ultravioleta B; DPC: dímeros de pirimidina ciclobutano; 6-4 PP: fotoproductos 6-4; 8-oxodG: 8-hidroxiguanosina.**

#### a) Síntesis de vitamina D.

Como consecuencia de la exposición de la piel a la luz UVB, la provitamina D3 (7-dehidrocolesterol) experimenta una isomerización espontánea, convirtiéndose en vitamina D3. Esta forma activa ingresa en la circulación asociada con una proteína de unión y con la D2 (ergocalciferol). Al llegar al hígado, sufrirán una hidroxilación en presencia de NADPH, O<sub>2</sub> y Mg y el producto resultante, la 25-dihidroxitamina D3, será la forma activa que migrará a los riñones para una segunda hidroxilación y convertirse en 1, 25-dihidroxitamina D3, que es la forma activa (Lehmann y Meurer, 2010; Kochevar et al., 2013).

Las longitudes de onda más eficaces para inducir la formación de vitamina D cutánea se encuentran en el rango de los 295 a 315 nm, correspondiente a la

UVB. Por lo tanto, con un índice de radiación de 3 (zonas tropicales), la piel produce una cantidad suficiente de vitamina D a partir de los 15 minutos de exposición. La síntesis cutánea de vitamina D se produce en el transcurso de minutos y alcanza la intensidad máxima antes de que la piel alcance un tono rosado, produciéndose así más de 90% de los requerimientos de esta vitamina. Esta es fundamental en diversos procesos metabólicos, entre los que destaca el metabolismo del calcio y del fósforo. Cabe destacar que en países que presentan poca incidencia de luz, las personas pueden presentar deficiencias en sus niveles de vitamina D. Lo mismo sucede con pacientes restringidos a la RUV, como los que tuvieron un trasplante renal o que presentan xenoderma pigmentosa. En esos casos sus niveles de D3 se encuentran por debajo de lo normal (Reichrath, 2009; Kochevar et al., 2013).

#### **b) Efecto inmune**

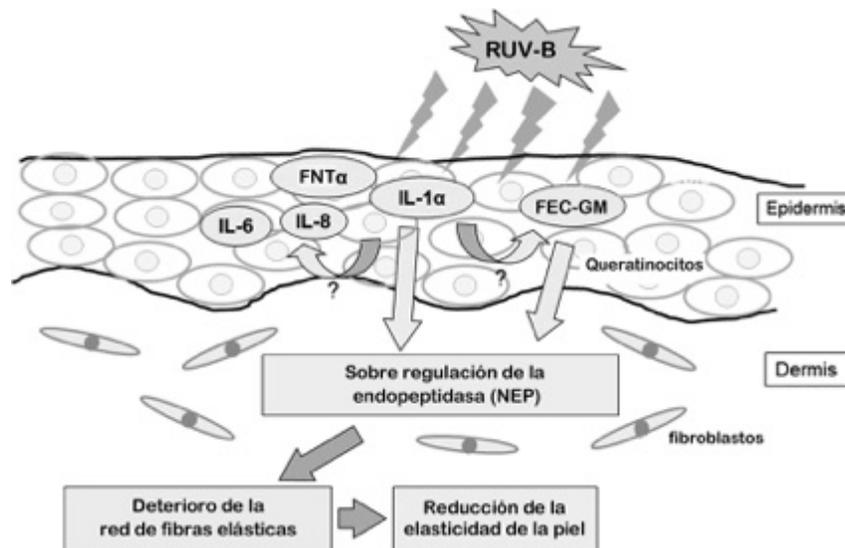
La RUVB que absorbe el ADN ha demostrado daños específicos y no específicos a las respuestas inmunes de la piel, tanto local como sistémicamente.

La exposición *in vivo* a la RUV modifica la morfología y la función de las células de Langerhans, disminuyendo su intensidad y la expresión de antígenos. Estas células pueden perder sus marcadores de superficie, emigrar o perecer, aunque algunas permanecen en la epidermis. Parte de esta respuesta está mediada por el ácido *trans*-urocánico sintetizado por los queratinocitos. Este ácido, al ser expuesto a la RUV, sufre una isomerización convirtiéndose en el ácido *cis*-urocánico que es inmunosupresor y trae como consecuencia la falla en la función de las células de Langerhans y la desgranulación de los mastocitos. En su forma normal, el ácido *trans*-urocánico contribuye al mantenimiento del pH de la piel (Vink y Roza, 2001; Ichihashi et al., 2003; Afaq et al., 2005; Afaq y Mukhtar, 2006; Maverakis et al., 2010; Afaq, 2011).

Está bien establecido que la exposición a la luz UV suprime la inmunidad mediada por las células. La disminución de las células de Langerhans, el reclutamiento de macrófagos en la dermis y en la epidermis y la liberación de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -MSH, son acontecimientos importantes

durante la inmunosupresión. Estas modificaciones llevarán a la alteración del proceso de presentación de antígenos que hacen que se generen células T reguladoras que inhiben las respuestas inmunes mediadas por células a los nuevos antígenos encontrados. Esta inmunosupresión desempeña un papel importante en el proceso de aparición y crecimiento de cánceres de piel distintos del melanoma en ratones, y se sospecha un papel similar en humanos (Vink y Roza, 2001; Walker et al., 2005; Maverakis et al., 2010).

Las moléculas inmunes de la piel como los antígenos y las células dendríticas también son blancos del daño al ADN causado por la RUV, ya que las células dañadas han demostrado una deficiencia en la presencia de antígenos que involucra la formación de células T (Vink y Roza, 2001; Ichihashi et al., 2003; Afaq y Mukhtar, 2006; Maverakis et al., 2010; Afaq, 2011) (Fig. 16).



**Figura 16. Efecto inmune y daño a la piel por efecto de la RUV.**

**d) Inflamación aguda: Quemadura o eritema solar.**

El indicador más visible de la inflamación cutánea inducida por la RUV es el eritema, que se presenta después de una excesiva exposición a la RUV. Esta reacción es consecuencia de la vasodilatación, principalmente de venas subpapilares, y este factor también es responsable del incremento de la

temperatura cutánea. Las quemaduras solares tienen diversos niveles de daño, inicialmente con eritema, edema, formación de vesículas, tumefacción y dolor. Posteriormente aparecerá la descamación y desprendimiento de la piel. Cuando las reacciones agudas como esta son graves, se acompañan de debilidad, cansancio y comezón (Kullavanijaya et al., 2005; Lim, 2013; Kochevar et al., 2013).

El espectro que causa la quemadura solar es el correspondiente a la luz UVB, sin embargo debido a la mayor cantidad de luz UVA que incide en la piel, esta representa el 10% de los rayos causantes de quemaduras (Walker et al., 2005; Maverakis et al., 2010).

El eritema inducido por la RUV tiene dos fases: la inmediata y la retardada. En los individuos con piel muy blanca que se exponen en grado suficiente al sol, el eritema es visible al final del periodo de irradiación y puede desaparecer rápidamente. La fase retardada consiste en la reaparición de un pico de eritema en cualquier zona entre las 6 y 24 h después de la exposición. En individuos de piel oscura sólo se observa la fase retardada. El eritema desaparece a los pocos días y es más persistente en personas de piel muy blanca (Kullavanijaya et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Afaq y Mukhtar, 2006; Maverakis et al., 2010).

El eritema es un prerrequisito para que aparezcan cambios pigmentarios secundarios a la exposición a los rayos UV; el bronceado retardado tiene lugar en el curso de tres días y la neomelanogénesis se produce en esta fase. La pigmentación por UVB desaparece en un tiempo menor que cuando es por UVA. Por lo tanto, el eritema es la respuesta cutánea aguda más conspicua y mejor reconocida de la RUV, en particular para individuos de piel clara y se asocia con los signos clásicos de inflamación, enrojecimiento, calor, dolor e hinchazón (Afaq et al., 2005; Kullavanijaya et al., 2005)..

La absorción de fotones de UVB por los cromóforos cutáneos determina la producción de los mediadores inflamatorios y las citocinas que caracterizan la reacción de quemadura solar. El espectro de acción para la formación de eritema está íntimamente relacionado con el espectro de absorción del ADN, por lo que se

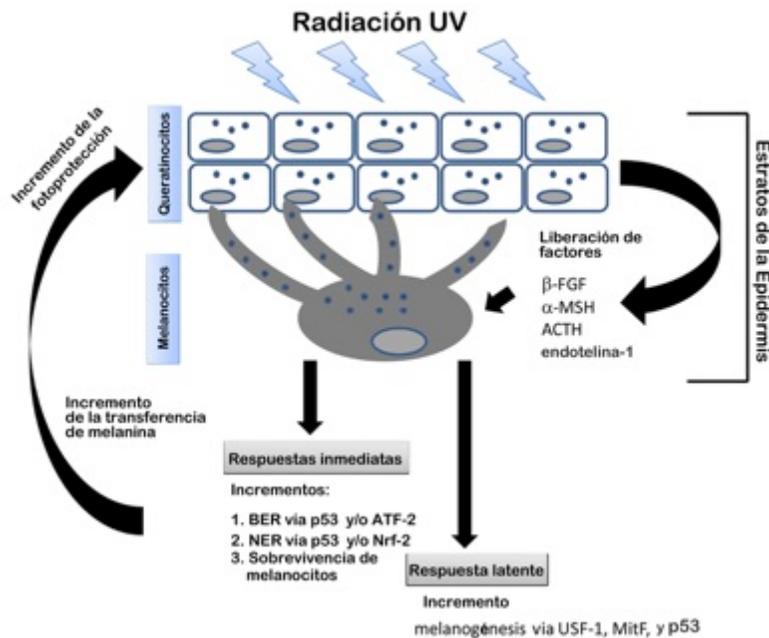
puede decir que el ADN constituye un cromóforo importante y que la dosis de UVB que induce el eritema es suficiente para generar daños al ADN, alterando su estructura por medio de la formación de fotoproductos (DPC y 6-4PP), los cuales a su vez son parcialmente responsables de desencadenar el proceso inflamatorio. Se sabe que aproximadamente se forman  $10^5$  DPC por cada célula de la epidermis al producirse eritema, por lo que puede ser causa del grave daño al genoma de las células de la piel y que a la larga producen cáncer de piel (Vink y Roza, 2001; Ichihashi et al., 2003; Walker et al., 2005; Afaq et al., 2005; Linden y Lim, 2006; Kochevar et al., 2013).

No se conocen con certeza los procesos bioquímicos que vinculan los fotoproductos del ADN con los mediadores inflamatorios, sin embargo se ha estudiado la estrecha relación entre la formación de fotoproductos del ADN y el desencadenamiento en la producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (Kochevar, et al., 2013).

Además del ADN, existen otros cromóforos que absorben RUVB y desencadenan la formación de mediadores proinflamatorios. Uno de ellos es el triptófano, que desencadena procesos de señalización que conducen a la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima responsable de la catálisis de prostaglandinas responsables de inducir eritema. La exposición a RUV-B genera especies reactivas de oxígeno (ERO) que oxidan los lípidos de las membranas y conducen a la formación de citocinas pro inflamatorias. La acción de las ERO en el proceso inflamatorio es avalada por la capacidad de los antioxidantes tópicos de regular el eritema inducido por UVB (Pinnell, 2003; Kochevar et al., 2013).

Existen mediadores fisiológicos que participan en el proceso inflamatorio, que incluyen productos derivados del ácido araquidónico, histaminas, citosinas, prostaglandinas y óxido nítrico. Todas ellas son moléculas mediadoras de la actividad vasodilatadora o antiinflamatoria. La exposición de la piel a RUV se acompaña de un incremento de los niveles de varias citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8). Estas citocinas pueden desempeñar diversas funciones en el proceso inflamatorio, como el reclutamiento de leucocitos

por medio de quimiotaxis y la inducción de moléculas de adhesión celular (ICAM-1) para facilitar el paso de las células a través de la pared de los capilares y participar en el reclutamiento y activación de las células mononucleares y neutrófilos causantes de la vasodilatación e inflamación. La liberación de prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>α, ácido nítrico e histamina son inmediatas a la exposición a la RUV (Vink y Roza, 2001; Walker et al., 2005; Afaq et al., 2005; Kochevar et al., 2013; Maverakis et al., 2010) (Fig. 17).



**Figura 17. Moléculas liberadas por efecto de la RUV. Bronceado y formación de eritema.**

Los neuropéptidos -como el relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P (SP)- tienen un papel importante en el eritema causado por la RUV como moduladores del dolor, picazón, inflamación y respuesta inmune, ya que producen vasodilatación y aumentan la permeabilidad microvascular cutánea. También pueden modular la desgranulación de los mastocitos. La RUV induce la liberación de ácido nítrico de los nervios sensoriales, el cual propicia la vasodilatación directa (Walker et al., 2005; Afaq et al., 2005; Kochevar et al., 2013).

### 1. Cambios histológicos agudos

Cuando existe eritema histológicamente se pueden observar diversos daños en las diferentes capas que conforman a la piel. El tipo de piel determina las consecuencias clínicas de la exposición al sol y la mejor medida de la sensibilidad a la radiación UV es la dosis erimatososa mínima (DEM), que se define como la menor dosis de radiación que provoca un eritema perceptible en la zona expuesta (Kochevar y Taylor, 2009).

Las células disqueratósicas o células de quemadura solar aparecen en la epidermis 30 minutos después de la exposición a la RUV (3 DEM) y se reconocen por ser células redondas con núcleos picnóticos y quizá sean el indicador histológico más sobresaliente (Maverakis, 2010). Los daños que pueden ser observados en presencia de eritema se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Daños observados en un corte histológico de piel por la formación de eritema causado por luz ultravioleta.**

Daño	En estrato córneo:
<b>Paraqueratosis</b>	La queratina del estrato córneo es histológicamente anormal, ya que contiene restos nucleares fusiformes y se suele asociar con pérdida o marcado adelgazamiento de la capa granular subyacente (Stevens et al., 2003).
<b>Ortoqueratosis</b>	Engrosamiento de las capas del estrato córneo con apariencia histológicamente normal (Stevens et al., 2003).
En epidermis:	
<b>Espongiosis</b>	Es un edema intra epidérmico, se observa como una separación de células y se puede definir como una separación de los desmosomas por acumulación de líquidos, desarrollando vesículas que al ir aumentando de tamaño pueden provocar hiperplasia epidérmica (Stevens et al., 2003).

<b>Apoptosis</b>	Los queratinocitos apoptóticos o células de quemadura, se reconocen por ser redondas con núcleos picnóticos. Son importantes para el desarrollo normal del tejido, ya que la apoptosis juega un papel importante en la eliminación de las células dañadas y se considera patología cuando el daño afecta al ADN. En estas situaciones, la célula irremediablemente dañada se elimina. Las similitudes entre las células apoptóticas y células de quemadura apoyan el hecho de que el ADN se ve afectado por la RUV (Robbins et al., 2008).
<b>Necrosis</b>	Muerte de las células con pérdida de la integridad de la membrana.
<b>Hiperplasia</b>	Posterior a una quemadura solar se produce la proliferación celular que lleva a un engrosamiento epidérmico, el cual comienza en horas y es visible histológicamente en días. Presenta una detención del crecimiento entre las 24 y 48 h y se puede llegar a un aumento del 40% en el número de capas del estrato córneo. Es por eso que se considera un tipo de fotoprotección natural, aunque su efecto es limitado (Walker et al., 2005).
<b>Hipertrofia</b>	Aumento de tamaño de las células y del tejido.
<b>Atrofia</b>	Disminución en el tamaño de la célula con pérdida de sustancia celular.
<b>En dermis</b>	
<b>Edema</b>	El edema es un aumento de líquido intersticial debido a presiones hidrostáticas en la dermis y puede ser localizado o difuso (Robbins et al., 2008).
<b>Hemorragia</b>	Extravasación de eritrocitos.
<b>Infiltrados inflamatorios</b>	Presencia de polimorfos nucleares (neutrófilos y macrófagos). Desgranulación de mastocitos.
<b>Congestión</b>	Acumulación de sangre en vasos sanguíneos.

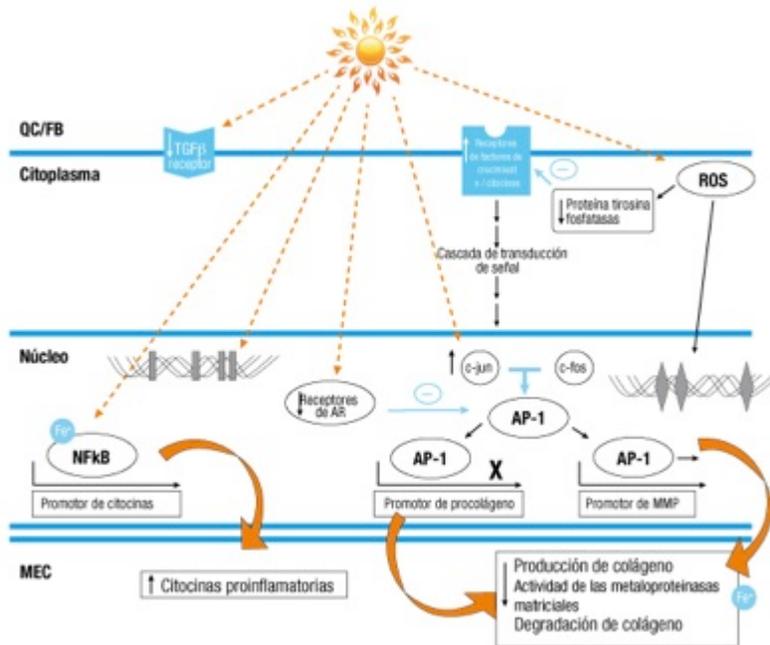
### **3.2.4.2 Efectos crónicos**

#### **a) Fotoenvejecimiento.**

El envejecimiento es el proceso por el cual se dan cambios fisiológicos y morfológicos que derivan en la disminución de la funcionalidad del tejido de forma progresiva y acumulativa, por lo que el proceso se acelera con el tiempo (Cano et al., 2010; Jenkins, 2002). Además, está influido por factores intrínsecos y extrínsecos que modelan el microambiente celular y tisular. Los efectos de ambos factores se suman, a pesar de que actúan de manera independiente. Los factores intrínsecos son los propios del sujeto y del tejido, como son la información genética, el tipo celular y el número de ciclos replicativos. Por su parte, los factores extrínsecos modelan el microambiente celular y tisular, entre los cuales destacan los productos del metabolismo celular, inducido principalmente por compuestos exógenos y la RUV. Dada la importancia de esta radiación en el envejecimiento debido a causas extrínsecas, este es denominado en general fotoenvejecimiento. Microscópicamente se caracteriza por la reducción de los niveles de colágeno, la degradación de la red elástica y la pérdida de hidratación. A este conjunto de fenómenos se le conoce como elastosis (Uitto, 2008) (Fig. 16). A nivel macroscópico se observan arrugas muy finas y profundas, adelgazamiento de la piel debido a la atrofia de la dermis y la pérdida del tejido adiposo subcutáneo, sequedad y engrosamiento, así como la aparición de manchas por la reorganización de los melanocitos (Randhawa et al., 2013; Reyes y Vitale, 2012; Bae et al., 2010; Leyden, 2001). La principal característica del fotoenvejecimiento es la presencia de acúmulos de material elástico en la dermis, pero a diferencia de las fibras elásticas funcionales, estos acúmulos no se disponen en fibras ni redes que doten a la piel de elasticidad, para que pueda ejercer su función. En este proceso se evidencia la presencia de fibroblastos hiperplásicos y de células inflamatorias como los mastocitos e histiocitos. También se presenta un aumento en la presencia de linfocitos T CD4+ en la dermis. A diferencia de la piel envejecida por la edad, en el fotoenvejecimiento se presenta acantosis, atrofia, pérdida de polaridad celular y atipia celular. Asimismo, existe una disminución en la cantidad y funcionalidad de las células de Langerhans (Yaar y Gilchrist, 2013).

## 1. Mecanismos del fotoenvejecimiento

La RUV activa receptores de la superficie celular, como el factor de crecimiento epidérmico. IL-1 y TNF-  $\alpha$ , para inducir la señalización intracelular que culmina con el estímulo de la proteína activadora del complejo de transcripción nuclear (AP-1), compuesta por las proteínas c-Jun y c-fos. El aumento en la actividad de AP-1 interviene en la síntesis de los colágenos I y III, bloqueando el efecto del factor de crecimiento transformante (TGF-  $\alpha$ ), una citocina que aumenta la transcripción de los genes del colágeno. También se ve disminuida la producción de TGF- $\beta$ , lo que da como consecuencia un aumento en el bloqueo de síntesis del colágeno. Aunado a lo anterior, el exceso de RUV induce la síntesis de un factor de crecimiento rico en cisteína (CYR61) que reduce la síntesis de procolágeno tipo I, así como el factor de transcripción nuclear (NF $\kappa$ B). Ambos aumentan la síntesis de metaloproteininas (MMP o colagenasas), especialmente la colagenasa (MMP-1), estromelisina (MMP-3) y la gelatinasa (MMP-9) capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular. Las MMP son de origen neutrófilo y se presentan después de una exposición a la RUV. Por lo general, la degradación del colágeno inducida por RUV es incompleta, de ahí la acumulación observada de fragmentos de colágeno parcialmente degradados, que inhibe la síntesis de nuevo colágeno. Por último, la exposición de la piel a la RUV induce la transcripción de genes que participan en la síntesis de citocinas pro inflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-8 (Yaar y Gilchrest, 2013) (Fig. 16, 17 y 18).



**Figura 18. Mecanismos de fotoenvejecimiento cutáneo.**

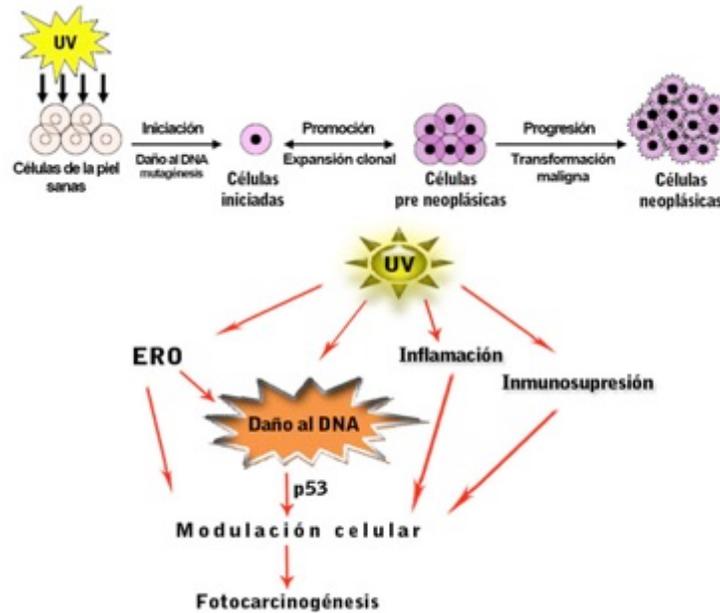
La RUV y las especies reactivas de oxígeno (ERO) inducen la transcripción de tropoelastina y elastasa secretada por los neutrófilos atraídos por mediadores inflamatorios, por lo que la síntesis no equilibrada de las fibras elásticas conduce a la formación de material amorfo elastósico.

Por último, es importante mencionar que el fotoenvejecimiento no solo está relacionado con las proteínas de la piel, sino también genera daños a nivel mitocondrial, oxidación de otras proteínas y daños en la membrana basal y alteraciones lisosómicas. Estos daños están relacionados con la formación y acumulación de ERO, así como con un aumento en las concentraciones de MMP (Yaar y Gilchrest, 2013).

### **b) Fotocarcinogénesis**

La fotocarcinogénesis se define como la suma de eventos bioquímicos complejos y simultáneos que dan como resultado el cáncer de piel. La RUV es un carcinógeno completo, ya que participa en las tres etapas de la carcinogénesis: la iniciación, que implica mutaciones en regiones codificantes de genes y es irreversible; la promoción, que consiste en la expansión clonal de células mutadas;

y la progresión, que es la transformación maligna a carcinoma. Cabe señalar que existe un periodo de latencia entre la primera exposición y la presencia del tumor (Afaq et al., 2005; Katiyar, 2008) (Fig 19).



**Figura 19. Etapas de la carcinogénesis por efecto de la RUV.**

La iniciación de la fotocarcinogénesis se da por la formación de fotoproductos que tiene como consecuencia la mutación de genes cruciales en el control, proliferación y diferenciación celular, como los protooncogenes y los genes supresores de tumores, tal es el caso del gen p53 (Sarkany, 2011; Grujil et al., 2001) (Fig. 19).

### **c) Cáncer de piel.**

Los datos epidemiológicos relacionan la exposición a la RUV como principal causa de la aparición de cáncer de piel. Se pueden diferenciar los tumores en función del tipo celular implicado: los melanomas, cuando las células transformadas son melanocitos; y los no melanómicos, en los que el tumor se origina en los queratinocitos. Estos últimos se dividen en dos tipos: carcinomas de células basales (CCB) y de células escamosas (CCE). Ambos presentan bajas tasas de mortalidad y de metástasis, pero son los más frecuentes (80 y 16%

respectivamente) y pueden dar lugar a la destrucción del tejido adyacente (Armastrong y Kricker, 2001; Gallagher y Lee, 2006; Afaq, 2011; Hong et al., 2008).

### **1. Carcinoma de células basales (CCB).**

El CCB es el más frecuente, con una incidencia del ≈80% (Afaq, 2011). Es más común en los fototipos claros y aparece en lugares del cuerpo con y sin exposición solar (Ahmed et al., 2008). Se relaciona con irradiaciones ligadas a la infancia que producen inflamaciones severas (Grujil et al., 2001). Las lesiones precancerosas se conocen como queratosis actínica (Hong et al., 2008; Madan et al., 2010). También este tipo de cáncer se asocia a deficiencias de enzimas reparadoras del ADN como en el caso de *xeroderma pigmentosum* (Gallagher y Lee, 2006; Lauth et al., 2004).

El CCB se origina en las células basales de la epidermis o de los apéndices cutáneos, invade a la dermis pero casi nunca hace metástasis. Las células que identifican al CCB son histológicamente pleomórficas, se disponen de forma irregular y presentan diferentes tamaños. Las células basales presentan núcleos grandes y citoplasma escaso y mal definido. Alrededor de estas células centrales dispuestas al azar se disponen otras de morfología cilíndrica, largas y estrechas con núcleo grande y basófilo (Lauth et al., 2004).

### **2. Carcinoma de células escamosas (CCE).**

La incidencia de CCE se asocia a personas de fototipos claros que viven en una zona geográfica de alta irradiación solar y/o cercana al ecuador (Gallagher y Lee; 2006). Éste aparece en áreas del cuerpo expuestas a la RUV, se asocia con exposiciones continuas y acumulativas que producen episodios de quemadura solar, por lo que su incidencia aumenta con la edad (Grujil et al., 2001; Lauth et al., 2004). El CCE está asociado a la elastosis solar y con la queratosis actínica (Madan et al., 2010; Rigel et al., 2006).

Los CCE se presentan de forma aislada o como una masa única, donde los queratinocitos atípicos pueden invadir a la dermis. Las células características

presentan aumento en la mitosis. La queratinización es abundante y se manifiesta en forma de perlas o capas concéntricas (Lauth et al., 2004).

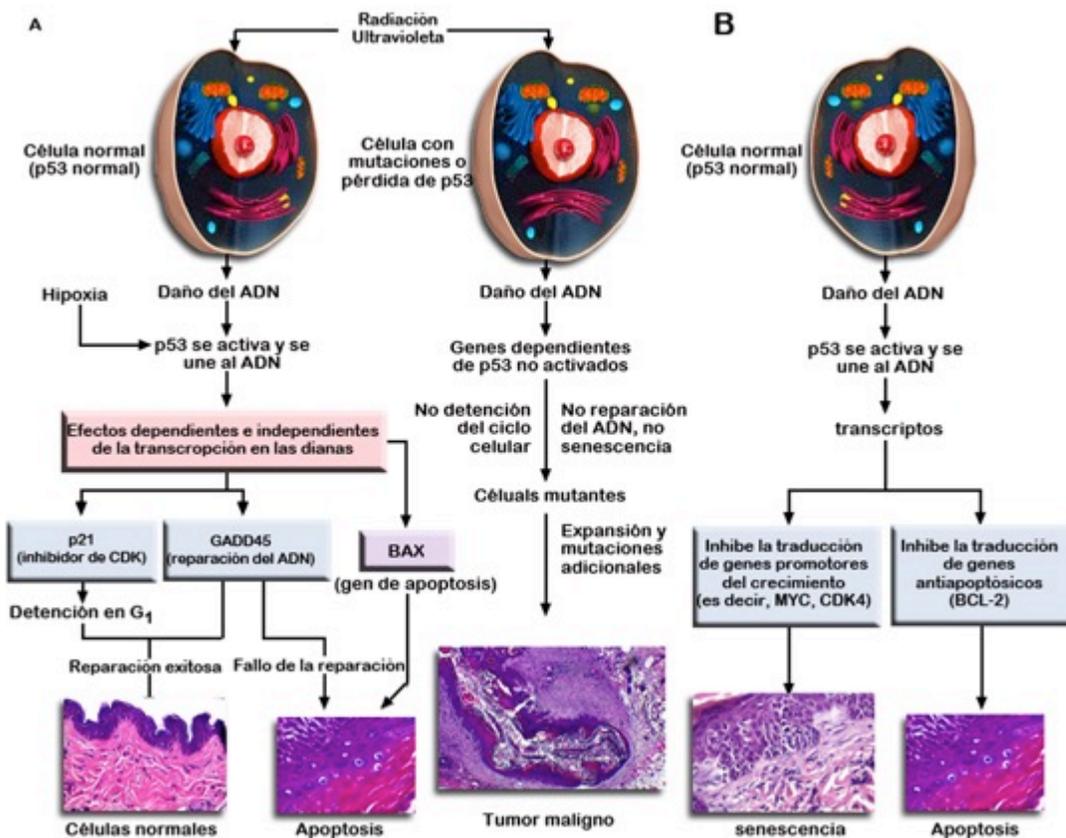
### **3. p53 y carcinogénesis.**

En las células humanas el gen p53 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17, se extiende a lo largo de 20 Kb y está constituido por 11 exones. Este gen codifica a la proteína P53 de 393 aminoácidos con un peso molecular de 53 KDa, la cual desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación celular y en la respuesta de la célula a estímulos de estrés. El gen p53 se encuentra mutado en alrededor del 50% de los cánceres en los seres humanos, debido a esto el cáncer surge como consecuencia de la pérdida de su función normal (Bai y Zhu, 2006).

La proteína P53 es un factor que regula la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a ella y que son responsables de las diferentes funciones asociadas a ésta (Afaq et al., 2005; Steele y Lane, 2005). Por ello, los genes regulados transcripcionalmente por P53 pueden agruparse dependiendo de sus funciones: 1) genes implicados en la inhibición del ciclo celular; 2) en la reparación del daño en el DNA; 3) en la inhibición de la angiogénesis y 4) en la inducción de la apoptosis (Bax, PERP, PUMA, Fas, APAF-1, DR5, p21, Bcl2) (Steele y Lane, 2005; Tokino y Nakamura, 2000; Zamzami y Kroemer, 2005 y Roos y Kaina, 2013). Por otro lado, se sabe que regula la transcripción de MDM2, que a su vez regula los niveles de P53, lo que sugiere un sistema de autorregulación (Bai y Zhu, 2006; Sam et al., 2012) (Fig. 20).

P53 se encuentra en un estado no-funcional en las células no sometidas a estrés. Pero cuando hay exposición a algún tipo de agente que daña al DNA, como la RUV, P53 se activa por medio de fosforilaciones en los residuos de serinas, llevadas a cabo por las cinasas ATM y ATR; liberándose de su asociación con MDM2. En ese momento P53 aumenta sus niveles por retroalimentación positiva, incrementa su vida media y activa vías de señalización para ejercer su función de factor de transcripción. Así P53 induce una respuesta que conduce al arresto del ciclo celular y a la reparación del DNA, debido a la expresión de genes

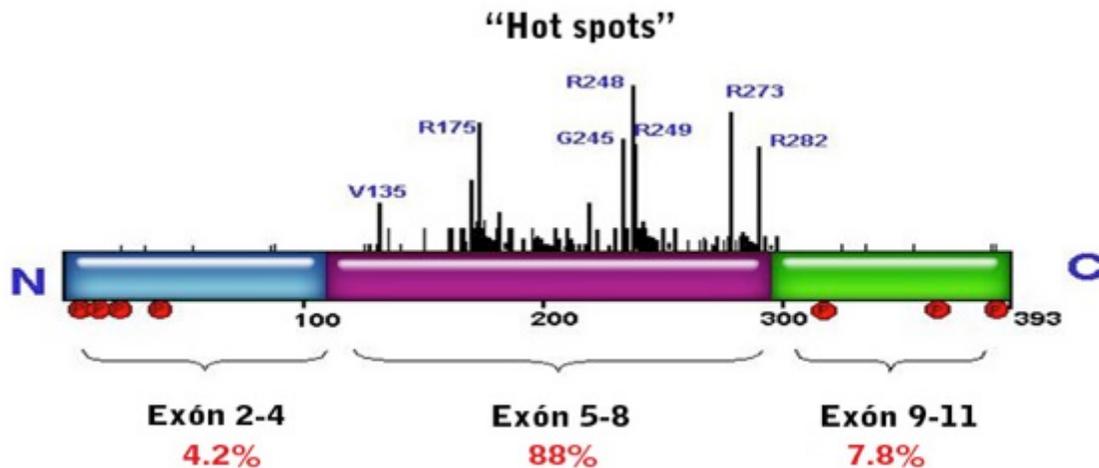
importantes para la reparación del daño como son GADD45 y p21. Sin embargo, si el nivel de daño es grave, P53 aumenta su concentración provocando la activación de la apoptosis (por efecto de genes como Bax) como una vía de protección para evitar la inestabilidad genómica (Melnikova y Ananthaswamy, 2005; Hickman et al., 2002). Este mecanismo disminuye la probabilidad de que se generen clones celulares con mutaciones, por lo que P53 actúa como “guardián del genoma”. Sin embargo, si los mecanismos de inducción fallan, debido a que las mutaciones se presenten en p53 la célula continuará replicándose, expresando la mutación y será en la fase de progresión que dará lugar al cáncer de piel (Steele y Lane, 2005; Bai y Zhu, 2006; Roos y Kaina, 2013) (Fig. 20).



**Figura 20. P53 y cáncer de piel.**

En tumores humanos casi el 90% de las mutaciones de p53 se localizan entre los exones 4-9 (Bai y Zhu, 2006; Besaratinia y Pfeifer, 2010). Dichos exones codifican

el dominio proteico que permite la unión al ADN, por lo que las mutaciones en estas zonas alteran la función de la proteína como factor de transcripción. Estas regiones se conocen como “hot spots” por su alta frecuencia de mutación (Besaratina y Pfeifer, 2009; Cadet et al., 2005) (Fig. 21).



**Figura 21. Sitios de alta incidencia de mutaciones en p53 (Modificado de Bai y Zhu, 2006).**

La inducción de la proteína P53 en respuesta al daño en el DNA está regulada post-traduccionalmente. La detección de fotoproductos es una de las primeras señales que llevan a su incremento. El aumento en los niveles de P53 suele ser proporcional al daño producido en el DNA, siendo proporcional a la dosis de irradiación (Afaq, 2011 y Afaq et al., 2005).

En el cáncer de piel se ha detectado que la alteración en p53 es causada por la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC) y la baja tasa de reparación, en los sitios de persistencia de fotoproductos (Benjamin y Ananthaswamy, 2007). Además, las regiones promotoras del gen son particularmente sensibles al daño (Besaratina y Pfeifer, 2010; Besaratina y Pfeifer, 2006).

Con respecto a las mutaciones que pueden ocurrir en p53 se ha observado que las transiciones C-T y CC-TT se encuentran en CCE, CCB y queratosis actínica

(Pfeifer y Besaratinia, 2012). Todas estas mutaciones se relacionan con la exposición a la RUV, debido como se ha mencionado a que el ADN es una molécula que por su estructura química es un cromóforo para la RUV. Por lo tanto, p53 es un blanco crítico en las mutaciones iniciales que llevan a la fotocarcinogénesis y se deben identificar aspectos adicionales genéticos y epigenéticos que ocurren durante los múltiples pasos del desarrollo del cáncer de piel (Grujil et al, 2001 y Lauth et al., 2004) (Fig. 20).

#### **4. Cambios en la epidermis y mecanismos moleculares implicados en la respuesta a la exposición a la RUV.**

Después de la exposición a RUV se observa que algunos queratinocitos mueren por apoptosis debido a un extenso daño en el ADN. A estos se les conoce como células de quemadura. Histológicamente se reconocen por presentar el núcleo picnótico y el citoplasma eosinofílico; en casos severos se puede observar en el corte histológico atrofia epitelial (Maverakis et al., 2010). La apoptosis es una vía efectiva para mantener la homeostasis tisular sin producir inflamación. Cuando se incrementan los niveles de enzimas reparadoras del daño celular hay una reducción del número de células de quemadura; sin embargo, no se eliminan del todo, indicando que otros mecanismos proapoptóticos continúan actuando (Tedesco et al., 1997; Rastogi et al., 2010).

En respuesta a la RUV, en la piel se estimula la división y diferenciación de los queratinocitos pudiendo desarrollar paraqueratosis, hiperplasia e hipertrofia. Por otra parte, se desencadenan los procesos de melanogénesis generando el bronceado (Wulf et al., 2004). Estos cambios son mecanismos de defensa para la prevención del daño inducido por la RUV, ya que la principal función de la capa córnea es la protección de los tejidos interiores al reflejar la luz, mientras que la melanina actúa absorbiendo estas longitudes de onda actuando como un filtro solar (Roelandts, 2009).

El sistema antioxidante es un conjunto de moléculas funcionalmente interrelacionadas con el fin de anular, neutralizar o eliminar sustancias capaces de inducir daño oxidativo en las distintas estructuras celulares. Por ello su acción es

fundamental para reducir las especies reactivas de oxígeno (ERO) inducidas por la RUV y prevenir el daño oxidativo derivado de las mismas (Kullavanijaya y Lim, 2005; De Gálvez, 2010).

La activación de los mecanismos de defensa está regulada por mediadores celulares, como citoquinas, factores de crecimiento y por factores de transcripción, como p53, NF- $\kappa$ B y el Nrf2, que estimulados por cambios celulares, modifican la expresión de genes en función de las necesidades de la células, y cuando todos los mecanismos de reparación y protección fallan se puede desarrollar el cáncer de piel (Maverakis et al., 2010; Afaq, 2011).

## **5. Reparación del ADN**

La RUV provoca daños al DNA de forma directa o indirecta. En el primer caso, la exposición a la RUV puede producir los dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC) y fotoproductos 6-4 (6-4 PP). Ambas lesiones son altamente mutagénicas, siendo los DPC las alteraciones más frecuentes inducidas por la RUV. También pueden presentarse rupturas de las cadenas, entrecruzamientos y fotoproductos de purinas (Matsumura y Ananthaswamy, 2004). La reparación de todos estos daños se da por la escisión de nucleótidos (NER), por mecanismos de recombinación y mediante la escisión de bases (BER) (Vreeswijk et al., 2009). La tasa de reparación para las diferentes lesiones no es la misma, ya que los 6-4 PP presentan una velocidad de reparación mayor, posiblemente porque la distorsión que producen es más evidente (Pfeifer et al., 2005; Ichihashi et al., 2003).

Los fotoproductos pueden ser mutagénicos durante el proceso de replicación cuando la DNA polimerasa encuentra un DPC, al no reconocerlo inserta una adenina complementaria a una citosina. Debido a esto, los dímeros formados por C-C pueden derivar en mutaciones C-T y CC-TT (Ichihashi et al., 2003). Como consecuencia de lo anterior los fotoproductos son un factor clave en los diferentes niveles de respuestas del organismo ante la exposición a la RUV (Passaglia y Martíns-Menck, 2010).

El daño indirecto al DNA es causado por la generación de radicales libres después de la exposición a la RUV, los cuales oxidan las bases nitrogenadas. El principal

marcador biológico de daño al DNA es la 8-hidroxiguanosina (8-oxodG) (Ichihashi et al., 2003; De Gálvez, 2010). Además, el daño al DNA mitocondrial por acción de la RUV es una vía para desacoplar la cadena respiratoria provocando daño permanente (Reyes y Vitale, 2012).

### **3.3 Modelos de estudio en fotoprotección.**

El ratón como modelo biológico es muy útil para la comprensión de los mecanismos moleculares que propician el desarrollo de la carcinogénesis. La cepa de ratones pelones SKH-1 facilita el estudio de patrones de las mutaciones de p53, así como modificaciones a la proteína (Benavides et al., 2009). La comparación de resultados histopatológicos de ratón y humano permite correlacionar datos e iniciar con una evaluación comparativa de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de cáncer de piel (Sharma et al., 2011). Uno de los blancos de estudio más significativos es p53 que presenta un patrón de mutaciones inducidas por la RUV similar en ratones y en humanos, por lo que se puede estudiar el mismo evento genético en ambos modelos (Schwarz et al., 2013).

El daño al DNA por la formación de DPC a lo largo de p53 es un mecanismo crucial en la carcinogénesis. La localización de lesiones persistentes en DNA en los “hot spots” en genes relevantes en cáncer como p53 puede ser un marcador cuando se sospecha que un agente es carcinogénico o se buscan agentes protectores. La detección puede realizarse *in vitro* e *in vivo*, por lo tanto el análisis de patrones de mutación ayuda a establecer la etiología del cáncer (Pfeifer y Besaratinia, 2012).

El estudio de p53 actualmente emplea técnicas específicas para determinar el daño al DNA a nivel de resolución de nucleótidos. Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten conocer un panorama general de mutaciones incluyendo tumores primarios que pueden ayudar a identificar los sitios con mayor cantidad de DPC y que a largo plazo pueden originar tumores altamente malignos. También ayudan a establecer la distribución y nivel de reparación de los DPC (Besaratinia y Pfeifer, 2009).

La inducción de tumores por medio de RUV permite estudiar a las diversas sustancias fotoprotectoras que, cuando son efectivas, disminuyen la incidencia y tamaño de los tumores. Histológicamente se puede diagnosticar si las lesiones son benignas, precancerosas o malignas (Kim et al., 2003), por lo que cortes histológicos de ratón y de humano con presencia de queratosis actínica, CCB y CCE correlacionan con el espectro de mutación causado por la RUV en p53 (Chen et al., 2013).

En este contexto, los estudios con sustancias de origen natural como la silibina, cafeína y fenólicos del té verde (por mencionar algunos), han llegado a determinar el espectro de mutación en p53 después de exponer líneas celulares (ratón y humano) y ratones en presencia de las sustancias a la RUV. Los resultados muestran similitudes en los modelos de estudio en la inducción de apoptosis, la reparación e inhibición de la formación de DPC y el arresto del ciclo celular. Todo lo anterior se relaciona con el aumento de P53, su adecuado funcionamiento y por tanto la disminución en la incidencia de tumores (Roy et al., 2012; Conney et al., 2013).

Los procesos relacionados con el desarrollo de cáncer de piel son importantes para la determinación de los criterios de valoración molecular implicadas con el estudio de sustancias fotoprotectoras (McFeat et al., 2013).

### **3.3.1 Ratones SKH-1**

El fotoenvejecimiento cutáneo humano es un problema médico importante que incluye el envejecimiento prematuro y la fragilidad de la piel, por lo que diversos modelos de animales han sido utilizados para evaluar este daño e identificar cuál se asemeja más a los cambios observados en la piel humana durante la exposición a luz UV, tanto de forma aguda como crónica. Algunos estudios han evaluado estos cambios y han demostrado que la cepa de ratones SKH-1 muestra características semejantes al fotodaño humano, incluyendo el engrosamiento epidérmico, congestión sanguínea, infiltración de la dermis con células inflamatorias, células apoptóticas, inducción de tumores y pérdida de colágeno. Asimismo, se ha evaluado con los ratones SKH-1 el uso de protectores solares, ya

que muestran una mayor sensibilidad a la luz UV. Estos efectos han sido evaluados a nivel histológico, bioquímico e inmunológico (Lee et al., 2003; Kim et al., 2003; Sharma et al., 2011).

Los ratones SKH-1 utilizados tienen una mutación en el gen *Hr* que hace que pierdan el pelo alrededor de los 20 días de nacidos. Después la piel se vuelve más gruesa, particularmente en la zona de la cabeza, por lo que los folículos pilosos se pueden observar en su mayoría atrofiados. Además, pueden presentar hiperqueratosis en el estrato córneo. En la dermis las glándulas sebáceas y los folículos pilosos pueden estar degenerados y la presencia de quistes pilosos o sebáceos con láminas concéntricas de queratina es común debido a ese proceso, y al existir muerte celular se puede desencadenar una respuesta inflamatoria que traerá como consecuencia la congestión de vasos sanguíneos. Estos ratones tienen una mayor sensibilidad a la luz ultravioleta y, por lo tanto, presentan con mayor facilidad daños ocasionados por luz UV que pueden desencadenar cáncer de piel (Crew y Mirskaia, 1931; Montagna et al, 1952; Cachon-González et al., 1994; McGregor y Hawk, 2001; Benavides et al., 2009).

### **3.3.2 Cultivos celulares.**

Las dietas basadas en productos naturales ricos en polifenoles y que brindan protección contra la RUV han tomado gran importancia. Sin embargo, existe poca información sobre el potencial de riesgo para la salud si se consumen en exceso. Diversas sustancias producidas por las plantas presentan actividad citotóxica y pueden tener correlación con la incidencia de ciertos tumores, además de que pueden causar efectos irritantes o alérgicos por el contacto con la piel u otros órganos. Por lo tanto, al realizar un estudio de nuevos compuestos con interés en fotoprotección, se deben considerar los posibles efectos citotóxicos para garantizar su correcto uso en un modelo animal, o bien para el consumo humano (Labieniec y Gabryelak, 2005).

La determinación de la citotoxicidad, viabilidad y genotoxicidad es una parte fundamental en la evaluación de nuevos compuestos con potencial en el campo de la fotoprotección, y determinar el riesgo/beneficio de dicho compuesto,

garantiza que la actividad para la que fue probado sea segura y con el mínimo efecto tóxico al organismo (Rao et al., 1997; y Savi et al., 2006).

Los cultivos celulares son un método que permite simplificar los estudios de citotoxicidad y viabilidad hasta determinados niveles aceptables, ya que eliminan las interacciones y variaciones que se presentan al experimentar con organismos completos. Al mismo tiempo son una alternativa para conocer los mecanismos celulares y los cambios que ocurren en ellos tras la exposición a un posible agente tóxico. Las células HaCaT de queratinocitos humanos inmortalizados no son tumorigénicas, sin embargo, son más sensibles a los daños inducidos por la RUV debido a la mutación que presentan en el gen p53, esto en comparación con los cultivos no inmortalizados o de células normales. Por lo tanto, son un modelo ideal para pruebas de fotoprotección *in vitro* (Magal et al., 1998; Aoki-Yoshida et al., 2013; Baccarin et al., 2015).

En los últimos años se han desarrollado métodos colorimétricos en placas de microtitulación con el fin de evaluar la viabilidad celular. Tal es el caso de la técnica de MTT, que se basa en el uso de la sal de tetrazolio, 3-(4,5-dimetiazol-2il)-2,5-bromo difeniltetrazolio (MTT). Los ensayos con esta técnica son un método rápido, eficaz y confiable para cuantificar colorimétricamente la viabilidad celular en estudios de proliferación y citotoxicidad *in vitro* (Ramón, 2006).

El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo soluble en agua; su empleo se basa en la reducción a un formazan de color azul-púrpura insoluble en agua. Esta reducción se lleva a cabo por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, activa solamente en células vivas (Carmichael, 1987a y b; Talorete, 2006). Para el análisis se toma en cuenta la correlación existente entre MTT metabolizado y el número de células viables, a partir de la intensidad de color que se presenta en cada pozo, la cual se puede medir por medio de un espectrofotómetro de placas. Esta correlación es importante, tomando en cuenta que se utiliza un control, el cual no es adicionado con ningún fármaco, por lo que la densidad celular de éste puede verse incrementada y en el caso de los grupos experimentales, disminuida.

Debido a la facilidad de realización y lectura de muestras, la técnica de MTT es una de las más utilizadas en el estudio de viabilidad celular (Schroeterova, 2009). Cabe mencionar que existen pruebas de tiempo medio (24 h) y evalúan los cambios por muerte directa (Yañez, 2004). En los estudios a largo plazo (72 h) la evaluación se basa en el efecto antiproliferativo del compuesto, ya que da tiempo suficiente de que se produzcan fenómenos como paro del ciclo celular y apoptosis (Hansson, 1987; Yañez, 2004).

### **3.3.3 Analisis de curvas de disociación de alta resolución (PCR-HRM).**

Durante el siglo pasado, el avance en la biología molecular ha contribuido a la comprensión cada vez mayor de los mecanismos relacionados con la iniciación, promoción y progresión del cáncer (Garro et al., 2014). La identificación de daños y mutaciones al ADN son de vital importancia en el establecimiento de las estrategias de fotoprotección. De ahí que en los últimos años las diversas técnicas de biología molecular han avanzado en la detección de mutaciones causadas por la RUV.

La metodología de PCR-HRM direcciona un análisis de datos cuantitativos de expresión génica en estudios biológicos, biotecnológicos y de diagnóstico de enfermedades o daños. Se basa en el uso de colorantes fluorescentes para combinar la amplificación y los pasos de detección de la reacción de PCR en un único paso. Este ensayo mide el incremento en la señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN procesado durante cada ciclo de PCR. Las alteraciones de las bases se observarán como cambios, tanto en la fluorescencia como en la temperatura de alineamiento (curvas de Melting). Esta curva de fusión y  $T_m$  (temperatura de fusión: temperatura en la que el 50% de las moléculas de DNA se encuentran como cadena doble) es característica de cada producto de PCR, variando con la secuencia de bases, el contenido de G-C y la longitud del amplicón (Erali et al., 2008; Nolan et al., 2006; Bjarnadottir y Jonsson, 2005; Wong y Medrano, 2005).

Cualquier cadena de doble hebra presente en la muestra emitirá fuertemente fluorescencia a bajas temperaturas. Pero a medida que esta última aumenta, la

fluorescencia disminuye hasta que a determinada temperatura decae, reflejando la temperatura de Melting (Quintana et al., 2014). HRM es una técnica de rastreo de la mutación que va controlando el cambio progresivo de la fluorescencia causada por la liberación de un colorante de intercalación del ADN de doble cadena conforme éste se va desnaturalizando a cadena sencilla al ir aumentando la temperatura.

A través del análisis de estas curvas (HRM), el sistema de análisis proporcionará una aproximación para detectar polimorfismos de una única base (SNPs) o descubrir mutaciones genéticas. El análisis de las curvas de Melting monitorea la hibridación (temperatura dependiente de cada cadena) y determina las pequeñas variaciones en la  $T_m$  debido a los errores o desestabilizaciones; y es esta diferencia la base para la detección de variantes debido a la presencia de mutaciones (Bustin, 2005; Reed et al., 2007). Por lo tanto, los resultados se pueden analizar en función de las diferentes curvas que se presentan, basados en las diferentes  $T_m$  (Hermann et al., 2007). A partir de estos datos el programa del equipo lleva a cabo una transformación matemática para generar un gráfico que permitirá detectar la disminución de fluorescencia expresada como picos.

Estas diferencias serán analizables después del tiempo de amplificación. Por lo tanto, esta prueba permite una rápida detección de genes involucrados en neoplasias o bien en otras enfermedades, siempre y cuando se cuente con el equipo y programa de análisis adecuados para cada plataforma.

Es una técnica que ha sido empleada para buscar mutaciones somáticas en diferentes genes como KIT, BRAF, EGFR, ErbB2 y KRAS, por lo que se considera eficaz para la identificación de mutaciones en p53 (Krypuy et al., 2007). La tecnología de qPCR ha permitido la identificación de mutaciones no conocidas o modificaciones de ADN por acción de agentes tóxicos. (Hoffmann et al., 2008; Benlloch et al., 2006; McGivern et al., 2004).

Si las condiciones de PCR son llevadas a cabo con cuidado y la pureza de la muestra de ADN es buena, el patrón de análisis será único y los picos o diferencias en las  $T_m$  serán de gran utilidad al momento de generar datos nuevos.

Las ventajas de este procedimiento en comparación con los métodos convencionales incluyen: su alta sensibilidad, rango dinámicamente grande y su velocidad en la cuantificación, lo que incrementa su sensibilidad. Esta metodología es simple, rápida y reproducible para uso en aplicaciones clínicas y de investigación. La metodología de PCR-HRM presenta ventajas en costo y tiempo y es una alternativa de la técnica de secuenciación directa automatizada, ya que a pesar de que la secuenciación directa es muy eficiente, también es más laboriosa, más cara en términos de reactivos y el análisis de datos no es 100% eficiente (Ishikawa et al., 2010; Rangel et al., 2008).

### **3.4 Fotoprotección.**

La fotoprotección es una actividad preventiva y terapéutica frente a la quemadura solar, el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel. Este término implica diversas acciones para evitar los daños por radiaciones solares, como el uso de ropa, gorros, lentes, antioxidantes, filtros y bloqueadores solares (Kullavanijava y Lim, 2005; González et al., 2008). Los dos últimos contienen moléculas que pueden absorber, reflejar o dispersar la RUV (Gilaberte y González, 2010).

Los fotoprotectores tópicos han demostrado prevenir el daño causado por la RUV, al evitar los efectos agudos y crónicos de la radiación solar (Serpone et al., 2007); actúan en dos niveles: como filtros y/o modulando procesos celulares (Afaq, 2011). Por lo que un buen fotoprotector deberá prevenir o reparar los daños cutáneos generados por la radiación solar y sus efectos deberán incluir la absorción de fotones, inhibición de la inflamación aguda y crónica, modulación de la respuesta inmune, inducción de la apoptosis y actividad antioxidante (Carrascosa, 2011; Lautenschlager et al., 2007). Su desarrollo implica nuevos retos ya que, además, deberán ser estables y seguros para el ser humano y el medio ambiente (Gilaberte y González, 2010; Carrascosa, 2011).

Los protectores solares se dividen en físicos o inorgánicos y químicos u orgánicos. Los físicos incluyen agentes que forman una capa visible sobre la piel, por lo que son llamados pantallas solares; debido al tamaño de estas partículas, son opacos (Serpone et al., 2007). Hoy en día el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y el óxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ) son los más utilizados. Actúan dispersando, reflejando y absorbiendo la RUV, visible e infrarrojo (Sambandan y Ratner, 2011). Los filtros orgánicos o químicos absorben la RUV gracias a anillos aromáticos que debido a su estructura, excitación y posterior estabilización, pueden convertir la radiación en calor. Este grupo se clasifica en filtros contra la UVB y la UVA (Giokas et al., 2007).

El octil-metoxicinamato (PARSOL) es el filtro más utilizado en Estados Unidos y Europa (Lautenschlager et al., 2007). Actualmente se ha demostrado que al encapsularlo en microesférulas aumenta su potencial protector (Gilaberte y González 2010). El principal problema que presenta este compuesto es su incompatibilidad con la avobenzona (filtro UVA), ya que al estar en contacto con ésta se hace inestable y se degrada (Kullavanijaya y Lim, 2005). También se realizan otras combinaciones con el fin de aumentar la potencia final de los fotoprotectores. Entre los filtros químicos de amplio espectro más novedosos destacan el Mexoryl® y el Tinosorb®. Estos tienen microcápsulas con los fotoprotectores que así reducen la penetración del filtro en la piel, mejorando la fotestabilidad y disminuyendo el riesgo de alergias (Carrascosa, 2011; Lautenschlager et al., 2007; Sambandan y Ratner, 2011).

Tomando en cuenta que durante la exposición al Sol se generan radicales libres, una de las herramientas novedosas para aumentar la eficacia de los fotoprotectores es incorporar antioxidantes. Esto trae como resultado una combinación de ambas propiedades. Por lo tanto, este tipo de combinaciones con ingredientes multi activos permitirá aumentar la actividad fotoprotectora (González et al., 2008; Afaq, 2011).

### **3.4.1 Fotoprotección con sustancias de origen natural.**

Las principales novedades en fotoprotección incluyen la búsqueda de sustancias de origen natural que puedan ser incorporadas a los fotoprotectores tradicionales, además de la administración oral. Los suplementos orales y tópicos de antioxidantes disminuyen los efectos inmediatos de la RUV, sin interferir en la síntesis de vitamina D. Sin embargo, las dosis necesarias pueden causar alteraciones gástricas o bien irritaciones cutáneas (Gilaberte y González, 2010; Carrascosa, 2011).

En los últimos años algunos metabolitos de origen vegetal han ganado una considerable atención como agentes fotoquimioprotectores. Este término engloba a compuestos de origen sintético o natural que puedan prevenir, inhibir o revertir la fotocarcinogénesis (Afaq et al., 2005; García Bores y Avila, 2008). De acuerdo con lo anterior, la fotoquimioprotección se puede considerar como una estrategia viable para reducir la incidencia de cáncer de piel (Afaq y Mukhtar, 2006; Afaq et al., 2005). Así, la búsqueda de nuevos agentes de origen natural con estas propiedades es necesaria para la prevención de los daños causados por la exposición excesiva al Sol, como el estrés oxidativo, daño al ADN, inmunosupresión y procesos inflamatorios (Afaq, 2011).

El principal grupo de sustancias de origen natural con actividad fotoprotectora son los polifenoles, que incluyen taninos, flavonoides, estilbenos y fenilpropanoides (Gilaberte y González, 2010). El interés creciente por su uso deriva de sus propiedades antioxidantes y su capacidad de absorber la RUV (García Bores y Avila, 2008). Los antioxidantes polifenólicos se han asociado con la disminución de la fotocarcinogénesis y existen estudios que demuestran la eficacia de este tipo de compuestos al reducir la inflamación, el daño al DNA y la inmunosupresión producida por RUV (Valenzuela y Espinoza, 2012; Nichols y Katiyar, 2010). Los polifenoles presentan un gran beneficio en la prevención de la fotocarcinogénesis. Sin embargo, en algunos casos -como los presentes en el té verde- en altas concentraciones pueden llegar a ser tóxicos. Otra desventaja es que se oxidan y

pierden su actividad rápidamente, por lo que se buscan alternativas que los hagan más estables (De Gálvez, 2010).

A pesar del gran número de sustancias fotoprotectoras en el mercado, los avances en esta área hacen que cada día se busquen nuevas estrategias para evitar los daños, por lo que se ha incrementado el tipo de moléculas que puedan ser adicionadas a los filtros existentes. La aplicación tópica de oligonucleótidos o de enzimas reparadoras del ADN aumenta la capacidad endógena para la reparación de fotoproductos, generando protección frente a la RUV y disminuyendo la fotocarcinogénesis (Gilaberte y González, 2010).

Las enzimas reparadoras como la T4 endonucleasa V, son aplicadas en liposomas, lo que facilita el funcionamiento del sistema reparador de DNA y disminuye la inmunosupresión. Las fotoliasas son enzimas presentes en plantas, bacterias, reptiles, anfibios y marsupiales e, incluso, en placentas de mamíferos. Actúa absorbiendo la luz visible para romper los DPC, disminuyendo hasta en un 50% la apoptosis y la producción de DPC (Kullavanijaya y Lim, 2005; Sambandan y Ratner, 2011). Otro mecanismo enzimático es el de la oxoguanina glicoxilasa, la cual cataliza el primer paso de la reparación de bases, retirando las 8-oxodG y reduciendo el tamaño y progresión de tumores cutáneos en ratones expuestos a RUV (Gilaberte y González, 2010).

Los oligonucleótidos (TTAGGG), aplicados tópicamente, activan el proceso de melanogénesis sin necesidad de irradiación previa. Se ha demostrado que su uso reduce el desarrollo de carcinomas en ratón, disminuye la apoptosis, los DPC y el estrés oxidativo (González et al., 2008; Sambandan y Ratner, 2011).

Existen otras sustancias que a pesar de que aún no son utilizadas comercialmente, tienen resultados prometedores en el laboratorio. Algunas de ellas son: los quelantes de hierro, osmolitos, dihidroxiacetona, pitriacitrina e inhibidores de la ciclo-oxigenasa (Gilaberte y González, 2010).

Las estrategias más recientes en fotoprotección incluyen la estimulación de melanogénesis por medio del forskolin, un diterpenoide que penetra en las células activando a los melanocitos sin necesidad de exposición solar, lo que genera un

efecto fotoprotector persistente. La importancia de este compuesto radica en la capacidad de inducir la síntesis de melanina en aquellos individuos incapaces de broncearse (Gilaberte y González, 2010).

Por lo tanto, los nuevos modelos de fotoprotección deben buscar estrategias que permitan el equilibrio necesario evitando la quemadura solar y el cáncer de piel, pero permitiendo los efectos benéficos de la radiación solar.

El estudio de diversas sustancias fotoprotectoras está enfocado a prevenir y reparar mutaciones puntuales en p53 y evaluar el efecto de la administración de estos compuestos en el nivel de daño al ADN inducido por la RUV, empleando como marcadores los DPC, 6-4 PP y la 8-oxodG (Afaq y Mukhtar, 2006; Afaq, 2011; Besaratinia y Pfeifer, 2009; Besaratinia y Pfeifer, 2006) (Tabla 7). Es en este sentido que las investigaciones se han encaminado a reconocer las mutaciones en codones específicos de p53 y están siendo descritas para cada uno de los diferentes tipos de carcinomas cutáneos (Pfeifer et al., 2005; Afaq et al., 2005; Besaratinia y Pfeifer, 2009; Besaratinia y Pfeifer, 2006).

Algunas sustancias que se han estudiado por sus diversos efectos fotoprotectores se resumen en la tabla 7.

**Tabla 7. Algunas sustancias estudiadas en la fotoprotección.**

Agente	Sustancia	Modelo de protección					
		Molecular Daño oxidativo	Daño al DNA	Celular p53	Tisular Inflamación e inmunosupresión	Sistémico Carcinogénesis	
<b>1. Carotenoides</b>	Luteína	*					
	Astaxantina	*					
	Licopeno	*					
	β-caroteno	*					
	Zeaxantina	*					
<b>2. Polifenoles Flavonoides</b>	Genisteína	*			*	*	
	Silimarina	*	*	*	*	*	
	Isoflavonas	*			*		
	Quercitina	*					
	Picnogenol	*			*	*	
	Apigenina	*				*	
	Flavonol	*					
<b>Estilbenos</b>	Resveratrol	*	*		*	*	
<b>Fenil propanoides</b>	Ác. Ferúlico	*			*		
	Ác. Cafeico	*	*		*	*	
	Verbascósido	*			*		
<b>3. Extractos de plantas</b>	<i>Polipodium leucotomos</i>	Ác. Ferúlico	*		*	*	
		Ác. Cafeico	*		*		
	<i>Camelia cinensis</i>	Epigallocateína	*	*	*	*	
	<i>Brassica</i>	Carotenoides	*	*			*
		Vitamina C	*				
		Vitamina E	*				
	<i>Equinacea</i>	Alcamidas	*			*	*
		Ác. Cafeico	*				
	<i>Trifolium pratense</i>	Biochanina A	*			*	
	<i>Coleus forskohlii</i>	Forscolina				*	
	<i>Punica granatum</i>	Antocianidinas	*	*		*	
		Taninos hidrolizables	*	*		*	
	<i>Polygonum multiflorum</i>		*				
<i>Coffea arabica</i>	Cafeína	*	*	*	*	*	
<b>4. Vitaminas</b>	<b>Vitamina C</b>	Ác. Ascórbico	*		*		
	<b>Vitamina E</b>	α tocoferol	*		*	*	
	<b>Vitamina C+E</b>		*				
	<b>Vitamina C+E+ picnogenol+ Ác. de primula</b>		*				
	<b>Seresis (β caroteno, licopeno, vitaminas C y E, selenio y proantocianidinas)</b>		*				
	<b>Vitamina D</b>		*	*			
	<b>5. Proteínas</b>	<b>Endo T4V</b>		*		*	
		<b>Fotoliasa</b>	*	*		*	*
		<b>Oxoguanina</b>	*	*			*
		<b>glicoxilasa</b>					

<b>Péptidos melanotrópicos</b>	Análogos de la $\alpha$ -MSH Melatonan I y II	*			*	
<b>6. Ácidos grasos</b>						
Ácido eicosapentanóico		*	*			
Ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 y 6			*	*		
<b>7. Otros</b>						
Dihidroxiacetona						*
Pitriactrina						*
Sunspheres®	Indol Polímeros de estireno-acrilato	*				*
UV pearls®	Corpúsculos de sílice	*		*		
Oligonucleótidos		*	*			*
Productos para peeling	Ác. Salicílico					*
N-acetil-cisteína				*		
Zinc				*		

(Reyes y Vitale, 2012; Gilaberte et al., 2003; Kullavanijaya y Lim, 2005; Moreno y Moreno,; García-Bores y Avila, 2008; Valenzuela y Espinoza, 2012; Katiyar et al., 2008; Mallikarjuna et al., 2004; González et al., 2008; Esposito et al., 2010; Funes et al., 2010).

En los últimos años, algunos compuestos de origen natural y sintético han ganado una considerable atención como agentes fotoprotectores. La utilización de filtros solares preparados o suplementados a partir de productos naturales es una opción para el cuidado de la piel y que evita e incluso repara el posible daño ocasionado por la RUV (Afaq, 2011).

Se ha demostrado que algunas sustancias producidas por las plantas, como los fenilpropanoides, tienen la capacidad de absorber la RUV debido a los grupos cromóforos presentes en sus estructuras químicas (Kostyuk et al., 2008). Un ejemplo de posible fotoprotector vegetal es el verbascósido (tabla 7), compuesto aislado de diferentes plantas, entre las que destaca el género *Buddleja* (Avila et al., 2005; Adedapo et al., 2009).

### 3.5 Género *Buddleja*.

El género *Buddleja* está compuesto por árboles o arbustos dicóicos que miden desde menos de 1 m. hasta 30 m. de alto, en ocasiones dicóicos, ramas jóvenes con pubescencia brillante; hojas pecioladas o sésiles, ovadas, lanceoladas, oblongas o elípticas, densamente estrellado-tomentosas en las

ramas jóvenes y el envés de las hojas; inflorescencias en panículas, capitadas o en cabezuelas esféricas axilares; flores blanco-verdosas, amarillas o amarillento-anaranjadas, más bien pequeñas, cáliz persistente, lóbulos de la corola imbricados o valvados en el botón, oblongos u ovado-redondeados; estambres con los filamentos adheridos a la garganta de la corola; ovario bilocular y bicarpelar, con muchos óvulos, estilo corto, estigma casi entero a manifiestamente bilobado, a veces algo bilabiado; frutos capsulares con dehiscencia loculicida y septicida o indehiscentes, semillas pequeñas, numerosas o escasas, aladas o sin alas (Rzedowski, 2005;). Su corteza es rugosa (Rosas, 2000) y fracturada; en promedio un fruto puede tener 80 semillas, de las cuales el 30% son vanas (Mendoza, 2002).

El género *Buddleja* está ampliamente distribuido en el mundo y comprende alrededor de 100 especies arbóreas y arbustivas. El 50% de las taxa crece en el continente americano y en México existen aproximadamente 15 especies con algunos representantes de amplia distribución (Norman, 2000), por lo que representan un banco de germoplasma que puede ser empleado para diversos fines (Quintanar, De la Paz y Razo, 1996; Camacho et al., 1999; Romero et al., 2003).

### **3.5.1 *Buddleja cordata* H. B. K.**

*Buddleja cordata* comprende árboles y arbustos dioicos de 1 a 20 m de alto; tronco de 10 a 45 cm de diámetro en la base, corteza rugosa de color café a negruzca; con ramillas tetragonales, densamente tomentoso-estrelladas en las ramas jóvenes; hojas con líneas estipulares, en ocasiones con estípulas foliosas; el peciolo mide de 1 a 7 cm de largo, limbo lanceolado, oblongo, ovado elíptico, de 5.5 a 24 cm de largo por 1.5 a 10.5 cm de ancho, ápice agudo, acuminado o largamente acuminado, margen entero, serrado, serrulado, irregularmente aserrulado o en ocasiones dentado, base obtusa, cuneada, cordada, truncada o raramente atenuado u oblicua, venación muy prominente en el envés, textura algo coriácea, pubescencia densa en el envés, formada de tricomas estrellados aplicados y tricomas estrellados muy laxos, grandes, candelabrifformes, de color

blanco brillante, caduco con el tiempo; inflorescencia formada por grandes panículas terminales de 14 a 25 cm de largo, ramificadas por dos a cuatro veces y con brácteas en cada ramificación; flores con corola amarillenta, generalmente con un toque anaranjado en la garganta, campanuladas; cáliz tomentoso, de 1.5 a 3 mm de largo; corola de 3 a 4 mm de largo con cuatro lóbulos más largos que el tubo, oblongos y extendidos, imbricados en el botón, pubescentes interna y externamente; estambres subsésiles o con filamentos cortos y fuertes; ovario ovoide, estilo conspicuo, estigma claviforme, muy ligeramente bilabiado; fruto ovoide-elipsoide de 2.5 a 6 mm de largo por 1.5 a 4 mm de diámetro, con dehiscencia septicida y loculicida, con numerosas semillas aladas, de 1 a 1.5 mm de largo por 0.2 a 0.4 mm de ancho (Norman, 2000; Rzedowski & Rzedowski, 2001) (Fig. 22 y 23).

Se encuentra ampliamente distribuida en México, desde el norte, principalmente en el Altiplano, y se extiende hasta Guatemala. Se desarrolla en una gran variedad de hábitats, sobre todo en lugares de vegetación secundaria, parcelas de cultivo y ambientes humanos a altitudes de 1400 a 3200 m (Norman, 2000; Ocampo, 2003). Se ha reportado en clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Mendoza, 2002). Esta especie crece en bosques de *Quercus*, de coníferas, mesófilo de montaña y en vegetación secundaria, en donde se encuentra acompañando a la especie *Alnus acuminata* ssp. *glabrata* (Fern.) Furlo (Rzedowski, 2005). También se presenta en climas semisecos templados con lluvias en verano (García et al., 1999) por lo que tolera condiciones de sequía, y se desarrolla en matorrales xerófilos y en suelos erosionados (Norman, 2000). Las temperaturas que soporta van de 6.5 hasta los 22°C. Crece en suelo vertisol pélico y feozem calcárico (Navarro, 2001), andosol y litosol (Mendoza, 2002), así como en sitios donde predominan las rocas calizas y lutitas (García, 1999). También crece en sitios con precipitación anual media de 870 mm (Corona, 1999) y de 1200 a 2000 mm (Sanginés, 2001). Se reconocen tres subespecies, que se diferencian por el tipo de pubescencia en el envés de sus hojas, por el color de sus flores y el tamaño de sus inflorescencias. Se ha colectado en floración de mayo a marzo, es probable que durante todo el año, con mayor frecuencia de julio a febrero. *Buddleja cordata*

ssp. *cordata*, comúnmente llamada “Tepozán”, es una especie de crecimiento rápido que se ha utilizado como planta ornamental (Martínez y Chacalo, 1994). En el campo forestal se le considera como una especie de crecimiento rápido y resistente a la contaminación (Martínez y Chacalo, 1994).

Reino----*Plantae*

Subreino----*Tracheobionta*

División----*Magnoliophyta*

Clase----*Magnoliopsida*

Subclase----*Asteridae*

Orden----*Scrophulariales*

Familia---*Buddlejaceae*

Género----*Buddleia*

Especie---- *Buddleja cordata* H. B. K.

El género *Buddleja* comprende alrededor de cien especies. De ellas, la mitad son de origen americano y 15 habitan en México, de las cuales 5 se encuentran en el Valle de México. El tepozán tiene registros en la medicina tradicional que le atribuyen propiedades bactericidas, amebicidas, analgésicas, diuréticas, antisépticas, para el tratamiento de la cirrosis, reparador del útero, de la bilis y ojos, como anti tumoral, contra las úlceras y como antiinflamatoria (Adedapo et al., 2009; Alonso et al., 2011). Los estudios fitoquímicos realizados en especies de *Buddleja* -en sus semillas, hojas, corteza y raíces- han reportado que presenta diversos compuestos como: sesquiterpenos, flavonoides, feniletanoides y fenilpropanoides, entre los que destaca el verbascósido (Acevedo et al., 2000; Avila et al., 1999).

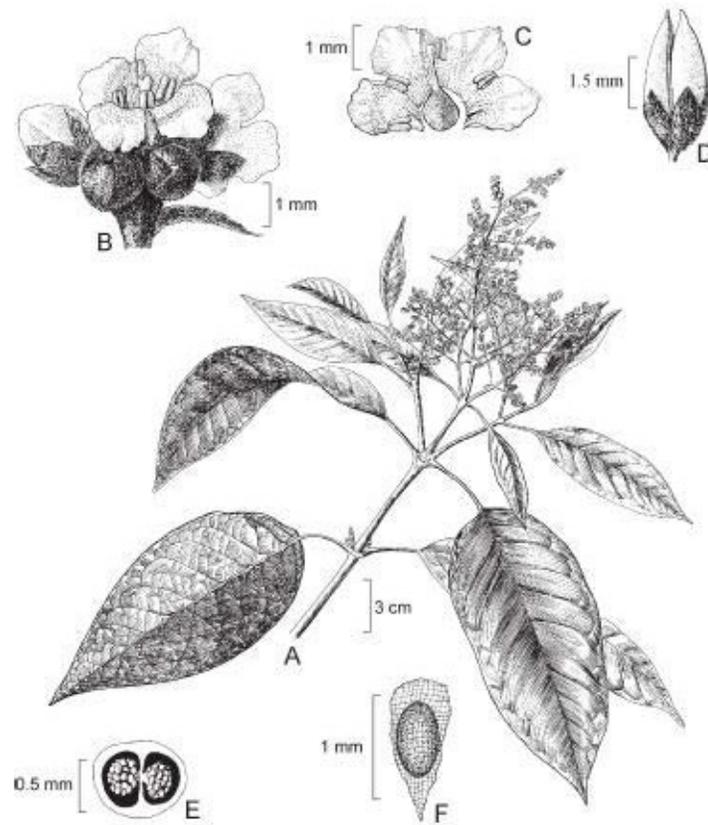


Figura 22. *Buddleja cordata*



Figura 23. Imagen de *Buddleja cordata*. Nombre común: Tepozán.

### 3.5.1.1 Verbascósido

El verbascósido o acteósido es un glucósido fenilpropanoide que estructuralmente presenta una molécula de ácido cafeico (fenilpropanoide) y un 4,5 hidroxifenil etanol (tirosol) unidos a una  $\beta$ - [D]- glucopiranososa, a la cual también se une una ramnosa. Esta molécula es soluble en agua y se produce en las plantas por medio de la ruta del ácido shikímico, a partir de la desaminación de la fenilalanina mediada por enzimas sensibles a estímulos como la RUV (Kostyuk et al., 2008; Esposito et al., 2010; Alipieva et al., 2014) (Fig. 24).

Al verbascósido se le han reportado diversas actividades biológicas, entre las que destacan antiinflamatoria, neuroprotectora, antitumoral (Esposito et al., 2010; Seo et al., 2013; Kurisu et al., 2013) y antibacteriana (Avila et al., 1999) Asimismo, presenta propiedades antioxidantes y fotoprotectoras (Kostyuk et al., 2008; Avila et al., 2005; Kostyuk et al., 2013). Debido a su estructura química este compuesto absorbe luz en la región de la RUV, por lo que es considerado un cromóforo a ésta (Avila et al., 1999; Kostyuk et al., 2008; Esposito et al., 2010; Alipieva et al., 2014) (Fig. 24).

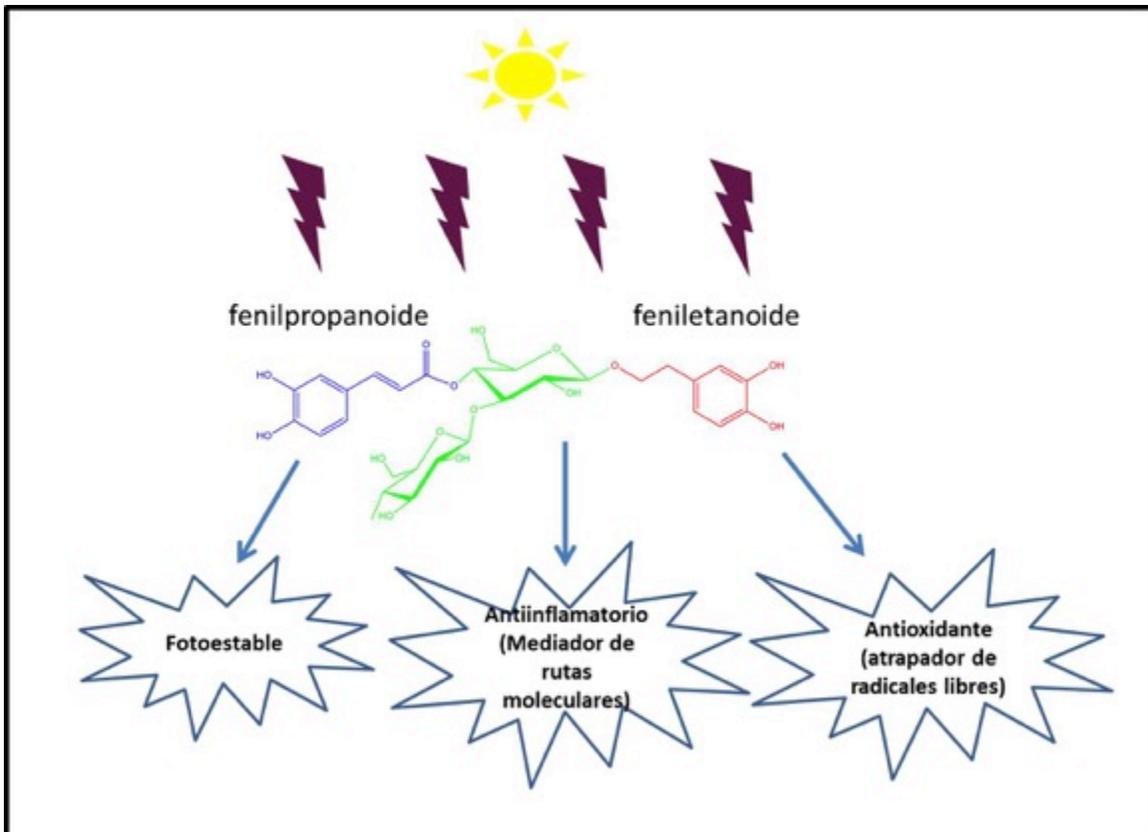


Figura 24. Estructura química del verbascósido y características asociadas a la fotoprotección. En azul se observa la molécula de ácido cafeico (fenilpropanoide), en rojo el 4,5 hidroxifenil etanol (feniletanoide) y en verde la  $\beta$ - [D]- glucopiranososa y ramnosa. Modificado de Alipieva et al., 2014.

#### 4. Justificación.

Debido al aumento de la incidencia de luz UV en la superficie terrestre durante los últimos años, a sus efectos nocivos en las células de la piel como la formación de fotoproductos, así como al incremento en los últimos años de la incidencia de cáncer de piel, se ha hecho necesario el uso de sustancias fotoquimioprotectoras que protejan de esta radiación a la piel.

Las plantas son una fuente natural de metabolitos, muchos de ellos con capacidad de absorber la luz ultravioleta y/o ser antioxidantes, que les confiere una función fotoquimioprotectora.

Por lo cual en este trabajo se evaluó la actividad del extracto metanólico de *B. cordata* y uno de sus compuestos más abundantes, el verbascósido, como posibles agentes fotoquimioprotectores debido a su estructura química.

Es importante mencionar que las mutaciones puntuales en genes relevantes en el cáncer de piel, como p53, pueden dar como consecuencia la formación de tumores en dicho órgano. Es en p53 donde se ha encontrado que la acumulación de mutaciones puede iniciar el proceso tumoral y canceroso.

Por lo tanto, las preguntas científicas que surgieron son:

- **¿El extracto metanólico de *B. cordata* o uno de sus compuestos más abundantes, el verbascósido, al aplicarse tópicamente en ratones SKH-1 expuestos a la RUV, tendrán la capacidad de disminuir, retrasar o evitar el daño ocasionado por RUV?**
- **¿Cuál será el resultado a nivel histológico de la fotoprotección en la piel de ratones?**

## **5. Hipótesis:**

Debido a la estructura química del verbascósido en forma pura o presente en el extracto metanólico de *B. cordata*, ambas sustancias tendrán un efecto fotoprotector al ser aplicado de forma tópica en la piel de ratones SKH-1 irradiados con RUV, y por lo tanto habrá disminución del daño a nivel histológico, al inhibir la formación de tumores en la piel y a nivel molecular al reducir la formación de aductos en regiones de alta mutación del gen p53 en las células de piel de ratones SKH-1 sometidos a radiación UV.

## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto fotoquimioprotector del extracto metanólico de *Buddleja cordata* y del verbascósido en piel de ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta B.

### 6.2 Objetivos particulares

- Obtener el extracto metanólico de *B. cordata*.
- Purificar y aislar el verbascósido a partir del extracto metanólico de *B. cordata*.
- Evaluar el efecto citotóxico del extracto metanólico de *B. cordata* y del verbascósido en cultivos celulares de queratinocitos HaCaT.
- Evaluar el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *B. cordata* y del verbascósido en la línea celular de queratinocitos HaCaT.
- Determinar la presencia de eritema en piel de ratones SKH-1 sometidos a irradiación con luz ultravioleta B de forma aguda en presencia y ausencia del extracto metanólico de *B. cordata* y del verbascósido.
- Evaluar el efecto fotoquimioprotector del extracto metanólico de *B. cordata* y del verbascósido a partir del diagnóstico histológico de piel de ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta B de manera aguda.
- Analizar el efecto fotoquimioprotector del extracto metanólico de *B. cordata* y del verbascósido a partir del diagnóstico histológico y macroscópico de piel de ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta B de manera crónica.
- Identificar si existe un patrón diferencial de proteínas en piel de ratones SKH-1 con y sin protección del extracto metanólico de *B. cordata* y del verbascósido e irradiados con luz ultravioleta B de forma crónica.
- Determinar las variaciones en las curvas de disociación (T<sub>m</sub>), por efecto de las mutaciones en regiones específicas del gen p53 en la piel de ratones SKH-1 protegidos o no con el extracto metanólico de *B. cordata* o con el verbascósido e irradiados con luz ultravioleta B de forma crónica.

## 7. Estrategia metodológica.

Este trabajo se dividió en cuatro etapas. La primera consistió en la elaboración del extracto metanólico de *Buddleja cordata* (EMBC), su caracterización y la obtención del verbascósido. Tanto al EMBC como al compuesto puro se les realizó un barrido espectrofotométrico para identificar los máximos de absorción ( $\lambda_{max}$ ).

En la segunda etapa se llevaron a cabo pruebas *in vitro* con cultivos de la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Se determinó la citotoxicidad y la fotoprotección del EMBC y del verbascósido, midiendo viabilidad celular con la técnica colorimétrica de reducción de la sal de tetrazolio (MTT). Posteriormente se realizó citometría de flujo para determinar porcentajes de apoptosis y necrosis, usando como marcadores anexina V (A) y ioduro de propidio (IP).

Durante la tercera etapa se llevó a cabo la prueba de penetración del EMBC y del verbascósido, a fin de cuantificar la cantidad de sustancia que penetraba el estrato córneo de los ratones SKH-1. Posteriormente se realizó el experimento agudo, donde los animales fueron sometidos a una sola exposición de RUV, en presencia y ausencia de las sustancias. Se evaluó la formación de eritema y se realizó el estudio histológico como diagnóstico de fotoprotección. En esta etapa se hizo el experimento crónico con una duración de 32 semanas, el cual permitió establecer un modelo de fotocarcinogénesis cutánea en los ratones SKH-1. Durante este periodo se realizaron observaciones y conteos semanales de las lesiones para determinar incidencia y multiplicidad. Al finalizar el experimento se llevó a cabo el análisis histológico, a fin de determinar el nivel de fotoprotección.

En la cuarta etapa, se realizó el análisis de expresión diferencial de proteínas totales a partir del patrón de bandeo. También se llevó a cabo el análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRM) para identificar mutaciones por acción de la RUV en regiones conocidas de p53. Se evaluó la factibilidad de ambos análisis para ser propuestos como nuevos indicadores de fotoprotección a nivel molecular (Figura 25).

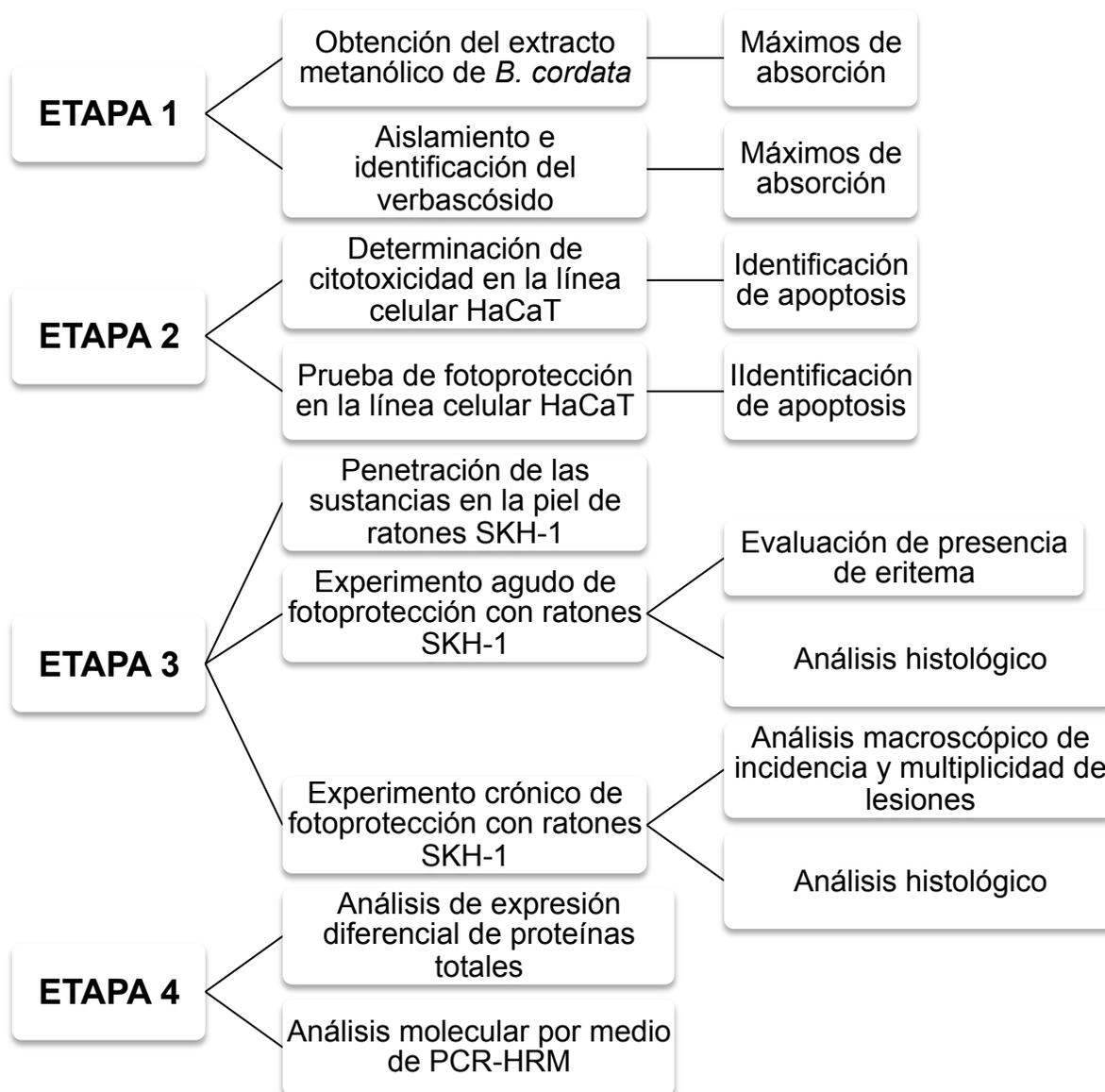


Figura 25. Estrategia metodológica.

## **7.1 Primera etapa.**

### **7.1.1 Obtención e identificación del material vegetal de *Buddleja cordata*.**

El material vegetal fue colectado en el año 2010 previo a este trabajo, dentro del campus de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el Pedregal de San Ángel, Ciudad de México. Fue identificado como *Buddleja cordata* HBK en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por la M. en C. Edith López Villafranco, y se depositó un ejemplar de herbario con el número de registro 42663 IZTA para su resguardo en la colección institucional.

### **7.1.2 Obtención del extracto metanólico de *Buddleja cordata*.**

Las hojas y tallos de la planta se secaron a temperatura ambiente. Se obtuvieron 253 g de peso seco, los cuales se maceraron con hexano y metanol de forma consecutiva. La fracción metanólica se destiló a presión reducida, en un rotavapor a una temperatura de 55°C para obtener el extracto (EMBC). El rendimiento total fue de 11.67% correspondiente a 29.55 g de EMBC y se almacenó a 4°C para su uso posterior. Para obtener una mayor cantidad de EMBC y poder aislar verbascósido suficiente, esta metodología se repitió hasta llegar a 300 g de EMBC.

### **7.1.3 Obtención de los máximos de absorción ( $\lambda_{max}$ ) del EMBC.**

Al EMBC se le realizó un barrido en un espectrofotómetro UV/VIS marca Perkin-Elmer, Lambda 2S UV/VIS, para verificar que absorbiera en la región correspondiente del espectro de luz UV y determinar sus máximos de absorción ( $\lambda_{max}$ ). Como control se utilizó el filtro solar orgánico comercial octil-metoxinamato (Parsol, ISP VAN DYK). Para llevar a cabo el barrido, el EMBC, el verbascósido y el parsol se disolvieron por separado en etanol al 70% (v/v) a una concentración final de 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El barrido se llevó a cabo en celdas de cuarzo en un rango de luz UV de 200 a 400 nm.

### **7.1.4 Caracterización del EMBC por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

El EMBC se analizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo HPLC Hewlett Packard Serie 1100 con detector de UV a 320 nm. Se

utilizó una columna C18 (150 mm X 4.6 mm, 5 µm) marca Supelco Technologies. La fase móvil fue una mezcla de 4% de tetrahidrofurano en acetonitrilo-agua (35:65, v/v) y ácido fosfórico al 0.04%. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min a una temperatura de 23°C y 149 bares de presión. El volumen de inyección fue de 20 µL. A partir de estándares, se identificó la presencia de los principales compuestos de interés que fueron el verbascósido (98.75 mg/g), linarina (36.45 mg/g) y siringina (Avila et al. 2014).

**\*Trabajo realizado a la par de esta tesis.**

#### **7.1.5 Aislamiento y purificación del verbascósido.**

El verbascósido se purificó a partir de 300 g del EMBC, el cual se sometió a cromatografía de adsorción en columna abierta (CC) realizada sobre gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (partícula 0.063-0.200 mm) marca Merck malla de 70-230 ASTM. Para separar las fracciones se utilizó como eluyente una mezcla de diclorometano-metanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH) a diferentes concentraciones (9:1; 8:2, 7:3 y 6:4) de forma consecutiva para obtener las fracciones de interés (Avila et al., 2005; Avila et al., 1999).

A las fracciones separadas se les realizó cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de aluminio con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck 0.2 mm de espesor). Estas cromatografías se revelaron con luz UV a 254 y 366 nm (Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet. Spectroline Mod. CX-20) y posteriormente con una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, con el fin de localizar y verificar las fracciones con presencia del verbascósido. La identidad de la sustancia se determinó mediante análisis de barrido espectroscópico de 200 a 400 nm como se mencionó anteriormente y comparando los espectros con los de una muestra auténtica (Avila et al., 2005; Avila et al., 1999).

## **7.2 Segunda etapa.**

### **7.2.1 Prueba de citotoxicidad y viabilidad celular del EMBC y del verbascósido en cultivos de la línea celular HaCaT.**

La línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) fue proporcionada por el laboratorio 11 de Genómica Funcional de la Unidad de Biomedicina (UBIMED), en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, cuyo responsable es el Dr. Carlos Pérez Plasencia. Estos experimentos se llevaron a cabo bajo la asesoría de la M. en C. Verónica García Castillo.

Se evaluó el efecto citotóxico de diferentes concentraciones del EMBC, del verbascósido y un control (Parsol) (Tabla 8) sobre la línea celular HaCaT. Los experimentos fueron realizados por triplicado y de manera independiente.

El cultivo celular fue mantenido en cajas petri de 100 x 15 mm con medio DMEM-F12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), en una incubadora de CO<sub>2</sub> marca Thermo a 37 °C y una concentración del 5% de CO<sub>2</sub>. Como primer paso las células fueron cosechadas con 800 µL de Tripsina-EDTA 0.25% (marca IN VITRO) la cual se dejó actuar durante 5 min a 37°C. Se adicionó 1mL del medio para lavar y despegar por completo las células. La suspensión celular se colocó en un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó durante 5 min a 1300 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de medio DMEM-F12 suplementado con SFB al 10%. Se tomaron 10 µL para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer y determinar el número de células que se tendrían por pozo ( $1 \times 10^5$ ). Las células se subcultivaron en placas de 96 pozos para permitir su adherencia durante 5 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 µL de medio DMEM-F12 con SFB 2% y se dejó en incubación por 24 h. Pasado el tiempo se cambió el medio a cada uno de los pozos y se agregaron las diferentes sustancias a evaluar.

Cada compuesto a probar se disolvió en 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo y 4.98 mL de medio DMEM-F12 para realizar la solución de trabajo inicial, a partir de la cual se llevaron a cabo las diluciones correspondientes para obtener las diferentes concentraciones de trabajo (Tabla 8).

Se colocaron 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones en los pozos que contenían a las células, previo diseño de la placa experimental. Cada concentración se realizó por quintuplicado. Después de un periodo de incubación de 24 horas, se realizó el método de reducción de la sal 3-(4,5,-dimetiazol-2-il)-2,5- bromo difeniltetrazolio (MTT) (Ramon, 2009). y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas EPOCH (Biotek) a través del software Gene5. Las absorbancias fueron normalizadas y el porcentaje de viabilidad celular se determinó empleando el software estadístico Prisma 5.0. Cada experimento se realizó por triplicado y de manera independiente.

### **7.2.2 Prueba de fotoprotección con células HaCaT irradiadas con RUV.**

Para los experimentos de exposición a RUV, las células HaCaT se mantuvieron en placas petri de 100 x 15 mm con medio DMEM-F12 con 10% de SFB a un 80% de confluencia. Posteriormente fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos para permitir su adherencia durante 5 h. Se retiró el medio y se agregaron 100  $\mu$ L de medio DMEM-F12 con SFB al 2% y se dejó en incubación por 24 h. Pasado el tiempo se cambió el medio y se agregaron las diferentes sustancias a evaluar a cada uno de los pozos.

Los queratinocitos fueron pre-incubados 30 min con cada una de las sustancias, (EMBC, verbascósido o parsol como control), con las concentraciones descritas en la tabla 8, como blanco se utilizó DMSO. A continuación se irradiaron por 60 min, a una distancia a partir de las células de 20 cm, con una lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La dosis de irradiación utilizada fue de 90 mJ/cm<sup>2</sup>, la cual se determinó con un radiómetro Spectroline DM-300HA. Para determinar el porcentaje de viabilidad e inhibición, se llevó a cabo la prueba colorimétrica de MTT (Carmichael et al., 1987; Ramón, 2006).

#### **a) Prueba de MTT.**

Transcurrido el tiempo de exposición a los compuestos y/o a la RUV, se retiró el medio de cultivo y se añadió a cada pozo 100  $\mu$ L de MTT disuelto en acetona. Para obtener la concentración final de 0.5 mg/mL en cada pozo, se realizó una solución con DMEM-F12 previo a ser incorporado. La placa se incubó por 4 h a 37

°C y 5% de CO<sub>2</sub>. para permitir la formación de cristales de formazán; transcurrido el tiempo de incubación se retiraron 75 µL de MTT, se añadieron 50 µL de DMSO por pozo y se dejó en incubación por 10 min a 37°C. Posteriormente se realizó la lectura a 540 nm en un lector de placas EPOCH (Biotek). El porcentaje de

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células sin tratamiento}} \times 100$$

viabilidad se obtuvo con la siguiente fórmula:

DO: Densidad óptica (Valor de absorbancia obtenido).

Esta reducción se lleva a cabo por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, activa solamente en células vivas (Carmichel, 1987a y b; Talorete, 2006). Para el análisis se toma en cuenta la correlación existente entre MTT metabolizado y el número de células viables, a partir de la intensidad de color que se presenta en cada pozo.

**Tabla 8. Concentraciones del EMBC, del verbascósido y del parsol utilizadas en los experimentos de citotoxicidad y fotoprotección en cultivos celulares HaCaT.**

Experimento	Compuesto	Concentraciones utilizadas				
		Pruebas de citotoxicidad y fotoprotección	Verbascósido (µM)	50 µM	100 µM	200 µM
Parsol (µM)	50 µM		100 µM	200 µM	400 µM	800 µM
EMBC (ppm)	1 ppm		10 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm

**b) Determinación de muerte celular por medio de citometría de flujo.**

La citometría de flujo es un proceso que permite realizar diversas mediciones de una sola célula de forma simultánea. La ventaja que presenta es que se pueden llevar a cabo mediciones cuantitativas y multiparamétricas estadísticamente aceptables para definir las propiedades de una población celular (Parks D.R., et.al.; 1984). Para realizar el análisis se requiere de una computadora que produce un histograma de dos parámetros (dot plot) a partir de la luz dispersada por las células o por la fluorescencia. Para la adecuada interpretación de los resultados,

es importante el establecimiento de controles negativos y positivos, ya que definen la localización de la población de interés (Coligan et.al.; 2001).

Una de las maneras más precisas de detectar la apoptosis en estadios tempranos es comprobar la localización de fosfatidilserina en la membrana plasmática. La fosfatidilserina es un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. Cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de la membrana. Esta localización puede ser detectada fácilmente ya que la Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. Las moléculas de Anexina V se marcan con diferentes fluorocromos para detectar apoptosis mediante citometría de flujo.

En estadios tardíos de apoptosis o necrosis, cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el DNA se hace accesible, se emplean moléculas fluorescentes que actúan como agentes intercalantes en el DNA como el Ioduro de Propidio (PI) (Rieseberg, M., et.al.; 2001).

Obtenidos los resultados de citotoxicidad y fotoprotección por medio de MTT, se eligieron aquellos tratamientos de las sustancias que tuvieron los más altos porcentajes de viabilidad celular para realizar esta prueba. Para el EMBC se eligieron las concentraciones de 1 y 10,000 ppm, verbascósido 800  $\mu$ M y parsol 200  $\mu$ M. Las células HaCaT se mantuvieron a una confluencia del 80% y se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo en placas de cultivo de 6 pozos donde se mantuvieron durante 24 h. Transcurrido el tiempo de adherencia, las células fueron expuestas a las sustancias y posteriormente a la RUV bajo las características ya mencionadas.

24 h después del estímulo se retiró el medio y las células fueron tripsinizadas como anteriormente se ha descrito. La suspensión celular fue colocada en tubos de 15 mL que se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS frío y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se descartó y se continuó con el protocolo de la anexina/ioduro de propidio (A/IP). El porcentaje de apoptosis y necrosis se evaluó

mediante el uso del kit de detección de apoptosis con Anexina V-FITC (GeneTex) de acuerdo con las indicaciones del fabricante [250  $\mu$ L de amortiguador, 2.5  $\mu$ L de anexina (A) y 2.5  $\mu$ L de yoduro de propidio (IP)]. Las muestras se incubaron 5 min en oscuridad y siempre se mantuvieron en frío para después realizar la lectura y análisis en el citómetro de flujo (BD FACS Calibur) a través del programa de captura de datos Cell Quest Pro (BD). Con los “Dot Plots” obtenidos se llevó a cabo el análisis de resultados con el programa FlowJO V10.1.

Los análisis estadísticos de esta etapa se realizaron con el programa Prisma Graph Pad V. 5.0c.

### **7.3 Tercera etapa.**

#### **7.3.1 Determinación de penetración del EMBC y de verbascósido en piel de ratones SKH-1.**

Para determinar la cantidad de EMBC y verbascósido que penetra a la epidermis, se utilizaron 5 ratones SKH-1 de entre 6 y 8 semanas de edad y un peso de  $25 \pm 5$  g para cada una de las sustancias. Los ratones se colocaron durante 30 minutos en una cámara de flujo laminar a  $21^{\circ}\text{C}$  y a 62% de humedad relativa. Se marcó una zona de  $4\text{ cm}^2$  en la parte dorsal de cada organismo, a la que se le aplicaron  $50\mu\text{L}$  del EMBC o del verbascósido, disueltos en etanol y a una concentración final de  $2\text{mg}/\text{cm}^2$ . Después de 15 min de aplicado el compuesto, se retiró el excedente con un hisopo de algodón impregnado con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se cubrió la zona con cinta adhesiva (marca 3 M, 19mm) cortada en cuadros para retirar las células del estrato córneo. Esta operación se repitió cuatro ocasiones en cada ratón. El primer cubo de cinta fue desechado y los tres subsecuentes se depositaron en vasos de precipitado con 5 mL de etanol. Cada repetición se mantuvo en agitación durante 30 min.

La cantidad de EMBC y/o verbascósido que penetró se determinó usando medidas espectrofotométricas (Perkin-Elmer, Lambda 2S UV/VIS). La absorbancia se ajustó a 320 nm. Los resultados de penetración se obtuvieron por medio de regresión lineal y fueron transformados a porcentajes (Lademann et al., 2009). El análisis estadístico se realizó con el programa Prisma Graph Pad V 5.0.

#### **Evaluación fotoprotectora del EMBC y del verbascósido en ratones SKH-1 irradiados de forma aguda y crónica.**

El efecto fotoprotector del EMBC y del verbascósido se determinó de forma aguda y crónica. Se utilizaron ratones hembras SKH-1 de 6 a 8 semanas de edad y un peso de  $25 \pm 5$  g. Los animales fueron adquiridos de Charles River Laboratories International, Inc (NY), mantenidos en condiciones de bioterio durante todo el experimento, alimentados con agua y alimento Harlan para roedores *ad libitum*, en una habitación en condiciones estériles con un ciclo de 12 h luz y 12 h de oscuridad a una temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$ . Previa aclimatación de los ratones, se tomó el peso inicial antes de los experimentos.

### 7.3.2 Evaluación aguda.

Para la evaluación de forma aguda del EMBC y del verbascósido se utilizaron 35 ratones divididos en 7 grupos: sin ningún tratamiento (T); control negativo (C-), al que solo se le aplicó el vehículo (etanol); control positivo (C+), al que se le aplicó etanol y RUV y cuatro grupos experimentales: verbascósido (V), verbascósido con irradiación UV (V+UV), EMBC y EMBC con irradiación UV (EMBC+UV) (Tabla 9).

A cada uno de los ratones del C+ y del C- se les aplicó 200  $\mu$ L de etanol al 70% en la zona dorsal, cubriendo un área aproximada de 6  $\text{cm}^2$ . A los grupos experimentales se les aplicaron 200  $\mu$ L de una solución de verbascósido o EMBC disuelto en etanol al 70% a una concentración final de 2mg/mL, cubriendo la misma área de exposición que en los controles. El grupo sin ningún tratamiento (T) se mantuvo bajo las condiciones de bioterio, para describir las características normales de la piel de estos ratones.

Las sustancias (etanol, EMBC o verbascósido) se aplicaron 15 minutos antes de la irradiación. Los grupos C+ y experimentales (EMBC+UV y V+UV) fueron irradiados durante diez minutos con lámparas de luz UV-B (312 nm, Spectroline 280C) colocadas a 15 cm de distancia de los ratones que estaban contenidos en cajas de acrílico. Bajo estas condiciones los ratones tuvieron una dosis de 6  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Los valores de radiación se obtuvieron con un radiómetro marca Spectroline (DM-300HA) (Fig. 26).

**Tabla 9. Grupos utilizados en los experimentos agudo y crónico.**

Grupos (5 ratones por grupo)	Experimento agudo (una exposición a RUV 10 min)		Experimento crónico (32 semanas)	
	Sin RUV	Con RUV 6 mJ/cm <sup>2</sup>	Sin RUV	Con RUV 6 mJ/cm <sup>2</sup>
<b>T</b> (Sin ningún tratamiento)	X		X	
<b>C-</b> (aplicación de etanol)	X		X	
<b>C+</b> (Aplicación de etanol y RUV)		X		X
<b>V</b> (aplicación de verbascósido disuelto en etanol) 2mg/cm <sup>2</sup>	X		X	
<b>V+UV</b> (aplicación de verbascósido disuelto en etanol y RUV) 2mg/cm <sup>2</sup>		X		X
<b>EMBC</b> (aplicación del extracto metanólico de <i>B. cordata</i> disuelto en etanol) 2mg/cm <sup>2</sup>	X		X	
<b>EMBC+ UV</b> (aplicación del extracto metanólico de <i>B. cordata</i> disuelto en etanol y RUV) 2mg/cm <sup>2</sup>		X		X

### 7.3.2.1 Evaluación de la presencia de eritema.

A las 24 h de exposición a la RUV se midió la formación de eritema por medio de un analizador de color (Lutron, Mod RGB-1002), expresando estos valores como enrojecimiento producido en la zona dorsal (RGB). Posteriormente los animales fueron sacrificados por asfixia en cámaras de CO<sub>2</sub> y disectados para obtener la piel de la zona dorsal (Fig. 26).

### 7.3.3 Experimento de exposición crónica a la RUV.

Para el experimento crónico del verbascósido y del EMBC se utilizaron 35 ratones divididos en siete grupos: sin ningún tratamiento (T), control negativo (C-), control positivo (C+) y cuatro grupos experimentales: verbascósido (V), verbascósido con irradiación UV (V+UV), EMBC y EMBC con irradiación UV (EMBC+UV) (Tabla 9).

El experimento crónico tuvo una duración de 32 semanas. La forma de aplicación de las sustancias y el equipo utilizado es la misma que en el ensayo agudo.

La inducción de tumores se realizó simulando un proceso de fotocarcinogénesis de la siguiente manera: la fase de iniciación tuvo una duración de diez días, aplicando 200µL de la sustancia correspondiente a cada grupo e irradiando un minuto diario a los grupos +C, V+RUV y EMBC+RUV.

Posteriormente se aplicaron las sustancias a los diferentes tratamientos (T, C-, V y EMBC), y los grupos experimentales correspondientes (C+, V+UV y EMBC+UV) fueron irradiados por un minuto tres veces a la semana, lo que representó las fases de promoción y progresión de la fotocarcinogénesis durante las 32 semanas que duró el experimento (Modificado de Kundoor et al., 2007; Mitchell et al., 2001) (Fig. 26).

#### **7.3.3.1 Análisis macroscópico de incidencia y multiplicidad de lesiones.**

Una vez a la semana se tomó el peso de cada ratón y se realizó la observación macroscópica para poder determinar incidencia y multiplicidad de lesiones y/o tumores. Después de 32 semanas se llevó a cabo el sacrificio de los 35 animales con la técnica descrita anteriormente para obtener la piel de la zona dorsal (Figura 26).



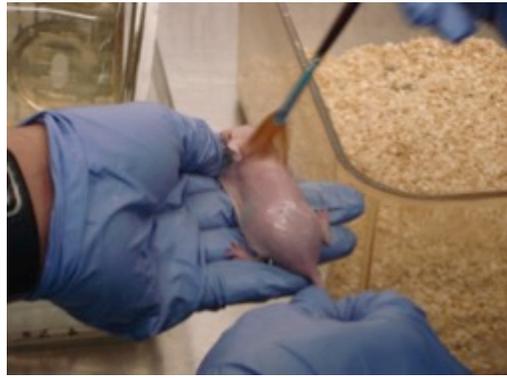
Ratones previo a ser irradiados.



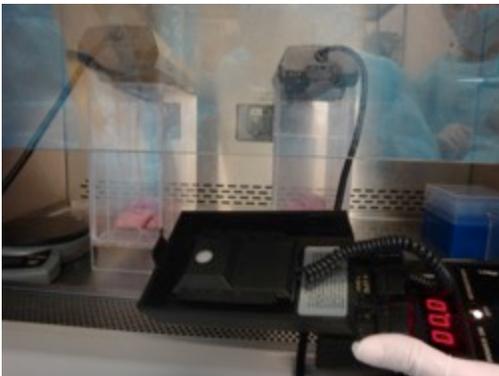
Medición de eritema.



Medición de peso semanal.



Aplicación de los compuestos.



Medición de la RUV.



Aplicación de la RUV.

**Figura 26. Vista general de los experimentos agudo y crónico con ratones SKH-1.**

### 7.3.4 Análisis histológico.

#### Toma de muestras.

La piel de cada ratón de los experimentos agudo y crónico se dividió en regiones sin lesión aparente y regiones con lesiones y/o tumores, a fin de tener material histológico diversificado. Las muestras de piel de todos los tratamientos se fijaron por 24 h en paraformaldehído al 2% disuelto en buffer de fosfatos a un pH de 7.2. Posteriormente se deshidrataron con un tren de alcoholes (70, 80, 96 y 100%, v/v) y se incluyeron en parafina para realizar los cortes y tinciones necesarios en busca de lesiones en epidermis y dermis (Figura 27).

Se prepararon cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de grosor y tres diferentes tinciones: hematoxilina y eosina (H y E), tricrómica de Mason (M) y reacción de PAS (PAS). Las observaciones y fotografías se realizaron con un microscopio óptico (Leica DM500) (Tabla 10).

**Tabla 10. Tinciones realizadas para las muestras del ensayo agudo y crónico.**

<b>Tinción</b>	<b>Estructura a observar</b>
<b>Hematoxilina-eosina</b>	Tinción general de todas las estructuras de la epidermis.
<b>Tricrómica de Mason</b>	Fibras de colágeno y núcleo.
<b>Reacción de PASS</b>	Componentes bioquímicos de células epiteliales. Membrana basal.

#### Análisis histológico.

Se tomó como aspecto inicial la evaluación de los grupos T y C- para definir las características normales de la piel de ratones SKH-1, tanto en el experimento agudo como en el experimento crónico.

La clasificación de daños histológicos causados por la RUV de forma aguda se llevó a cabo tomando en cuenta la presencia o ausencia de daños producidos por la RUV en epidermis y dermis, determinando así el grado (leve, moderado o grave) y extensión de las lesiones (focal, multifocal o difuso) (Tabla 6 y 11)

(Tedesco et al., 1997; Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Elder et al., 1997; Robbins et al., 2008; Sharma et al., 2011).



Vista general de los ratones.



Ratones sacrificados para obtención de muestras.



Ratones sacrificados para obtención de muestras.



Obtención de muestras de piel.

**Figura 27. Sacrificio y toma de muestras de la piel de los ratones SKH-1.**

La evaluación de los daños por RUV de forma crónica se realizó determinando los cambios en epidermis y dermis, describiendo las características de cada muestra procesada y clasificándolas según el tipo de lesión (hiperplasia, precancerosa o cancerosa) (Tabla 12) (Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Bissett et al., 1987; Mitchell et al., 2001; Elder et al., 1997; Robbins et al., 2008; Gallagher et al., 1984). Para corroborar la presencia de edema se realizó la observación de laminillas con la tinción tricrómica de Masson, a fin de identificar las fibras de colágeno con mayor claridad.

**Tabla 11. Daños histológicos evaluados en la piel de los ratones SKH-1, ocasionados por exposición aguda a RUV (Stevens et al., 2003; Nelson, 2000; Walker et al., 2005; Robbins et al., 2008).**

TEJIDO	DAÑO	CRITERIO DE IDENTIFICACIÓN	
<b>ESTRAT</b>	<b>Paraqueratosis</b>	El estrato córneo contiene restos nucleares fusiformes.	
	<b>Hiperqueratosis</b>	Engrosamiento de las capas del estrato córneo con apariencia histológicamente normal.	
	<b>Espongiosis</b>	Edema intra epidérmico. Se observa la separación de las células.	
<b>EPIDERMIS</b>	<b>Apoptosis (células de quemadura)</b>	Células redondas con núcleos picnóticos, contraídos y citoplasma eosinófilo.	
	<b>Necrosis</b>	Muerte celular con pérdida de la integridad de la membrana. Pérdida de la forma y polaridad.	
	<b>Hiperplasia</b>	Aumento del número de capas en la epidermis por proliferación celular .	
	<b>Hipertrofia</b>	Aumento del tamaño de las células y del tejido.	
	<b>Atrofia</b>	Adelgazamiento por disminución del tamaño o número celular con pérdida de sustancia celular.	
	<b>Disqueratosis</b>	Cornificación de células en la epidermis.	
	<b>Edema</b>	Acumulación de líquido tisular en el intersticio que provoca la separación de fibras de colágena.	
	<b>DERMIS</b>	<b>Hemorragia</b>	Extravasación de eritrocitos a la dermis.
		<b>Infiltrados inflamatorios</b>	Presencia de polimorfos nucleares (neutrófilos, mastocitos y macrófagos principalmente).
		<b>Congestión de vasos sanguíneos</b>	Acumulación de eritrocitos en vasos sanguíneos por el incremento de flujo sanguíneo.

**Tabla 12. Daños histológicos evaluados en la piel de los ratones SKH-1, ocasionados por exposición crónica a RUV (Stevens et al., 2003; Nelson, 2000; Walker et al., 2005; Robbins et al., 2008; Rigel, 2006).**

TEJIDO	DAÑO	CRITERIO DE IDENTIFICACIÓN
<b>Estrato córneo</b>	<b>Paraqueratosis</b>	Presencia de núcleos picnóticos en la capa córnea.
	<b>Hiperqueratosis</b>	Engrosamiento del estrato córneo con apariencia histológicamente normal.
	<b>Disqueratosis</b>	Queratinización anticipada e individual de las células epidérmicas.
	<b>Espongiosis</b>	Edema intracelular en la epidermis. Separación de las células.
	<b>Apoptosis (células de quemadura)</b>	Células redondas con núcleos picnóticos, contraídos y citoplasma eosinófilo
	<b>Displasia</b>	Proliferación aumentada con maduración incompleta de las células
<b>Epidermis</b>	<b>Hiperplasia</b>	Aumento del número de capas en la epidermis por proliferación celular
	<b>Hipertrofia</b>	Aumento del tamaño de las células ya existentes y/o del tejido
	<b>Atrofia</b>	Adelgazamiento de todas o algunas capas de la epidermis por disminución del tamaño o número celular con pérdida de sustancia celular
	<b>Acantosis</b>	Engrosamiento irregular de la epidermis con prolongaciones irregulares hacia la dermis.
	<b>Neoplasia</b>	Proliferación celular aumentada y maduración incompleta.
	<b>Necrosis</b>	Muerte celular con pérdida de la integridad de la membrana.
	<b>Células pleomórficas</b>	Células atípicas o con forma diferente. Pérdida de polaridad celular.
	<b>Metástasis</b>	Ruptura o pérdida de continuidad de la membrana basal.
	<b>Angiogénesis</b>	Formación de vasos sanguíneos cerca de un tumor.
	<b>Edema</b>	Acumulación de líquido en el intersticio con separación de las fibras de colágena
<b>Dermis</b>	<b>Congestión</b>	Acumulación de eritrocitos en vasos sanguíneos
	<b>Hemorragia</b>	Extravasación de eritrocitos a la dermis
	<b>Infiltrados inflamatorios</b>	Presencia de polimorfos nucleares (neutrófilos mastocitos y macrófagos, principalmente).

## **Análisis estadístico**

Después de las descripciones histológicas se realizaron cuadros en donde la incidencia de daños, lesiones y/o tumores por RUV, tanto en el estudio agudo como en el crónico, se expresaron en términos de frecuencia. Los resultados se analizaron por medio de la prueba t de Student con una  $p \leq 0.05$  con la finalidad de obtener la diferencia entre cada uno de los grupos experimentales en relación con los grupos de control. El análisis estadístico se realizó en el programa EXCEL 2010 y con el programa Prisma Graph Pad V 5.0c.

## **7.4 Cuarta etapa.**

### **7.4.1 Obtención de muestras de piel de ratones SKH-1 para las técnicas moleculares.**

De los experimentos agudo y crónico se obtuvieron muestras de piel de todos los ratones. En el caso de los ratones irradiados se tomó tejido liso o sin lesión aparente (sin cambio de color y textura) y tejido con lesión aparente, la cual se definió como aquella piel con cambio de tonalidad y/o formación de tumor. Se colocaron en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos y proteínas.

### **7.4.2 Extracción de ADN y proteínas**

Para la extracción y purificación del material genético y proteínas se utilizó el sistema de extracción AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (50) (QUIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. Después de la obtención del material genético y de las proteínas se llevó a cabo la visualización y determinación de su calidad por medio de electroforesis horizontal en gel agarosa para el ADN y gel de poliacrilamida para las proteínas. El ADN se cuantificó a 260 nm y las proteínas mediante el método de curvas de calibración con el kit de ácido bicinconínico (BCA) (Sigma), utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA) y cuantificando a 562 nm.

### **7.4.3 Expresión diferencial de proteínas.**

Para determinar el número de muestras en este experimento se usaron como referencia los resultados y diferencias del análisis histológico de la etapa anterior. Por lo tanto, se utilizaron muestras de cuatro grupos del experimento crónico (C+, C-, EMBC+UV y V+UV) (Tabla 13).

**Tabla 13. Muestras utilizadas para la expresión diferencial de proteínas.**

<b>Tratamiento del experimento crónico</b>	<b>Control – (etanol)</b>	<b>Control + (etanol+RUV)</b>	<b>V+UV</b>	<b>EMBC+UV</b>
<b>Número de muestras para extracción de proteínas</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

#### **7.4.3.1 Electroforesis unidimensional (1D).**

Una vez obtenidas las proteínas totales de cada tratamiento, se llevó a cabo la electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); con gel separador al 10% y concentrador al 4%. El marcador de peso molecular utilizado fue de 15 a 175 kDa (PiNK Prestained Protein Marker™). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara BioRad Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell a 150 V durante 90 minutos.

Se realizó la tinción de los geles con azul de Comassie (Phast Blue R 0.02%) 5 min a 90 °C en agitación y destañidos con solución destañidora metanol, ácido acético y agua (3:1:6). Posteriormente, se llevó a cabo el cálculo del peso molecular de las diversas bandas presentadas y se analizó el patrón de bandeo de cada tratamiento para identificar la posible expresión diferencial en cada uno de los grupos evaluados. Las muestras con mayor concentración de proteínas se utilizaron para la electroforesis en segunda dimensión (2D).

#### **7.4.3.2 Electroforesis bidimensional desnaturizante (2D).**

##### **Preparación de muestras**

Las muestras de proteínas se liofilizaron y se precipitaron con acetona al 100%. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en amortiguador de hidratación para 2D.

##### **a) Primera dimensión-Isoelectroenfoque (IEF).**

El primer paso de la electroforesis 2D es separar las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico ( $pI$ ) por medio de IEF. En este paso las proteínas son separadas por un gradiente de pH y una diferencia de potencial eléctrico (el ánodo + es ácido y el cátodo – es alcalino) hasta alcanzar una posición en la que su carga neta sea cero y estar en forma zwitterion, lo que define su punto isoeléctrico (Abel, 2008; Plántenik, 2009).

Para el IEF se utilizaron tiras de poliacrilamida de 7 cm (marca GE, USA) con rango de pH de 3 a 10. Las tiras (una por tratamiento) se hidrataron durante 18 h, con 125  $\mu$ L de solución hidratante conteniendo 100  $\mu$ g de proteína por tira. Posteriormente se colocaron en el equipo de isoelectroenfoque (Ettan IPGphor III Isoelectric Focusing System) y se utilizó un programa de cuatro pasos para la

separación de las proteínas: 1) 1 h a 250 V, 2) 30 min a 500 V, 3) 30 min a 1000 V y 4) 2 h a 8000.

Terminado el IEF las tiras se equilibraron usando los siguientes amortiguadores: un lavado de 15 minutos con amortiguador de equilibrio I (SDS, 0.01 g/mL de DTT) y dos lavados de 15 minutos cada uno con amortiguador de equilibrio II (SDS, 0.025 g/mL de iodoacetamina IAA). Todo se llevó a cabo en agitación suave.

#### **b) Segunda dimensión.**

En la segunda dimensión las proteínas se separaron de acuerdo con su masa molecular mediante electroforesis con SDS. Cada tira equilibrada se colocó de forma horizontal en la parte superior de un gel de poliacrilamida al 10%, de 80 X 90 X 1 mm. Se colocaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular en un papel filtro a un extremo del gel SDS-PAGE, el cual se selló con agarosa al 0.5% teñida con azul de Bromofenol al 0.1 %. Los geles se corrieron a 150 V durante 1.5 h. La tinción se realizó con azul de Comassie y posteriormente fueron digitalizados para visualizar los puntos -“spots”- de coincidencia del *pI* con el peso molecular relativo (PMr) de las diferentes proteínas separadas.

#### **c) Determinación del punto isoelectrico (pI).**

El *pI* se determinó por interpolación de puntos en la graduación de la tira de pH de 3 a 10 a escala en el gel 2D digitalizado.

#### **d) Peso molecular relativo (PMr).**

El peso molecular relativo se obtuvo por medio de regresión lineal y graficando el logaritmo ( $\log_{10}$ ) del PM de los valores estandar del marcador de peso molecular (15 a 175 kDa) contra la movilidad relativa (*Rf*) de los geles 2D. Tomando en cuenta que el *Rf* es la relación entre la distancia de migración de la banda de proteína y la longitud de corrida del gel, entonces la migración de los derivados proteína-SDS hacia el ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ( $\log$  PM) (García, 2000).

Posteriormente se graficó el  $\log$  PM contra el *Rf* de la proteína patrón. Los pesos moleculares se determinaron a partir de regresión lineal y por interpolación de la curva del  $\log$  PM contra el *Rf* a partir de la siguiente ecuación:  $\text{Log}(\text{PM}) = m \times \text{Rf} + b$ . Donde *m*= pendiente y *b*=ordenada al origen.

Se calculó así el Rf de las proteínas desconocidas y se extrapoló en la curva el log (PM). Por último, se realizó el antilogaritmo para obtener el PM de las proteínas problema (García, 2000).

#### **f) Identificación de proteínas.**

A partir de los resultados de la electroforesis 2D se eligieron aquellas proteínas expresadas diferencialmente en cada uno de los tratamientos, así como aquellas que se presentaban en todas las muestras (“spots”). Tomando los valores de *pI* y de PMr se realizó la búsqueda por medio de la base de datos: TagIdent <http://web.expasy.org/tagident/>. ExPASy (Expert Protein Analysis System) que es una plataforma donde se encuentran secuencias proteicas e información sobre su función, estructura, dominios, *pI* y PMr. Analiza secuencias de proteínas, estructuras y electroforesis 2D y despliega una lista de proteínas con su respectivo *pI* y PMr. Esta herramienta identifica las proteínas por apareamiento de secuencias cortas de hasta 6 aminoácidos con proteínas registradas en la base de datos Swiss-Prot y TrEMBL a partir de la entrega de los *pI* y del PMr (Bairoch y Apweiler, 2000; Gasteiger et al., 2005).

#### **7.4.4 Análisis de las curvas de disociación de alta resolución: High Resolution Melting (PCR-HRM).**

##### **a) Diseño de oligonucleótidos y condiciones de amplificación.**

Una vez obtenido el ADN genómico de los ratones y verificada su integridad, se llevó a cabo el diseño de dos oligonucleótidos específicos de las regiones correspondientes a los exones e intrones 6, 7 y 8 del gen p53, ya que es la zona que presenta la mayor incidencia de mutaciones por acción de la RUV (Besaratina y Pfeifer, 2006). Para el diseño se utilizó el software Geneious 9.1 y los primers diseñados fueron analizados usando el software IDT primer analyser ([www.idtdna.com/calc/analyzer](http://www.idtdna.com/calc/analyzer)) (Tabla 14). Los oligonucleótidos fueron elaborados por IDT Integrated DNA Technologies y se resuspendieron en el volumen de agua calculada para obtener una concentración inicial de trabajo de 100µM.

**Tabla 14. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para p53.**

Secuencia	Región amplificada	Tamaño de fragmento esperado
P1:5'-GGGAGAGGCGCTTGTGCAGG-3'	20	800
P2:5'-AGGCCCCCACCTGTTCCCAA-3'	20	600
pF:5'-CAGCTCCAGCAGGTGTGCCG-3'	20	

Posteriormente se realizó el diseño experimental de las condiciones probables de PCR en punto final. En primera instancia se llevó a cabo un gradiente de temperatura, partiendo de la temperatura teórica calculada a través de la fórmula de Wallace, para establecer las condiciones óptimas de amplificación. Estos ensayos permitieron determinar que la mejor temperatura de alineación ( $T_m$ ) fue la de 68°C. (Tabla 15).

**Tabla 15. Condiciones de amplificación.**

	Temperatura °C	Tiempo
<b>Pre incubación</b>	95°C	1 min
<b>Amplificación (40 ciclos)</b>	95°C	15 seg
	68°C	30 seg
	72°C	2 min
<b>Enfriamiento</b>	4°C	∞

Una vez estandarizadas las condiciones del PCR se realizaron los ensayos de las muestras correspondientes a los testigos, controles y grupos experimentales de cada experimento. Los amplicones fueron visualizados en gel de agarosa 1.2%. El marcador de peso molecular que se utilizó fue Kapa Universal DNA Ladder 1 mL 100 ng/ $\mu$ L.

Los amplicones fueron secuenciados en ambos sentidos. Los electroferogramas obtenidos se analizaron con el software Geneious, v. 9.1, y se secuenciaron con el kit Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) y se analizaron en un secuenciador ABI PRISM 313 0xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems).

#### **b) Diseño de oligonucleótidos para el análisis de PCR-HRM.**

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este experimento se diseñaron con el programa Geneious 9.1. Tomando en cuenta los requisitos del

PCR en tiempo real, los oligonucleótidos se diseñaron para tener una Tm no mayor a 60°C, un porcentaje de G-C del 30 al 80% y un tamaño máximo de los amplicones de 150 pb. Con el propósito de identificar un mayor número de variaciones, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, correspondientes a regiones de los exones e intrones 6 al 8 del gen p53 (Tabla 16).

Los oligonucleótidos fueron elaborados por IDT Integrated DNA Technologies y se resuspendieron en el volumen de agua calculada para obtener una concentración de 100µM. La concentración de trabajo se ajustó a 10µM. La secuencia de ambas parejas de oligonucleótidos y el tamaño del amplicón se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16. Secuencias de amplicones.**

Secuencia del oligonucleótido	Secuencia del amplicón	Tamaño del amplicón (pb)
<b>1. FW: 5'-TGTTTCCTCTTGGGCTTAGGG-3'</b> <b>1. RV: 5'-CTGTTCCCAACCCTCTTGTC-3'</b>	TGTTTCCTCTTGGGCTTAGGGA CGTCTCTTATCTGTGGCTTCTC GGGGTTCTGTAACTGGACCTT TGGCTGCAGATATGACAAGAG GGTTGGGAACAG	<b>100</b>
<b>2. FW: 5'-AACAGGTGGGGGCCTAGTTTA-3'</b> <b>2. RV: 5'-CAGAAGGTTCCCACTATCCGG-3'</b>	AACAGGTGGGGGCCTAGTTTA CACACAGTCAGGATGGGGCCC AGCTTTCTTACTGCCTTGTGCT GGTCCTTTTCTTGTCCCGGATA GTGGGAACCTTCTG	<b>91</b>

**c) Reacción de PCR-HRM.**

La mezcla de reacción para el PCR-HRM que se utilizó fue Maxima SYBR Green/Rox qPCR, Master Mix (2X) (Thermo Scientific), desarrollada para reproducir resultados para la plataforma del equipo StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). La mezcla final que se utilizó para la reacción se presenta en la tabla 17.

**Tabla 17. Mezcla de reacción utilizada para el PCR-HRM.**

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
<b>Master Mix (2X)</b>	7.5	1 X
<b>Primer FW (10 µM)</b>	0.5	0.33 µM
<b>Primer RV (10 µM)</b>	0.5	0.33 µM
<b>ADN (10 ng/µL)</b>	1.0	10 ng/µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5.5	—
<b>Volumen final</b>	15 µL	—

El programa de temperatura que se utilizó para el PCR-HRM se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 18. Programa de temperatura utilizado para el análisis HRM.**

	Temperatura °C	Tiempo
Pre incubación	95°C	10 min
Amplificación (40 ciclos)	95°C	15 seg
	60°C	1 min
HRM	95°C	1 min
	40°C	1 min
	65°C	1 seg
	95°C	--
Enfriamiento	40°C	10 seg

La reacción de PCR-HRM se llevó a cabo por quintuplicado y en cada repetición se colocaron muestras de los experimentos, como se puede ver en la tabla 19.

**Tabla 19. Diseño experimental y número de muestras utilizadas para el experimento de PCR-HRM.**

Tratamiento	Experimento agudo	Experimento crónico
	Número de muestras	Número de muestras
Control negativo (piel sin tratamiento)	5	5
Control + (piel irradiada con UV)	5	5
Grupo experimental 1 (EMBC+RUV)	5	5
Grupo experimental 2 (Verbascósido+RUV)	5	5

#### **d) Análisis de resultados del PCR-HRM.**

Los resultados obtenidos de este experimento se analizaron con el programa de libre acceso uAnalyze, diseñado por la Universidad de Utah y disponible en la página: <https://www.dna.utah.edu/uv/uanalyze.html>

Los datos de temperatura y fluorescencia se introdujeron en formato genérico (.gen). El programa discrimina automáticamente las muestras con una baja intensidad de fluorescencia para evitar el análisis de datos que no pueden ser normalizados de forma adecuada.

El método utiliza la adquisición de datos de alta densidad y detecta las pequeñas diferencias en las secuencias de los fragmentos de PCR, simplemente por fusión directa. Las curvas de fusión se pueden utilizar para la exploración de mutaciones en las regiones amplificadas. Debido a su velocidad y simplicidad, la popularidad de este método es cada vez mayor.

También se realizó un análisis estadístico por medio de la prueba t de student, con una  $p \leq 0.05$  a fin de obtener la diferencia entre cada uno de los grupos experimentales en relación con los grupos control y así establecer si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las  $T_m$  de cada grupo. El análisis estadístico se realizó en el programa EXCEL 2010 y con el programa Prisma Graph Pad V 5.0.

## 8. Resultados y discusión

### 8. 1 Resultados y discusión de la primera etapa.

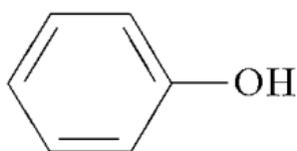
#### 8.1.1 Obtención del extracto metanólico de *Buddleja cordata* (EMBC).

El rendimiento total del extracto fue de 29.55 g que corresponden al 11.67% (Avila et al., 2014; Espinosa-González et al., 2015). Este porcentaje nos indica la eficiencia del proceso realizado en relación con los solventes utilizados. Al ser un extracto metanólico indica que *B. cordata* es rica en compuestos de carácter polar como los polifenoles. Avila en 2002 llevó a cabo el estudio fitoquímico de la especie *B. scordioides* y obtuvo extractos de diferente polaridad: hexánico, clorofórmico y metanólico, concluyendo que este último fue el de mayor rendimiento. Diversos estudios con especies del género *Buddleja*, como *B. officinalis*, *B. globosa*, *B. asiática*, *B. yunanesis*, *B. thyrsoides* y *B. myriantha* han preparado extractos con solventes de diversa polaridad, obteniendo los rendimientos más altos con el uso de metanol (Pardo et al., 1993; Liao et al., 1999; Mensah et al., 2001; Piao et al., 2003; Backhouse et al., 2008; Mahlke et al., 2009). El género *Buddleja* es rico en polifenoles, lo que permite que la obtención de los extractos se lleve a cabo de forma satisfactoria con solventes orgánicos de carácter polar como el metanol y el etanol. Otros estudios, como el de Mesa et al., 2011 relacionados con el rendimiento de los diferentes extractos de *Pipper piedecuestanum*, avalan nuestros resultados.

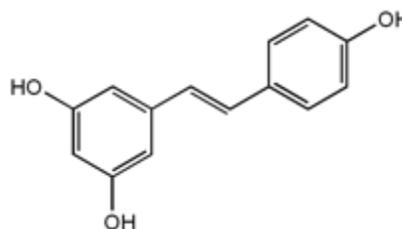
El hecho de que el EMBC tuviera un alto rendimiento nos indica que es rico en diversas moléculas, principalmente compuestos fenólicos, los cuales se encuentran en todas las partes de las plantas: en las raíces, tallos, troncos, hojas, frutos y semillas. Se sabe que son la señal química hacia el estrés ambiental producido en las plantas, desarrollando diversas funciones como la de protección y defensa contra microorganismos, herbívoros y la RUV. También participan en la formación de la pared celular, como atrayentes para los polinizadores, y otorgan características distintivas a las cortezas, maderas y el color a las flores; por lo que su síntesis y presencia es de vital importancia para la sobrevivencia de las plantas

vasculares (Dreosti, 2000; Cooper-Driver y Bhattacharya, 1998; Stevenson y Hurst, 2007; Croteau et al., 2000).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de metabolitos naturales más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras conocidas (Dreosti, 2000). Casi todos son derivados primarios del metabolismo de los fenilpropanoides y acetato-fenilpropanoides, que a su vez derivan de la fenilalanina y tirosina provenientes de la vía del ácido Shikimico (Croteau et al, 2000). Pueden ser clasificados de diversas formas; por ejemplo, tomando en cuenta la unidad base o según la naturaleza de los grupos unidos a la misma. Desde el punto de vista químico se caracterizan por contener un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (grupo fenol) y pueden clasificarse en función del número de anillos que presentan, como en este caso los polifenoles (Croteau et al, 2000). (Fig. 28).



Anillo fenólico



Ejemplo de polifenol (resveratrol)

**Figura 28. Estructura de un anillo fenólico y ejemplo de polifenol.**

El ser humano es capaz de metabolizar por medio de enzimas los compuestos polifenólicos, por lo que la ingesta de productos vegetales hace que los incorporemos a nuestro organismo, donde son absorbidos en diferente grado por el intestino y metabolizados en productos detectables en plasma para poder ser utilizados principalmente como antioxidantes, y finalmente secretarlos de forma rápida por vía biliar o urinaria. Debido a esto es necesario contar con una ingesta diaria de productos vegetales para mantener altas las concentraciones de estos metabolitos en la sangre (Crespy et al., 2003; Manach et al., 2004). La absorción por vía cutánea se tocará más adelante en este trabajo.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que muchos de los efectos de los polifenoles se derivan de cambios adaptativos que involucran a estas moléculas en la regulación de mecanismos de respuesta al estrés metabólico. En otras palabras, los mecanismos de acción de los polifenoles son simples, como en la actividad antioxidante, o bien pueden tener participación como moléculas de señalización o mensajeros químicos (Taylor, 2005; Oliveras-Ferracos, 2011).

En un trabajo previo con el EMBC se cuantificó la presencia de compuestos fenólicos totales mediante la prueba de Folin-Ciocalteu, y dio como resultado  $177.13 \pm 1.97$  mg Eq. ácido gálico/g, equivalente al 17.71% (Avila et al., 2014). Mahlke et al., en 2009 y Pan et al., en 2010 realizaron extractos metanólicos de *B. thyrsoides* y *B. officinalis* respectivamente y obtuvieron cantidades de compuestos fenólicos similares a las obtenidos por Avila et al., 2014, lo que permite decir que en el género *Buddleja* es común la presencia de estos metabolitos en concentraciones que son consideradas altas. En este sentido Adedapo et al., 2009 compararon los extractos metanólicos de hojas y tallos de *B. Saligna* y las concentraciones de fenoles totales presentes en cada uno y concluyen que en los tallos existe una mayor concentración de estos metabolitos.

Ebrahimzadeh et al., 2014 analizaron 20 diferentes extractos de cuatro especies vegetales utilizadas como fotoprotectores. De cada extracto obtuvieron la concentración de compuestos fenólicos y el factor de protección solar (FPS) y determinaron la correlación existente entre ambos valores. Este estudio concluyó que el extracto de *Crataegus pentagyna* con un FPS de 24.47 y una concentración de fenoles totales de 186 mg eq. Ácido gálico/g, y el extracto metanólico de *Feijoa sellowiana* (FPS= 1.30 y 375 mg eq. Ácido gálico/g) fueron los que presentaron una correlación directa entre ambos factores y que eran candidatos para ser utilizados como suplementos en las formulaciones fotoprotectoras. Con base a estos autores, se puede decir que los resultados obtenidos con el EMBC también presentan una correlación directa entre la concentración de fenoles totales ( $177.13 \pm 1.97$  mg Eq. ácido gálico/g, equivalente al 17.71%) y FPS (24).

Es importante mencionar que antes de realizar un extracto en busca de ciertos

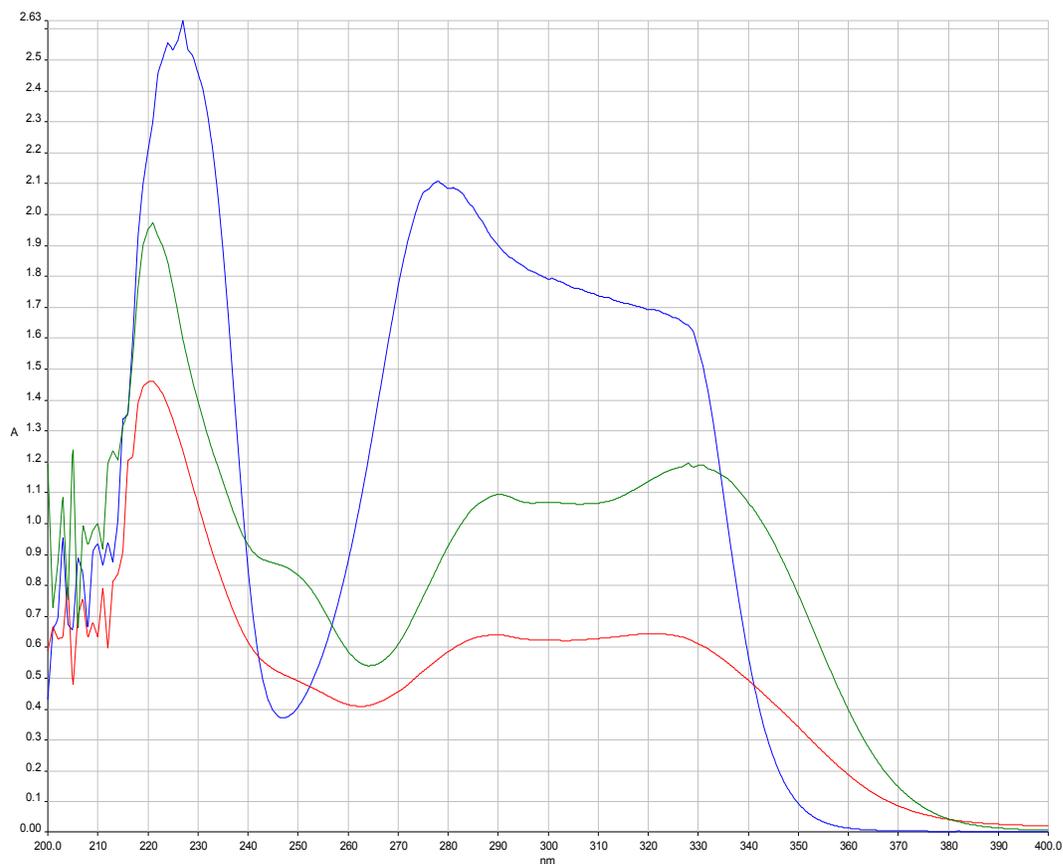
compuestos, se debe tomar en cuenta la naturaleza y condiciones de la planta. Cabe mencionar que el material vegetal para este estudio se colectó en época de sequía (marzo) y a pesar de que está reportado que es un periodo del año en el que disminuye considerablemente la biomasa (Camacho et al., 2009), la concentración de polifenoles totales fue buena. Zhang y Björn en 2009 demostraron que diversos metabolitos producidos por las plantas, incluidos los polifenoles, aumentan su concentración por la exposición a la RUV, principalmente a la UV-B. Lo anterior corrobora que *B. cordata* es una especie capaz de sintetizar compuestos fenólicos, como flavonoides y fenilpropanoides como el verbascósido durante todo el año, y que pueden ser obtenidos en buena cantidad a partir de la fracción metanólica de un extracto.

### **8.1.2 Determinación de los máximos de absorción ( $\lambda_{max}$ ) en la región UV del EMBC.**

Una vez obtenido el EMBC se llevó a cabo un barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm, para corroborar la presencia de compuestos capaces de absorber en la región de luz UV, como el verbascósido, que presenta un máximo de absorción ( $\lambda_{max}$ ) a 291 nm, región correspondiente a luz UV-B (Fig. 29) (Avila et al., 2005; Martínez-Vázquez et al., 1997).

En la figura 29 se observa que los picos máximos de absorción que se presentaron en el barrido del EMBC se encuentran dentro de la región de luz UV-B a  $\lambda_{max}$  = 224, 290 y 324 nm. Estos resultados son similares a los reportados en el extracto de *B. thyrsooides* y se consideran un patrón característico de la presencia de feniletanoides (Li et al., 2005; Mahlke et al., 2009). Las longitudes de onda que presentó el EMBC indicaron la existencia de sustancias cromóforas para la RUV, las cuales tienen como características químicas la presencia de dobles enlaces conjugados con anillos aromáticos; es decir que poseen sistemas de enlaces  $\pi$  conjugados capaces de presentar deslocalización electrónica y traslapamiento de los orbitales (Vollhardt y Schore, 2002). Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de insaturaciones en la molécula dentro del sistema conjugado, mayor será su desplazamiento en el pico de absorción hacia longitudes de onda mayores (Ege,

1998). Además, este resultado sugiere que el EMBC presenta un nivel de absorción similar al del octil-metoxi-cinamato (PARSOL) ( $\lambda_{max} = 310 \text{ nm}$ ) (Pattanaargson et al., 2004) que fue utilizado como control y se encuentra presente en muchas formulaciones comerciales de protectores solares (Figura 29).



**Figura 29. Picos máximos de absorción del EMBC (línea verde) PARSOL (línea azul) y verbascósido (línea roja). Concentración: 60  $\mu\text{g/mL}$ .**

### 8.1.3 Caracterización del EMBC por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Como parte del trabajo desarrollado en el laboratorio por otros investigadores, se analizó el EMBC por medio de HPLC, y a partir de estándares se identificó la presencia de los principales compuestos de interés en el EMBC: el verbascósido (98.75 mg/g), linarina (36.45 mg/g) y siringina (Avila et al. 2014). Estos resultados coinciden con los reportados por Liu y Jia en 1991 que aislaron el verbascósido de *Pedicularis striata*. La presencia de estos compuestos explica la capacidad del

EMBC para absorber en la región de luz UV. Cabe mencionar que el verbascósido, al ser un fenil propanoide, presenta sistemas de dobles enlaces conjugados, anillos aromáticos y dobles ligaduras externas, lo que le confiere la propiedad de actuar como cromóforo a la RUV.

### **8.1.3 Aislamiento e identificación del verbascósido.**

A partir de la cromatografía en columna (CC) que se realizó al EMBC se obtuvo un total de 121 alícuotas de 250 a 300 mL cada una, las cuales se destilaron a presión reducida para posteriormente realizar CCF de cada una, en placas de aluminio con gel de sílice, utilizando como fase móvil la misma mezcla de CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub>-MeOH utilizada en la CC. Posteriormente, las placas fueron reveladas con luz UV a 254 y 366 nm, finalizando con la solución de sulfato cérico y ácido sulfúrico. Los resultados obtenidos del patrón de CC permitieron reunir las alícuotas en cuatro fracciones, donde la porción 8:2 de CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub>-MeOH fue la que presentó la concentración de verbascósido. Estos resultados coinciden con los reportados por Avila en 2002.

El rendimiento total de verbascósido aislado del EMBC fue de 11 g con respecto a los 300 g de EMBC utilizados para su obtención; se observó como una sustancia amorfa, que presentó una sola mancha en las cromatografías de capa fina en los diferentes revelados a las que fueron sometidas. El *r<sub>f</sub>* coincidió con el de una muestra de verbascósido puro (0.45), así como con los reportes de otros autores que aislaron verbascósido (Caufin et al., 2014; Frum et al., 2007).

El análisis del espectro de absorción con luz UV arrojó dos picos máximos a  $\lambda_{max}$ = 291 y 332 nm y coincide con lo reportado por otros autores que purificaron verbascósido a partir del extracto metanólico de *Buddleja scordioides* (Avila et al., 1999; Avila et al., 2005) (Tabla 20). Garro et al., 2014 aislaron verbascósido de la parte aérea de *B. cordobensis* y lo describió como un polvo amorfo amarillento. Thitilertdech et al., en 2014 aislaron verbascósido a partir de *Clerodendrum petasites* S. Moore y reportó un pico máximo de absorción de  $\lambda_{max}$ = 330 nm. Estos resultados concuerdan con los aquí obtenidos, y se pudo confirmar la autenticidad y pureza del verbascósido aislado del EMBC.

Las cantidades de verbascósido obtenidas en diferentes especies del género *Buddleja* se encuentran en el orden de 5 a 60mg/g, mientras que el cultivo *in vitro* de *B. cordata* aumenta la concentración de verbascósido en un rango de 66.24 a 86.26 mg/g (Pardo et al., 1993; Arciniegas et al., 1997; Liao et al., 1999; Mensah et al., 2001; Piao et al., 2003; Frum et al., 2007; Bakhouse et al., 2008; Mahlke et al., 2009; Estrada-Zuñiga y Cruz-Sosa, 2009; y Oyourou et al., 2013). Estos resultados indican que las concentraciones de verbascósido obtenidas en este trabajo (98.75 mg/g) a partir del EMBC (300 g) pueden considerarse como altas y por lo tanto que *B. cordata* es una especie rica en polifenoles, especialmente verbascósido. Además, este compuesto se ha detectado a diferentes concentraciones en las diversas partes de las plantas de las que se ha aislado. Así encontramos reportes de las raíces, tallos, hojas y flores con concentraciones y rendimientos variables que van del 0.002% (Kirmizibekmezet al., 2012) en raíces, hasta 3.0% (Georgiev et al., 2011b), por lo que el rendimiento en este trabajo se considera bueno. Con estos resultados se pudo confirmar la autenticidad y pureza del verbascósido aislado del EMBC .

**Tabla 20. Características generales del verbascósido obtenido a partir del EMBC**

Rendimiento del verbascósido a partir del EMBC (g)	Picos máximos de absorción	Eluyentes de obtención	Penetración en piel	
			µg/mL	%
11 g	$\lambda_{max}$ 291 y 332 nm	Dicloro metano-metanol (80:20)	9.3±2.3	1.86%
			33.4±9	0.82%

El primer reporte que se tiene del aislamiento y purificación del verbascósido es del año 1963. Desde entonces se ha reportado su presencia en más de 200 especies vegetales, distribuidas en 23 familias de plantas, en las que destacan los géneros *Verbascum*, *Lippia* y *Buddleja* (Alipieva et al., 2014b, Deepak et al., 1999; Schlauer et al., 2004; Taskova et al., 2005; Filho et al., 2012; Oyourou et al., 2013) (Fig 30).

La presencia de verbascósido en diferentes especies vegetales ha generado toda una línea de investigación basada en el cultivo de tejidos, especialmente del

género *Buddleja*, a fin de optimizar y obtener grandes cantidades de verbascósido con fines terapéuticos (Vertuani et al., 2011). Lo anterior ha permitido encontrar la ruta biosintética del compuesto, ya que a pesar de que los primeros pasos de la vía se conocen, algunos productos intermedios, enzimas y sus respectivos genes aún son desconocidos (Alipieva et al., 2014). El conocimiento actual de la vía de síntesis se basa en experimentos con isótopos marcados y comienza con la biosíntesis de fenilalanina y tirosina por los precursores del ácido Shikímico. El hidroxitirosol del verbascósido es biosintetizado a partir de la tirosina, ya sea a través de la tiramina o de la dopamina, mientras que la parte cafeica se sintetiza a partir de la fenilalanina a través de la vía del cinamato. La dopamina se incorpora a través de la oxidación de aldehído para convertirse en alcohol; y finalmente se lleva a cabo la  $\beta$ -glicosilación (Saimaru y Orihara, 2010) (Fig 31).

La importancia del verbascósido se ve reflejada en los estudios que permiten, mediante 15 pasos, sintetizar de forma artificial al compuesto (Duynstee et al., 1999). Sin embargo, los métodos de separación y purificación a partir de extractos vegetales se han ido perfeccionando según las necesidades de la investigación. Ejemplo de ello son los trabajos publicados por Han et al., 2012 y Yue et al., 2013, que implican el uso de cromatografías de alta resolución, aumentando así la pureza del verbascósido aislado.

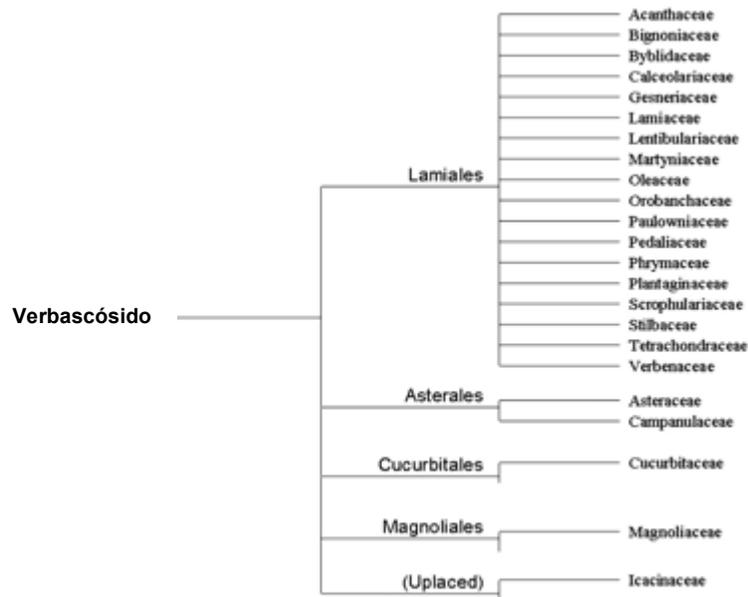


Fig 30. Distribución y presencia del verbascósido en el reino vegetal Schlauer et al., 2004.

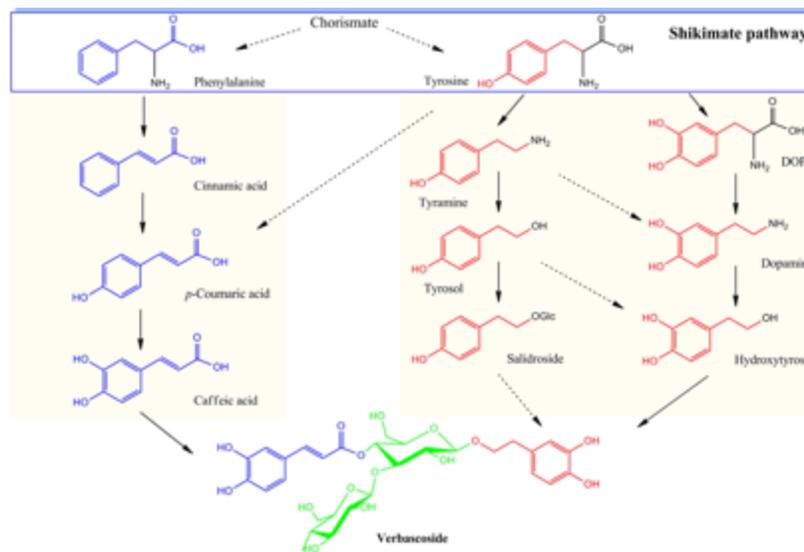


Figura 31. Biosíntesis propuesta para el verbascósido.

Todo lo mencionado nos ofrece un panorama general del uso e importancia a nivel farmacológico de este compuesto, debido a las diferentes propiedades que se le han atribuido por su estructura química. Por lo tanto, se procedió a realizar pruebas de toxicidad, viabilidad celular y una prueba preliminar de fotoprotección en cultivos de la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT.

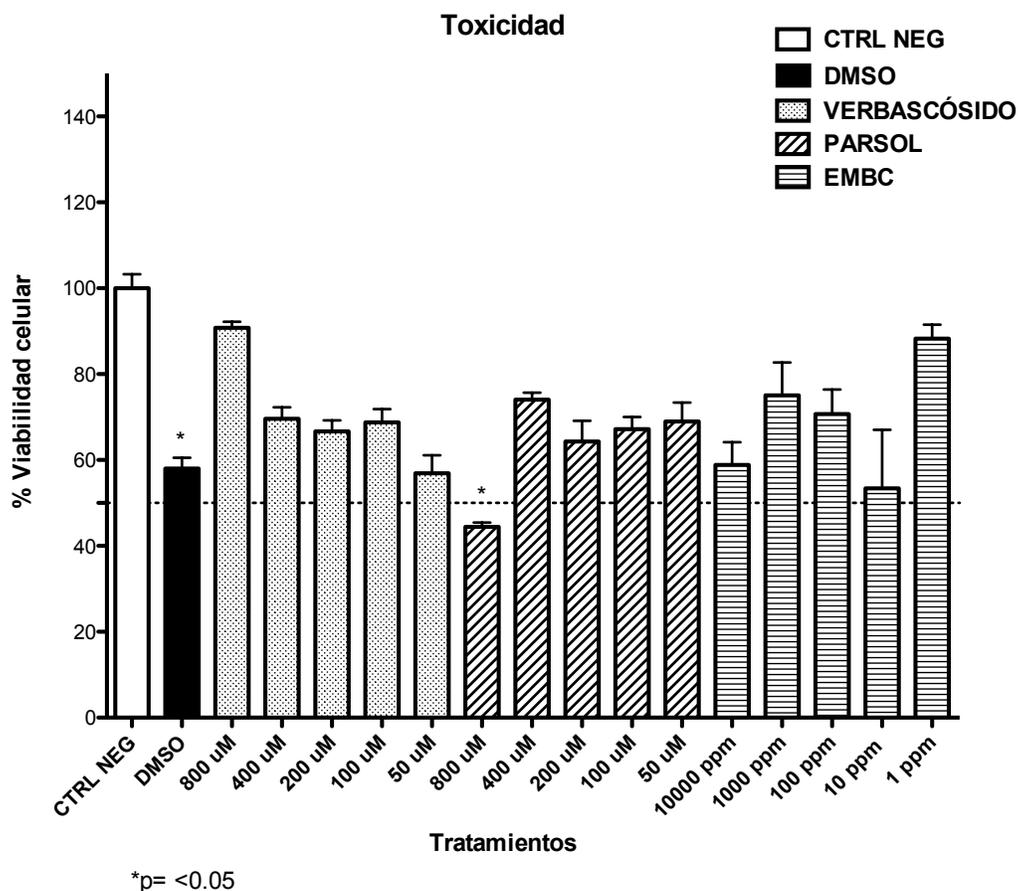
## **8. 2 Resultados y discusión de la segunda etapa.**

Para evaluar los posibles efectos tóxicos del EMBC y del verbascósido se llevaron a cabo pruebas de toxicidad y viabilidad en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, a través de la exposición a los compuestos y a la RUV. Los datos se obtuvieron por medio de la prueba de MTT. Posteriormente se determinó el porcentaje de células viables y en apoptosis por medio de citometría de flujo.

### **8.2.1 Determinación de citotoxicidad y viabilidad del EMBC y del verbascósido en la línea celular HaCaT.**

La figura 32 muestra las concentraciones que se utilizaron. El análisis estadístico demostró que las diferentes concentraciones utilizadas no afectaron significativamente el crecimiento y viabilidad celular con respecto a las células sin compuesto (control), al que se le asignó un valor de 100%.

La concentración más alta del Parsol (800  $\mu$ M) presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, al reducir la viabilidad celular hasta un 44%. Diversos estudios sobre la efectividad de este compuesto han concluido que es una molécula poco estable y su descomposición promueve la peroxidación lipídica. Además, la concentración más alta permitida en las formulaciones comerciales que contienen Parsol es del 3%, y en este estudio la dosis más alta equivale a casi un 2% del compuesto presente en cada pozo. Por lo tanto la viabilidad celular se vio comprometida al someter al cultivo a una dosis cercana a la máxima permitida (Damani et al 2006; Pattanaargson et al., 2004; Kullavanijaya y Lim, 2005; Sambandan et al., 2011). Cabe mencionar que Serpone et al., en 2007 probaron diversas combinaciones de filtros solares en cultivos de levaduras, y encontraron que aquellos que contenían parsol en la fórmula tuvieron una disminución en la tasa de supervivencia.



**Figura 32. Porcentaje de viabilidad de células HaCaT, después de 24 horas con diferentes concentraciones de verbascósido, Parsol y EMBC.**

En la figura 32 se puede observar que ninguna de las concentraciones evaluadas tuvo una supervivencia del 100% al final del experimento. En diversas investigaciones se ha demostrado que los polifenoles pueden actuar como sustancias antiproliferativas, proapoptóticas y reguladoras del ciclo celular, esto se ha probado en diversas líneas celulares de diferentes tipos de tejido, incluida la piel. Así entre las posibles aplicaciones de este tipo de compuestos está el uso como agentes quimiopreventivos, por lo cual esta actividad debe ser selectiva para células tumorales, por lo que es necesario comprobar que son sustancias menos tóxicas para las células normales (Matito et al., 2003).

Existen estudios realizados con diversos compuestos polifenólicos probados en células de melanoma que han demostrado los efectos antiproliferativos y

apoptóticos derivados de la incorporación de polifenoles. Sin embargo, estos compuestos han sido modificados en su forma original (catequinas galoizadas), lo cual implica que pueden aumentar la citotoxicidad, aunque se considera que para estudios relacionados con la piel, las modificaciones a los compuestos no alteran las funciones normales de las células. (Torres et al., 2002 a y b; Lozano et al., 2005).

En este experimento se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo para garantizar el crecimiento exponencial durante todo el experimento. Esta población inicial permite que las células adheridas dispongan de espacios libres para que tengan lugar divisiones celulares a lo largo de todo el ensayo. Este requisito es indispensable para determinar si distintas concentraciones de una determinada sustancia influyen sobre la capacidad natural de las células para propagarse mediante mitosis, y formar una monocapa de células en toda la superficie disponible.

Existen dos factores fundamentales relacionados con el espacio de crecimiento de un cultivo celular, y que limitan la fiabilidad de un experimento si no se toman en cuenta. Por un lado, la fisiología natural de las células les permite dividirse únicamente mientras dispongan de espacio adyacente, de modo que al establecerse contacto con células vecinas se inicie una cascada de señalización intracelular que envía moléculas al interior del núcleo que interfieren y paran el ciclo celular. Por otro lado, y como consecuencia de la detención del ciclo, los análisis colorimétricos realizados después de alcanzada la confluencia en cada pozo serán menos significativos.

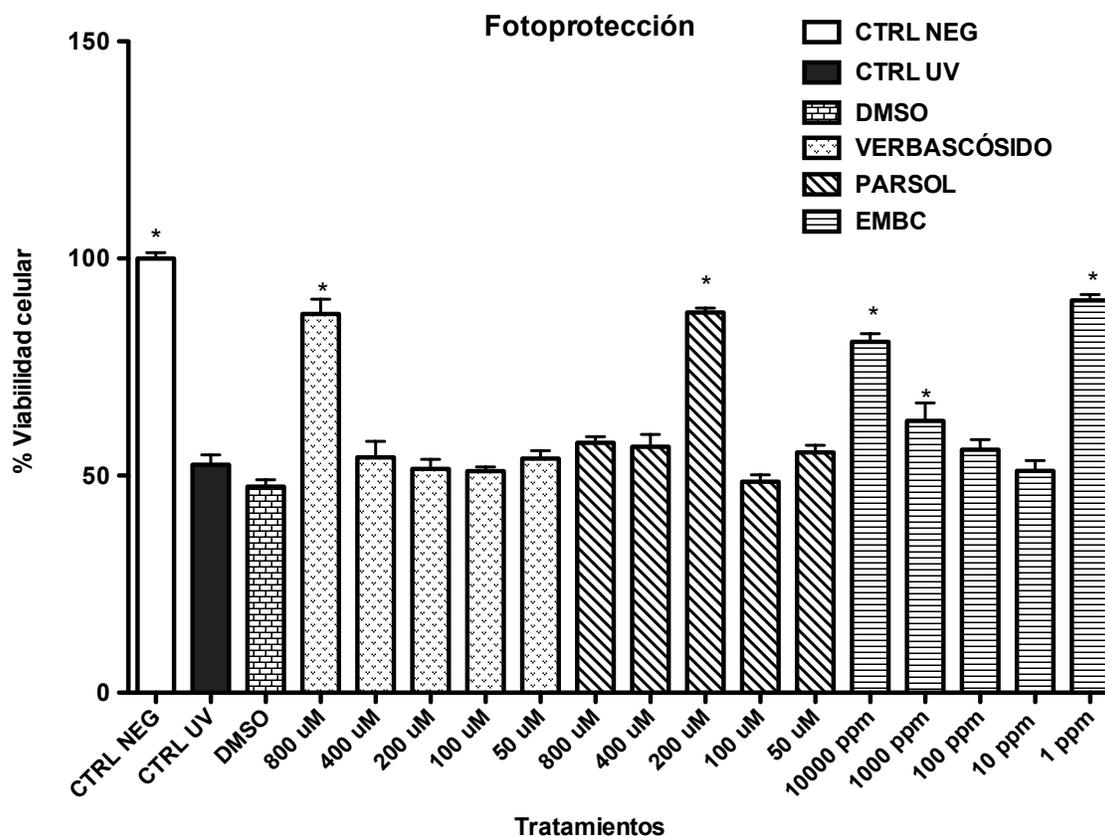
### **8.2.2 Prueba de fotoprotección en la línea celular HaCaT irradiada con RUV.**

Se determinó el efecto fotoprotector del EMBC y del verbascósido en las células HaCaT irradiadas con UV-B. Se utilizó como control al parsol en las mismas concentraciones que el verbascósido (50, 100, 200, 400 y 800  $\mu\text{M}$ ).

La figura 33 presenta los resultados del experimento de fotoprotección con las distintas concentraciones de las sustancias. Se observan los porcentajes de viabilidad de las células HaCaT 24 horas después de ser irradiadas con luz UVB.

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y las distintas concentraciones utilizadas de las sustancias, por lo que se consideró que tanto el EMBC como el verbascósido tienen un efecto fotoprotector sobre las células HaCaT irradiadas sin importar la concentración utilizada. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas con respecto al control positivo (irradiado sin protección) y los porcentajes de viabilidad en cuatro diferentes tratamientos: verbascósido 800  $\mu\text{M}$ , Parsol 200  $\mu\text{M}$ , EMBC 10,000 y 1 ppm. Este resultado nos da evidencia de que existe una concentración ideal que protege a las células del daño ocasionado por la RUV.

Al igual que con el experimento de toxicidad, se puede observar que ninguno de los tratamientos alcanza la confluencia del 100%, lo cual es explicado debido a que los compuestos polifenólicos presentan cierta actividad antiproliferativa ante células carcinogénicas, sin embargo en este experimento no comprometen de forma extrema la viabilidad celular, y se observa que las poblaciones se mantienen por arriba del 50% de supervivencia en todos los grupos protegidos con las sustancias.



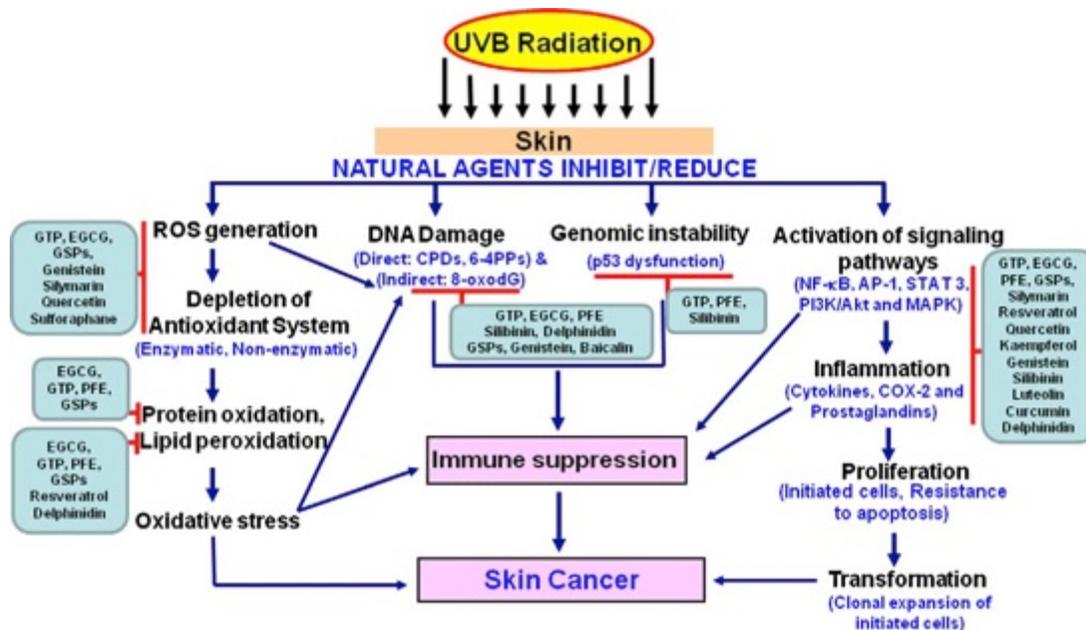
\*p<0.05

**Figura 33. Experimento de fotoprotección. Se presentan los porcentajes de viabilidad en las diferentes concentraciones de las sustancias 24 horas después de la exposición a la RUV.**

Diversos estudios han probado la eficacia de los agentes naturales en la fotoprotección y han buscado determinar las vías moleculares y celulares que puedan inhibir o retrasar el proceso de fotocarcinogénesis. Por ello los cultivos celulares son una buena herramienta para conocer más a fondo estos procesos (Afaq, 2011) (figura 34). Los estudios realizados con cultivos de la línea celular HaCaT han permitido determinar que la incorporación de extractos y compuestos de origen natural, previo y post exposición a la RUV, ayudan a reducir los daños al ADN por efecto de las ERO, disminuyen la respuesta inflamatoria e inhiben el

aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas (Afaq et al., 2009; Afaq et al., 2007; Tesoyi et al., 2000; Saewan y Jimtaisong., 2015; Zheng et al., 2014).

Las células HaCaT no son tumorigénicas; sin embargo, son más sensibles a los daños inducidos por la RUV debido a la mutación que presentan en el gen p53 (Magal et al., 1998). Un estudio realizado para evaluar el efecto de fotoprotección de diversos extractos de algas ricos en polifenoles, en la línea celular HaCaT, determinó mediante la técnica de MTT que la exposición a la RUV sin ningún tratamiento lleva a una reducción significativa de células viables. Sin embargo, al ser tratadas con el extracto metanólico de las algas, la viabilidad celular aumentó considerablemente, así como el incremento de apoptosis en células dañadas a través de la activación de las vías de señalización de JNK y ERK sin importar la concentración del extracto utilizada (0.5, 1 y 3 mg/mL) (Kim et al., 2014).



**Figura 34. Agentes naturales y su habilidad de inhibir o reducir los efectos adversos de la RUV.**

En 2015 Baccarin et al., realizaron un estudio de fotoprotección contra la RUV en la línea celular HaCaT mediante la técnica de MTT. Evaluaron el efecto pre y pos tratamiento del extracto de granada (*Punica granatum*) y utilizaron las mismas

dosis que en este trabajo. Concluyeron que la presencia del extracto previo y después de irradiar a las células aumentó la viabilidad celular y ayudó a la protección del ADN, debido a los polifenoles presentes en el extracto.

La RUV produce daños en los queratinocitos al inducir la producción de citosinas inflamatorias y prostaglandinas. Estos mediadores son los responsables de las reacciones cutáneas como la inflamación, hiperpigmentación, eritema, hiperplasia y carcinogénesis. El daño en estas células por efecto de la RUV puede ser directo debido a la absorción de la luz por parte de los cromóforos o bien indirecta por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que juegan un papel importante en los procesos fisiopatológicos derivados de la exposición a la RUV, ya que activan diversas moléculas como el factor nuclear NF- $\kappa$ B y el factor promotor de la mitosis MAPK (Ichihashi et al., 2003; Assefa et al., 2005 ; Bickers y Athar, 2006).

Zhou et al., 2012 probaron el efecto fotoprotector del salidrósido, fenil propanoide glicosilado que tiene reportes de actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica. Compararon diferentes dosis de RUV y diversas concentraciones del compuesto en células HaCaT. Determinaron que el compuesto tiene un efecto fotoprotector y antiapoptótico, ya que modifica la expresión de NF- $\kappa$ B y regula el ciclo celular por efecto de las proteínas BCL-2 y CDK6. Ellos concluyen que el salidrósido es una molécula que promueve la viabilidad celular y puede ayudar a prevenir los daños ocasionados por RUV al ser aplicado tópicamente.

Diversos estudios de fotoprotección que utilizaron compuestos y extractos de origen natural han determinado que la respuesta inflamatoria por efecto de la RUV está dada por la inhibición de mediadores inflamatorios como las interleucinas IL-1b, IL-6 y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), las cuales se ven disminuidas cuando se aplican compuestos que tengan efecto fotoprotector, inhibiendo así la respuesta inflamatoria en cultivos celulares de piel (Aoki-Yoshida et al., 2013).

Otros estudios probaron que la cúrcuma, el ácido cafeíco y las antocianinas inhiben la producción de COX-2 mediante la supresión de la actividad de las

proteínas p38 MAPK, JNK, AP-1, NF- $\kappa$ B y PGE<sub>2</sub> (Cho et al., 2005; Kang et al., 2009 y Tsoyi et al., 2008).

El tratamiento con sulfurano reduce la inducción de IL-6, IL-1 $\beta$ , COX-2 y PGE<sub>2</sub>, p38 y SAPK/JNK y ERK y esto disminuye el efecto inflamatorio (Shibata et al., 2010).

La aplicación de extractos de *Zingiber officinales* y gingerol inhiben la producción de citosinas en cultivos celulares (Guahk et al., 2010).

La quercetina contribuye a la inhibición de la transformación neoplásica mediante el bloqueo de la activación de las vía de señalización celular, reduciendo la producción de AP-1, NF- $\kappa$ B y la fosforilación de MAPK (Olson et al., 2010; Ding et al., 2010).

El extracto de *Prunella vulgaris* -que es rico en polifenoles-, al ser incorporado en cultivos de células HaCat previo a la exposición a la RUV, demostró que era capaz de reducir la ruptura del ADN por efecto de la RUV (Svobodová et al., 2009).

La delfinidina inhibe el incremento de peroxidación lipídica y modula la actividad de las enzimas antioxidantes en cultivos de HaCaT y fibroblastos humanos (Afaq et al., 2007; Wang et al., 2010).

El extracto de *Prunella Vulgaris*, que es rico en polifenoles, reduce la presencia de ERO y de IL-6 en células expuestas a la RUV (Vostálová et al., 2010).

Tomando en cuenta nuestros resultados y la literatura disponible, se sabe que los productos de origen natural, como los polifenoles, tienen una mayor capacidad de citotoxicidad en líneas tumorales (Chen et al., 2003). Se ha propuesto que las células normales (por ejemplo, las de la piel) al estar en contacto frecuente con compuestos fenólicos derivados de plantas, han desarrollado tolerancia para mitigar su posible toxicidad, mientras que las células normales de los órganos internos y las células tumorales presentan más sensibilidad a estos compuestos (Yamamoto et al 2004).

En otras investigaciones se corroboró que los compuestos polifenólicos son útiles como fotoprotectores, y que la línea celular HaCaT es un buen modelo de estudio

para estos análisis. Por lo tanto, estos estudios son una alternativa altamente sensible para la evaluación de riesgos fototóxicos y se evita así un posible efecto inflamatorio en la piel cuando algún extracto es aplicado, ya que son capaces de inducir estrés oxidativo en la membrana celular, desencadenando la acumulación de fotosensibilizadores, la fotooxidación de lípidos y proteínas que son agentes causales de la fotoirritación (Afaq et al., 2007; Afaq et al., 2009).

Con respecto al verbascósido, este fenil propanoide ha sido evaluado para determinar su papel en la reducción del proceso inflamatorio en queratinocitos humanos. Se ha demostrado que inhibe la respuesta inflamatoria ya que regula y disminuye los niveles de NFkB y AP-1, mientras que flavonoides como quercetina solo inhiben a NFkB. Al comparar ambos compuestos, se determinó que el verbascósido era la sustancia más efectiva al reducir la respuesta inflamatoria, aun con la presencia de moléculas pro inflamatorias (Potapovich et al., 2011; Pastore, 2009 y Pastore, 2008).

### **8.2.3 Determinación de apoptosis por citometría de flujo.**

Determinada la capacidad fotoprotectora de las sustancias se evaluó su efecto sobre la apoptosis celular, para determinar si existían cambios en el patrón de muerte celular por efecto del EMBC y del verbascósido.

En la figura 35 se muestran los gráficos obtenidos por método de doble tinción con anexina (A) y yoduro de propidio (IP). Las primeras dos columnas corresponden a los resultados obtenidos de las pruebas de citotoxicidad a las sustancias. La columna 3 y 4 corresponden a las pruebas de fotoprotección.

En los resultados de las muestras de citotoxicidad (columna 1 y 2) se observaron cambios en el comportamiento del cultivo después de 24 h de exposición a las sustancias (parsol, EMBC y verbascósido). En el cultivo del control positivo (DMSO) la población aumenta el porcentaje de células en necrosis (IP+), mientras que las poblaciones tratadas con EMBC y con verbascósido aumentaron los porcentajes de apoptosis (A+). Esto puede ser explicado por las concentraciones altas de parsol y a la posible toxicidad de los polifenoles que puede desencadenarse después de 24 h de aplicado un agente externo a los cultivos

(Damani et al 2006; Pattanaargson et al., 2004; Kullavanijaya y Lim, 2005; Sambandan et al., 2011; Serpone et al., en 2007; Matito et al., 2003).

Los resultados de las muestras de fotoprotección corroboraron los efectos protectores de las sustancias. Los controles positivos (RUV y DMSO+RUV) presentaron el mayor porcentaje de muerte celular por necrosis, mientras que el parsol y el EMBC mantuvieron el mayor porcentaje de células en la región de viabilidad. En la muestra con verbascósido aumentó la población de células en apoptosis; sin embargo, los niveles de necrosis se consideraron muy bajos (Fig. 35-38).

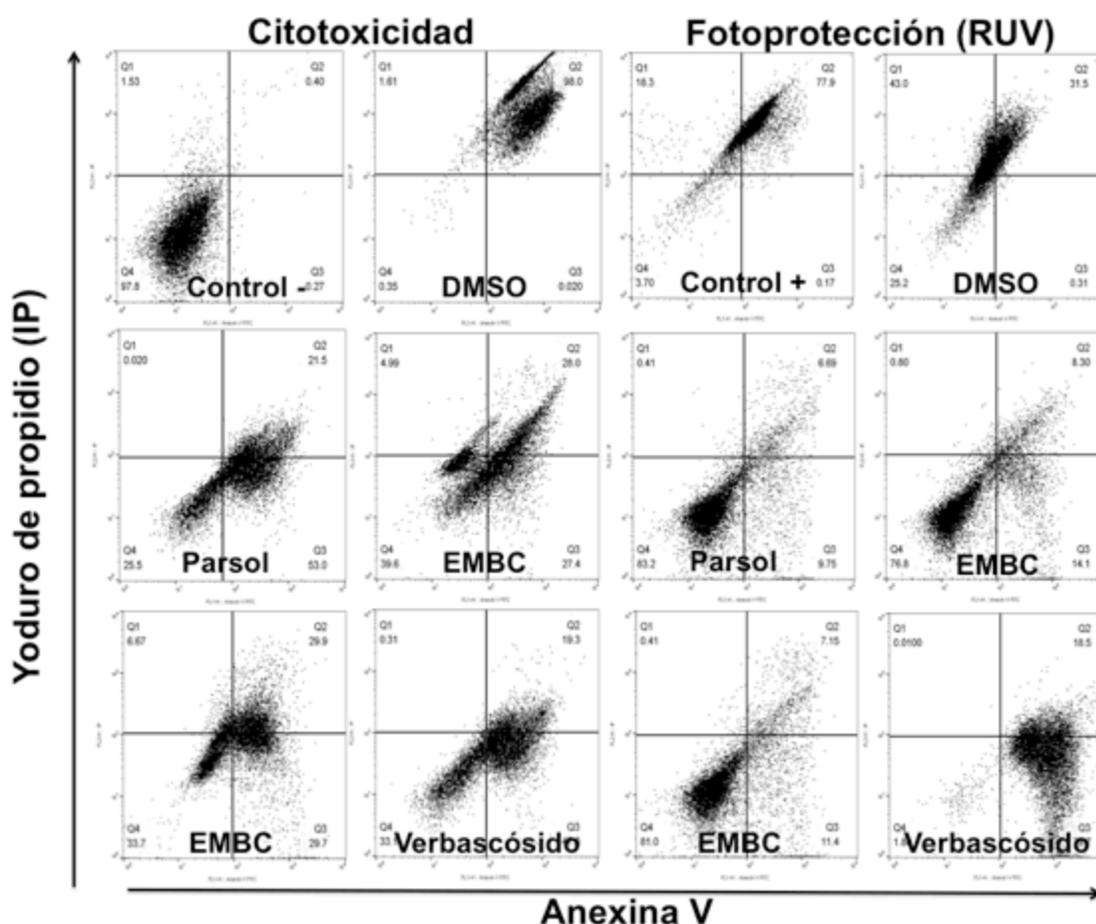
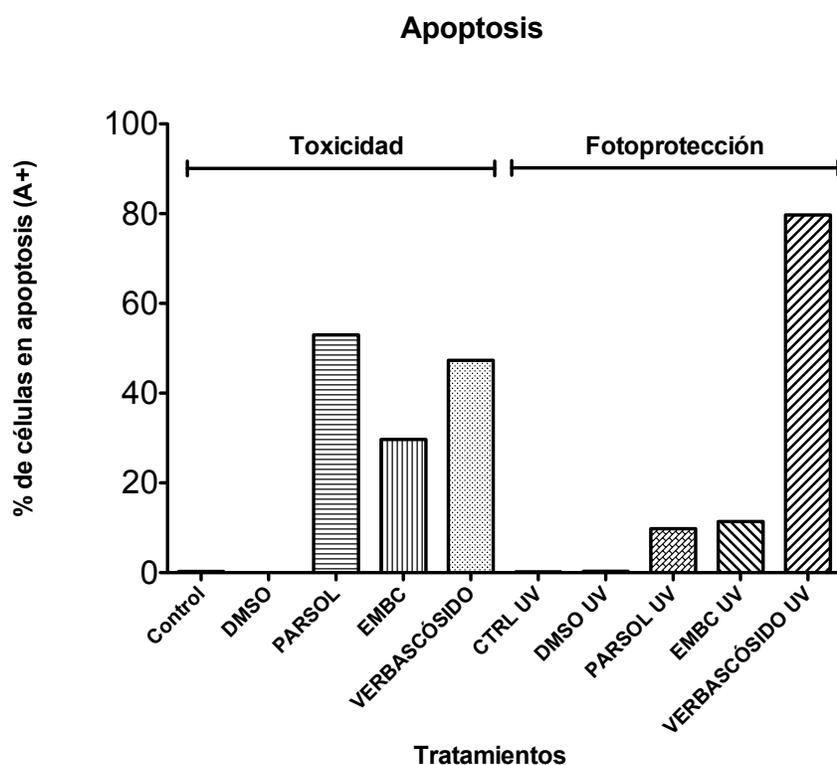


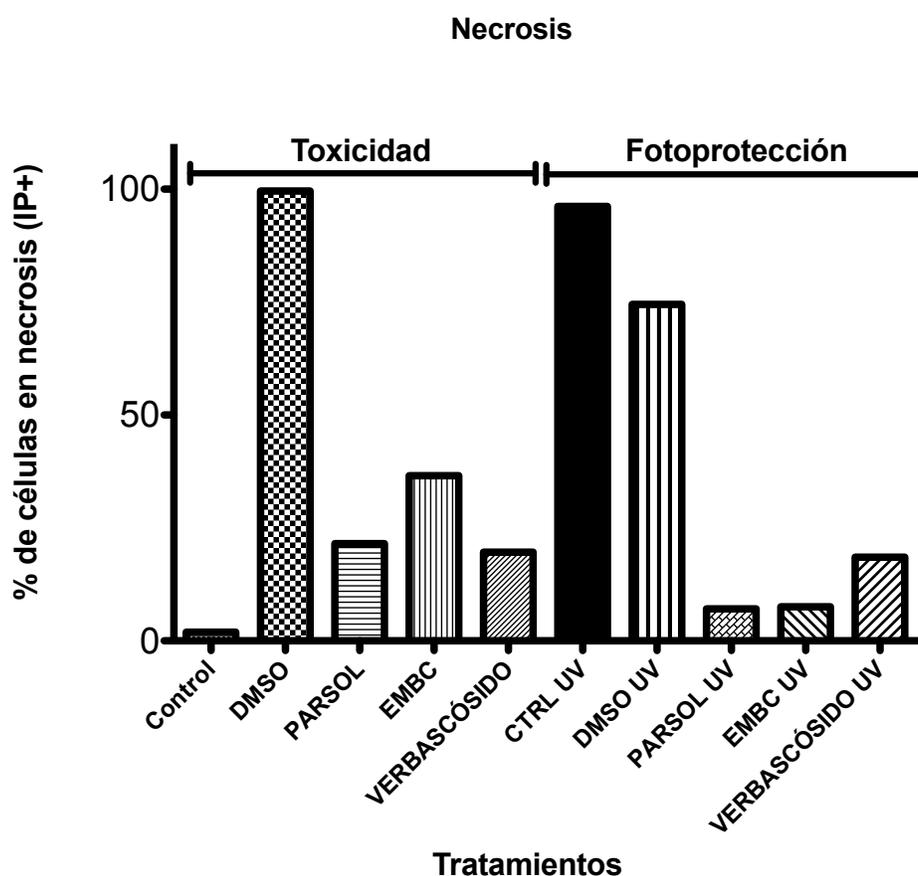
Figura 35. Resultados de las pruebas de toxicidad y fotoprotección obtenidos por medio de citometría de flujo 24 h después de aplicado el estímulo.

Las células responden a los daños inducidos por RUV de diversas maneras: activando procesos como la reparación y la adaptación por medio de rutas antioxidantes, señalización de las vías de regulación de la proliferación celular y en, último caso, someterse a apoptosis para eliminar las células dañadas gravemente (Kim et al., 2014; Calò y Marabini, 2014). Sin embargo, si los mecanismos de reparación están dañados, las células pueden escapar de los controles del ciclo celular y suprimir la apoptosis convirtiéndose en células cancerosas. Por lo tanto, la supresión de la apoptosis juega un papel crítico en el desarrollo y propagación de todos los tipos de cáncer. La mejora en la tasa de apoptosis en células dañadas se considera una importante estrategia para prevenir la carcinogénesis (Kim et al., 2014). Los resultados de este trabajo muestran que el EMBC mantiene la viabilidad celular, posiblemente por la adecuada reparación de los daños ocasionados por la RUV; por su parte la presencia de verbascósido en el cultivo induce la vía apoptótica, debido a que el daño celular es irreparable (Fig. 36-38).



**Figura 36. Porcentajes de células en apoptosis en los diferentes tratamientos. Medición por medio de citometría de flujo.**

Diversas sustancias de origen natural como el resveratrol, beta caroteno y el licopeno han sido estudiadas para la prevención de diversas enfermedades como el cáncer de piel, y se ha comprobado que estas moléculas inducen la apoptosis en células cancerígenas de diversos órganos y en cultivos celulares como el utilizado en este trabajo (Vitale et al., 2013; Lozano et al., 2005; Yeh et al., 2012 y Namvar et al 2012). El aumento en la tasa de apoptosis usando productos naturales previo a la exposición a la RUV también ha sido evaluado y confirmado, quedando de manifiesto que es una forma de fotoprotección generada por las sustancias de origen natural para evitar la progresión del ciclo celular en células dañadas (Ji et al., 2012; Han et al., 2011 y Reagan et al., 2006). El mismo comportamiento se observó en este trabajo con la aplicación del EMBC y el verbascósido en los cultivos de células HaCaT previo a ser expuestos a la RUV.



**Figura 37. Porcentajes de células en necrosis en los diferentes tratamientos. Medición por medio de citometría de flujo.**

Los resultados de este trabajo demuestran que el pretratamiento con las sustancias dio como resultado el mayor porcentaje de células viables, y al mismo tiempo un aumento en la tasa de apoptosis por exposición a la RUV, disminuyendo drásticamente la presencia de necrosis en los cultivos de células HaCaT. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kim et al., 2014 en el que utilizaron extractos de algas ricos en polifenoles y concluyen que los extractos de origen natural presentan un efecto dual en células HaCaT expuestas a la RUV, ya que observaron un aumento en la proliferación de células no dañadas y una mejora en la inducción de la apoptosis de células dañadas, que en conclusión da como resultado un incremento en la viabilidad y fotoprotección global de las células.

### Población viable

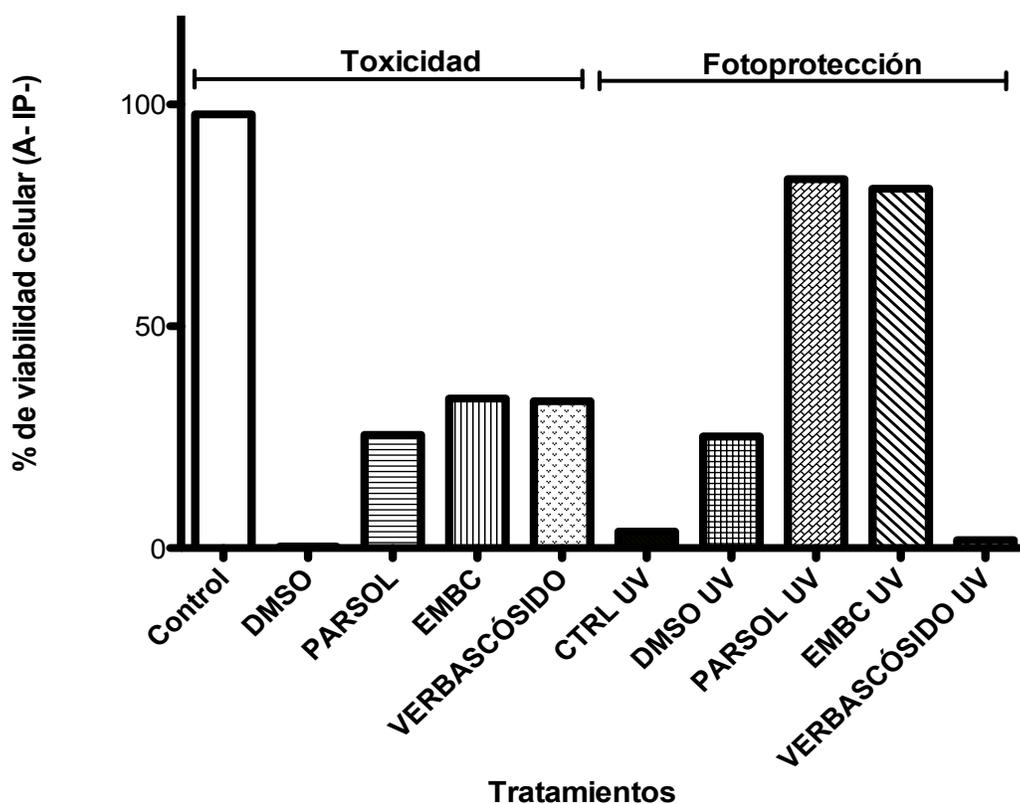


Figura 38. Porcentajes de células viables en los diferentes tratamientos. Medición por medio de citometría de flujo.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los reportados por Calò y Marabini, 2014, que probaron el extracto metanólico de *Vaccinium myrtillus*, el cual es rico en polifenoles, y demostraron que el pre-tratamiento de cultivos celulares HaCaT con el compuesto previo a ser expuestas a RUV daba como resultado un efecto fotoprotector al aumentar la apoptosis de células dañadas. Ellos plantean la hipótesis de que la RUV activa la apoptosis de células que no pueden ser reparadas. Sugieren que la fotoprotección de su extracto se debe principalmente a la capacidad de atrapar radicales libres y evitar el estrés oxidativo, y por lo tanto la lipoperoxidación, ya que los productos finales de esta vía pueden llevar a la formación de aductos en ADN y culminar en la aparición de cáncer de piel. Concluyen que el extracto de arándano es un buen candidato para ser utilizado en las formulaciones comerciales de fotoprotectores.

El establecimiento de la RUV como causa etiológica del cáncer de piel ha llevado al estudio de diversos compuestos que puedan ser usados como quimioprotectores. Una manera eficaz de estudiarlos es medir el daño al ADN y la apoptosis en queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT). Entre los más recientes estudios se encuentran nanopartículas de plata, las cuales son toleradas por los cultivos celulares y usadas como pretratamiento contra la RUV para reducir significativamente la apoptosis y la formación de DPCs. Se encontró que el ciclo celular se detiene en la fase G1 y que se veía alterada la expresión de diversos genes implicados en el ciclo celular, la apoptosis y la reparación de nucleótidos. Ellos confirman que las células HaCaT irradiadas sin protección continúan el ciclo celular hasta la fase G2/M, a pesar de que cuando una célula se encuentra dañada usualmente se detiene en G1 para iniciar el proceso de reparación (Branzei y Foiani, 2008 y de Laat et al., 1996) y la siguiente fase G2/M restringe la multiplicación de células dañadas (Arora et al., 2015).

El ciclo celular está regulado por la actividad de las ciclinas, CCDK y CDK inhibitoras (Kastan y Bartek, 2004; Vermeulen et al., 2003). La ciclina E1/CDK2 y la ciclina D1/CDK4 son complejos que desempeñan un papel clave en la transición a la fase G1/S, mientras que la interacción con B1 y CDK1 es clave para la progresión del ciclo celular a la fase G2/M (Satyanarayana y Kaldis, 2009). Por lo

tanto, se ha demostrado que la exposición a RUV de células de mamíferos aumenta los niveles de p53 que actuará como factor de transcripción de p21/WAF1/CIP1, codificando a CDK inhibidor 1 que a su vez interactuará con p21 para así arrestar el ciclo celular en la fase G1. (Lu y Lane, 1993; Liu y Pelling, 1995 y Petrocelli et al., 1996). Sin embargo, se ha demostrado que los daños en p53 conducen a que el ciclo celular prosiga hasta la fase G2/M en células HaCaT, debido posiblemente a que estas células presentan una mutación en p53 en ambos alelos (Latonen et al., 2001) y por lo tanto no son capaces de alcanzar los niveles de p21 que se requieren para parar el ciclo. No obstante, estos autores también mencionan que la exposición a RUV activa la ubiquitina E3 ligasa MDM2 y la glucógeno sintasa beta 3 (GSK3), para luego promover la degradación de p21 y proponen que las vías moleculares de estos procesos deben ser analizadas más a fondo (Lei et al., 2010).

El proceso de apoptosis es controlado por medio de la expresión de genes pro apoptóticos, como Bax, y proteínas antiapoptóticas, como Bcl y Bcl-XL, por lo tanto, si las células irradiadas mueren por apoptosis por un lado nos indica que es un mecanismo de regulación para eliminar células dañadas, y por otro que ocurrió un daño que no pudo ser reparado. Este estudio comprobó que las células expuestas a RUV sin protección tuvieron un aumento en la relación de los niveles de Bax/Bcl-2/ y Bax7BXL-xL (Lei et al., 2010).

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los de Salucci et al., 2014, donde ponen de manifiesto que el uso de sustancias protectoras contra la RUV previene la apoptosis en queratinocitos de la capa basal, que son las células de la piel más propensas al daño por UV-B. Ellos concluyen que el uso de polifenoles naturales tiene efectos antiapoptóticos en la línea celular HaCaT previamente tratadas, ya que se reduce significativamente la muerte celular por esta vía y, que la población mantiene su viabilidad al evitar las alteraciones producidas por la RUV, en especial estrés oxidativo.

Los estudios epidemiológicos han vinculado a la cafeína con una baja en los porcentajes de varios tipos de cáncer incluido el de piel por efecto de la RUV, y

aunque el mecanismo aún no se ha establecido por completo, existen estudios que concuerdan con los resultados de este trabajo donde los ratones fueron tratados tópicamente con cafeína y después de ser expuestos a la RUV no presentaron lesiones a nivel histológico, disminuyeron sus niveles de Chk1 y aumentó la apoptosis. En el tratamiento crónico los ratones tuvieron una disminución en un 69% de la aparición de tumores, en comparación con los controles sin protección. Ellos sugieren, al mismo tiempo, que la inhibición de la proteína ATR permite eliminar las células con ADN dañado a través del aumento de la apoptosis (antes de que los oncogenes se activen), lo cual confiere una ventaja de supervivencia. También sugieren que la cafeína interactúa directamente con la RUV, por lo tanto puede ser considerada como una molécula fotoprotectora. (Kawasumi et al., 2011).

El hecho de que la población de células HaCaT a las que se protegió con verbascósido previo a ser expuesta a la RUV y que la medición en citometría demostrara un aumento en la apoptosis, puede ser explicado como el mecanismo de respuesta de las células dañadas y que no pueden ser reparadas. Estudios con verbascósido como protector contra la RUV en células HaCaT, han demostrado el mismo comportamiento, sugiriendo que la apoptosis es el mecanismo fisiológico de protección y que cuando se administra verbascósido al cultivo celular ésta es la respuesta metabólica contra la exposición aguda y crónica a la RUV. Por lo tanto, el hecho de que las células entren a apoptosis se considera un mecanismo de fotoprotección eficaz para la piel humana expuesta a la RUV (Kostyuk et al., 2008)

El método de cultivos celulares ayuda a simplificar los estudios. En este trabajo permitió un bosquejo inicial del potencial del EMBC y del verbascósido como fotoprotectores vegetales; y a diferencia de los experimentos con organismos vivos completos, se pueden eliminar las interacciones y las variables que se presentan a lo largo de un experimento. Su principal ventaja es la capacidad de controlar el ambiente, la homogenización de la muestra y la exposición directa del agente a estudiar.

Esta fase del trabajo se consideró el uso de la línea celular HaCaT para realizar una prueba de toxicidad *in vitro* previa al modelo *in vivo* (ratones SKH-1). Además, sirvió para conocer de inicio las afectaciones causadas por la RUV. Los ensayos *in vitro* son simples y reproducibles y por tanto una alternativa confiable para determinar el uso y concentraciones óptimas de las sustancias de origen vegetal, que en los últimos años han cobrado gran relevancia en busca de nuevas opciones de fotoprotección (Benavides et al., 2004; Afaq, 2011).

Nuestros resultados corroboran al EMBC y al verbascósido como agentes quimioprotectores y como sustancias viables para ser probadas en otros modelos biológicos, ya que actuaron como filtro a la RUV y no presentaron mayores efectos citotóxicos en la línea celular utilizada. Estos resultados son comparables con otros estudios llevados a cabo en la misma línea celular, probando diversos compuestos polifenólicos, lo cual demuestra el potencial protector de estas sustancias y su utilidad para eliminar o evitar que se produzcan lesiones en el ADN por efecto de la RUV (Perde-Schrepler et al., 2013; Choi et al., 2015).

### 8.3 Resultados y discusión de la tercera etapa.

#### 8.3.1 Determinación de penetración del EMBC y del verbascósido en piel de ratones SKH-1.

Los resultados de la prueba de penetración del EMBC y del verbascósido se muestran en la tabla 21. Esta prueba arrojó que el 0.82% del EMBC y el 0.465% del verbascósido aplicado tópicamente penetraron el estrato córneo de los ratones.

**Tabla 21. Resultados de la prueba de penetración.**

Compuesto	Penetración en piel $\mu\text{g/mL/cm}^2$	%
<b>EMBC</b>	33.4 $\pm$ 9	0.82 $\pm$ 0.2 %
<b>Verbascósido</b>	9.3 $\pm$ 1.3	0.465 $\pm$ 0.2 %

Los polifenoles -como el verbascósido- presentan una tasa de penetración epidérmica baja (Nichols y Katiyar, 2010). La penetración del verbascósido ha sido probada en modelos porcinos encontrando valores por debajo de los hallados en este trabajo (0.270 nmol/cm<sup>2</sup>) (Thitilertdecha et al., 2014; Ouitas y Heard, 2009). Sin embargo, la interacción a nivel de membrana es la responsable de su alta capacidad antioxidante y fotoprotectora (Funes et al., 2009 y 2010). Hoy en día parte de las estrategias de fotoprotección incluyen la formulación a base de solventes orgánicos o lípidos para ayudar a mejorar la penetración de los polifenoles, y al mismo tiempo aumentar la biodisponibilidad y estabilidad de los compuestos a través de las membranas biológicas. Se han propuesto modelos de obtención del verbascósido a partir de cultivos meristemáticos de *B. davidii*, generando acil-verbascósido, el cual es menos hidrofílico y más estable en mezclas de agua y aceite que el verbascósido, manteniendo las propiedades antioxidantes y fotoprotectoras (Nichols y Katiyar, 2010; Vertuani et al., 2011).

Los resultados de este trabajo sugieren que la piel de los ratones SKH-1 es más permeable a este tipo de compuestos que la piel de cerdo y concuerdan con lo reportado por Thitilertdecha et al., 2014 que propone el uso de diversas sustancias polifenólicas (entre ellas el verbascósido) como activos potenciales para la

optimización de las formulaciones de administración tópica. Sin embargo, los autores aclaran que la biodisponibilidad de estos compuestos se puede ver disminuida cuando se ocupan de forma individual y no como parte de un extracto, o bien cuando se encuentran en un compuesto farmacéutico, ya que éste puede interactuar para reducir su penetración transdérmica. En otro estudio realizado por el mismo investigador en 2015, se utilizaron diversos compuestos polifenólicos para monitorear y comparar el rendimiento de penetración en dos diferentes formulaciones (crema y loción) y se determinó que el verbascósido no es liberado y no presenta gran penetración transdérmica, aunque se propone que su actividad se lleva a cabo a nivel de estrato córneo como molécula que interactúa directamente con la RUV.

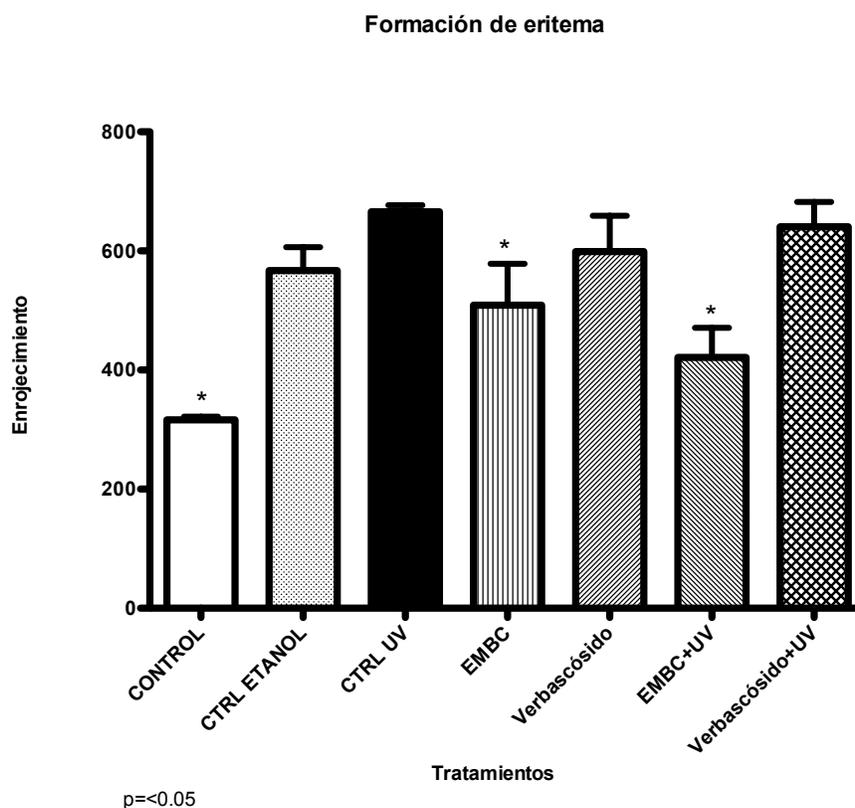
Marti-Mestres et al., 2007 llevaron a cabo un estudio de penetración transdérmica de tres compuestos: ácido clorogénico, ácido cafeico y oraposido y concluyeron que el uso de potenciadores de penetración (como las formulaciones a base de propilen glicol y dietil glicol) no aumentó de forma significativa la penetración percutánea. Mencionan que la penetración del verbascósido es sumamente baja ( $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) aun utilizando alguno de los potenciadores mencionados. Ellos proponen que la efectividad del verbascósido se presenta a nivel de la membrana de las células que conforman la epidermis, y esto puede estar relacionado con su actividad fotoprotectora y antioxidante, ya que actúa directamente como cromóforo a la RUV.

### **8.3.2 Experimento agudo de fotoprotección con ratones SKH-1.**

#### **8.3.2.1 Evaluación de la presencia de eritema.**

La presencia de eritema se evaluó antes de iniciar el experimento agudo y 24 horas después de aplicados los diferentes tratamientos y la RUV, debido a que el eritema alcanza su pico máximo de expresión 24 horas después del estímulo. Se midió el enrojecimiento en la zona dorsal de los ratones utilizando el analizador de color/Lutron, RGB-1002. Los valores se expresaron como enrojecimiento para cada tratamiento (Trujillo et al., 1996).

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 39, donde se observa que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos. Sin embargo, los ratones tratados con el EMBC y que fueron expuestos a la RUV, tuvieron los valores más bajos de enrojecimiento. El enrojecimiento o eritema se da por la congestión de vasos sanguíneos debido a la exposición de un agente tóxico, en este caso la RUV o el propio compuesto, que debido a que es rico en polifenoles puede generar fotoirritación sin aumentar los daños producidos por la RUV (Yamamoto et al., 2004). Al mismo tiempo, las sustancias presentes en el EMBC tienen un efecto fotoprotector, y pueden ser las responsables de la palidez presente en ese grupo, al evitar la interacción directa de la RUV con la piel de los ratones.



**Figura 39. Valores colorimétricos relacionados con eritema en ratones SKH-1 tratados con el EMBC y/o verbascósido, así como los controles.**

### **8.3.2.2 Análisis histológico del experimento agudo**

Los daños reportados por exposición a RUV de forma aguda y que fueron evaluados en este trabajo se enlistan en la tabla 11 de la estrategia metodológica. Los resultados más representativos de este experimento se muestran en las figuras 40 a 48.

A pesar de estas anomalías, este modelo es el más utilizado en los estudios para determinar los cambios histológicos por acción de la RUV, tanto de forma aguda como crónica, ya que genera respuestas eritema-edema y desarrollo de tumores similares a los humanos (Kim et al., 2003; Sharma et al 2011) (Fig. 40).

La tabla 22 presenta el total de muestras histológicas que se procesaron para el ensayo agudo. Por cada muestra se realizaron tres tinciones (Hematoxilina y eosina, tricrómica de Mason y PAS) y de cada una, un mínimo de tres laminillas con tres cortes cada una.

Los cortes histológicos se dividieron en campos de observación, los cuales variaron de 6 a 10, dependiendo el largo del corte. De cada laminilla se revisó un mínimo de 3 cortes histológicos y se determinaron los daños causados por la irradiación aguda con luz ultravioleta (Kochevar et al., 2013; McGregor y Hawk, 2001), (Tabla 11 y 12) (Figs. 41 a 48). Los resultados se evaluaron tomando el nivel de daño presentado por grado (leve, medio y severo) y extensión (focal, multifocal y difuso). Estas observaciones se colocaron en tablas que posteriormente fueron analizadas estadísticamente con la prueba t de student, con un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ . La figura 41 presenta los valores obtenidos con el análisis estadístico.

Para corroborar la presencia de edema se realizó la observación en las laminillas con la tinción tricrómica de Masson para identificar con mayor claridad las fibras de colágeno. En los casos en que hubo dudas sobre la integridad de la unión dermoepidérmica, se realizaron observaciones en las laminillas con tinción de PAS.

Todas las observaciones fueron corroboradas y analizadas con ayuda del Biol. José del Carmen Benítez Flores en el laboratorio de Histología de la unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala, UNAM.

**Tabla 22. Tratamientos del ensayo agudo y número de muestras obtenidas para el estudio histológico.**

Tratamiento	Número de muestras histológicas por ratón	Número de muestras histológicas por tratamineto	Número de laminillas por ratón	Número de laminillas por tratamiento
Testigo	1	5	3	15
C-	1	5	3	15
C+	1	5	3	15
Verbascósido	1	5	3	15
Verbascósido+UV	1	5	3	15
EMBC	1	5	3	15
EMBC+UV	1	5	3	15
Total	7	35	21	105



Ratón previo al experimento



Medición de enrojecimiento

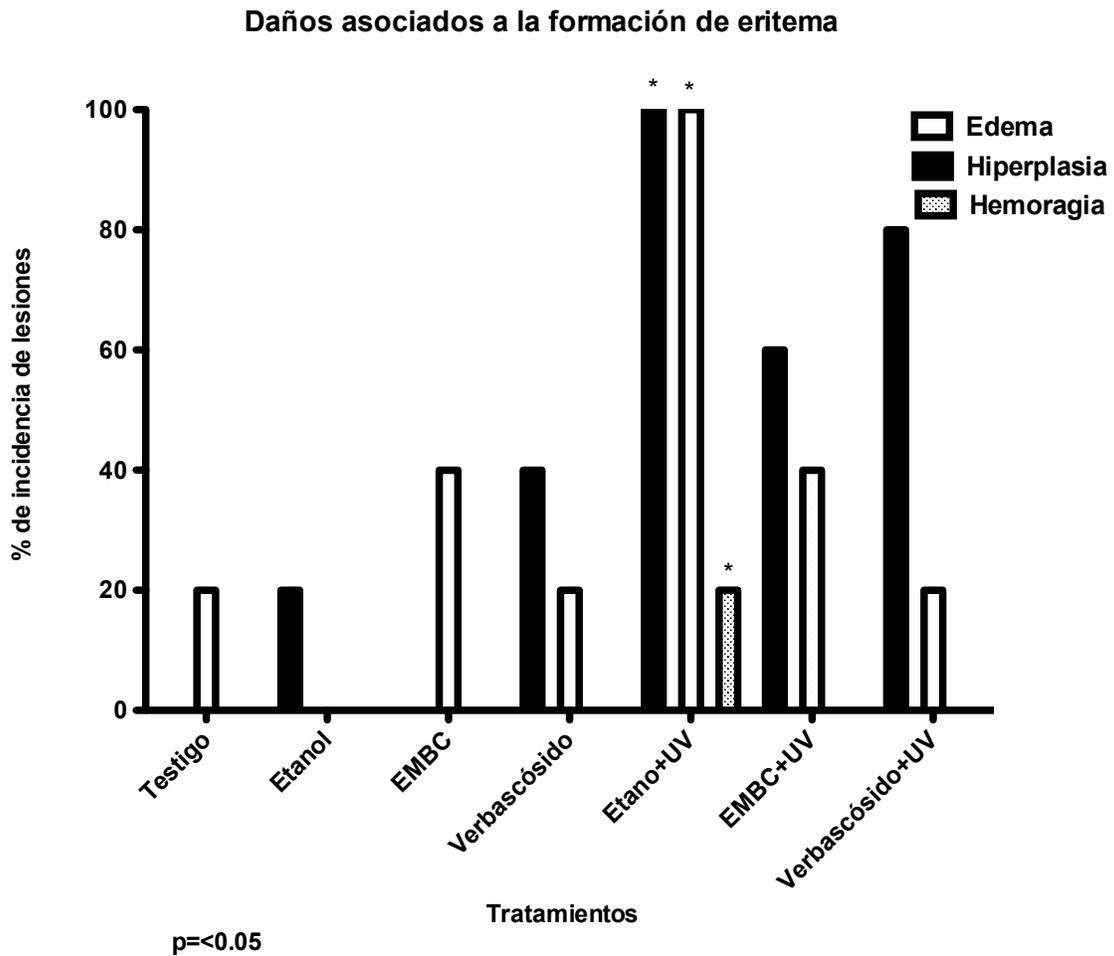


Formación de eritema



Sacrificio y toma de muestras 24 h después de la exposición a RUV  
**Figura 40. Vista general de los ratones SKH-1 durante el experimento agudo.**

Debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control, control negativo y experimental con EMBC y verbascósido sin irradiar, estos diagnósticos se describen y analizan en conjunto (Fig. 41).



**Figura 41. Gráfica de daños asociados a la formación de eritema obtenidos en el experimento agudo.**

### **a) Grupos sin irradiar: T, C-, EMBC y V**

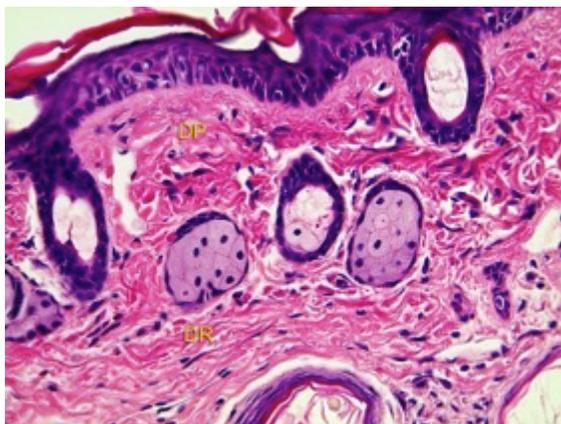
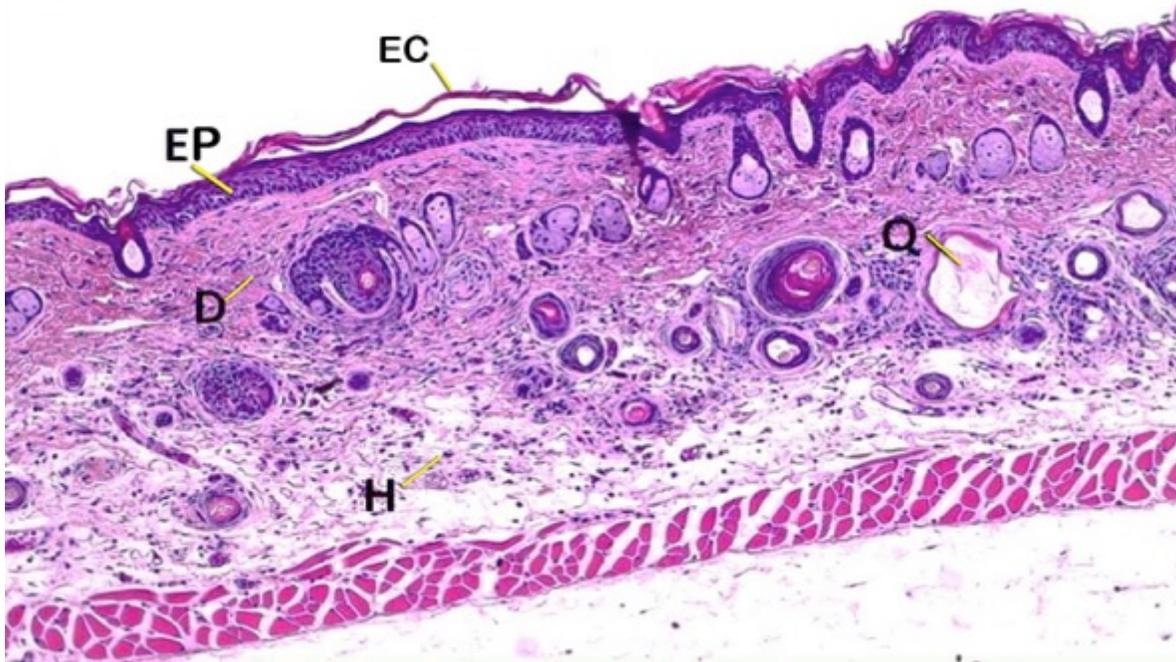
En la figura 41 puede verse el porcentaje de daños asociados a la formación de eritema que se observaron en los cortes histológicos de este experimento. Las figuras 42 a 45 corresponden a cortes histológicos de los grupos controles sin irradiación (T, C-, EMBC y V), los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas y se consideraron como tejido normal para la cepa de ratones SKH-1 ( $p \geq 0.05$ ) (Fig. 41). Se observaron características similares en el estrato córneo, epidermis y dermis. Estas capas son marcadas y de fácil diferenciación. El estrato córneo presentó características normales, según lo descrito para estos ratones. La epidermis presentó de 3 a 8 capas de células, dependiendo de la zona de corte y observación. La espongiosis e hiperplasia fueron focales y leves en una sola muestra, y según lo reportado por Crew y Mirskaia en 1931, se debe a dermatitis causada por las alteraciones genéticas de estos ratones y por la manipulación. La presencia de células apoptóticas (células de quemadura) fue focal y leve, debido a que en la piel unas pocas células se someten a muerte celular de forma constante o bien a procesos de diferenciación distribuidos a lo largo del epitelio (Lee et al., 2003). En algunas zonas la epidermis se encuentra adelgazada, lo cual se catalogó como atrofia leve focal y sólo se presentó en uno de los organismos.

En la dermis la presencia de fibroblastos y fibras de colágena fue de apariencia normal. La hipertrofia e hiperplasia fue focal y leve. La atrofia correspondió a las zonas alrededor de los folículos pilosos, debido al proceso de degeneración que sufren por la mutación de estos ratones. La presencia de quistes se debe a la degeneración de las glándulas sebáceas y los propios folículos asociados a ellas. Los grupos C-, EMBC y V tuvieron un aumento no estadísticamente significativo con relación al grupo T en la presencia de vasos sanguíneos congestionados y edema ( $p \geq 0.05$ ) (Fig. 41) ya que, aunque el etanol es ampliamente utilizado como vehículo y aplicado tópicamente, es un eficaz potenciador de la penetración transdérmica. Su uso de forma aguda o crónica puede inducir la apoptosis y la activación de algunas vías de reparación celular debido al metabolismo realizado

por la célula para su eliminación (Neuman et al., 2010; Das y Vasudevan, 2007; Crew y Mirskaia, 1931; Montagna et al., 1952; Brand y Jendrzewski, 2008)

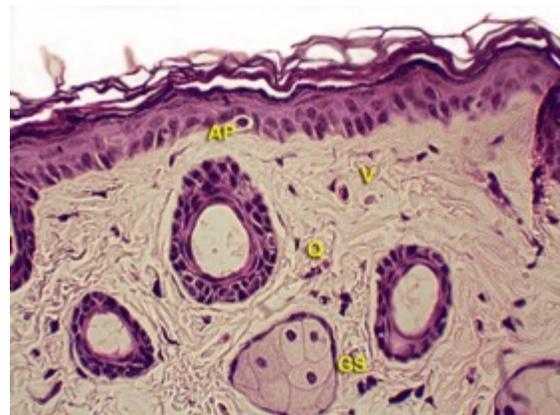
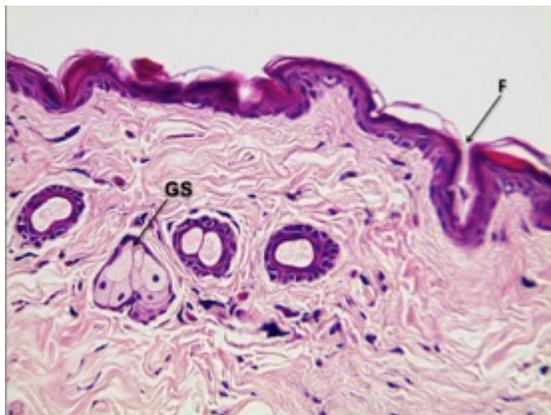
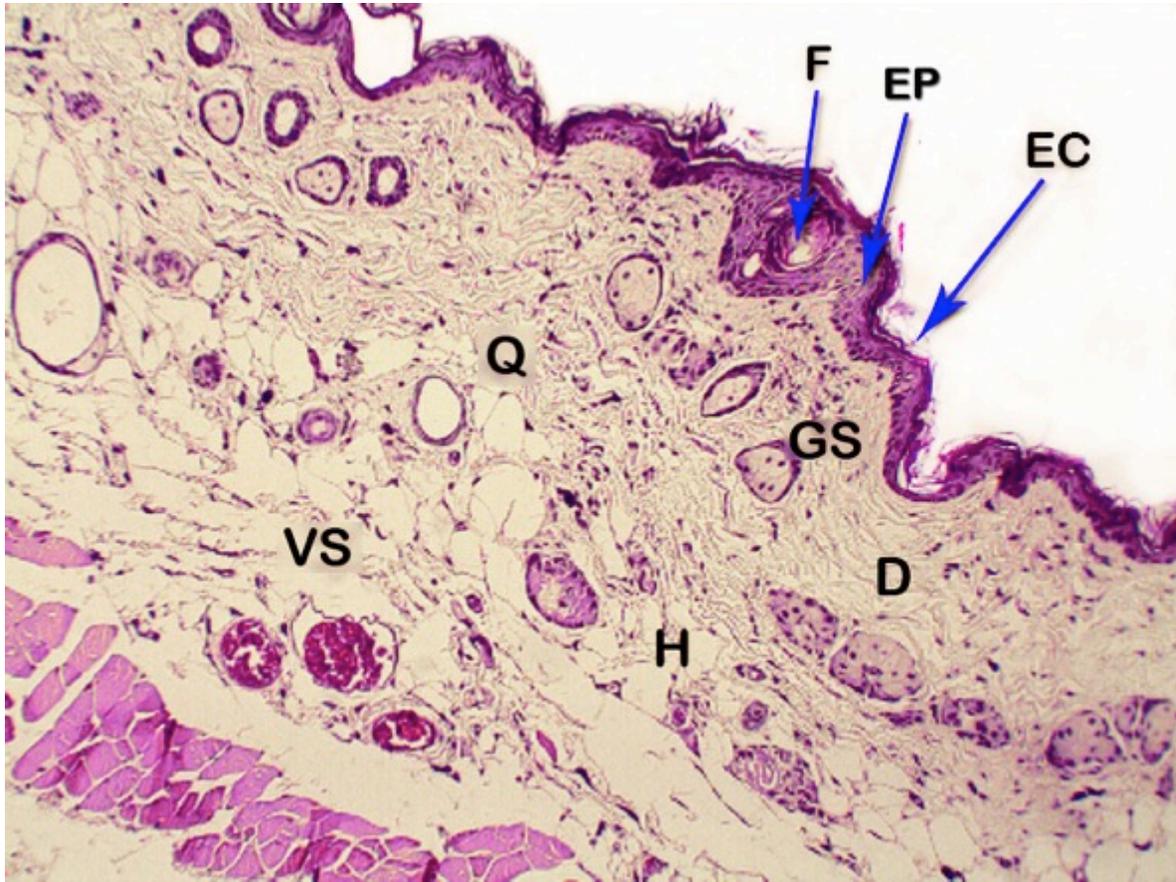
La aplicación o ingesta de etanol genera cambios en el flujo sanguíneo por vasodilatación y produce peroxidación lipídica, ocasionando daños y alteraciones a nivel de membrana, citoesqueleto y ADN (Brand y Jendrzewski, 2008 y Neuman, 2002). En trabajos anteriores, en los que se evaluó el extracto metanólico de *B. scordioides* para determinar el efecto fotoprotector en cobayos, se encontraron alteraciones de este tipo, relacionadas con el vehículo (Avila et al., 2005). En ambos casos, estas alteraciones no afectaron de forma sistémica a los ratones. Se ha reportado en fibroblastos murinos y cultivos de células humanas tratadas con etanol un aumento en la liberación de citocinas proinflamatorias, encontrando que aun a bajas dosis, el etanol causa daños a nivel celular, histológico o molecular, debido al incremento de la apoptosis (Brand y Jendrzewski, 2008; Neuman et al., 2010; Avila et al., 2005).

El grupo al que se aplicó verbascósido o EMBC tuvo un ligero incremento en la frecuencia de hipertrofia e hiperplasia (Fig. 44 y 45), que tiene una relación directa con la actividad biológica de los compuestos fenólicos. Estos pueden ser afines con los lípidos de membrana y traer como consecuencia un cambio asociado a membrana y funcionalidad de la misma, generando los daños antes mencionados (Yang et al., 2001). El estrato córneo es la primera barrera de protección en la piel, y un cambio o pérdida en la conformación de los lípidos de membrana puede ocasionar desórdenes en la función celular. Por lo tanto, el verbascósido y el EMBC, al ser aplicados de forma tópica, pueden generar cambios a nivel de membrana que llevarán a la alteración de diversos procesos celulares como hiperplasia, que es un mecanismo de defensa primario (Scheuplein y Blank, 1971; Lee et al., 2003; El-Abaseri et al., 2006).



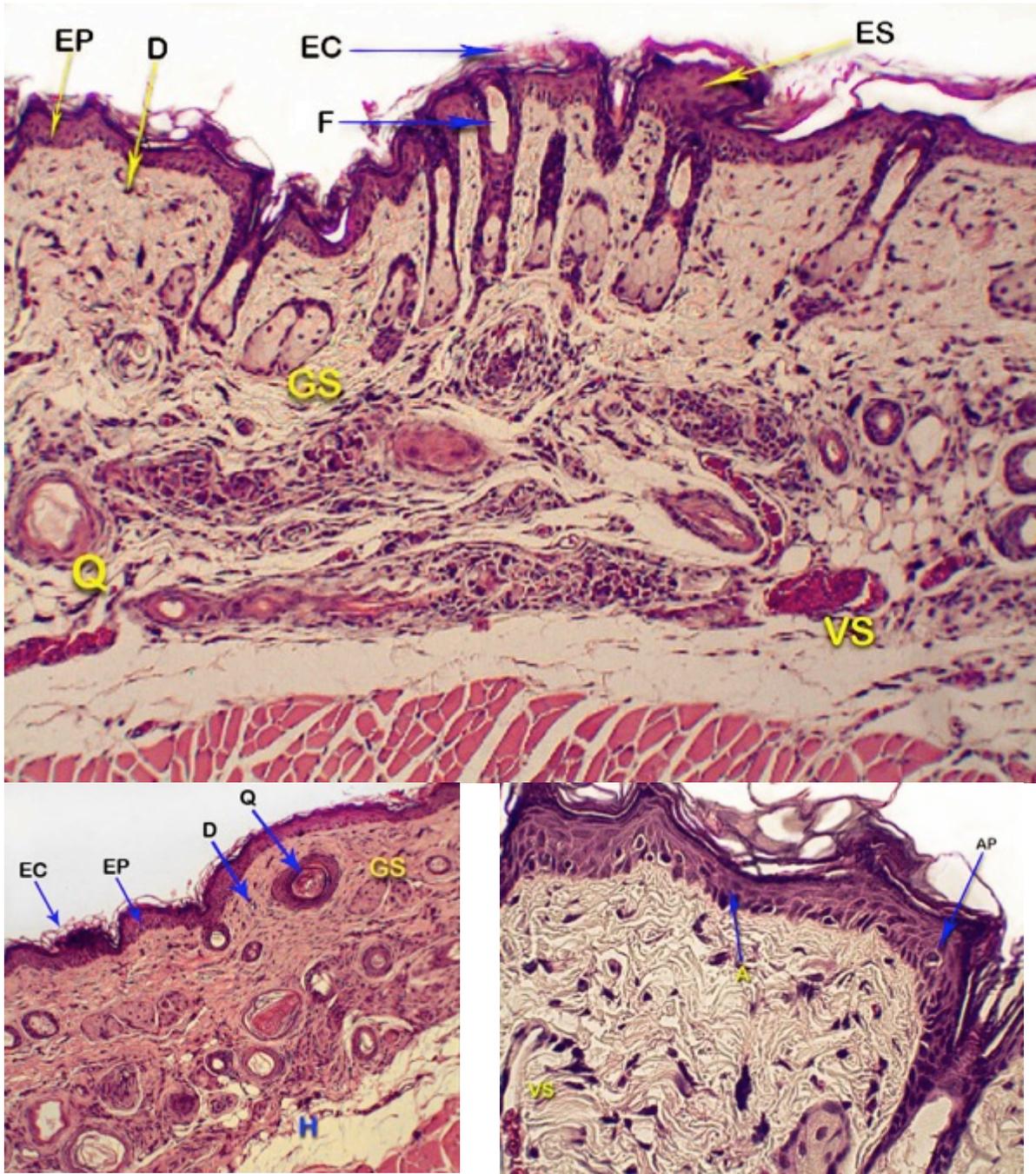
**Figura 42. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Testigo. Sin ningún tratamiento.**

AP: células apoptóticas; Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; F: folículo; H: hipodermis; EC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; VS: vaso sanguíneo. Tinción H y E, Aumento: panel a 100X, panel b y c 400X.

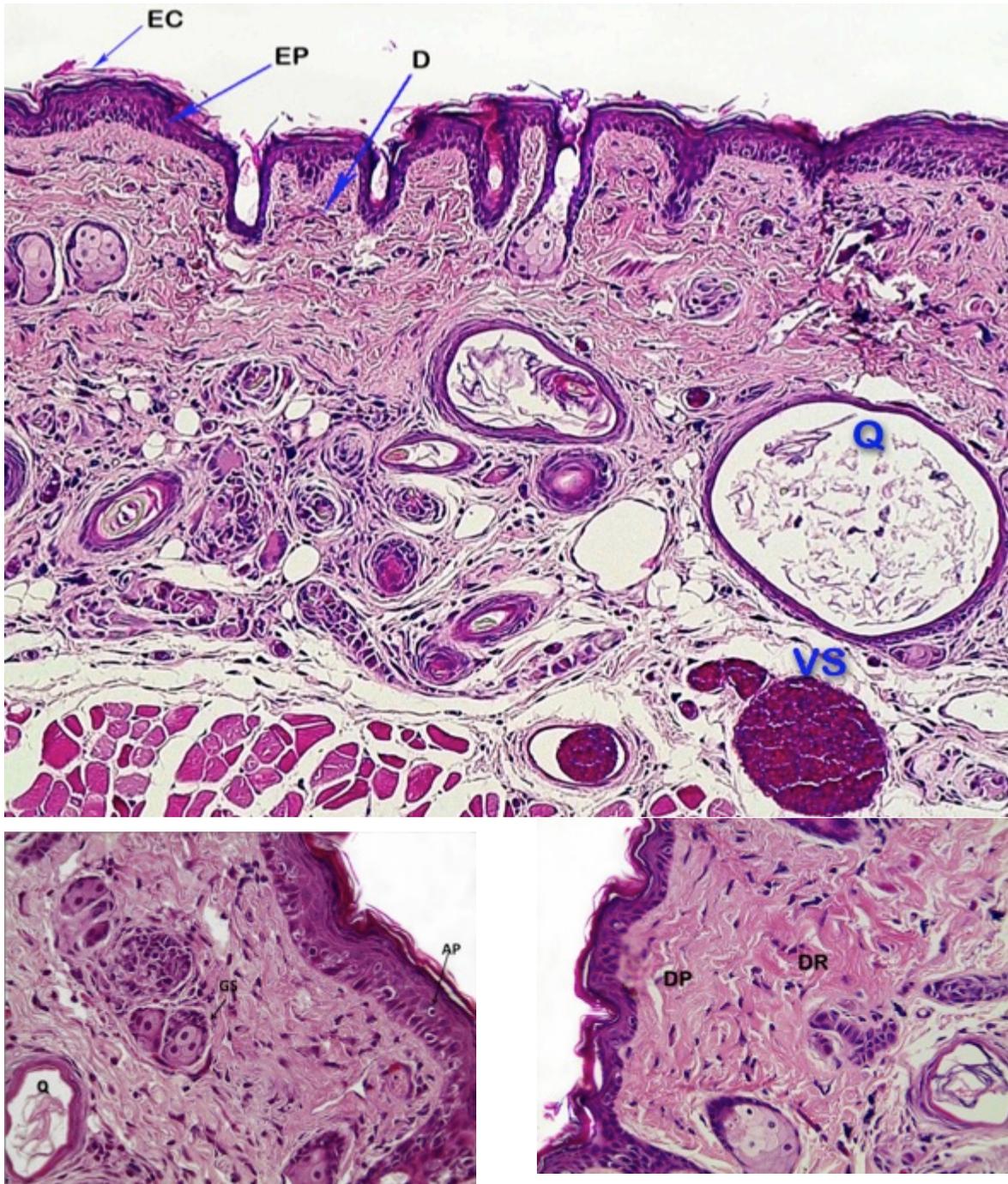


**Figura 43. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Grupo control. Etanol**

AP: células apoptóticas; Q: quiste; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; F: folículo; H: hipodermis; SC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; VS: vaso sanguíneo. Tinción H y E, Aumento: panel a 100X, panel b y c 400X.



**Figura 44. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. EMBC.** A: Atrofia; AP: células apoptóticas; Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; F: folículo; H: hipodermis; EC: estrato córneo; ES: espongiosis; GS: glándula sebácea; VS: vaso sanguíneo. Tinción H y E, Aumento: panel a y b 100X, panel c 400X.



**Figura. 45 Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Verbascósido.** AP: células apoptóticas; Q: quiste; D: dermis; DP: dermis papilar; DR: dermis reticular; EP: epidermis; F: folículo; EC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; VS: vaso sanguíneo. Tinción H y E, Aumento: panel a 100X, panel b y c 400X.

## **b) Grupos irradiados: C+. Sin protección.**

El C+ tuvo el mayor número de daños a nivel histológico, los cuales fueron estadísticamente significativos en relación con los demás grupos evaluados en este trabajo ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 41 y 46).

El estrato córneo presentó hiperqueratosis. También se observaron zonas focales con paraqueratosis, donde los restos nucleares son consecuencia de una anomalía en la maduración de los queratinocitos que puede deberse al aumento de la actividad mitótica asociada con la exposición a RUV (Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Stevens et al., 2003).

En la epidermis se observó un aumento estadísticamente significativo en las células de quemadura (apoptóticas), hiperplasia, hipertrofia, atrofia, espongirosis y necrosis ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 38 y 39). Todos estos daños se presentaron de forma multifocal y fueron ocasionados directamente por la acción de la RUV (Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Tedesco et al., 1997; Kim et al., 2003; Lee et al., 2003). La epidermis presenta reducción en el número de capas celulares, que se catalogó como atrofia, siendo un promedio de 5 capas de células epidérmicas las que se presentaron.

La hiperplasia es el resultado inmediato y adaptativo de la piel a la exposición a la RUV y desempeña un papel importante en la fotoprotección al aumentar la actividad mitótica como primer mecanismo de defensa y de reemplazo de células muertas (Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Lee et al., 2003; Walker et al., 2005; Kochevar et al., 2013; El-Abaseri et al., 2006; Robbins et al., 2008).

Aunque los mecanismos de aumento de la actividad mitótica e hiperplasia no están bien establecidos, existen diversos mediadores inflamatorios inducidos por la RUV, como el factor de transformación de crecimiento (TGF), que puede inducir la proliferación de queratinocitos (Tedesco et al., 1997; Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Walker et al., 2005; McGregor y Hawk, 2001; Petrova et al., 2011). Además, se ha documentado una relación directa entre la presencia de células apoptóticas inducidas por RUV e hiperplasia. Esta relación es mediada molecularmente por la vía p53/p21/E2F-1/bax que hace que las células muertas se

sustituyan por células hiperproliferativas, dando como resultado hiperplasia epidérmica tal y como se observó en este grupo (Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Lee et al., 2003). La presencia de papilas en dos de las muestras también puede ser el resultado de la hiperplasia debido al reacomodo de las células de la piel.

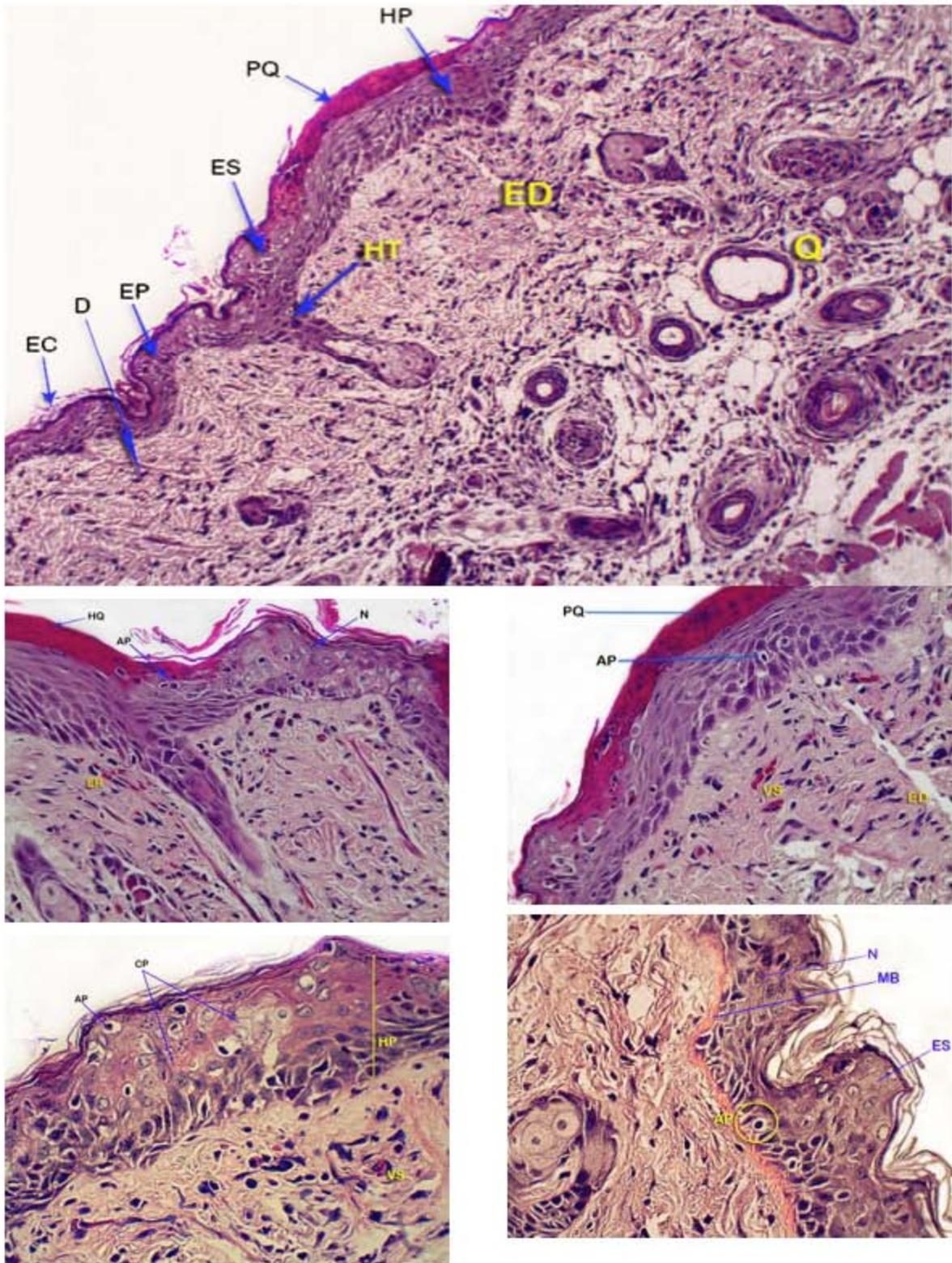
La atrofia celular también se considera una respuesta ante la muerte celular (Robbins et al., 2008), por lo que en términos generales este grupo presentó una epidermis irregular en el número de capas celulares, que concuerda con lo reportado por Elder et al., en 1997, como daño ocasionado por agentes físicos como la RUV.

Los trastornos observados a nivel celular coinciden con otros reportes que indican que de 24 a 48 h después de la exposición a la RUV existe aumento en el número de células de quemadura que presentan características apoptóticas, núcleos picnóticos y contraídos, citoplasma claro o rosado y el aumento de hiperplasia (Fig. 46), sugiriendo que su presencia se debe a la reparación del ADN mediada por la expresión de la proteína P53, de la cual está ampliamente documentado que aumenta su concentración después de la exposición a la RUV, activando el arresto del ciclo celular o induciendo la apoptosis cuando el ADN no puede ser reparado (Maverakis et al., 2010; Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Vink y Roza, 2001; Lee et al., 2003; Roos y Kaina, 2013; Benjamin y Ananthaswamy, 2007).

El papel de supresor de tumores de p53 se presenta siempre y cuando no se encuentre mutado para que se lleve a cabo la adecuada expresión de su proteína (P53), que actuará como factor de transcripción de otras moléculas, por ejemplo, de p21, que participa activamente regulando y deteniendo el ciclo celular por inhibición del complejo ciclina cinasa en la fase G1. El factor de transcripción E2F es crucial en la activación de genes para la entrada a la fase S del ciclo celular y propiciar la síntesis de ADN. Por lo tanto, estas moléculas juegan un papel clave en la proliferación e inducción de la apoptosis celular al ser inhibidas o sobreexpresadas, y es un mecanismo que ayuda a eliminar células dañadas y no afectar la integridad del ADN (Lee et al., 2003).

En la dermis la congestión de vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio (neutrófilos) y el edema fueron los daños que se encontraron multifocalmente en el C+ (Fig 46). Estos daños se presentan juntos, ya que forman parte de la respuesta a un proceso inflamatorio que tiene su expresión máxima entre las 24 y 48 h posteriores a la exposición a RUV (Tedesco et al., 1997; Lee et al., 2003).

La permeabilidad vascular generada por el aumento en los niveles de histamina y óxido nítrico da lugar a la congestión de vasos sanguíneos y el derrame de líquido intersticial hacia la dermis, produciendo una alteración en la respuesta inmune y la migración de las células de Langerhans. Esto da como resultado un aumento en la concentración de histamina, TNF $\alpha$ , TGF e interleucinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6 e IL-8) asociadas a la presencia de neutrófilos, monocitos y mastocitos. Estos eventos moleculares se vieron reflejados histológicamente como edema epidérmico (espongiosis) y dérmico, debido a la separación de células epiteliales, principalmente del estrato espinoso, donde la acumulación de fluido entre las células provoca la aparición de brechas que forman vesículas intraepidérmicas llenas de líquido, y están asociadas a la peroxidación lipídica y fallas en la adhesión celular, que pueden derivar en daños en las fibras elásticas y una disminución en la concentración de colágeno y su posterior degradación. Por lo tanto, todos estos daños fueron catalogados como dermatitis aguda causada por efecto de la RUV (Tedesco et al., 1997; Matsumura y Ananthaswamy, 2004; Sharma et al., 2011; Petrova et al., 2011; Stevens et al., 2003; Cachon-González et al., 1994) (Fig. 46).



**Figura 46 . Cortes histológicos representativos del experimento agudo C+.**

AP: células apoptóticas; Q: quiste; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; ER: eritrocitos; ES: espongirosis; HQ: hiperqueratosis; HP: hiperplasia; N: Necrosis;

PQ: Paraqueratosis; EC: estrato córneo; MB: membrana basal; CP: células pleomórficas; VS: vaso sanguíneo. Panel a-d:tinción H y E, panel f: PAS. Aumento: panel a 100X, panel b-f 400X.

### **c) Grupo experimental: V+UV**

El grupo experimental (V+UV) presentó algunos daños por acción de la RUV, aunque fueron focales y al ser comparados estadísticamente con el C+ presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 41).

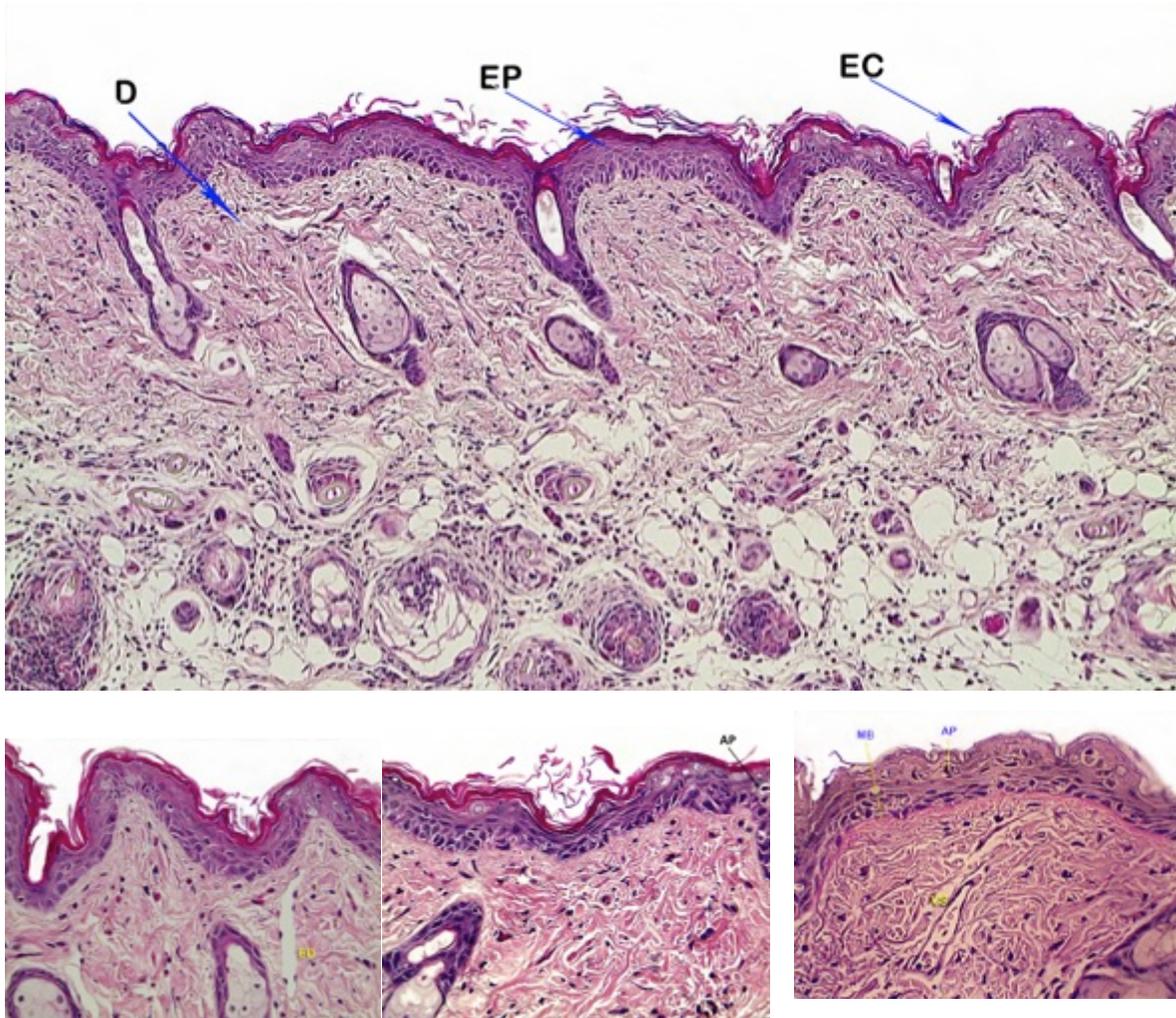
El grupo V+UV fue estadísticamente igual a los grupos C, -C y V ( $p \geq 0.05$ ) (Fig. 41). Los cortes histológicos más representativos de este grupo se observan en la figura 47.

El estrato córneo no presentó signos de atipia. En la epidermis el número de células apoptóticas, hiperplasia, hipertrofia y atrofia disminuyó en extensión y grado con relación al C+ (Fig. 41). En la dermis se presentó congestión de vasos sanguíneos de forma multifocal leve. Estos resultados sugieren una asociación directa con la función del verbascósido como fotoprotector y su interacción con las membranas biológicas (Alipieva et al., 2014; Funes et al., 2010) .

La afinidad con los lípidos de membrana de algunos compuestos fenólicos como el verbascósido, puede llevar a cambios asociados a la forma y funcionalidad de la estructura celular (Yang et al., 2001). Se ha evaluado el efecto antioxidante del verbascósido sobre los lípidos de membrana y su afinidad por aquellas cargadas negativamente, sobre todo compuestas de fosfatidil glicéridos. Esto promueve la separación de los dominios lipídicos y lleva a una perturbación, ya que a pesar de su carácter hidrofílico, el verbascósido ubica su parte cafeica en la zona hidrofóbica de las membranas quedando la parte etanoide de la estructura en la región superior, lo cual provoca un cambio conformacional que puede ser el responsable de la actividad antioxidante y fotoprotectora (Funes et al., 2010; Funes et al., 2009).

En este grupo (V+UV) la ausencia de eritema, edema e infiltrados inflamatorios en la dermis da un indicio de que el verbascósido actuó eficazmente, evitando un proceso inflamatorio y coincidiendo con lo reportado en diversos estudios que abordan a profundidad los mecanismos de acción de los polifenoles como

verbascósido, y su papel como antiinflamatorios (Adedapo et al., 2009; Esposito et al., 2010; Seo et al., 2013; Kurisu et al., 2013; Kostyuk et al., 2013; Alipieva et al., 2014; Petrova et al., 2011; Nichols y Katiyar, 2010; Bae et al., 2010; Afaq y Katiyar, 2011; Kostyuk et al., 2011).



**Figura 47. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. Verbascósido+UV.** AP: células apoptóticas; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; EC: estrato córneo; VS: vaso sanguíneo. Tinción H y E, Aumento: panel a 100X, panel b-f 400X.

#### **d) Grupo experimental: EMBC y UV**

El extracto metanólico de *B. cordata* aplicado tópicamente previo a la irradiación con UV fue el grupo que en términos generales tuvo menor daño de los grupos

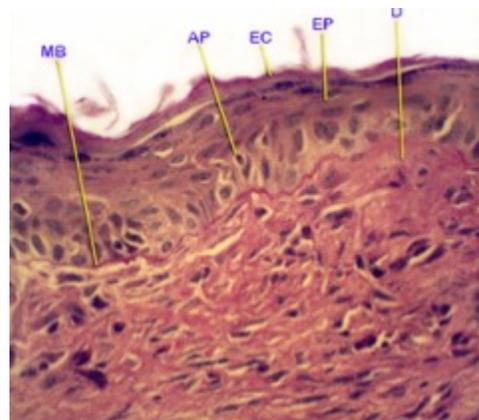
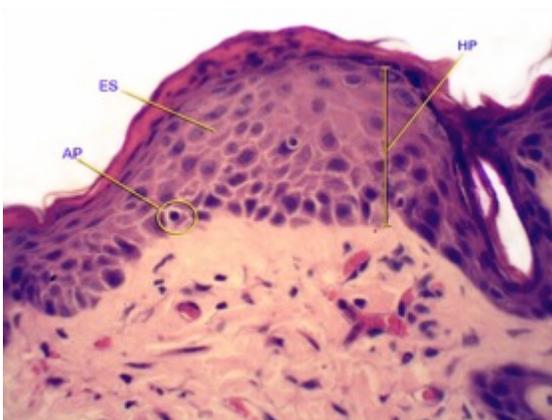
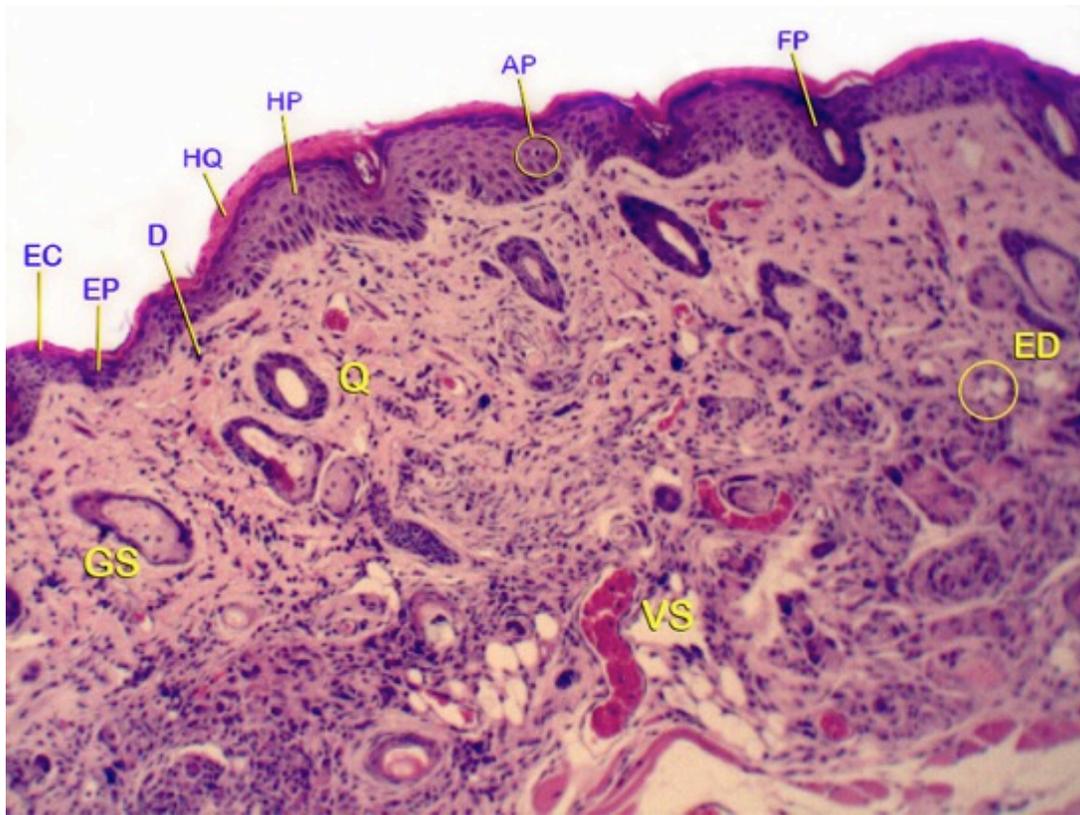
irradiados (Fig. 41). El estrato córneo tuvo apariencia normal. La epidermis presentó espongirosis, hiperplasia, hipertrofia y atrofia focal leve, características consideradas normales, atribuidas al vehículo y a la RUV. Se presentó apoptosis focal-leve, que es una característica normal de la piel del ratón. Por ello el EMBC, al presentar diversos componentes como el verbascósido y linarina, aumentó sus niveles de fotoprotección (Avila et al., 2005; Kochevar y Taylor, 2009 y 2013). La congestión de vasos sanguíneos fue persistente debido al proceso inflamatorio que ocurre como consecuencia de la RUV (Fig. 48).

Diversos estudios han reportado que los extractos metanólicos de diversas especies de *Buddleja* presentan efectos antioxidantes y fotoprotectores. Avila et al., en 2005, reportaron que el extracto metanólico de *B. scordioides* presentó una amplia fotoprotección en bacterias y cobayos, atribuyéndolo principalmente a la presencia de verbascósido en el extracto de *Buddleja* (Avila et al., 2005).

El extracto acuoso de hojas de *Buddleja globosa*, utilizado tradicionalmente en Chile para la cicatrización de heridas, se empleó para estimular el crecimiento de fibroblastos *in vitro* y la actividad antioxidante. Los resultados sugieren que a altas concentraciones el extracto permite un aumento en el crecimiento de fibroblastos, y mostró un efecto antioxidante relacionado con la presencia de dos derivados del ácido cafeico (Mensah, 2001).

Backhouse et al., 2008 estudiaron el extracto metanólico de *B globosa* para evaluar la actividad antiinflamatoria, analgésica y antioxidante, encontrando que el verbascósido y luteolina-7-O-glucósido fueron los componentes principales del extracto; y demostraron las propiedades analgésicas y antiinflamatorias del extracto.

Con estos antecedentes y las características de los componentes del EMBC como el verbascósido, linarina, siringina, entre otros, se puede concluir que este grupo fue el que presentó mayor fotoprotección en la piel de ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta B de forma aguda, debido posiblemente al efecto sinérgico que presentan sus componentes.



**Figura 48. Cortes histológicos representativos del experimento agudo. EMBC+UV.** AP: células apoptóticas; Q: quiste; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; F: folículo; HQ: hiperqueratosis; EC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; VS: vaso sanguíneo; MB: membrana basal; ES: espongiosis; HP: hiperplasia. Tinción panel a y b H y E, panel c: PAS. Aumento: panel a 100X, panel b y c 400X.

### 8.3.3 Análisis histológico del experimento de exposición crónica a la RUV.

Los daños reportados por exposición a RUV de forma crónica y que fueron evaluados en este trabajo se describen en las tablas 23 y 24. La incidencia y multiplicidad de tumores y/o lesiones se presentan en las figuras 54 y 55. Los resultados histológicos más representativos del ensayo crónico pueden verse en las figuras 49 a 59.

**Tabla 23. Correlación macroscópica y microscópica de las lesiones presentes en el ensayo crónico en todos los ratones SKH-1.**

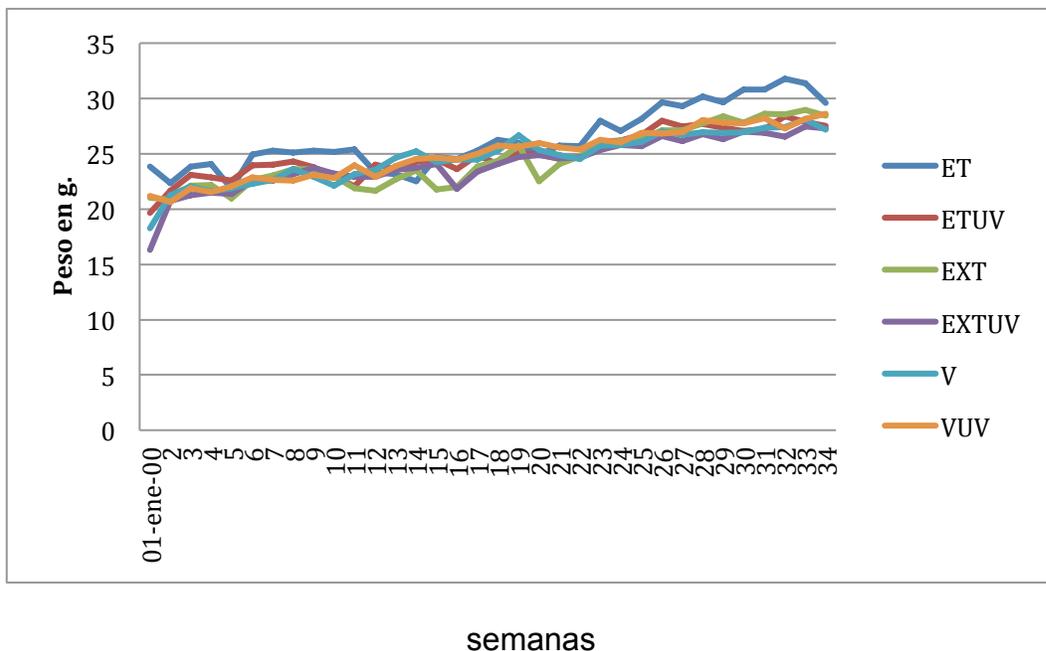
Grupos	Lesiones observadas al final del ensayo de forma macroscópica	Lesiones presentadas por tratamiento (sumatoria de todos los ratones n=5 por tratamiento)				
		Muestras evaluadas histológicamente	Sin lesión	Lesión inicial (Hiperplasia)	Lesión precancerosa (Queratosis actínica)	Carcinoma
T, C-, V, EMBC	0	40	40	0	0	0*
C+	15	15	1	5	4	5
V+UV	8	13	7	3	2	1*
EMBC+UV	6	11	7	2	1	1*

\*Grupos que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p \geq 0.05$ ). El C+ presentó diferencias estadísticamente significativas en relación con los demás tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Al igual que en el experimento crónico, los grupos control y experimental sin irradiación tuvieron características similares después de concluido el experimento, por lo que también se presentan de forma conjunta.

#### a) Grupos sin irradiar: T, C-, V y EMBC

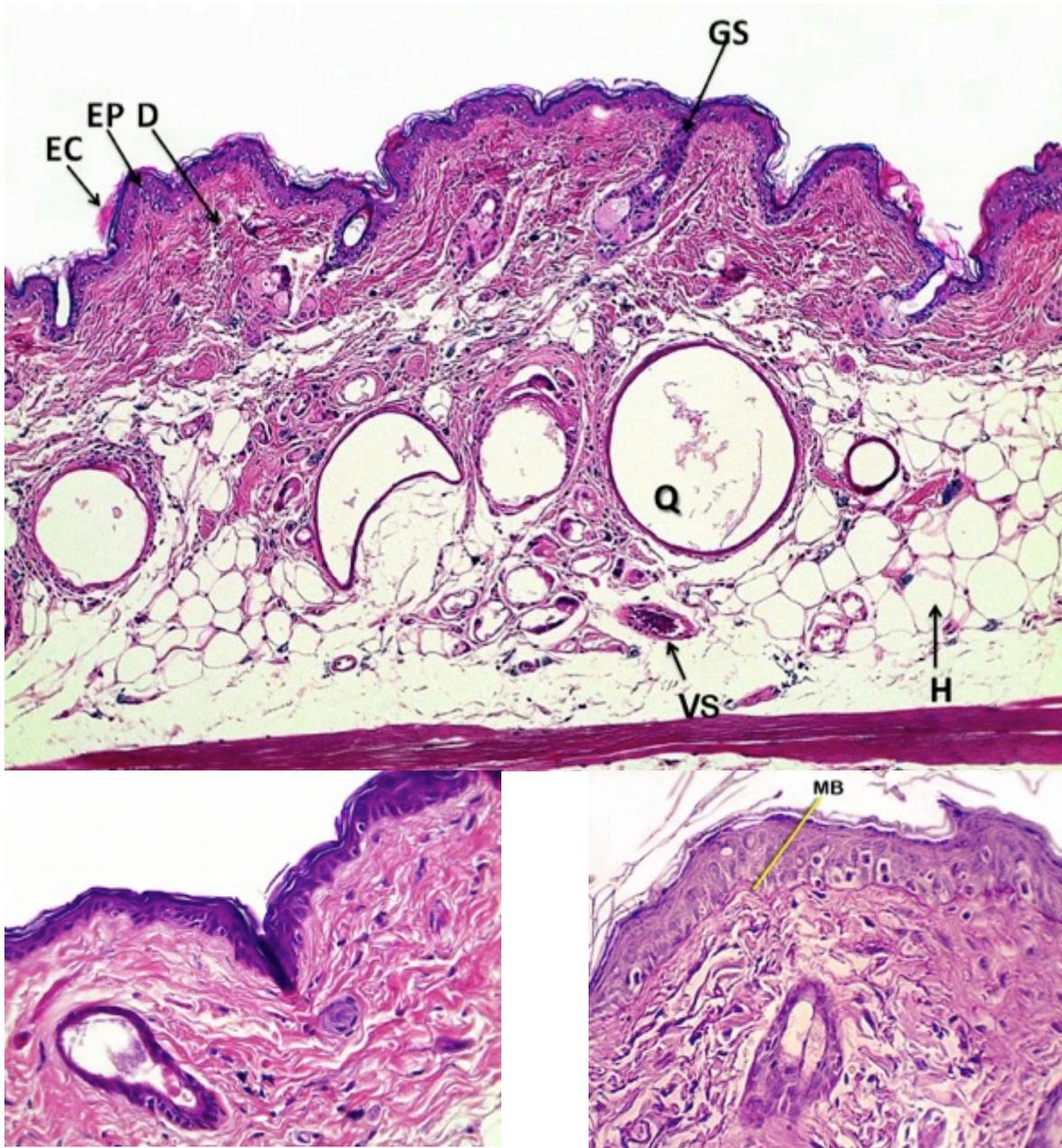
El peso de los ratones se registró semanalmente durante todo el experimento y no presentó diferencias estadísticamente significativas en los diferentes grupos por lo que se consideraron iguales y normales ( $p \geq 0.05$ ) (Fig. 49).



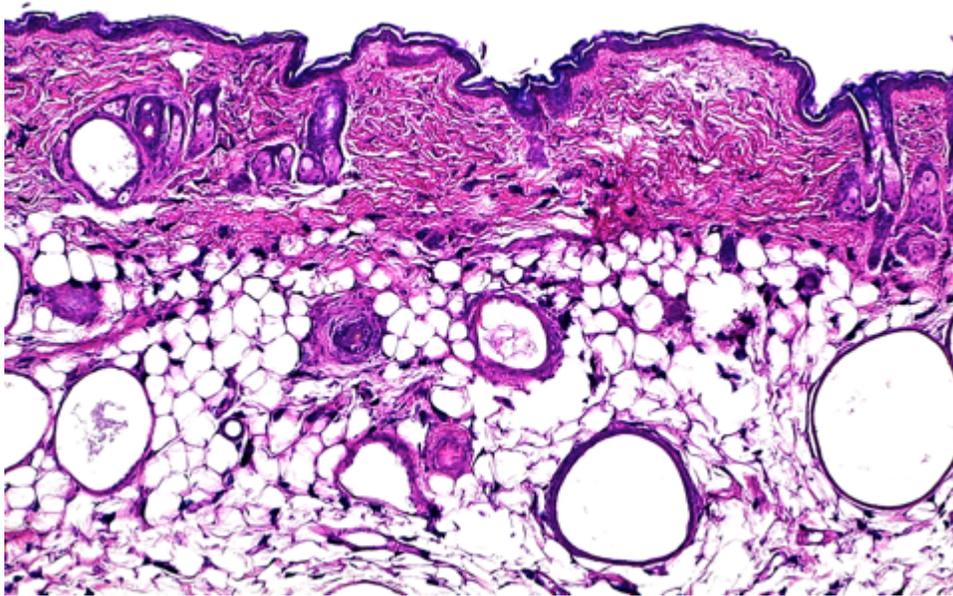
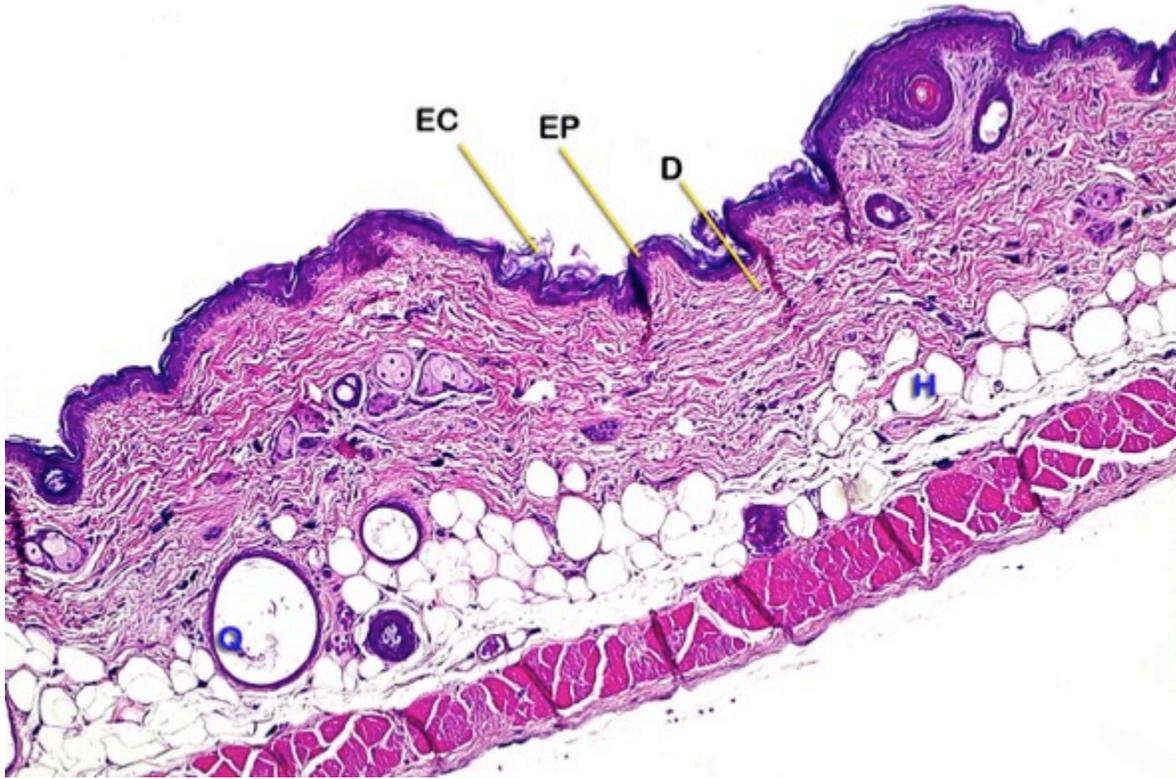
**Figura 49. Peso de los ratones durante el experimento crónico. ET: etanol, ETUV: etanol con radiación ultravioleta, EXT: extracto metanólico, EXTUV: extracto metanólico con radiación ultravioleta, V: verbascósido, VUV: verbascósido con radiación ultravioleta.**

La apariencia de la piel en los grupos con aplicaciones tópicas del vehículo EMBC o verbascósido y que no fueron expuestos a la RUV, concuerda con lo reportado y descrito anteriormente para estos ratones. La presencia de células apoptóticas en la epidermis y la congestión de vasos sanguíneos en la dermis fueron focales y leves. Como se mencionó, los resultados están asociados al vehículo utilizado y a la interacción del verbascósido con las membranas biológicas (Yang et al., 2001; Neuman et al., 2010; Das y Vasudevan, 2007). En la dermis, la presencia de fibroblastos, fibras elásticas y de colágena fue de apariencia normal sin encontrar edema en las muestras (Fig. 50).

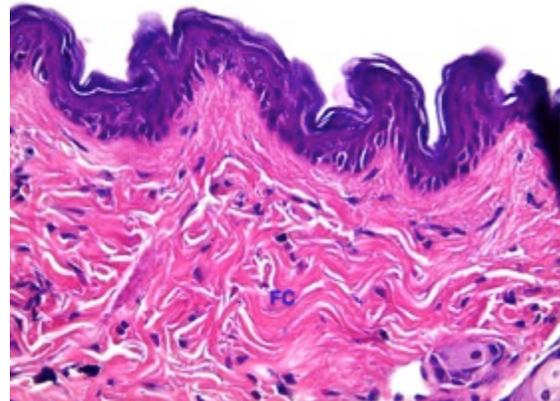
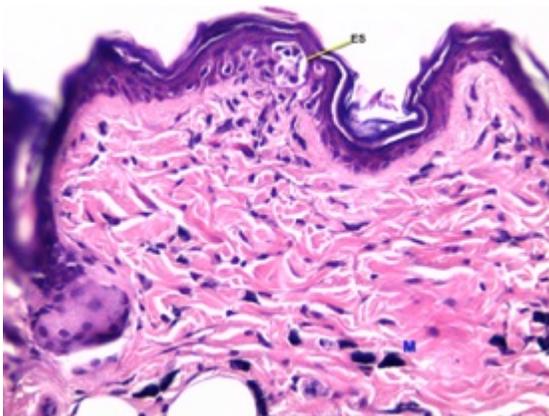
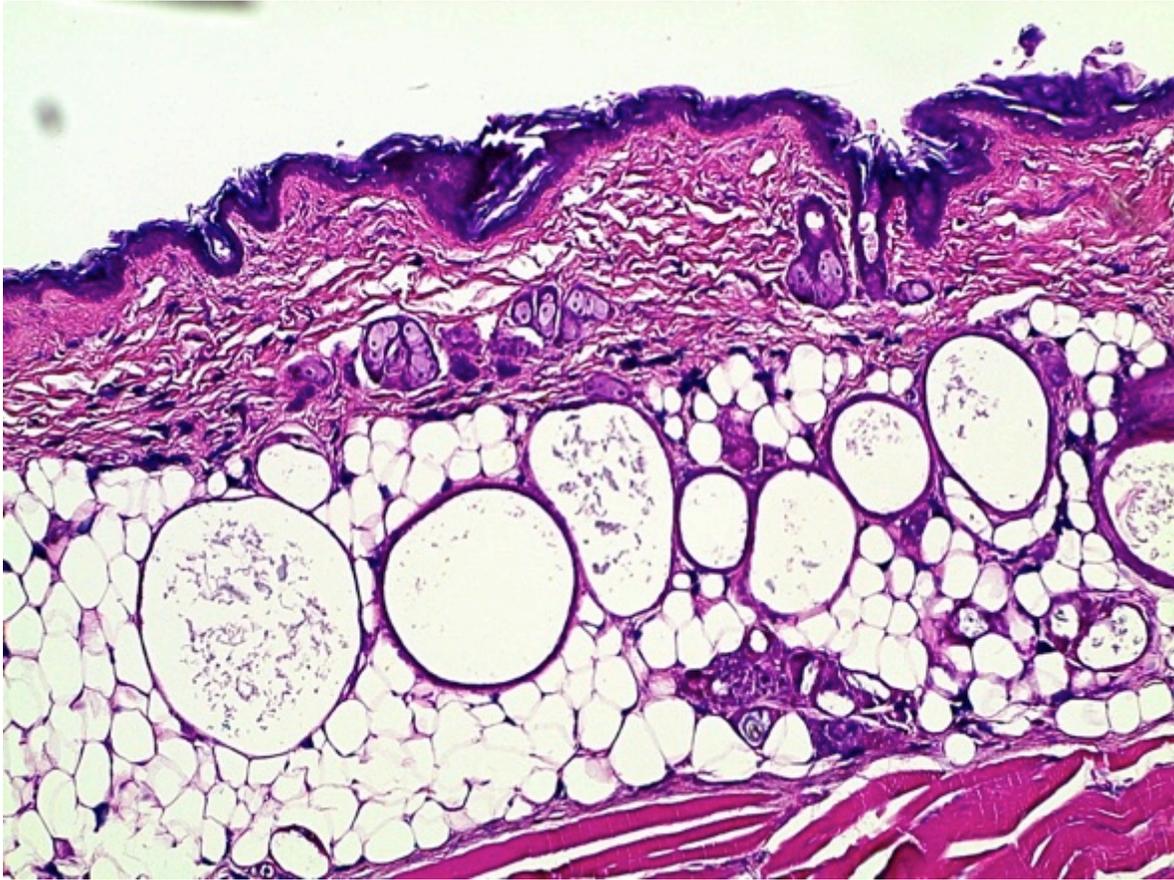
Los cambios asociados a la edad fueron el aumento de quistes dérmicos y la presencia de células con atrofia alrededor de las glándulas sebáceas y folículos pilosos, debido al proceso de degeneración de estas estructuras que sufren los ratones SKH-1 (Benavides et al., 2009) (Fig. 50).



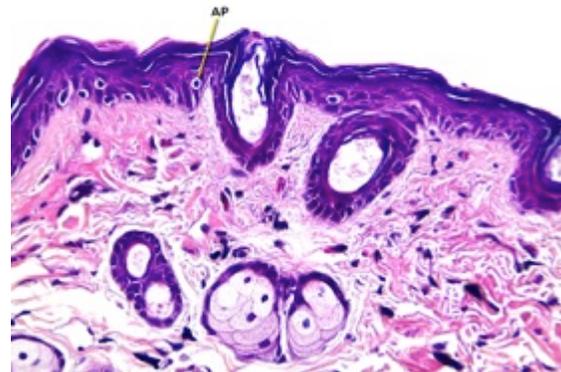
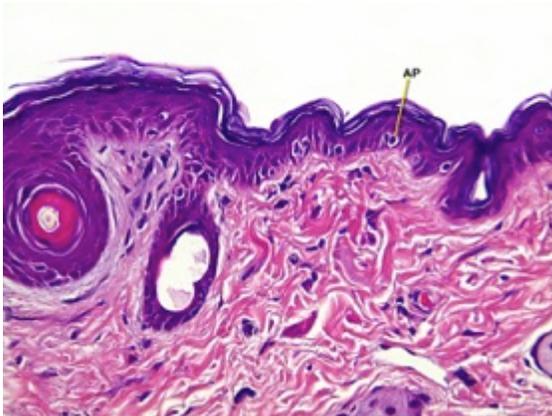
**Figura 50. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Testigo.** Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; H: hipodermis; EC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; VS: vaso sanguíneo; MB: membrana basal. Panel a y b Tinción H y E, panel c: PAS. Aumento: panel a 100X, panel b y c 400X



**Figura 51. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. C-. Etanol. Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; H: hipodermis; EC: estrato córneo; Tinción H y E. Aumento: 100X.**



**Figura 52. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo EMBC.** Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; F: folículo; H: hipodermis; EC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; AP: apoptosis; FC: fibras de colágena; ES: espongiosis; M: mastocitos. Tinción H y E, Aumento: panel a 100X, panel b y c 400X.

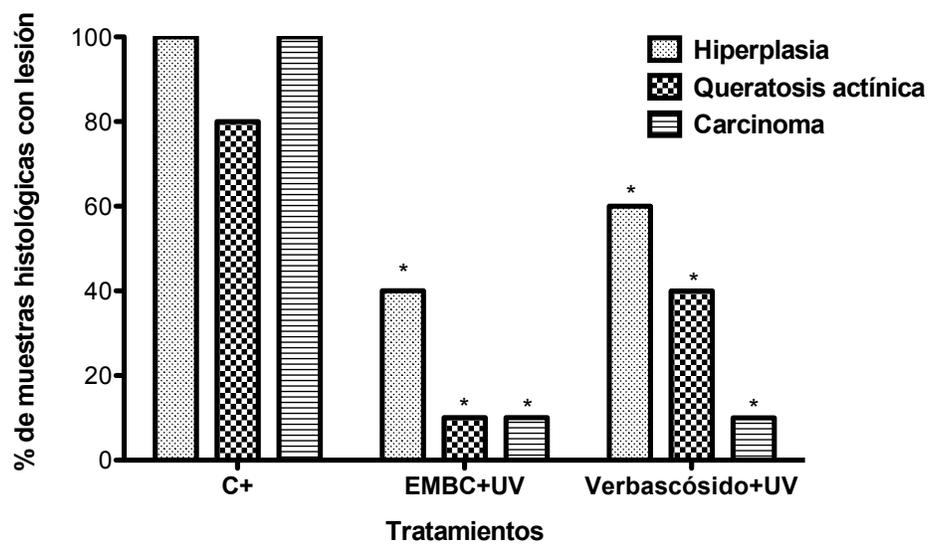


**Figura 53. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo Verbascósido.** Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; H: hipodermis; EC: estrato córneo; SG: glándula sebácea; V: vaso sanguíneo; AP: apoptosis; FC: fibras de colágena; ES: espongirosis; Tinción H y E, Aumento: panel a 100X, panel b y c 400X.

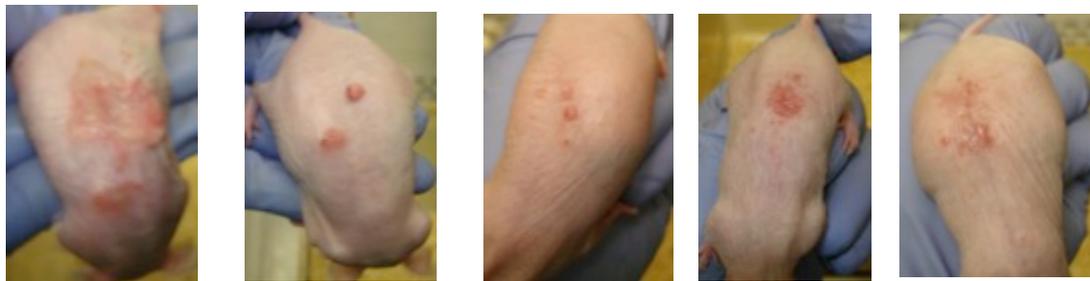
**b) Grupo irradiado sin protección: +C**

Este grupo presentó la mayor cantidad de daños y tumores ocasionados por la RUV, con valores estadísticamente significativos en relación con los grupos sin irradiar y experimentales ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 54 y 55).

**Lesiones experimento crónico**



$p < 0.05$



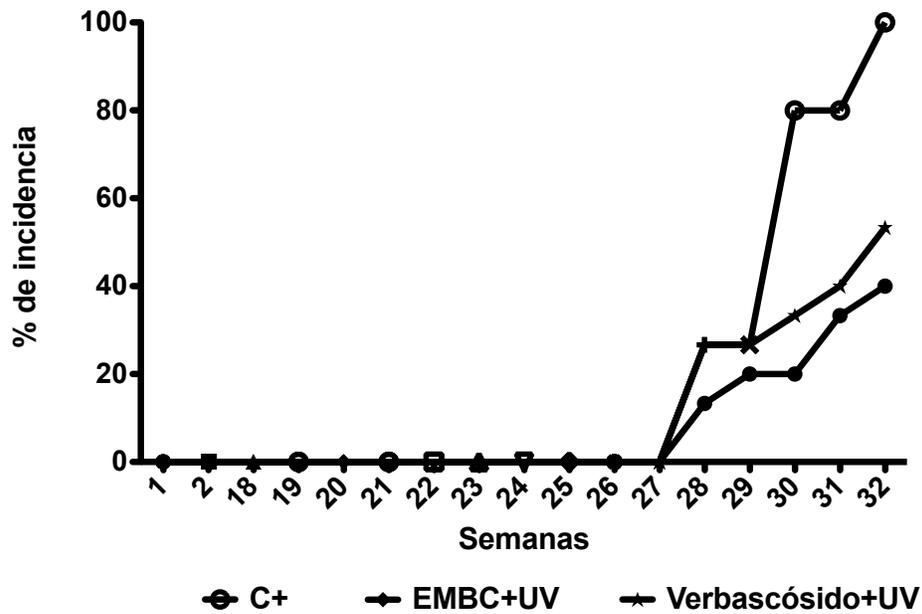
**Figura 54. Diagnóstico histológico de las lesiones observadas macroscópicamente. Los datos son el total de muestras con daño por tratamiento. Las imágenes muestran la progresión y diferentes tipos de lesiones que se presentaron en el C+ durante las 33 semanas de experimento. (\*  $p \leq 0.05$ ).**

Las lesiones fueron visibles a partir de la semana 28 después de iniciado el ensayo, las cuales se contabilizaron semanalmente (Wang et al., 1992) (Fig. 55). Terminado el experimento y con base en los conteos y observaciones histológicas, se llevó a cabo una correlación para determinar el número, tipo y grado de lesiones y/o tumores presentes en cada ratón según lo descrito en estudios anteriores (Hong et al., 2008; Kundoor et al., 2007; Mitchell et al., 2001; Gallagher et al., 1984; Wang et al., 1992; Makinen y Stenback, 1998; Rigel et al., 2006; Kambayashi et al., 2001; Katiyar et al., 1997) (Tabla 24).

**Tabla 24. Consideraciones histológicas para el diagnóstico del ensayo crónico.**

<b>Daño</b>	<b>Consideraciones</b>
<b>Hiperplasia</b>	Aumento en el grosor de la epidermis con grado moderado a grave y extensión multifocal o difuso. Presencia de espongiosis leve a moderada y extensión focal a multifocal.
<b>Queratosis Actínica</b>	La parte basal de la epidermis muestra atipia citológica, asociada con hiperplasia de las células basales o con atrofia. Elongaciones epidérmicas hacia la dermis sin pérdida de la integridad de la membrana basal. Estrato córneo engrosado y con núcleos (paraqueratosis). Grado leve a difuso y extensión focal a difusa.
<b>Carcinoma</b>	Presencia de células atípicas en todos los niveles de la epidermis, con amontonamiento y desorganización de los núcleos. Displasia escamosa amplia y ocupando todo el grosor del epitelio. Pérdida de la integridad de la membrana basal con invasión a la dermis. Zonas amplias de queratinización y formación de anillos de queratina. Necrosis y morfología celular atípica y variable. Formación de islotes de células basales en la dermis. In situ o invasivo. Presencia de restos celulares. Angiogénesis.

a)



b)

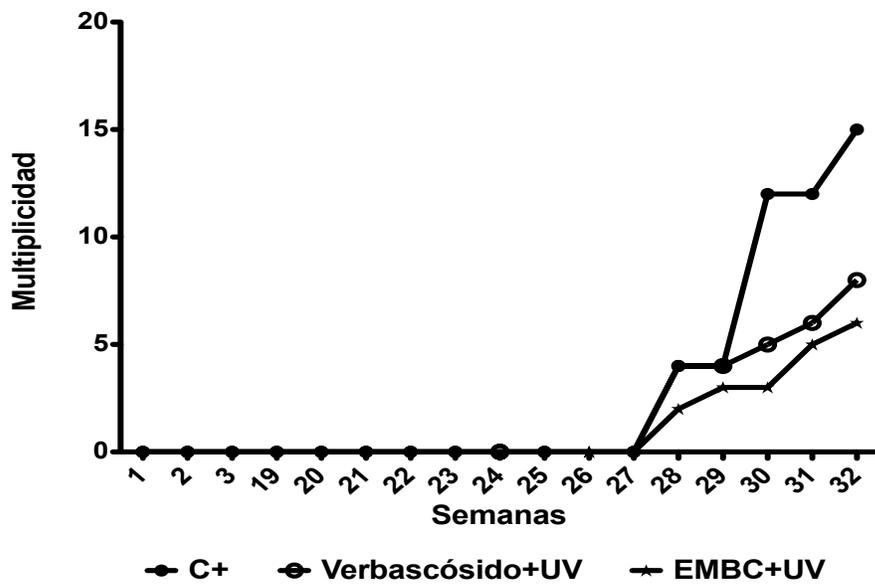


Figura 55. Incidencia y multiplicidad de tumores en la piel de ratones SKH-1 durante el ensayo crónico. Cada punto representa el número de tumores por

## **ratón.**

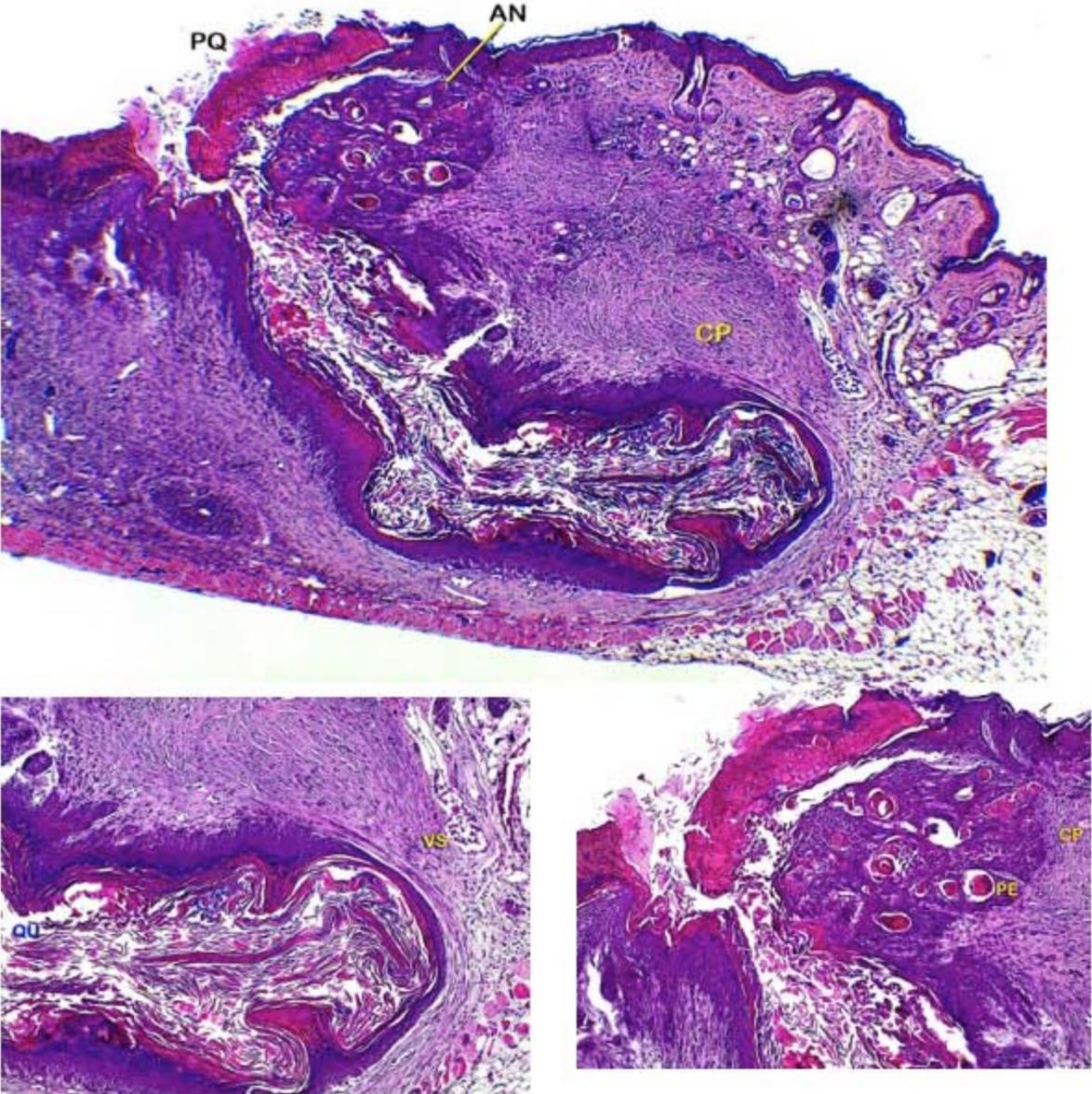
En este grupo se pudo observar todo el espectro de desarrollo neoplásico. El estrato córneo presentó hiperqueratosis y paraqueratosis; en la epidermis se observó hiperplasia, espongirosis, aumento en el número de células apoptóticas y presencia de células con necrosis. En la dermis se observó congestión de vasos sanguíneos, edema y presencia de infiltrados inflamatorios (neutrófilos y mastocitos). Los daños fueron de extensión multifocal-difusa y de grado moderado a grave, todos relacionados con un proceso de carcinogénesis (Wheater, 2003; Makinen y Stenback, 1998; Rigel et al., 2006; Robbins et al., 2008) (Fig. 56).

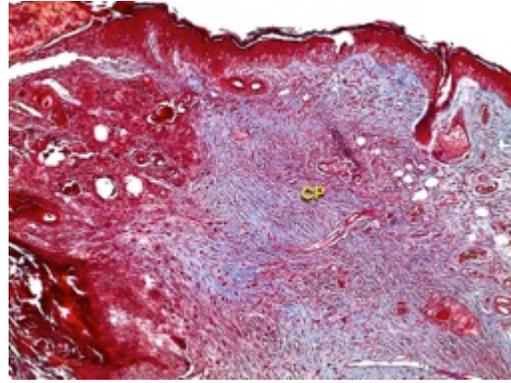
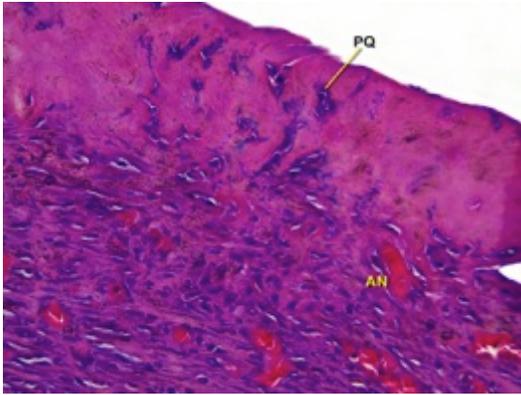
Para una mejor comprensión de los efectos ocasionados por la RUV de forma crónica, los daños se clasificaron según lo reportado en diversos estudios de inducción de fotocarcinogénesis en: a) Daño inicial, cuando la hiperplasia era la atipia predominante; b) Lesión precancerosa en las muestras en las que se determinó queratosis actínica y c) Carcinoma en los tejidos en los que se diagnosticó CCB y/o CCE (Gallagher et al., 1984; Wang et al., 1992; Makinen y Stenback, 1998; Rigel et al., 2006; Kambayashi et al., 2001) (Fig 56).

El diagnóstico de carcinomas se definió bajo los siguientes criterios: presencia de hiperplasia; pérdida de la arquitectura de epitelio plano pluriestratificado, quedando en algunas zonas indefinida la membrana basal; presencia de células pleomórficas, multinucleadas y mitóticas. También se observaron células que habían perdido la relación núcleo-citoplasma, lo cual es indicador de transformación celular; invasión de queratinocitos en la dermis, y por último un proceso de inflamación crónica determinado por la presencia de edema, neutrófilos y mastocitos en dermis. En algunas zonas de la epidermis y dermis las células habían perdido la cohesión entre ellas, observándose espacios vacíos (Gallagher et al., 1984; Nichols y Katiyar, 2010; Wang et al., 1992; Makinen y Stenback, 1998; Rigel et al., 2006; Kambayashi et al., 2001; Katiyar et al., 1997) (Fig. 56).

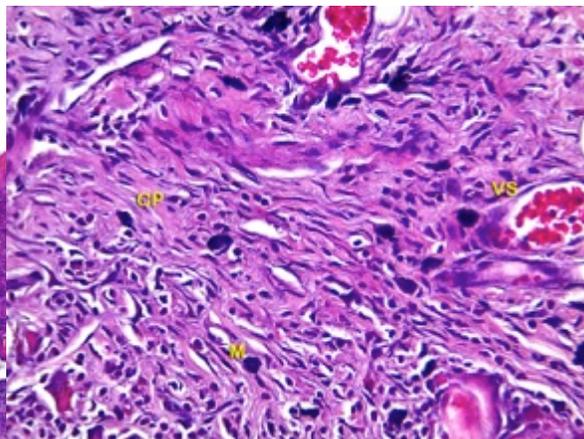
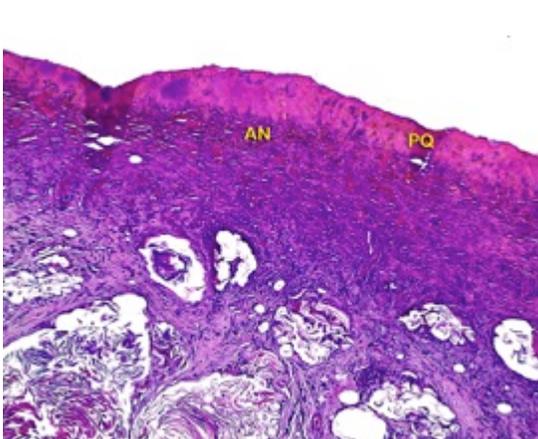
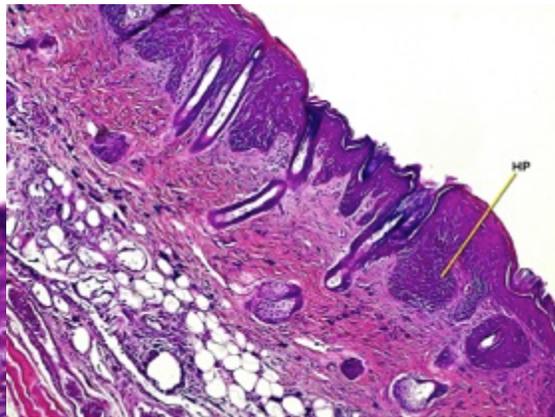
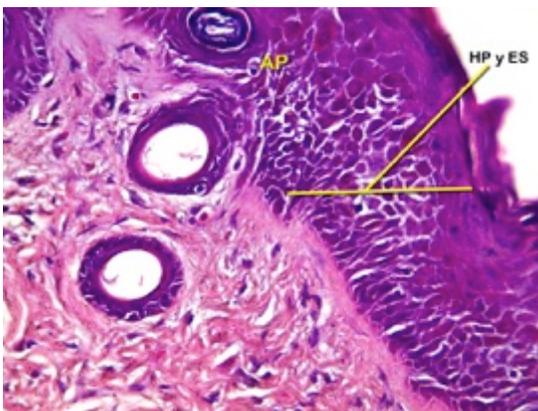
Según la clasificación propuesta por Gallagher et al., (1984), las lesiones que presentaron los ratones de forma macroscópica por acción de la RUV son de tipo

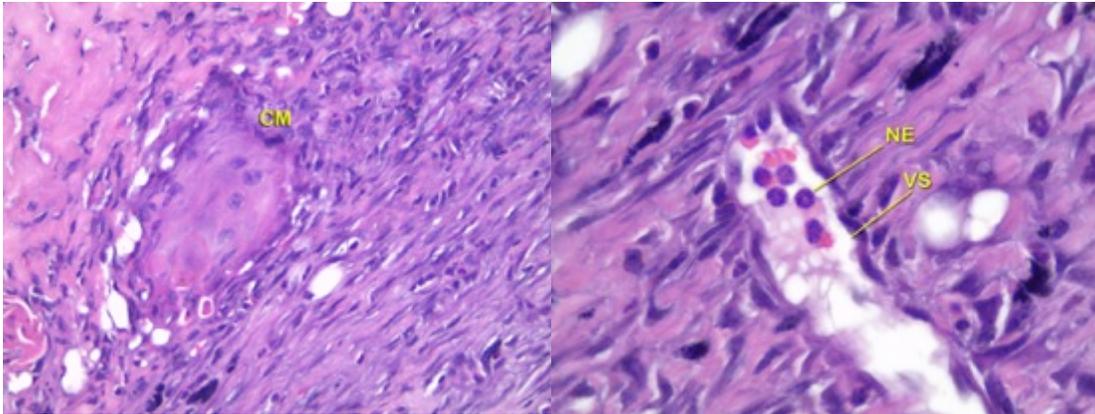
hiperplásico, exofílico y pápulas, estas últimas relacionadas con un proceso inflamatorio derivado de la exposición a la RUV. La correlación con las muestras histológicas permitió determinar hiperplasia, queratosis actínica y carcinomas (Fig. 54).



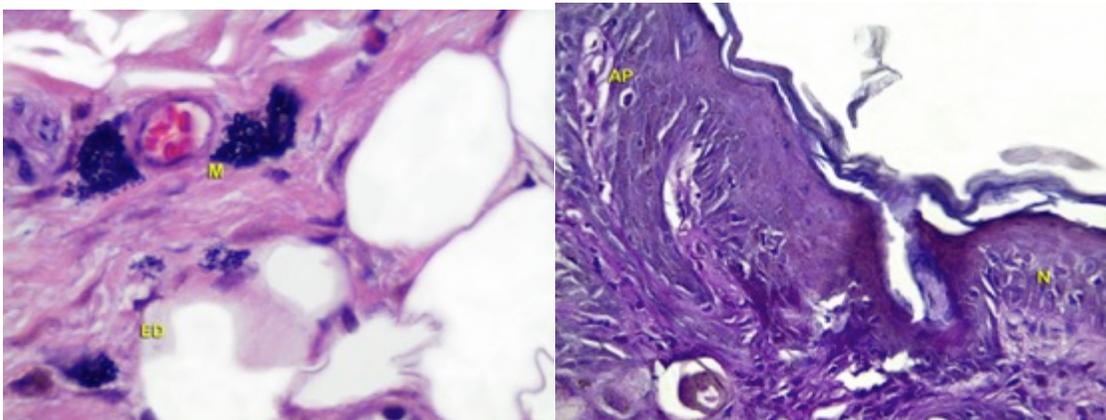


**Figura 56. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo C+. Carcinoma** AN: Angiogénesis; PQ:Paraqueratosis; CP: células pleomórficas; GS: glándula sebácea; VS: vaso sanguíneo; PE: Perlas de queratina; QU: queratina Aumento: 100X, Acercamientos 400X.





**Figura 56 continuación. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo C+. Carcinoma** AN: Angiogénesis; AP: células apoptóticas; C: quiste; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; H: hipodermis; HP: hiperplasia; M: mastocito; MC: células mitóticas; N: neutrofilos; P:Paraqueratosis; PC: células pleomórficas; SC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; V: vaso sanguíneo; Aumento: 100X, Acercamientos 400X y 1000X.



**Figura 56. Cortes histológicos representativos del experimento crónico. Grupo C+. Carcinoma** AN: Angiogénesis; AP: células apoptóticas; C: quiste; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; H: hipodermis; HP: hiperplasia; M: mastocito; MC: células mitóticas; N: neutrofilos; P:Paraqueratosis; PC: células pleomórficas; SC: estrato córneo; GS: glándula sebácea; V: vaso sanguíneo; Aumento: 100X, Acercamientos 400X y 1000X.

### c) Grupos experimentales V+UV y EMBC+UV

Los resultados más representativos de los grupos experimentales pueden verse en las figuras 57 y 58. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en

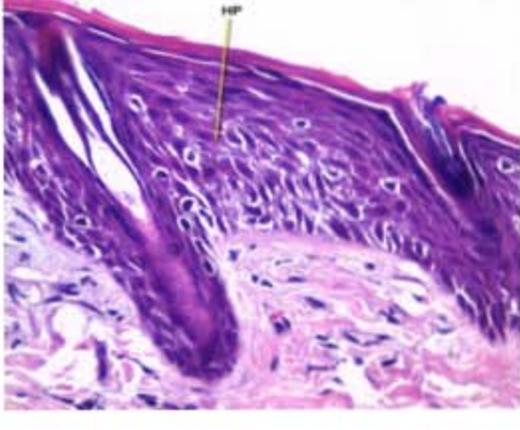
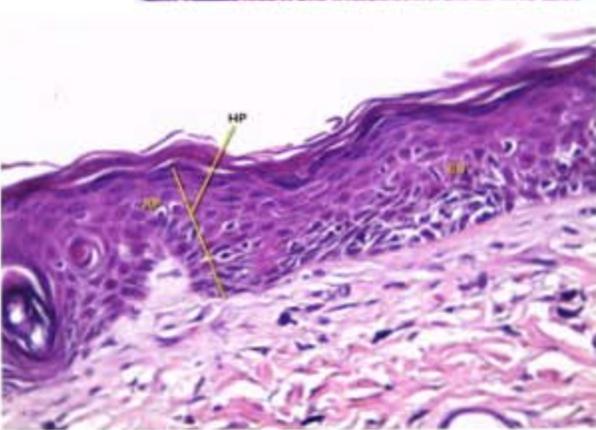
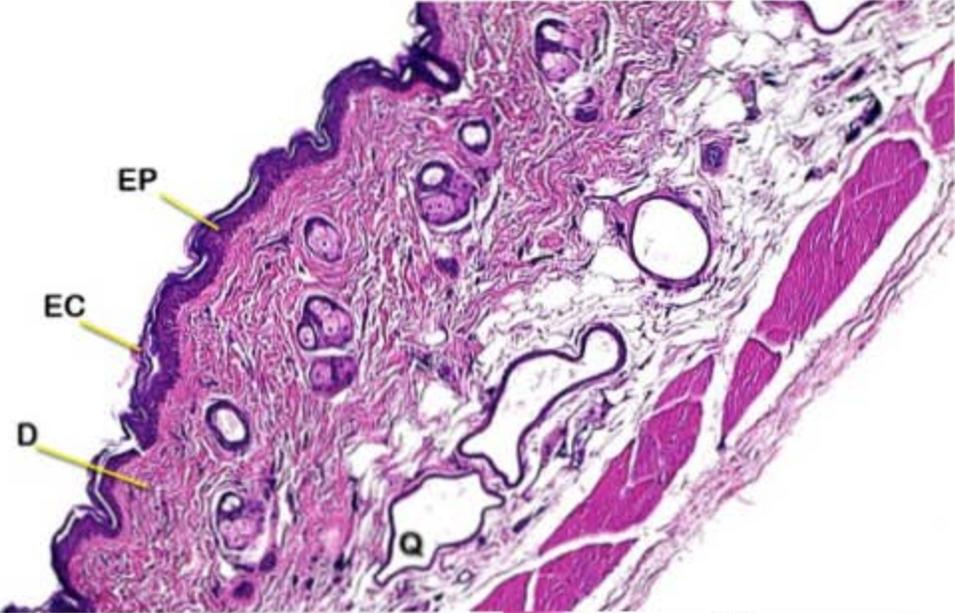
relación con ambos grupos experimentales ( $p \geq 0.05$ ), por lo que se describen juntos. Tampoco existieron diferencias con los grupos T, C-, V y EMBC ( $p \geq 0.05$ ). Las diferencias estadísticamente significativas se encontraron con el C+ ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 54 y 55).

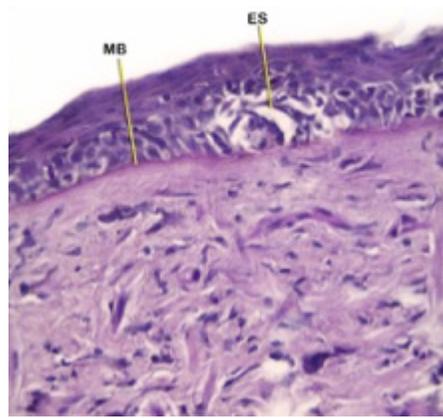
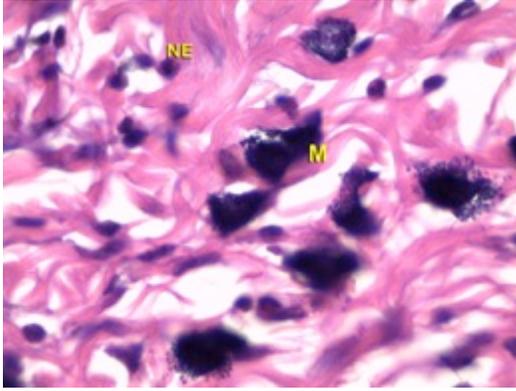
Los grupos experimentales tuvieron un menor número de lesiones ocasionadas por la RUV, determinado por las observaciones macroscópicas (Fig. 57 y 58) y la correlación histológica permitió definir que los daños disminuyeron 60% en el grupo V+UV y 66% en el grupo EMBC+UV. En ambos casos las lesiones correspondieron a zonas focales con hiperqueratosis, hiperplasia, espongirosis y aumento en el número de células apoptóticas con respecto al C-. Las células con necrosis tuvieron una disminución significativa en su presencia con relación al C+. En ambos tratamientos experimentales, sólo una de las lesiones se diagnosticó como carcinoma (Fig. 454 y 55).

La disminución de un proceso inflamatorio crónico en los tratamientos evaluados puede estar relacionada con las propiedades del verbascósido. Diversos estudios reportan que los extractos metanólicos de especies de *Buddleja* presentan efectos antioxidantes, fotoprotectores, antiinflamatorios, analgésicos y cicatrizantes (Avila et al., 2005; Mensah et al., 2001; Backhouse et al., 2008) atribuyéndolo principalmente al verbascósido y al posible sinergismo con la linarina, compuesto que se ha reportado con propiedades antiinflamatorias y que está presente en el EMBC (Avila et al., 2014).

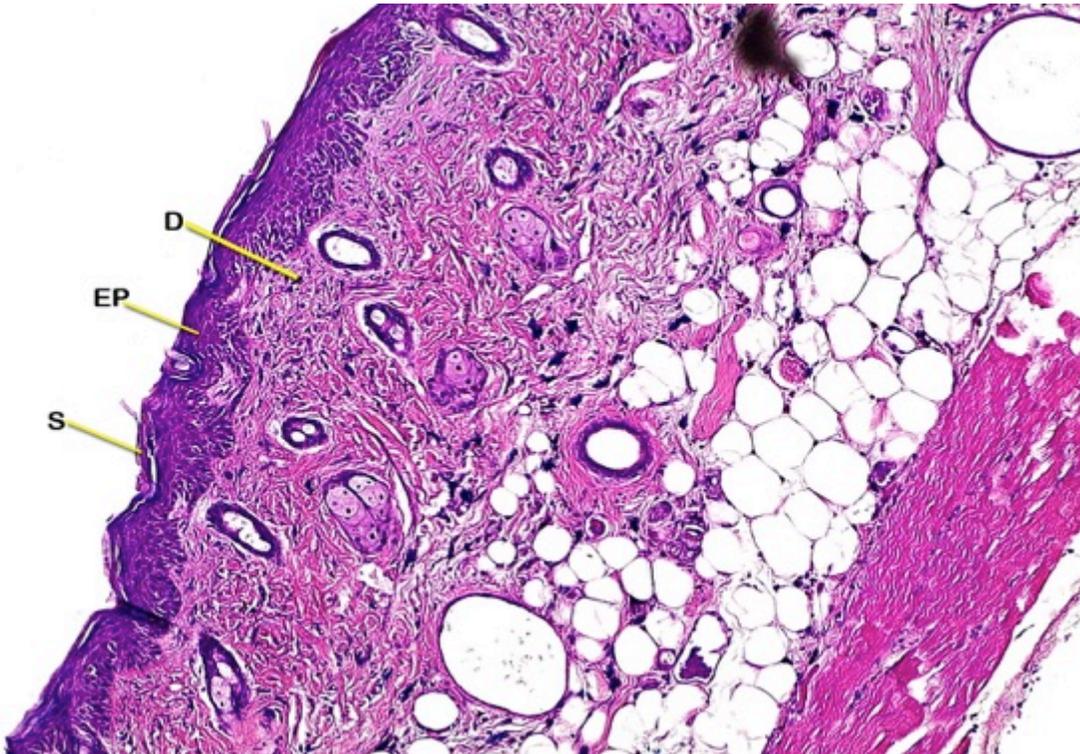
Nuestros resultados y los de otros estudios que analizan las propiedades fotoprotectoras de diversos polifenoles, incluido el verbascósido, sugieren que la presencia de células apoptóticas e hiperplasia en los grupos experimentales es resultado de la correcta activación de los mecanismos de reparación del ADN por la adecuada expresión de P53, equilibrando la proliferación epidérmica y la eliminación de células dañadas mediante la activación de diversas señales de transducción, generando un posible efecto antitumoral al salvaguardar la homeostasis de la piel (Matsumara y Ananthaswamy, 2004; Kostyuk et al., 2008; Kostyuk et al., 2013; Roos y Kaina, 2013; Benjamin y Ananthaswamy, 2007;

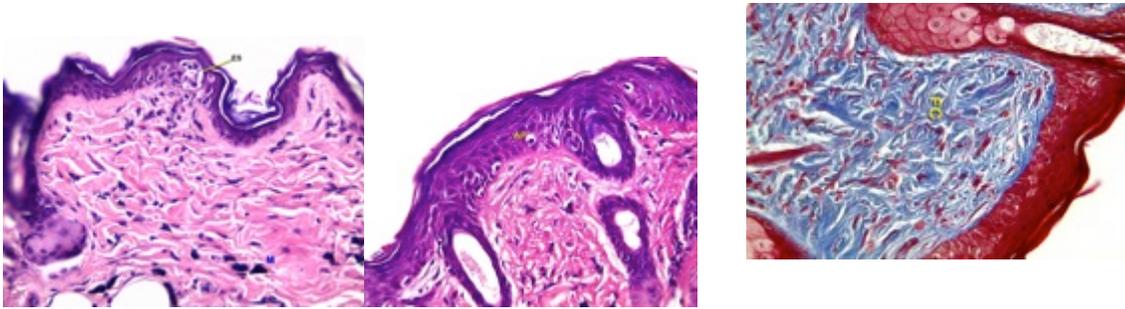
Besaratinia y Pfeifer, 2010; Katiyar et al., 1997; Schwartz et al., 2013; Katiyar et al., 2010; Tomas, 2009).





**Figura 57. Cortes histológicos representativos de los grupos verbascósido+UV.** AP: apoptosis; Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; EC: estrato córneo; V: vaso sanguíneo. HP: hiperplasia; ES: espongirosis; NE: neutrófilos; M: mastocitos; MB: membrana basal. Tinción H y E panel a-d; e PAS. Aumento: panel a 100X, panel b-e 400X





**Figura 58. Cortes histológicos representativos de los grupos EMBC+UV.** AP: apoptosis; Q: quiste; D: dermis; EP: epidermis; EC: estrato córneo; V: vaso sanguíneo. HP: hiperplasia; ES: espongirosis; NE: neutrófilos; M: mastocitos; MB: membrana basal. Tinción H y E panel a-d; e PAS. Aumento: panel a 100X, panel b-e 400X

La pérdida de la regulación epidérmica por efecto de la RUV desencadena el proceso de fotoenvejecimiento. Este conduce a daños irreversibles en las macromoléculas, generando un cambio en los componentes de los queratinocitos, primero a nivel de estrato córneo y posteriormente en las capas más profundas de la piel, culminando con el proceso de fotocarcinogénesis tal y como se observó en el C+, el cual tuvo la tasa más alta de lesiones pre-malignas y malignas (Pastore et al., 2012 a y b; Korkina et al., 2007; Korkina et al., 2009; Kozma y Eide, 2014) (Tabla 23 Fig. 43) (Fig. 56).

Al comparar los resultados de los grupos experimentales y el C+ se pudo determinar que tanto el EMBC como el verbascósido pueden evitar y retrasar la aparición de queratosis actínica, y por lo tanto las lesiones cancerosas.

Un metabolito secundario debe ser fotoestable y no permitir que se lleven a cabo reacciones fotoquímicas en los componentes de la piel con los que interactúa, por lo tanto pueden absorber la RUV (pantalla), interrumpir las reacciones de radicales libres, inducir la activación de los sistemas antioxidantes, atenuar la respuesta

inflamatoria y modular las respuestas al estrés, lo cual se verá reflejado en la disminución de daños ocasionados por la RUV (Alipieva et al., 2014).

Los polifenoles han demostrado tener características que hacen suponer que pueden ser utilizados en la quimioprevención, definida como el uso de sustancias que puedan prevenir, reparar o incluso retardar los daños ocasionados por la RUV (Nichols y Katiyar, 2010).

Después de la exposición a RUV, los eventos celulares desencadenan una serie de reacciones de tipo molecular, bioquímica y celular, alterando diversas respuestas y activando distintas vías de señalización y transducción de señales que estimulan la proliferación de queratinocitos por la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento transformante (TGF) y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ). Los polifenoles modulan diferencialmente las respuestas inflamatorias de los queratinocitos; y el verbascósido afecta directamente la fosforilación del EGFR y la expresión de citocinas proinflamatorias (Kostyuk et al., 2013; Potapovich et al., 2011; Pastore et al., 2012 a; Potapovich et al., 2013). Por ello se sugiere que el verbascósido es particularmente efectivo en la inhibición de las vías moleculares relacionadas con el proceso inflamatorio después de la exposición a la RUV y por lo tanto, también efectivo para evitar y/o retardar el proceso de fotocarcinogénesis.

Además, se ha propuesto que el verbascósido posee características citotóxicas y anti metastásicas en líneas celulares (Korkina et al., 2007), ya que es capaz de inhibir la proliferación de células tumorales y activar los mecanismos que las lleven a apoptosis y evitar su proliferación deteniendo el ciclo celular en la fase G0 a G1, bloqueando las ciclinas D2, D3 y E, así como las CDK2 y CDK6 (Wartenberg et al., 2003; Seo et al., 2013). Estos resultados y los reportados en este documento, dan evidencia de que el verbascósido puede ser utilizado como un fotoprotector de origen natural, protegiendo de la exposición a la RUV y evitando un proceso de daño crónico que a largo plazo induzca fotocarcinogénesis.

## **8.4 Resultados y discusión de la cuarta etapa.**

### **8.4.1 Expresión diferencial de proteínas.**

De las muestras de piel de ratones SKH-1 del experimento crónico de fotoprotección, se realizó la extracción de proteínas totales de los siguientes tratamientos: C-, C+, EMBC+UV y verbascósido+UV (V+UV), para determinar si existía un patrón de expresión diferencial de proteínas. Se cuantificó la concentración de proteínas totales para identificar aquellas muestras con la más alta concentración y utilizar las mismas concentraciones en cada muestra. Las concentraciones obtenidas estuvieron en el rango de 274 a 280 µg/mL en todos los tratamientos cuantificados.

#### **Electroforesis unidimensional (1D).**

Se realizaron electroforesis desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se les realizó tinción con azul de Coomassie para determinar la integridad de las proteínas y observar de forma preliminar si existían diferencias entre los tratamientos (Fig. 59).

Posteriormente se realizaron electroforesis unidimensionales para todas las muestras con las que se realizaría la electroforesis 2D para corroborar la integridad de las muestras. Los geles se muestran indicando con flechas el patrón diferencial de bandeo en cada uno de los tratamientos (Fig. 59)

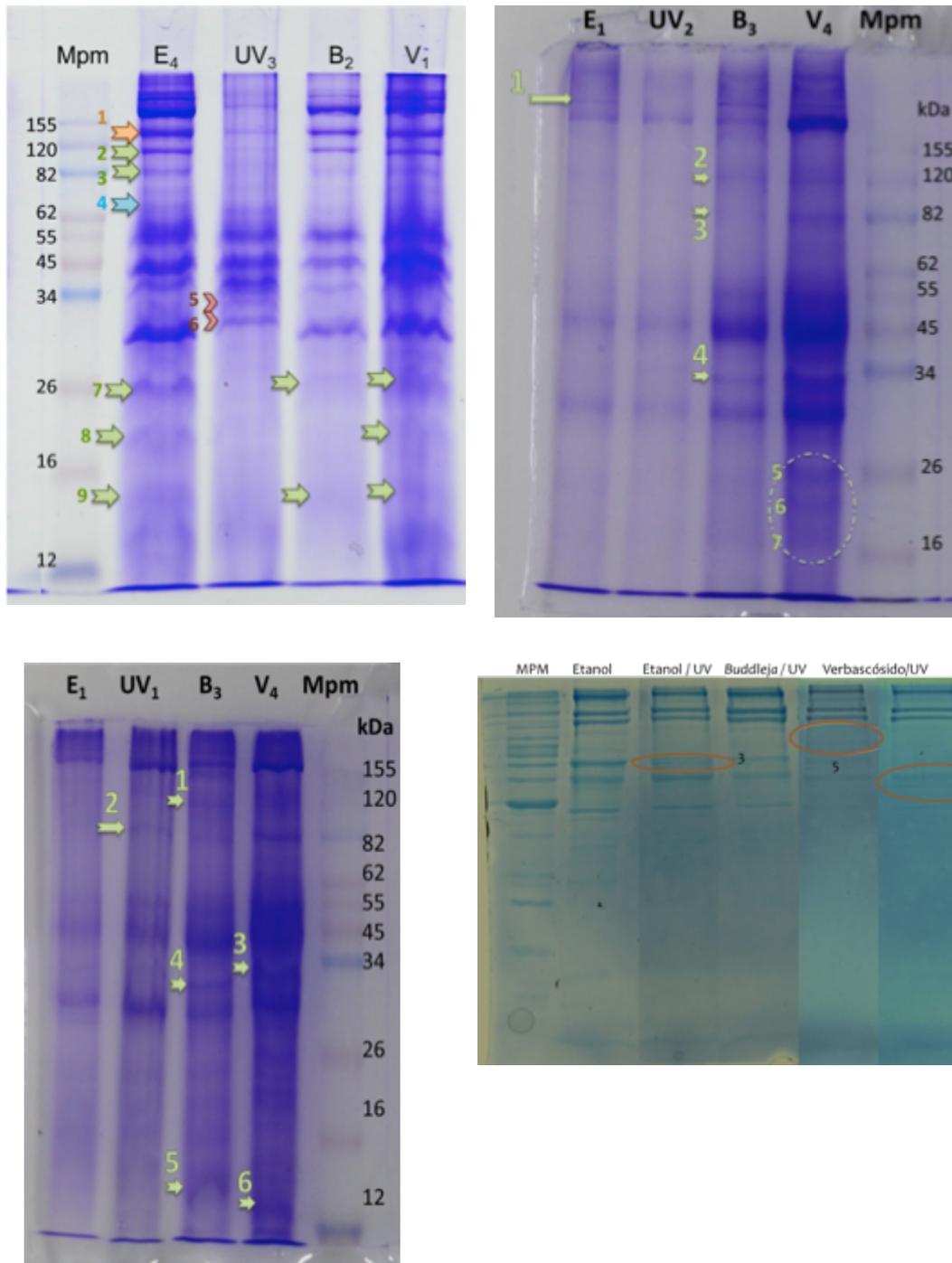


Figura 59. Geles de electroforesis desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Con los diferentes geles de electroforesis unidimensional que se obtuvieron, se calcularon los pesos moleculares relativos (PMr) de las bandas más visibles y que tuvieran expresión diferencial en los diferentes tratamientos (Tabla 25).

**Tabla 25. Pesos moleculares de 13 proteínas expresadas en la electroforesis unidimensional**

Número de banda	PMr KDa	C-	C+	EMBC+RUV	V+RUV
1	111.55	+	+	+	+
2	56.97	+		+	+
3	37.43	+		+	+
4	170	+		+	
5	91.64	+		+	+
6	51.16	+			+
7	47.25	+			
8	134.36	+	+	+	+
9	126.25	+	+	+	+
10	99.28	+			+
11	72.07	+		+	+
12	63.63		+		
13	63.45	+			+

#### **Electroforesis bidimensional (2D).**

Se obtuvo el peso, el PMr y *pI* de las proteínas diferenciales que se observaron en los geles digitalizados de la electroforesis 2D. Se realizó la búsqueda de proteínas expresadas en piel de ratón por medio de la mutiplataforma Expsy/Tag-ident. La búsqueda arrojó alrededor de 1000 proteínas diferentes, de las cuales se eligieron las más cercanas al *pI* y PMr calculado, que se expresaran en piel y que tuvieran relación con procesos de regulación de funciones normales de la piel, del ciclo celular; alteraciones por efecto de la RUV como procesos inflamatorios, apoptosis, reparación de ADN y tejidos; angiogénesis, invasión tumoral, carcinogénesis y metástasis. En las figuras 60 y 61 se puede observar el patrón diferencial de proteínas obtenido por medio de electroforesis 2D.

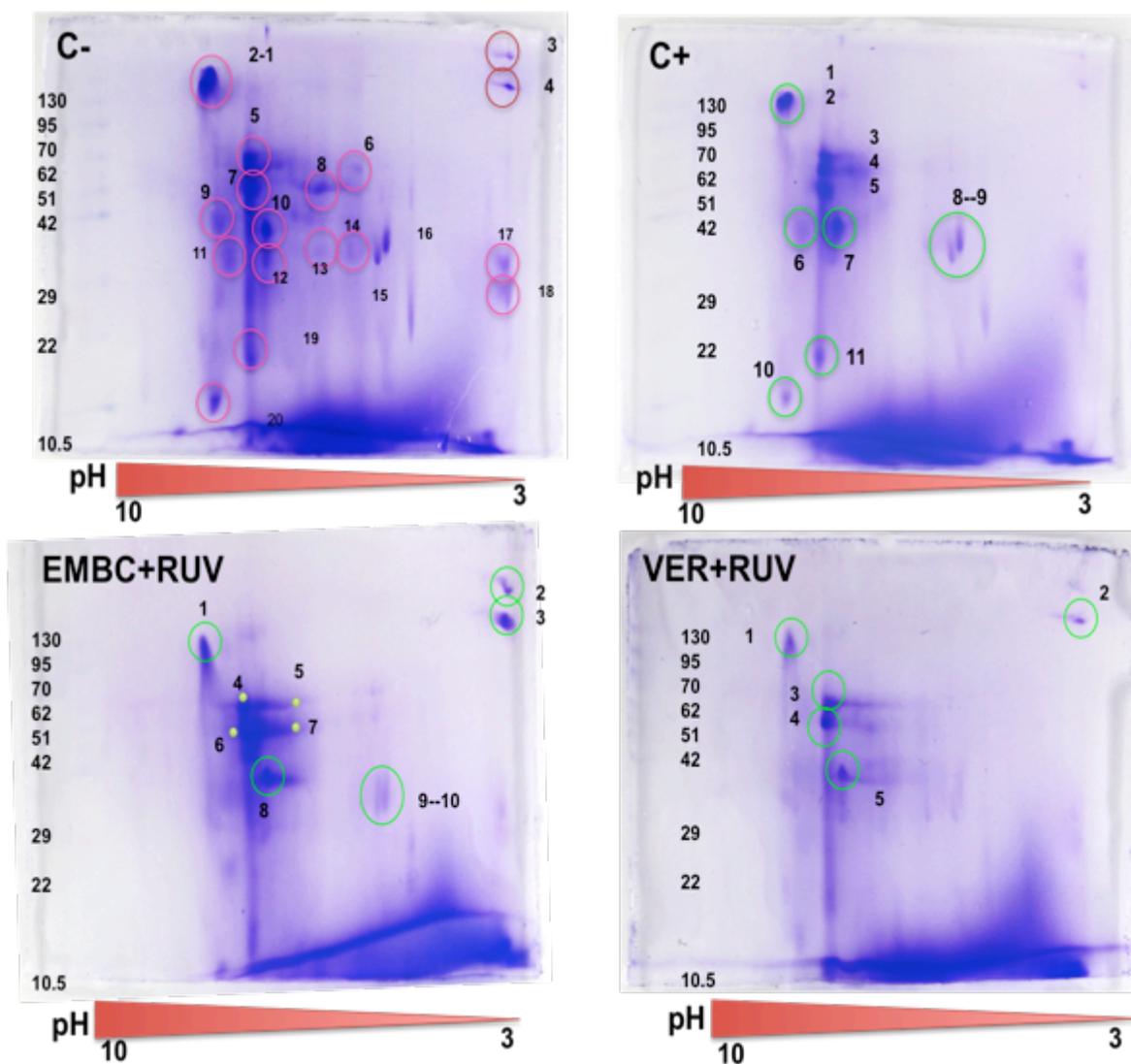
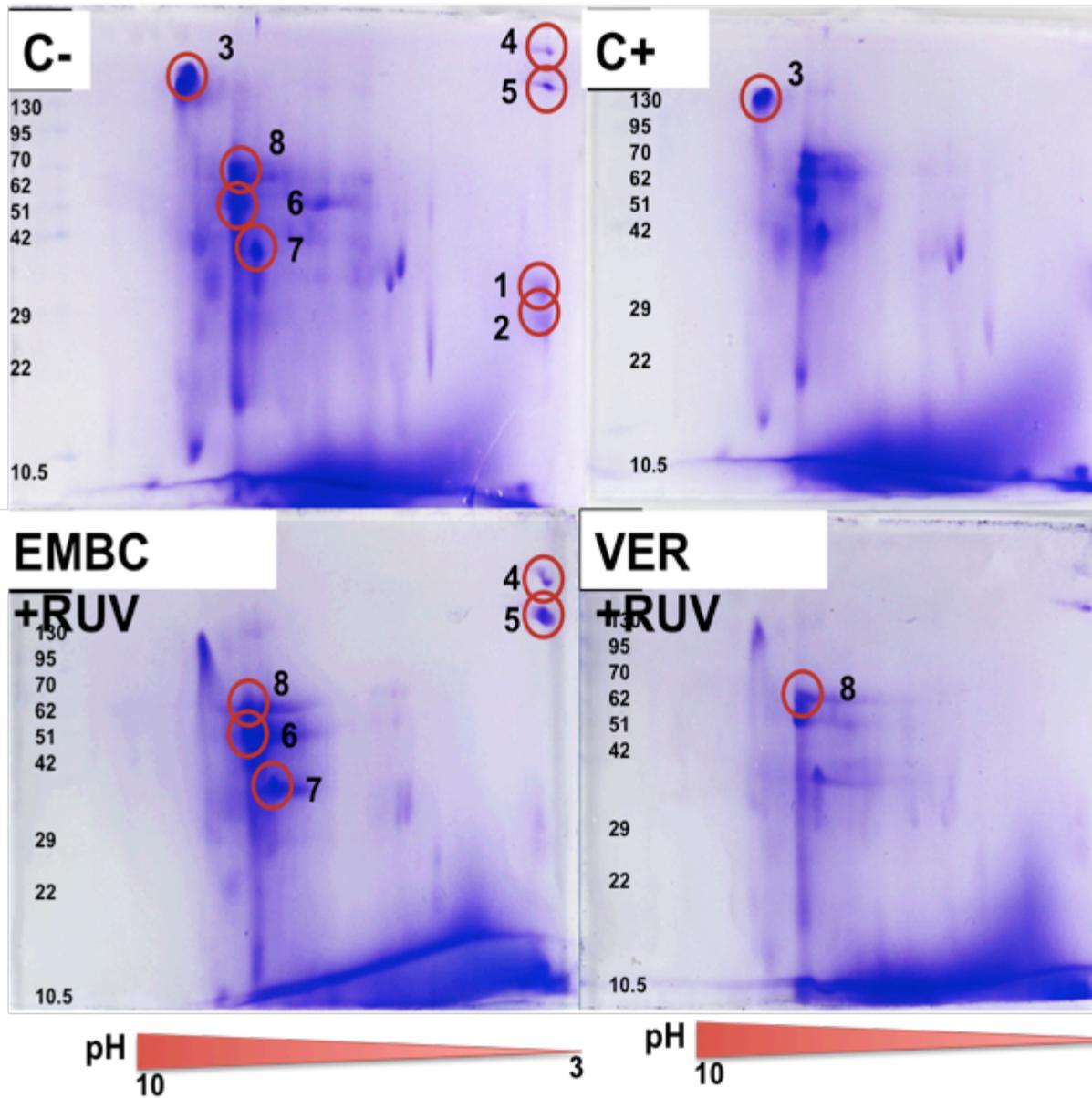


Figura 60. Proteínas expresadas “spots” en los diferentes tratamientos y visualizadas en geles de electroforesis (2D-SDS-PAGE). Los círculos y puntos indican las proteínas que se identificaron en los diferentes tratamientos.



**Figura 61. Proteínas expresadas diferencialmente en los diferentes tratamientos (spots). Los círculos indican las proteínas que se seleccionaron para su identificación por presentarse de forma diferencial en los diferentes tratamientos.**

Las proteínas seleccionadas y los grupos en que se expresaron se muestran en el siguiente tabla:

**Tabla 26. PMr y pI calculados por medio de electroforesis 2D.**

Número	pI	PMr (KDa)	Proteína identificada	Gen	C -	C +	EM BC	V
1	9.76	32.99	Factor de transcripción eritroide	GATA-1	+	-	-	-
1a	9.76	32.99	ADP/ATP traslocasa 2	Slc25a5	+	-	-	-
2	9.84	25.97	Factor de crecimiento de fibroblastos	Fgf13	+	-	-	-
3	4.24	138	Caderina 2	Cdhr2	+	+	-	-
4	9.89	159.28	Colágeno IV	Col 4 a 3	+	-	+	-
5	9.89	125.40	Ubiquitina E3 ligasa	Topors	+	-	+	-
6	5.26	42.11	Serpina B13	Serpin b13	+	-	+	-
6a	5.26	42.11	Metaloproteinasa 10		+		+	
7	5	51	Beciclina 1	Becn1	+	-	+	-
7a	5	51	Istimina 1	Ism1	+	-	+	-
7b	5	51	Antígeno CD44	Cd44	+	-	+	-
8	4.87	73.58	Factor asociado 1-FAS	Faf1	+	-	+	+

Este experimento permitió identificar que existe una expresión diferencial de proteínas en cada uno de los cuatro grupos evaluados. Además, se observó que existe una recuperación parcial del patrón proteico “normal” del C- con respecto al EMBC, y aunque en menor proporción, también con el verbascósido.

A continuación se mencionan algunas características importantes de las proteínas identificadas en la base de datos Tag-Ident:

La primera proteína que se identificó del C- fue el factor de transcripción eritroide. Se encuentra en el núcleo y tiene un papel importante en la regulación negativa de la proliferación, diferenciación celular y apoptosis mediada por p53. Está relacionada en el proceso de homeostasis y número de células dentro de un tejido. Entre las diferentes funciones que se encuentran descritas en la multiplataforma

se pueden destacar: que es una proteína de unión a MDM2, por lo tanto, participa en la detención del ciclo celular en la fase G1 cuando existe daño celular (incluidos los efectos por RUV), participa como señal de transducción de p53 para culminar en la transcripción de p21. (<http://www.uniprot.org/uniprot/P17679#P17679-2>).

Otra proteína que se expresó en el C- y que coincide con los *p1* y PMr es la ADP/ATP traslocasa 2, la cual regula de forma positiva la proliferación, diferenciación y migración celular del epitelio. Participa en la regulación positiva del crecimiento de fibroblastos y de forma negativa, en la apoptosis.

La segunda proteína presente únicamente en el C- correspondió al factor de crecimiento de fibroblastos. Su función dentro de la célula es controlar la supervivencia y la mitosis, además de participar en una variedad de procesos biológicos como el desarrollo embrionario, crecimiento celular, morfogénesis y reparación de tejidos. Otra función importante es la unión que realiza con la tubulina para la polimerización y estabilización de los microtúbulos, y por lo tanto la organización y polarización de las células (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2257>) (Genbank Gene ID 2257).

La tercera proteína que se expresó en los controles C- y C+ es muy similar a caderina 2. Es una molécula de adhesión intermicrovillar que controla con su dominio interno el embalaje de las microvellosidades en la membrana apical de las células epiteliales y con su dominio citoplasmático interactúa con diversas proteínas para formar complejos de adhesión célula-célula y evitar la inhibición por contacto. Entre las diferentes funciones en las que participa y que se mencionan en la multiplataforma destacan: la regulación negativa de la vía extrínseca de la apoptosis, la regulación positiva de la vasoconstricción, y la regulación de la muerte celular por citotoxicidad (por ejemplo por acción de la RUV), y la actividad de los mastocitos.

Caderina 2 participa en el montaje y estabilización de las estructuras de la matriz extracelular, en la organogénesis de la piel regulando el ciclo celular, la migración celular epitelial y en la tumorigénesis (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q99PJ1#Q99PJ1-21>). Todas estas funciones

reflejan que es una proteína que puede estar en tejido sano y en tejido dañado, tal y como ocurrió en este experimento, dejando en evidencia su múltiple papel dentro de las células de la piel.

La cuarta proteína identificada fue colágeno tipo IV que se presentó en el C- y se recuperó en el patrón de bandeo de las muestras de EMBC+RUV. El colágeno tipo IV es un importante componente estructural de las membranas basales. Participa en la diferenciación de queratinocitos y en la constitución de la matriz extracelular. Su presencia es indispensable en la regulación negativa de la angiogénesis, de la tumorigénesis y en la migración y la polaridad celular. Al mismo tiempo, es indispensable en la regulación positiva de la apoptosis y el arresto del ciclo celular. Participa en la regulación negativa de NF- $\kappa$ B, del ciclo celular en la fase G0/G1, de la angiogénesis y del crecimiento de fibroblastos. (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9QZS0>). Su papel es importante, ya que se ha demostrado que el aumento de la angiogénesis es uno de los eventos en el proceso de carcinogénesis (Hanahan y Weinberg, 2011).

La expresión de colágeno IV en el grupo control u experimental fortalece la idea de que el EMBC protegió la piel de los ratones que fueron expuestos a la RUV. Cabe destacar que esta proteína es una de las más estudiadas en relación con los efectos causales del cáncer de piel (Taihao et al., 2009). Por lo tanto, la presencia de colágeno IV en el grupo experimental hace suponer que su síntesis y funcionamiento es adecuado a pesar del efecto ocasionado por la RUV.

La quinta proteína encontrada fue la ubiquitina E3 ligasa. Se expresó en el C- y en el grupo del EMBC. Su principal función es la catálisis proteica por ubiquitinación. Se expresa como respuesta a un estímulo o daño (por ejemplo la RUV) y participa en la regulación de la proliferación celular, el arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis mediada por p53 cuando existe un daño irreparable en el ADN. (Castañeda et al., 2007). Mantiene la estabilidad de P53 a través de su degradación por ubiquitinación. (Tokino y Nakamura, 2000). También está reportada como molécula de adhesión a antígenos (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q80Z37>). La presencia de ubiquitina nos indicó que posiblemente al existir un daño en el ADN por efecto de la RUV (como la

formación de DPC) y al no poder ser reparado, se llevó a cabo la inducción de apoptosis como mecanismo de respuesta y protección favorecido por la presencia del EMBC (tal y como sucedió en el experimento con células HaCaT).

La sexta proteína identificada fue la serpina B13. Se expresó en C- y EMBC. Está implicada en la proliferación y diferenciación de queratinocitos, regulando de forma negativa la apoptosis en este tipo celular. También regula de forma negativa la expresión del factor de necrosis tumoral uniéndose a él, y por lo tanto se expresa como respuesta a daños ocasionados en la piel. (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8CDC0>). Como se puede observar, es una proteína implicada en el desarrollo y buen funcionamiento de la epidermis, por lo que su expresión en las muestras del C- y del EMBC nos indica que los mecanismos de maduración y diferenciación celular se encuentran funcionando adecuadamente.

La séptima proteína también expresada en el C- y EMBC corresponde a beclina 1. Destaca su participación en la apoptosis mitocondrial al inducir la traslocación de BAX, por lo tanto regula de forma negativa la proliferación y muerte celular, arretando el ciclo celular en la fase G1/S. También regula de forma negativa el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (<http://www.uniprot.org/uniprot/O88597>), por lo tanto en este trabajo se considera una proteína importante en el efecto fotoprotector del EMBC, grupo en el que se expresó.

En el C-y EMBC se presentó el antígeno CD44. Regula de forma negativa la respuesta inflamatoria, producción de interleucinas, producción del factor de necrosis tumoral, la desgranulación de mastocitos y las señales intrínsecas de la apoptosis mediada por p53. Participa en la respuesta celular del factor de crecimiento de fibroblastos y actúa como receptor del ácido hialurónico que juega un papel importante en la migración celular, el crecimiento y la progresión tumoral (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15379#P15379-10>). Por lo tanto, es una proteína que al estar expresada indica que están ocurriendo a nivel molecular procesos relacionados con la exposición a la RUV.

La istimina 1 que se presentó en el C- y EMBC participa en la regulación negativa de la angiogénesis (Xiang, et al, 2011).

La última proteína expresada de forma diferencial en el C-, EMBC y verbascósido, fue el factor asociado FAS 1. Participa en la respuesta inflamatoria causada por agentes externos. Se une a NF- $\kappa$ B y por lo tanto lo regula de forma negativa. Se une a la ubiquitina regulándola positivamente, al igual que a la apoptosis y la muerte celular. (<http://www.uniprot.org/uniprot/P54731>). Esta proteína nos deja claro que existe un proceso inflamatorio en la piel por efecto de la RUV (tal y como se observó de forma histológica) y que al expresarse en los grupos protegidos está ayudando a disminuir los efectos moleculares que puedan dar como consecuencia la formación de tumores. El hecho de que se expresara en el grupo con verbascósido deja claro el papel de esta molécula como antiinflamatorio en diferentes tejidos celulares, y por lo tanto se vio reflejado en la recuperación parcial del patrón de bandeo (Alipieva et al., 2014; Esposito et al., 2010; Korkina et al., 2007). El uso de polifenoles, en especial el verbascósido, en la regulación negativa de moléculas pro inflamatorias como NF- $\kappa$ B ha sido reportado por diversos autores, por lo tanto se considera una molécula con un alto potencial para este tipo de estudios de fotoprotección (Zhou et al., 2012; Potapovich et al., 2011; Ichihashi et al., en 2003).

Las proteínas identificadas en este trabajo nos dan un panorama de diversos mecanismos moleculares que están llevándose a cabo de forma normal en la piel y al expresarse en los tratamientos con protección ante la RUV posiblemente estén participando los diversos mecanismos de reparación celular, principalmente el grupo protegido con el EMBC. Esto puede deberse a los diversos compuestos presentes en el extracto como: verbascósido, linarina y siringina, que tienen reportes de actividad antiinflamatoria, antitumoral y por lo tanto fotoprotectora (Adedapo et al., 2009; Choi, et al, 2004; Zhang, et al, 2007; Avila et al., 2014; Alipieva et al., 2014; Korkina et al., 2009). Por lo tanto, la presencia de bandas diferenciales en cada uno de los grupos, y la recuperación parcial del patrón original de bandeo en los grupos protegidos e irradiados con respecto al control, hacen suponer que las sustancias probadas generan un efecto fotoprotector sobre

la piel de los ratones SKH-1, y por lo tanto la expresión de proteínas fue mayor en relación con el C+.

Es importante mencionar que en la base de datos utilizada en este trabajo ya existían las proteínas con las características y criterios utilizados para su búsqueda (PMr y *pI*). A partir de los datos encontrados se propone secuenciar cada una de las bandas para identificar fielmente a qué proteína pertenece. Otra propuesta para la continuidad de este trabajo es realizar el análisis del transcriptoma de la piel de los ratones SKH-1: obtener la secuencia y a partir de herramientas bioinformáticas establecer de forma más precisa la expresión diferencial en cada una de las condiciones del experimento.

#### **8.4.2 Análisis de curvas de disociación de alta resolución (PCR-HRM).**

Los resultados de la amplificación de p53 corresponden a la región del intrón y exones 7 y 8. Los datos obtenidos de cada tratamiento se promediaron y analizaron con uanalyze, que es una herramienta de libre acceso (<https://www.dna.utah.edu/ua/uanalyze.html>) para analizar datos obtenidos por PCR-HRM. Las siguientes gráficas muestran los resultados obtenidos:

Como se puede observar en las gráficas 62, 63 y 64 las variaciones de fluorescencia y  $T_m$  son evidentes entre las muestras del C- (negro) ( $T_m \approx 75^\circ\text{C}$ ) y el C+ (rojo) ( $T_m \approx 78^\circ\text{C}$ ). En el caso de los grupos experimentales se puede observar una tendencia similar a la que se ha presentado a lo largo de este trabajo: el grupo de muestras correspondiente al EMBC+UV tiene un patrón similar al C- ( $T_m \approx 75^\circ\text{C}$ ), mientras que el grupo de verbascósido presenta un patrón intermedio en los valores de  $T_m$  ( $\approx 76^\circ\text{C}$ ). Esto nos indica que las diferencias entre fluorescencia y  $T_m$  pueden deberse a variaciones en la secuencia de bases de las regiones amplificadas correspondientes a fragmentos de p53.

El análisis estadístico mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre el C- y el C+ ; que el C- es igual estadísticamente al EMBC +RUV y que el verbascósido+ RUV se encuentra en una zona intermedia, ya que con la prueba t de student es diferente estadísticamente al C- y al C+ ( $p < 0.05$ ) (Fig. 65). Estos resultados complementan los obtenidos histológicamente en

cultivos celulares y en expresión diferencial de proteínas, donde el efecto fotoprotector de las sustancias evaluadas siempre fue mayor en presencia del EMBC seguido por las muestras protegidas con verbascósido.

Cabe recordar que la incidencia y multiplicidad de tumores en la piel de ratones SKH-1 se vio disminuida en un 60% en los grupos donde se aplicó EMBC y en un 40% en aquellos con verbascósido previo a ser irradiados de forma crónica. Se debe resaltar el hecho de que las muestras de piel utilizadas para este experimento corresponden en todos los casos del C+ a zonas con tumor, y en el caso de los grupos experimentales correspondieron a zonas con el mayor daño visible (solo en una de las muestras de cada tratamiento se presentó lesión de forma macroscópica).

A lo largo de este trabajo se ha mencionado que la RUV-B induce daño directo en la piel debido a que se absorbe por las moléculas que actúan como cromóforos (lípidos de membrana, proteínas y ADN), lo cual lleva a la producción de diversos tipos de lesiones pro mutagénicas como los dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC) y los fotoproductos 6-4 (6-4 PP) o daños indirectos por medio de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Calò y Marabini, 2014; Afaq, 2001 y Jang et al., 2012).

Al amplificar la región correspondiente a los exones 7 y 8 del gen p53 se buscó tener el mayor número de mutaciones ocasionadas por la UVB, ya que es en esta región donde se presenta la mayor incidencia de mutaciones relacionadas con la presencia de cáncer de piel no melanómico (CCB y CCE), en especial por la formación de DPC (Besaratina y Pfeifer, 2010). La tasa de reparación de los DPC es más baja comparada con la de otros fotoproductos y son los cambios de C a T y CC a TT los de mayor prevalencia en las zonas de alta mutación del gen por efecto de la RUV (Besaratina y Pfeifer, 2009).

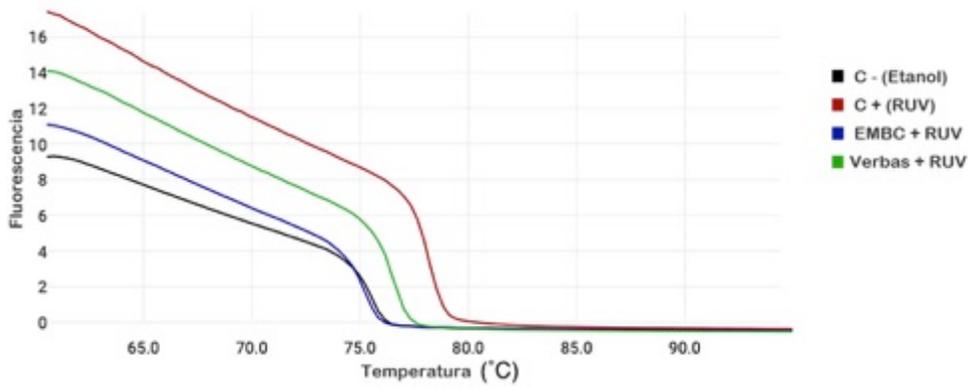


Figura 62. Resultados de PCR-HRM. Curvas de Melt obtenidas en los diferentes grupos. Se observan los cambios en la Tm y en la fluorescencia.

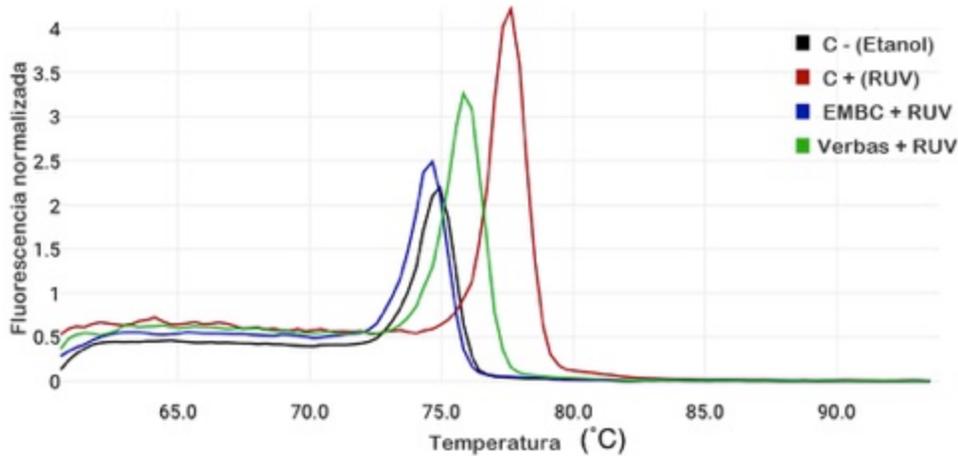


Figura 63. Gráfica de PCR-HRM de los datos normalizados en función de la fluorescencia con respecto a la temperatura.

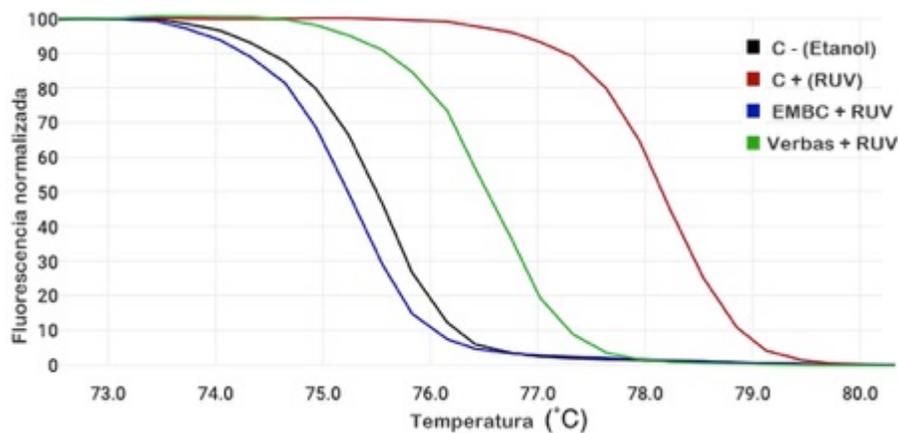


Figura 64. Normalización de la curvas de Melt. La gráfica corresponde a la zona pre melting de estabilización de la fluorescencia

### Curvas de Melt

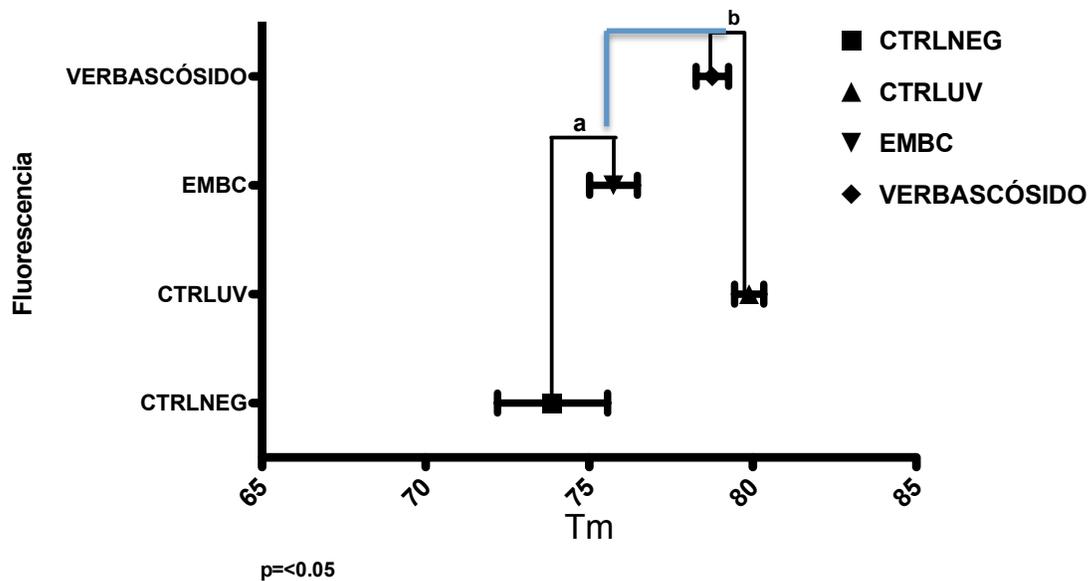


Figura 65. Análisis estadístico de las poblaciones sometidas a PCR-HRM. Las líneas indican similitudes estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre las poblaciones analizadas.

El gen p53 se inactiva comúnmente por mutaciones en el dominio de unión al ADN en una amplia variedad de tipos de cáncer y encontrar las regiones de mutación es de gran valor clínico. Por lo tanto, en este trabajo el uso de PCR-HRM es una herramienta de exploración rápida de mutaciones en las muestras de piel de ratón

con y sin lesiones macroscópicamente visibles de los diferentes tratamientos y evaluar la sensibilidad y valor predictivo positivo de la técnica.

P53 es un gen supresor de tumores que desempeña un papel importante en la regulación a la respuesta celular al medio ambiente y a los estímulos nocivos inhibiendo el ciclo celular y promoviendo la apoptosis o la senescencia (Diller et al., 1990). P53 responde al daño en ADN uniéndose a él por medio de su dominio central (exones 5 al 8), y se ha demostrado que esta zona es la que presenta la mayor cantidad de mutaciones por efecto de la RUV, por lo que un cambio en la conformación de esta región del gen puede dar lugar a que el ciclo celular continúe, no exista reparación y por lo tanto se desencadene un proceso de fotocarcinogénesis (Vogelstein et al., 2000).

En este trabajo se realizó un método semicuantitativo de PCR en tiempo real basado en el análisis de curvas de Melting, a fin de detectar las variaciones en la  $T_m$  por efecto de las mutaciones ocasionadas por la RUV. Se puede observar en los tres gráficos las diferencias en cada uno de los grupos, quedando claro que el C+ presenta la mayor variación en su  $T_m$ . Los resultados de este trabajo concuerdan con los reportados por Krypuy et al., 2007 donde realizan un barrido de mutaciones a lo largo de los exones 5, 6, 7, 8 de p53 en líneas celulares de cáncer de ovario y donde observaron variaciones entre los amplicones de las muestras con mutaciones en el gen y las que no presentaban daño (previamente identificadas por secuenciación). Ellos confirman que las mutaciones detectadas por secuenciación previo a la realización de PCR-HRM fueron 100% corroboradas por medio de esta técnica y pudieron detectar variaciones hasta de 0.1 °C en las curvas de fusión. También concluyen que la presencia de perfiles o curvas “aberrantes” o sin sentido corresponden a muestras con una alta tasa de mutación a lo largo de p53. Cabe mencionar que en este trabajo se obtuvieron perfiles de ese tipo en el control positivo.

Existen diversos métodos para detectar mutaciones en p53 y cada uno presenta ventajas y desventajas particulares. Hoy en día se buscan metodologías que sean rápidas y de bajo costo, como en este caso PCR-HRM, donde los datos de

fluorescencia se pueden obtener en el último ciclo de la PCR y determinar la  $T_m$  de los fragmentos previamente amplificados, todo en la misma reacción (Raymond et al., 2013; Erali et al., 2008). Esta técnica tiene ventajas al momento de detectar mutaciones somáticas en los genes que presenten alteraciones en diferentes posiciones de la secuencia de codificación, y puede detectar SNPs, mutaciones silenciosas y variaciones intrónicas de significado desconocido, por lo que también presenta una tasa intrínseca de falsos positivos al mismo tiempo que la presencia de curvas aberrantes debe ser validada por otro medio (como la secuenciación) (Krypuy et al., 2007; Ishikawa et al., 2010).

Por último, cabe destacar la relación directa existente entre la exposición a la UVB y el desarrollo de cáncer de piel. Se tiene bien establecido que la UVB induce mutaciones tipo C—T y CC—TT. Estas mutaciones corresponden en su mayoría a la posición del codón 248 y 278 de P53, que en humanos corresponden a CGG y en ratones a CGC (Besaratina y Pfeifer, 2010). Es por ello que los estudios de fotoprotección se han encaminado a la búsqueda de sustancias que, al ser aplicadas tópicamente o ingeridas, ayuden a la disminución de las tasas de mutación en dicho gen. El uso de fotoprotectores solares con un FPS 15 ha demostrado que al ser aplicado en piel de ratón previo a la exposición a UVB resulta en una disminución de entre el 88 y 92% del número de mutaciones en p53. Por lo tanto, si se toma en cuenta que las mutaciones de dicho gen representan un paso inicial en el proceso de fotocarcinogénesis, el uso de sustancias que reduzcan el riesgo es claramente efectivo. (Ananthaswamy et al., 2002). Cabe mencionar que el FPS que se ha establecido para el verbascósido y el EMBC se sitúa en 24, por lo que su uso como sustancia fotoprotectora es factible.

Esta técnica da un panorama general de que las variaciones entre los grupos sin protección y protegidos previo a la exposición a luz UVB no sólo se dan a nivel histológico, sino también a nivel molecular, por lo que se sugiere establecer el patrón de  $T_m$  para cada tipo de tratamiento, así como conocer las secuencias amplificadas y las mutaciones que se presentan.

## Conclusiones.

- El rendimiento del extracto metanólico obtenido a partir de *B. cordata* fue alto comparado con lo reportado en otras especies del mismo género.
- El aislamiento del verbascósido a partir del EMBC fue alto comparado con otras especies donde se ha reportado la presencia del compuesto.
- El EMBC y el verbascósido no presentaron efectos citotóxicos en los cultivos de la línea celular HaCaT.
- El EMBC y el verbascósido tuvieron efecto fotoprotector al ser incorporados por separado en el cultivo de la línea celular HaCaT expuesto a RUV-B.
- La aplicación tópica del EMBC o del verbascósido en los ratones SKH-1 previo a ser expuestos a la RUV-B de forma aguda o crónica, tuvo un efecto fotoprotector al verse disminuidos los daños macroscópicos con respecto al C+.
- La aplicación del verbascósido o el EMBC de forma tópica en los ratones SKH-1 previo a ser expuestos a la RUV-B de forma aguda o crónica, tuvo un efecto fotoprotector al verse disminuidos los daños histológicos.
- La aplicación de verbascósido o del EMBC de forma tópica en la piel de los ratones SKH-1 previo a ser expuestos a la RUV de forma aguda evitó la formación de eritema.
- La penetración del EMBC y del verbascósido en la piel de los ratones SKH-1 fue baja; sin embargo, se sugiere que su acción fotoprotectora se da por su interacción directa con la RUV.
- Existe un patrón diferencial de proteínas en las muestras de piel de ratones SKH-1 que no fueron expuestas a la RUV. Este patrón se pierde en las muestras que fueron expuestas a RUV sin ninguna protección, y se recupera parcialmente en las muestras de los grupos protegidos con las sustancias previo a la exposición a la RUV-B.
- Las variaciones en las curvas de disociación de la región del ADN analizado, sugieren que el número de mutaciones en p53 por efecto de la RUV disminuyó en los grupos de piel protegidas con EMBC o verbascósido.

- Se sugiere que el EMBC y el verbascósido tienen propiedades fotoprotectoras, por lo que pueden prevenir los daños ocasionados por la luz solar, y son considerados como candidatos viables para la quimioprevención de los daños agudos y crónicos causados por la RUV.

## 10. Referencias Bibliográficas.

Acevedo, L., Martínez, E., Castañeda, P., Franzblau, S., Timmermann, B. N., Linares, E., Bye, R. y Mata, R. 2000. New phenylethanoids from *Buddleja cordata* subsp. *Cordata*. *Planta medica*. 66(3):257–261.

Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Koduru, S., Masika, P. J. y Afolayan, A. J. 2009. Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9:21.

Afaq, F. 2011. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 508(2):144–151.

Afaq, F., Adhami, V. M. y Mukhtar, H. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 571(1-2): 153-173.

Afaq, F. y Mukhtar, H. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*. 15(9): 678–684.

Afaq, F. y Katiyar, S. K. 2011. Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 11(14): 1200–1215.

Afaq, F., Zaid, M. A., Khan, N., Dreher, M. y Mukhtar, H. 2009. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Experimental Dermatology*. 18(6): 553–561.

Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M. H., Khan, N., Zaid, M.A. y Mukhtar, H. 2007. *The Journal of Investigative Dermatology*. 127(1): 222–232.

Ahmed, A.H., Soyer, H. P., Saunders, N., Boukamp, P., y Roberts, M. S. 2008. Non-melanoma skin cancers. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 5(1): 55-62.

Alipieva, K., Erdogan, I., Tatli I.I., Kostadinova E.P. y Georgiev M.I. 2014b Treasure vinkfrom garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochemistry Reviews*. 13:417–44.

- Alipieva, K., Liudmila, K., Orhan, I. E. y Georgiev, M. I. 2014a. Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*. 32(6): 1065–1076.
- Alonso-Castro A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F y Garcia-Carranca, A. 2011 Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 133(3): 945–972.
- Amado, S. 2001. *Lecciones de dermatología*. 14<sup>a</sup> Edición. Méndez Editores. México. pág. 630-679.
- Ananthaswamy, H.N., Ullrich, S.E. y Kripke, M.L. 2002. Inhibition of UV-induced p53 mutations and skin cancers by sunscreens: implication for skin cancer prevention. *Experimental Dermatology*. 11(1):40-43.
- Aoki, R. A., Aoki-Yoshida, A., Suzuki, C. y Takayama, Y. 2014. Protective Effect of Indole-3-Pyruvate against Ultraviolet B-Induced Damage to Cultured HaCaT Keratinocytes and the Skin of Hairless Mice, *PLoS One*. 9 (5): e96804.
- Aoki-Yoshida, A., Aoki, R y Takayama, Y. 2013. Protective effect of pyruvate against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115(4): 442-448.
- Arenas R. 2009. *Atlas de dermatología: diagnóstico y tratamiento*. 3ra Edición. Mc Graw Hill Interamericana. 416 pp.
- Arenas R. 2013. *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. 5ta Edición. McGraw Hill Interamericana. 416 p.
- Armstrong, B.K. y Kricger, A. 2001. The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 63(1-3): 8-18.
- Arora, S., Tyagi, N., Bhardwaj, A., Rusu, L., Palanki, R., Vig, K., Singh, S. R., Singh, A. P., Palanki, S., Miller, M. E., Carter, J. E., Singh, S. 2015. Silver nanoparticles protect human keratinocytes against UVB radiation-induced DNA damage and apoptosis: potential for prevention of skin carcinogenesis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 11(5): 1265–1275

- Assefa, Z., Van Laethem, A., Garmyn, M., y Agostinis, P. 2005. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1755(2):, 90-106.
- Avila Acevedo J. G. 2002. Estudio fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*. Evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.
- Avila, A. J. G., Castañeda, C. M. C. M., Benítez, F. J.C., Durán, D. A., Barroso, V. R., Martínez, C. G., Muñoz, L. J. L., Martínez, C. A. y Romo de Vivar, A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*. 76(3-4): 301-309.
- Avila, A. J. G., Espinosa, G. A. M., De Maria y Campos, D. M., Benitez, F. J. C., Hernández, D. T., Flores, M. S., Campos, C. J., Muñoz, L. J. L. y García, B. A. M. 2014. Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.14: 281.
- Avila, A. J. G., de Liverant, J. G., Martínez, A., Martínez, G., Muñoz, J. L., Arciniegas, A. y Romo de Vivar, A. 1999. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 66(1): 75–78.
- Baccarin, T., Mitjans, M., Ramos, D., Lemos-Senna, E. y Vinardell, M. P. 2015. Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B, Biology*. 153: 127-136.
- Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C., Farías, M., Goñy, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C. y Miranda, H. 2008. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *Journal of Ethnopharmacology*. 119(1): 160-165.

- Bae, J.Y., Choi, J. S., Kang, S. W., Lee, Y. J., Park, J. y Kang, Y. H. 2010. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Experimental Dermatology* 19(8):182-190.
- Bai, L. y Zhu, W.G. 2006. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules*. 2: 141-153.
- Baldea, I., Mocan, T. y Cosgarea, R. 2009. The role of ultraviolet radiation and tyrosine stimulated melanogenesis in the induction of oxidative stress alterations in fair skin melanocytes. *Experimental Oncology*. 31(4): 200-208.
- Benavides, F., Oberyszyn, T. M., Vanbuskirk, A. M., Reeve, V. E., Kusewitt, D. F. 2009. The hairless mouse in skin research. *Journal of Dermatological Science* 53(1): 10-18.
- Benavides, T., Mitjans, M., Martínez, V., Clapés, P., Infante, M. R., Clothier, R. H. y Vinardell, M. P. 2004. Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: and in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. *Toxicology*. 197(3): 229-237.
- Benjamin, C. L. y Ananthaswamy, H. N. 2007. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 224(3): 241-248.
- Benlloch, S., Payá, A., Alenda, C., Bessa, X., Andreu, M., Jover, R., Castells, A., Llor, X., Aranda, F. I. y Massutí, B. 2006. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *The Journal of Molecular Diagnostics; JMD*. 8(5):540-543.
- Besaratinia, A. y Pfeifer, G. P. 2006. Investigating human cancer etiology by DNA lesion footprinting and mutagenicity analysis. *Carcinogenesis*. 27(8): 1526-1537.
- Besaratinia, A. y Pfeifer, G.P. 2009. DNA-lesion mapping in mammalian cells. *Methods*. 48(1): 35-39.
- Besaratinia, A. y Pfeifer, G.P. 2010. Applications of the human p53 knock-in (Hupki) mouse model for human carcinogen testing. *Journal FASEB*. 24(8):2612-2619.

- Bickers, D. R. y Athar, M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *The Journal of Investigative Dermatology*. 126(12): 2565-2575.
- Bissett, D. L., Hannon, D. P. y Orr, T. V. 1987. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochemistry and Photobiology*. 46(3):367-378.
- Bjarnadottir, H. y Jonsson, J. J. 2005. A rapid real-time qRT-PCR assay for ovine-beta-actin mRNA. *Journal of Biotechnology*. 117 (2): 173-182.
- Brand, R. M. y Jendrzewski, J. L. 2008. Chronic ethanol ingestion alters xenobiotic absorption through the skin: Potential role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for British Industrial Biological Research Association*. 46(6): 1940-1948.
- Branzei, D. y Foiani, M. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 9(4): 297-308.
- Brown, T., LeMay, H. E., Bursten, B. E. y Buraje, J.R. 2009. Química. La ciencia Central. 11va edición. Pearson Education. EUA.
- Bustin, S. A. 2005. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 5 (4):493-498
- Cabrera, M. C. M. y López-Nevot, M. A. 2006. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*. 29(7):291-298.
- Cachon-González, M. B., Fenner, S., Coffin, J. M., Moran, C., Best, S. y Stoye, J. P. 1994. Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(16): 7717-7721.
- Cadet, J., Sage, E. y Douki, T. 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research*. 57(1-2-3): 3-17.
- Calò, R. y Marabini, L. 2014. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT

cells). *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.* 132: 27-35.

Camacho, D., Nahed, J., Ochoa, S., Jiménez, G., Soto, L., Grande, D., Pérez-Gil, F., Carmona, J., Aguilar, C. 1999. Traditional knowledge and fodder potential of the genus *Buddleia* in the Highlands of Chiapas, Mexico. *Animal Feed Science and Technology.* 80 (2): 123-134.

Cano, G. A., Gómez. F. J., Álvarez, N., Sánchez-Pedreño, P. y Vicente, V. 2010. Modelo de fotocarcinogénesis cutánea en ratones SKH-1 por radiación ultravioleta. *Revista Española de Patología.* 43(4): 191-195.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. y Mitchell, J. B. 1987a. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research.* 47(4): 936-942.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. y Mitchell, J. B. 1987b. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivi

Carrascosa, J.M. 2011. The future makes present in sunscreen protection. *PIEL.* 26(7): 311-314.

Chen, A.C., Halliday, G. M. y Damian, D. L. 2013. Non-melanoma skin cancer: carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology.* 45(3): 331-341.

Chen, C., Shen, G., Hebbar, V., Hu, R., Owour, E. D. y Kong, A. N. 2003. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis.* 24(8): 1369-1378.

Chilampalli, C., Guillermo, R., Zhang, X., Kaushik, R., Young, A., Zeman, D., Hildreth, M., Fahmy, H. y Dwivedi, C. 2011. Effects of magnolol on UVB-induced skin cancer development in mice and its possible mechanism of action. *BMC Cancer.* 11:456-473.

Cho, J. W., Park, K., Kweon, G. R., Jang, B. C., Baek, W. K., Suh, M. H., Kim, C. W., Lee, K.S. y Suh, S. I. 2005. Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. *Experimental & Molecular Medicine.*

37(3): 186-192.

Choi, J., Shin, K.M., Park, H.J., Jung, H.J., Kim, H. J., Lee, Y. S., Rew, J. H. y Lee, K. T. 2004. Antiinflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringing. *Planta Medica*. 70(11):1027–1032.

Choi, H. S., Park, E. D., Park, Y. y Suh, H. J. 2015. Spent coffee ground extract suppresses ultraviolet B-induced photoaging in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 153: 164-172.

Chu, D.H. 2013. Desarrollo y estructura de la piel. En: Wolf, K., Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A.S., Leffell D. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo I. 8ª Edición. Editorial Medica Panamericana.

Conney, A.H., Lu, Y. R., Kawasumi, M. y Nghiem, P. 2013. Mechanisms of Caffeine-Induced Inhibition of UVB Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology*. 3:144

Corona Velazquez, Jaina Nickte. Efecto de los eventos lluviosos en la respuesta estomatica de *Buddleia cordata* H.B.K. (Loganiaceae) y *Verbesina virgata*, Cav. (Compositae) del Pedregal de San Angel, México, 1999. 56, [2] p. : il.

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Cotelle, N., Vézín, H., Demigné, C. y Rémesy, C. 2003. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 284(6): 980-988.

Crew, F. A. E. y Mirskaia, L. 1931. The character “hairless” in the mouse. *Journal of Genetics*. 25(1): 17-24.

Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). En: Buchanan, B. B., Grisseem, W. y Jones, R. L. (Eds). *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologist. Estados Unidos. 1367 p.

Das, S. K. y Vasudevan, D. M. 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences*. 81(3): 177-187.

De Gálvez, M. V. 2010. Antioxidants in photoprotection: Do they really work. *Actas Dermo-sifiliográficas*. 101(3):197–200.

Deepak, M., Umashankar, D. C., Handa, S. S. 1999. Verbascoside-A promising phenylpropanoid. *Indian Drugs*. 36(6): 336–345.

De la Paz P., O., C. y G. Corral., 1980. "Estudio anatómico de la madera de 11 especies de angiospermas". *Boletín Técnico del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales*. núm. 64. 80 pp.

de Laat, A., van Tillburg, M., van der Leun, J. C., van Vloten, W. A. y de Gruijl, F. R. 1996. Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochemistry and Photobiology*. 63(4): 492-497.

Ding, M., Zhao, J., Bowman, L., Lu, Y. y Shi, X. 2010. Inhibition of AP-1 and MAPK signaling and activation of Nrf2/ARE pathway by quercitrin. *International Journal of Oncology*. 36(1): 59-67.

Dreosti, I. E. 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*. 16(7-8): 692-694.

Duynstee, H. I., de Koning, M. C., Ovaa, H., van der Marel, G. A. y van Boom, J. H. 1999. Synthesis of Verbascoside: A Dihydroxyphenylethyl Glycoside with Diverse Bioactivity. *European Journal of Organic Chemistry*. 10: 2623–2632.

Ebrahimzadeh, M. A., Enayatifard, R., Khalili, M., Ghaffarloo, M., Saeedi, M. y Yazdani, C. J. 2014. Correlation between Sun Protection Factor and Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of some Medicinal Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 13(3): 1041-1047.

Ege, S. 1998. *Química orgánica: estructura y reactividad*. Tomo 2. Reverté. España. 720 p.

Egeblad, M. y Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. 2(3): 161-174.

El-Abaseri, T. B., Putta, S. y Hansen, L. A. 2006. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the

epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis*. 27(2): 225-231.

Elder, D., Elenistas, R., Jaworsky, C., Johnson, B. 1997. *Lever's Histopathology of the skin*. 8va edición. Lippincott-Raven. Estados Unidos. 1073 p.

Erali, M., Voelkerding, K. V. y Wittwer, C. T. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*. 85(1):50-58.

Esposito, E., Dal Toso, R., Pressi, G., Bramanti, P., Meli, R. y Cuzzocrea, S. 2010. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*. 381(1):93–105.

Ferrándiz C. 2009. *Dermatología Clínica*. 3ra Edición. ELSEVIER. España. Pag. 1-10.

Filho, A. G., Morel, A. F., Adolpho, L., Ilha, V., Giralt, E., Tarragó, T. y Dalcol, II. 2012. Inhibitory effect of verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. *Phytother Research*. 26(10)::1472–1475.

Funes, L., Laporta, O., Cerdán-Calero, M. y Micol, V. 2010. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid membranes. *Chemistry and Physics of lipids*. 163(2): 190-199.

Funes, L., Fernández-Arroyo, O., Laporta, A., Pons, E., Roche, A., Segura-Carreto, A., Fernández-Gutiérrez, A. y Mico, V. 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry*. 117(4): 589–598.

Gallagher, C. H., Canfield, P.J., Greenoak, G.E. y Reeve, V. E. 1984. Characterization and histogenesis of tumors in the hairless mouse produced by low-dosage incremental ultraviolet radiation. *The Journal of Investigative Dermatology*. 83(3): 169-174.

Gallagher, R.P. y Lee, T.K. 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 92(1):119-131

- García Sánchez F., Aguirre Rivera J.R., Villanueva Díaz J., García Pérez J. Contribución al conocimiento florístico de La Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, México. *Polibotánica*, agosto, 1999. IPN. DF, México. Núm. 10:73 - 103, 1999.
- García-Bores, A. M. y Avila, J. G. (2008) Natural products: Molecular mechanisms in the photochemoprevention. *Revista Latinoamericana de Química*. 36(3): 83-102
- Garro, H. A., García, C., Martín, V. S., Tonn, C. E. y Pungitore, C. R. 2015. A new iridoid, verbascoside and derivatives with inhibitory activity against Taq DNA polymerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25(4): 914–918.
- Georgiev, M. I., Ali, K., Alpieva, K., Verpoorte, R. y Choi, Y. H. 2011. Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry*. 72(16): 2045–2051.
- Gilaberte, Y., Coscojuela, C., Sáenz de Santamaría, M. C. y González, S. 2003. Fotoprotección. *Actas Dermo-sifiliográficas*. 94(5): 271-293
- Gilaberte, Y. y González, S. 2010. Update on Photoprotection. *Actas Dermo-sifiliográficas*. 101(8): 659-672
- Giokas, D. M., Salvador, A. y Chisvert, A. 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 26(5): 360-374
- González, S., Fernández-Lorente, M. y Gilaberte-Calzada, Y. 2008. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*. 26(6): 614-626
- Grujil, F. R. 2002. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB radiation. *Skin Pharmacology and applied skin Physiology*. 15(5): 316-320.
- Grujil, F. R. y Rebel, H. 2008. Early events in UV carcinogenesis--DNA damage, target cells and mutant p53 foci. *Photochemistry and Photobiology*. 84(2): 382-387.
- Grujil, F. R. 1999. Skin cancer and solar UV radiation. *European Journal of cancer*, 35(14):2003-2009.: Rodón, L. J. A. (Ed) *Temas dermatológicos: Pautas diagnósticas y terapéuticas*. Tipografía Olimpia, C. A. Venezuela. 312-332 pp.

- Grujil, F. R., Kranen, H. J. y Mullenders, L. H. F. 2001. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 63(1-3): 19-27.
- Han, L., Ji, L., Boakye-Yiadom, M., Li, W., Song, X. y Gao, X. 2012. Preparative isolation and purification of four compounds from *Cistanches deserticola* Y.C. Ma by high-speed counter-current chromatography. *Molecules*. 17(7): 8276–8284.
- Hansson, J., Lewensohn, R., Ringborg, U. y Nilsson, B. 1987. Formation and removal of DNA cross-links induced by melphalan and nitrogen mustard in relation to drug-induced cytotoxicity in human melanoma cells. *Cancer Research*. 47 (10): 2631-2637.
- Hase, T., Shinta, K., Murase, T., Tokimitsu, I., Hattori, M., Takimoto, R., Tsuboi, R. y Ogawa, H. 2000. Histological increase in inflammatory infiltrate in sun-exposed skin of female subjects: the possible involvement of matrix metalloproteinase-1 produced by inflammatory infiltrate on collagen degradation. *British Journal of Dermatology*. 142(2): 267-273.
- Hebert, J. M. Maffrand, J. P. Taoubi, K., Augereau, J. M. Fouraste, I. y Gleye, J. 1991. Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinasa C. *Journal of Natural Products*. 54(6): 1595-1600.
- Hickman, E.S., Moroni, M. C. y Helin, K. 2002. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* . 12(1): 60-66.
- Hoffmann, M., Geulen, O. y Weilke C. 2008. The LightCycler® 480 real-time PCR system: a versatile platform for genetic variation research. *Nature Methods*. 5(2)
- Hong, H., Sun, J. y Cai, W. 2008. Anatomical and molecular imaging of skin cancer. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 1,1-17
- Guahk, G. H., Ha, S. K., Jung, H. S., Kang, C., Kim, C. H., Kim, Y. B. y Kim, S. Y. 2010. *Zingiber officinale* protects HaCaT cells and C57BL/6 mice from ultraviolet B-induced inflammation. *Journal of Medicinal Food*. 13(3): 673-680.

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., y Horikawa, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 189(1-2): 21-39.

Iglesias D. L., Guerra T. A. y Ortiz R. P. L. 2004. *Tratado de Dermatología*. 2da Edición. Mc Graw Hill Interamericana. España. Pag. 1-11.

Jenkins, G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. 123 (7): 801-810.

Kambayashi, H., Yamashita, M., Odake, Y., Takada, K., Funasaka, Y. y Ichihashi, M., 2001. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *Journal of Dermatological Science*. 27(1): 19-25.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646-674.

Kastan, M. B. y Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432(7015): 316-323.

Katiyar, S. K., Korman, N. J., Mukhtar, H. y Agarwal, R. 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *Journal of the National Cancer Institute*. 89(8): 556-566.

Katiyar, S. K., Meleth, S., Shama, S. D. 2008. Silymarin, a flavonoid from milk thistle (*Silybum marianum* L.), inhibits UV-induced oxidative stress through targeting infiltrating CD11b+ cells in mouse skin. *Photochemistry and Photobiology*. 84(2): 266-271.

Katiyar, S. K., Vaid, M., van Steeg, H. y Meeran, S. M. 2010. Green tea polyphenols prevent UV-Induced Immunosuppression by rapid repair of DNA damage and enhancement of nucleotide excision repair genes. *Cancer Prevention Research*. 3(2):179-189.

Katiyar, S.K. 2008. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(1): 71-76

Katiyar, S., Elmets, C. A. y Katiyar, S. K. 2007. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18(5): 287-296.

Kawasumi, M., Lemos, B., Bradner, J. E., Thibodeau, R., Kim, Y. S., Schmidt, M., Higgins, E., Koo, S. W., Angle-Zahn, A., Chen, A., Levine, D., Nguyen, L., Heffernan, T. P., Longo, I., Mandinova, A., Lu, Y. P., Conney, A. H. y Nghiem, P. 2011. Protection from UV-induced skin carcinogenesis by genetic inhibition of the ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(33): 13716-13721.

Kang, N. J., Lee, K. W., Shin, B. J., Jung, S. K., Hwang, M. K., Bode, A. M., Heo, Y. S., Lee, H. J. y Dong, Z. 2009. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*. 30(2): 321-330.

Kim, S., You, D. H., Han, T. y Choi, E. M. 2014. Modulation of viability and apoptosis of UVB-exposed human keratinocyte HaCaT cells by aqueous methanol extract of laver (*Porphyra yezoensis*). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 141: 301-307.

Kim, T. H., Ananthaswamy, H. N., Kripke, M. L. y Ullrich, S. E. 2003. Advantages of using hairless mice versus haired mice to test sunscreen efficacy against photoimmune suppressions. *Photochemistry and Photobiology*. 78(1): 37-42.

Kirmizibekmez, H., Ariburnu, E., Masullo, M., Festa, M., Capasso, A., Yesilada, E. y Piacente, S. 2012. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Sideritis trojana*. *Fitoterapia*. 83(1): 130-136.

Kochevar, I. E., Taylor, C. R. y Krutmann, J. 2013. Fundamentos de fotobiología y fotoimmunología cutáneas. En: Wolf, K., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B.

A., Paller, A. S. y Leffell, D.J. Fitzpatrick. Dermatología en Medicina General. Tomo I. 8ª Edición. Editorial Medica Panamericana.

Kochevar, I. E. y Taylor, C. R. 2009. Fotofísica, fotoquímica y Fotobiología. En: Freedberg, I., Eisen, A., Wolf, K., Austen, K. F., Goldsmith, L. A., Katz, S. I. Fitzpatrick. Dermatología en Medicina General. Tomo II. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

Korkina, L. G., Mikhal'chik, E., Suprun, M. V., Pastore, S. y Dal Toso, R. 2007. Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylethanoid glycosides. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France) 53(5): 84–91.

Korkina, L. G., De Luca, C., Kostyuk, V. A. y Pastore, S. 2009. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. Current Medicinal Chemistry. 16(30): 3943-3965.

Korkina, L.G. y Pastore, S. 2009. The role of redox regulation in the normal physiology and inflammatory diseases of skin. Frontiers in Bioscience. 1: 123–41.

Korkina, L.G., Pastore, S., Dellambra, E. y De Luca, C. 2013. New molecular and cellular targets for chemoprevention and treatment of skin tumors by plant polyphenols: a critical review. Current Medicinal Chemistry. 20(7):852-68.

Korkina, O., Dong, Z., Marullo, A., Warshaw, G., Symons, M. y Ruggieri, R. 2013. The MLK-related kinase (MRK) is a novel RhoC effector that mediates lysophosphatidic acid (LPA)-stimulated tumor cell invasion. The Journal of Biological Chemistry. 288(8):5364-73.

Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., Lulli, D., Stancato, A., De Luca, C., Pastore, S. y Korkina, L. 2013. Modulation of human keratinocyte responses to solar UV by plant polyphenols as a basis for chemoprevention of non-melanoma skin cancers. Current Medicinal Chemistry. 20(7): 869–879.

Kostyuk, V., Potapovich, A., Suhan, T., De Luca, C., Pressi, G., Dal Toso, R. y Korkina, L. 2008. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. Planta Medica. 74(5): 509-514.

- Kostyuk, V.A., Potapovich, A. I., Suhan, T. O., de Luca, C. y Korkina, L. G. 2011. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 658(2-3): 248–256.
- Kozma, B. y Eide, M. J. 2014. Photocarcinogenesis: an epidemiologic perspective on ultraviolet light and skin cancer. *Dermatologic Clinics*. 32(3): 301-313.
- Krypuy, M., Ahmed, A. A., Etemadmoghadam, D., Hyland, S. J., Australian Ovarian Cancer Study Group, DeFazio, A., Fox, S. B., Brenton, J. D., Bowtell, D. D. y Dobrovic, A. 2007. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. *BMC Cancer*. 7:168.
- Kullavanijaya, P. y Lim, H. W. 2005. Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 52(6): 937-958.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. y Mitchell, R. N. 2008. *Robbins Patología Humana*. 8va Edición. España. ELSEVIER. 956 p.w
- 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(4): 197-207.
- Kurusu, M., Miyamae, Y., Murakami, K., Han, J., Isoda, H., Irie, K. y Shigemori H. 2013. Inhibition of amyloid  $\beta$  aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 77(6):1329–1932.
- Labieniec, M. y Gabryelack, T. 2005. Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hámster cells with chosen polyphenols. *Toxicology Letters*. 155(1): 15-25.
- Lademann, J., Jacobi, U., Suber, C., Weigmann, H. J. y Fluhr, J. W. 2009. The tape stripping procedure—evaluation of some critical parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 72(2): 317–323.
- Latonen, L., Taya, Y. y Laiho, M. 2001. UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene*. 20(46): 6784-6793.

Lautenschlager, S. Wulf, H. C. y Pittelkow M. R. 2007. Photoprotection. *Lancet*. 370(9586): 528-537.

Lauth, M., Uden, A. B., Tofgard, R. 2004. Non-melanoma skin cancer: pathogenesis and mechanisms. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 1(2): 267-272.

Lee, J. K., Kim, J. H., Nam, K. T. y Lee, S. H. 2003. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice. *Journal of Dermatological Science*. 32(3): 171-179.

Lehmann, B., y Meurer, M. 2010. Vitamin D metabolism. *Dermatologic Therapy*. 23: 2-12.

Lei, X., Liu, B., Han, W., Ming, M. y He, Y. Y. 2010. UVB-Induced p21 degradation promotes apoptosis of human keratinocytes. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society of Photobiology*. 9(12):1640-1648.

Leyden, J. 2001. What is photoaged skin?. *European Journal of Dermatology*. 11(2): 165-167

Lever. F. W. 1970. Morfología de las células del infiltrado dérmico. En: Lever, F. W. (Ed.) *Histopatología de la piel*. 5ta edición. Editorial Intermédica. Argentina. 44-50 pp.

Liao, Y., Houghton, P. J., Hoult, J. R. 1999. Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *Journal of Natural Products*. 62(9): 1241-1245.

Lim, H. W. 2013. Reacciones anormales a la radiación ultravioleta: fotosensibilidad inducida por factores exógenos. En: Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B.A., Paller, A. S., Leffell, D.J. y Wolf, K. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo I. 8ª Edición. Editorial Medica Panamericana.

Linden, L. y Lim H. W. 2006. Reacciones dermatológicas causadas por la radiación ultravioleta y la luz visible. En: Hall J. C. Sauer Manual de Enfermedades de la Piel. 9a Edición. Editorial Wolters Kluwer.

Liu, M. y Pelling, J. C. 1995. UV-B/A irradiation of mouse keratinocytes results in p53-mediated WAF1/CIP1 expression. *Oncogene*. 10(190):1955-1960.

Lu, X. y Lane, D. P. 1993. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?. *Cell*. 75(4):765-778.

Madan, V., Lear, J. T. y Szeimies, R. M. 2010. Non-melanoma skin cáncer. *Lancet*. 375(9715): 673-685.

Magal, S. S., Jackman, A., Pei, X. F., Schlegel, R. y Sherman, L., 1998. Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins. *International Journal of Cancer*. 75 (1): 96-104.

Magaña M. G., y Magaña M. L. 2003. *Dermatología*. Editorial Médica Panamericana. México.

Mahlke, J. D., Bolignon, A. A., Machado, M. M., Spader, T. B., Alves, S. H., Canto-Dorow, T. y Athayde, M. L. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. *Quimica Nova*. 32(2):277-281.

Makinen, M. y Stenback, F. 1998. Skin tumor development and keratin expression in different experimental models. Relation to inducing agent and target tissue structure. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*. 50(3): 199-208.

Mallikarjuna, G., Dhanalakshmi, S., Singh, R. P., Agarwal, C. y Agarwal, R. 2004. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. *Cancer Research*. 64(17): 6349-6356.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5): 727-747.
- Martínez, G. Y A. Chacalo, 1994. "Los árboles de la Ciudad de México". Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco. 351 pp.
- Martínez-Vázquez, M., Ramírez, A. T. O., Aguilar, H. y Bye, R. 1996. Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract of the flavone linarin of *Buddleja cordata*. *Planta Medica*. 62(2):137–140.
- Matito, C., Mastorakou, F., Cantelles, J. J., Torres, J. L. y Cascante, M. 2003. Antiproliferative effect on antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *European Journal of Nutrition*. 42(1): 43-49.
- Matsumura, Y. y Ananthaswamy, H. N. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195(3): 298–308
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen M. P., Correa, G., Ono, Y. y Goodarzi, H. 2010. Light, including ultraviolet. *Journal Autoimmun*. 34(3): 247-257.
- McFeat, G. D., Allison, S. L. y McMillan T. J. 2013. Characterisation of the p53-Mediated Cellular Responses Evoked in Primary Mouse Cells Following Exposure to Ultraviolet Radiation. *PloS One*. 8(9): e75800.
- McGivern, A., Wynter, C. V., Whitehall, V. L., Kambara, T., Spring, K. J., Walsh, M. D., Barker, M. A., Arnold, S., Simms, L. A., Leggett, B. A., Young, J. y Jass, J. R. 2004. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Familial cancer*. 3(2): 101-107.
- McGregor, J. M., Hawk, J. L. M., 2001. Efectos agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Fitzpatrick, M. D., Thomas B., Arthur Z., Elsen, M.D., Klaus, Wolff M. D., Irwin M., Fredbeg, M. D. K, Frank Austin, M. D. (Eds). *Dermatología en Medicina General*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Melnikova, V.O. y Ananthaswamy, H.N. 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research*. 571(1-2): 91-106

- Mendoza-Hernandez, P. E. 2002. Sobrevivencia y crecimiento de los estadios iniciales de *Buddleia cordata* (tepozan) en ambientes contrastantes del Ajusco medio, D.F. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México. IX, 89 p.
- Mensah, A. Y., Sampson, J., Houghton, P. J., Hylands, P. J., Westbrook, J., Dunn, M., Hughes, M. A. y Cherry G. W. 2001. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*. 77(2-3): 219-26.
- Mesa, A. M., Rincón, D. C., Toro, J. F., Tamayo, A., Blair, S. y Rojano, B. A. 2011. Actividad antioxidante de *Piper Piedecuestanum* Trel. & Yinck y *Piper Subpedale* Trel & Yunck. *Revista Latinoamericana de Química*. 39(3): 91-99.
- Mitchell, D. L., Byrom, M., Chiarello, S. y Lowery, M. G. 2001. Effects of chronic exposure to ultraviolet B radiation on DNA repair in the dermis and epidermis of the hairless mouse. *The Journal of Investigative Dermatology*. 116(2): 209-215.
- Montagna, W., Chase, H. B. y Melaragno H. P. 1952. The skin of hairless mice I. The formation of cysts and the distribution of lipids. *The Journal of Investigative Dermatology*. 19(1): 83-94.
- Moreno, M. I. y Moreno, L. H. 2010. Fotoprotección. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*. 18: 31-39.
- Navarro Ascencio, Gabriel. Determinación de la calidad nutritiva de cuatro plantas forrajeras (*Amelanchier denticulata*, *Buddleia cordata*, *Cotoneaster pannosa*, *Dodonaea viscosa*) como alternativa para la alimentación de caprinos y ovinos. México, 2001. 36 p.
- Neuman, M. G. 2002. Synergetic signaling for apoptosis in vitro by ethanol and acetaminophen. *Alcohol*. 27(2): 89-98.
- Neuman, M. G., Oruña, L., Coto, G., Lago, G., Nanau, R. y Vincent, M. 2010. Hyaluronic acid signals for repair in ethanol-induced apoptosis in skin cells in vitro. *Clinical Biochemistry*. 43(10-11): 822–826.

Nichols, J. A. y Katiyar, S. K. 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*. 302(2): 71-83

Nolan, T., Hands, R. E. y Bustin, S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 1(3): 1559-1582.

Norman, M., 2000. "Buddlejaceae". In: J.L. Luteyn, M. Flagler Cary y S. Rob Gradstein, eds. *Flora Neotropica*. Monograph 81. The New York Botanical Garden. Bronx. NewYork. 225 pp.

Ocampo-Acosta, G. 2003. Buddlejaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 115. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Olson, E. R., Melton, T., Dickinson, S. E., Dong, Z., Alberts, D. S. y Bowden, G. T. 2010. Quercetin potentiates UVB-Induced c-Fos expression: implications for its use as a chemopreventive agent. *Cancer Prevention Research*.3(7): 876-884.

Oliveras-Ferraro, C., Fernández-Arroyo, S., Vazquez-Martin, A., Lozano-Sánchez, J., Cufí, S., Joven, J., Micol, V., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. y Menendez, J. A. 2011. Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histone H3. *International Journal of Oncology*. 38(6): 1533-1547.

Ouitas, N. A. y Heard, C. M. 2009. A novel ex vivo skin model for the assessment of the potential transcutaneous anti-inflammatory effect of topically applied *Harpagophytum procumbens* extract. *International Journal of Pharmaceutics*. 376(1-2): 63-68.

Oyourou, J-N., Combrinck, S., Regnier, T. y Marston, A. 2013. Purification, stability

and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts. *Industrial Crops and Products*. 43: 820–826.

Pan, Y., He, C., Wang, H., Ji, X., Wang, K. y Liu, P. 2010. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. *Food Chemistry*. 121(2): 497–502.

Passaglia, S.A. y Martins-Menck, C.F. 2010. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 99(3):111–116

Pastore, S., Lulli, D., Fidanza, P., Potapovich, Al., Kostyuk. V. A., De Luca, C., Mikhail'chik, E. y Korkina, L. G. 2012a. Plant polyphenols regulate chemokine expression and tissue repair in human keratinocytes through interaction with cytoplasmic and nuclear components of epidermal growth factor receptor system. *Antioxidants & Redox Signaling*. 16(4): 314-328.

Pastore, S., Lulli, D., Pascarella, A., Maurelli, R., Dellambra, E., Potapovich, A., Kostyuk, V., De Luca, C. y Korkina, L. 2012b. Resveratrol enhances solar UV-induced responses in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*. 88(6): 1522-1530.

Pastore, S., Potapovich, A., Kostyuk, V., Mariani, V., Lulli, D., De Luca, C. y Korkina, L. 2009. Plant polyphenols effectively protect HaCaT cells from ultraviolet C-triggered necrosis and suppress inflammatory chemokine expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1171: 305-313.

Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V. y Girolomoni, G. 2008. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *The Journal of Investigative Dermatology*. 128(6): 1365-1374.

Pattanaargson, S., Munhapol, T., Hirunsupachot, P. y Luangthongaram, P. 2004. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. *Journal of Photochemistry and Photobiology: A Chemistry*. 161(2-3): 269-274.

Perde-Schrepler, M., Chereches, G., Brie, I., Tatomir, C., Postescu, I. D., 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-García, L. J. 2004. Metaloproteinasas y piel. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 95(7): 413-23.

Petrocelli, T., Poon, R., Drucker, D. J., Slingerland, J. M. y Rosen, C. F. 1996. UVB radiation induces p21Cip1/WAF1 and mediates G1 and S phase checkpoints. *Oncogene.* 12(7):1387-1396.

Petrova, A., Davids, L. M., Rautenbach, F., y Marnewick, J. L. 2011. Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.* 103(2):126-139.

Pfeifer G. P., Denissenko, M. F. y Tang M. 1998. PCR-based approaches to adduct analysis. *Toxicology Letters.* 102-103: 447-451.

Pfeifer, G.P., You, Y. H., Besaratinia, A. 2005. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Research.* 571(1-2): 19–3.

Pfeifer, G.P. y Besaratinia, A. 2012). UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry y Association and the European Society for Photobiology.* 11(1): 90-97

Pinnell, S. R. 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 48(1): 1-19.

Potapovich, A. I., Kostyuk, V. A., Kostyuk, T. V., de Luca, C. y Korkina, L. G. 2013. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society.* 62(8): 773-780.

Potapovich, A. I., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, V. A., De Luca, C., Pastore, S. y Korkina, L. G. 2011. Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription

factors NF $\kappa$ B and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 255(2): 138-149.

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J. J. y Fisher, G. J. 2009. Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*. 14(1): 20–24.

Quintana, H. T., Bortolin, J. A., Ribeiro, D. A. y De Oliveira, F. 2014. Systemic host response following skin burn injury in rats: cytotoxicity and genotoxicity evaluation. *In Vivo*. 28(6): 1065-1070.

Quintanar, A., C. De la Paz, P., de la Cruz, I. L. y Razo, D., 1996. "Anatomía de la madera de ocho especies de angiospermas de clima templado". *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 58: 5-14.

Ramón, G. E. 2006. Técnicas básicas de cultivo de células y tejidos animales. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Morfología. Lab de Citopatología Ambiental. México.

Randhawa, M., Southall, M. y Tucker Samaras, S. 2013. Metabolomic analysis of sun exposed skin. *Molecular bioSystems*. 9(8): 2045-2050.

Rangel, M.C., Da Silva, S.D., Pereira, N.C., Dominguez, M. V. 2008. Essentials of Molecular Biology in Cancer Research. *Applied Cancer Research*. 28(1):2-10.

Rao, C. V., Wang C. X., Simi, B., Lubet, R., Kelloff, G., Steele, V. y Reddy, B. S. 1997. Enhancement of experimental colon cáncer by genistein. *Cancer Research* 57(17): 3717-3722.

Rastogi, R.P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., Shinha R. P. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*. 2010: 1-32.

Reddy, K. K., Lenzy, Y. M., Brown, K. L. y Gilchres, B. A. 2013, Consideraciones raciales: la piel de color. En: Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B. A., Paller, A. S., Leffell, D.J. y Wolf, K. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo I. 8ª Edición. Editorial Medica Panamericana.

- Reed, G.H., Kent, J.O. y Wittwer, C.T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 8(6): 597-608.
- Reichrath, J. 2009. Skin cancer prevention and UV-protection: how to avoid vitamin D-deficiency? *Br Journal of Dermatology*. 161(3): 54-60
- Reunanen, N., Foschi, M., Han, J. y Kahari, V. M. 2000. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(44): 34634-34639.
- Reyes, E. y Vitale, M. A. 2012. Advances in photoprotection. Molecular mechanisms. *PIEL*. 28(4):235-247
- Rigel, D. S. Dzubow, L. M. Reintgen, D. S. y Bystry, J. 2006 *Cáncer de Piel*. Elsevier. España. 728 p.
- Robbins, S. L., Cotran, R. S. y Kumar, V. M. D. 2008 *Patología estructural y funcional*. 8va edición. Editorial Elsevier. España. pp. 1517.
- Rodón L.A.J., Oliver, L.M., Jacobo, T.F. 2001. Examen dermatológico y funciones de la piel. En: Rodón L.J.A. *Temas dermatológicos: Pautas diagnósticas y terapéuticas*. Tipografía Olympia, C. A. Pag. 7-22.
- Roelandts, R. 2009. Photodermatology. Quo vadis?. *Actas Dermo-sifiliográficas*. 100(1): 66-72.
- Romero Rangel, Silvia, Aguilar Rodríguez Silvia y Rojas Zenteno Ezequiel. *Buddleja cordata* H.B.K. ssp. *Chordata* (Buddlejaceae): Propagación y anatomía de la madera. México, 2003. Número 16, pp 63-77.
- Roos, W.P. y Kaina, B. 2013. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*. 332(2): 237-248.
- Rosas Aguirre Francisco. *Caracterización químico-nutricional y aporte de follaje de Buddleia skutchii en la zona borreguera de Los Altos de Chiapas*. Mexico, 2000. 64, VI p. : il.

Roy, S., Deep, G., Agarwal, C., Agarwal, R. 2012. Silibinin prevents ultraviolet B radiation-induced epidermal damages in JB6 cells and mouse skin in a p53-GADD45 $\alpha$ -dependent manner. *Carcinogenesis*. 33(3):629-636.

Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski, y colaboradores, 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), México. 1406 pp.

Rzedowski, G., J. Rzedowski y colaboradores, 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2ª. ed. Instituto de Ecología A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán. México. pp. 546-550.

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México, D.F. 431 pp.

Saewan, N. y Jimtaisong, A. 2015. Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 14(1): 47-63

Salucci, S., Burattini, S., Curzi, D., Buontempo, F., Martelli, A. M., Zappia, G., Falcieri, E. y Battistelli M. 2014. Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*. 141:1-9.

Saimaru, H. y Orihara, Y. 2010. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea*. *Journal of Natural Medicine*. 64(2): 139-145.

Sam, K.K. Gan, C. P., Yee, P. S., Chong, C. E., Lim, K. P., Karen-Ng L. P., Chang, W. S., Nathan, S., Rahman, Z. A., Ismail, S. M. y Cheong, S. C. 2012. Novel MDM2 splice variants identified from oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 48(11):1128-1135.

Sambandan, D. R. y Ratner, D. 2011. Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 64(4): 748-758.rigebai

Sanginés, G. L., Nahed, T. J., Juárez, S. M. E. y Pérez - Gil, R. F. 2007. In vivo and in situ digestibilities and nitrogen balance of *Buddleia skutchii* as a sole

component and mixed with *Pennisetum clandestinum* in sheep diets. *Small Ruminant Research*. 69(1-3): 129 - 135.

Sanginés García Leonor. Potencial nutricional del follaje de *Buddleia skutchii* (hojas y pecíolos) en la alimentación de ovinos y análisis de las variables ruminales. México, 2001. 52 p.

Sarkany, R.P.E. 2011. Ultraviolet Radiation and the Skin. *Encyclopedia Environ Health*. 469-482.

Satyanarayana, A. y Kaldis P. 2009. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 28(399): 2925-2939.

Savi, L. A. Barardi, C. R., Simões, M. O. 2006. Evaluation of antiherpetic activity and genotoxic effects of tea catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(7):2552-2557.

Scheinfeld, N., De Leo, V.A. 2006. Factores etiológicos en el cáncer de piel: ambientales y biológicos. En: Rigel, S.D., Friedman, R.J., Dzubow, L.M., Reintgen, D.S., Bystryń Jean-Claude., Marks R. *Cáncer de piel*. ELSEVIER Saunders.

Schlauer, J., Budzianowski, J., Kukulczanka, K. y Ratajczak, L. 2004. Acteoside and related phenylethanoid glycosides in *Byblis liniflora* Salisb. Plants propagated in vitro and its systematic significance. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 73(1): 9-15.

Schröterova, L., Králova, V., Vorácova, A., Hasková, P., Rudolf, E. y Cervinka, M. 2009. Anti proliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicology In Vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 23(7): 1406-1411.

Schwarz, M. Münzel, P. A. y Braeuning, A. 2013. Non-melanoma skin cancer in mouse and man. *Archives of Toxicology*. 87(5): 783-798

Seo, E. S., Oh, B. K., Pak, J. H., Yim, S. H., Gurunathan, S., Kim, Y. P. y Lee, K.J. 2013. Acteoside improves survival in cecal ligation and puncture-induced septic

mice via blocking of high mobility group box 1 release. *Molecules and Cells*. 35(4): 348-354.

Serpone, N., Dondi, D. y Alvinì, A. 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta*. 360 (3): 794-802.

Sharma, M.R., Werth, B. y Werth, V. P. 2011. Animal Models of Acute Photodamage: Comparisons of Anatomic, Cellular and Molecular Responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c Mice. *Photochemistry and Photobiology*. 87(3): 690-698.

Shibata, A., Nakagawa, K., Yamanoi, H., Tsuduki, T., Sookwong, P., Higuchi, O., Kimura, F. y Miyazawa, T. 2010. Sulforaphane suppresses ultraviolet B-induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 21(8): 702-709.

Steele, R. J. C. y Lane, D. P. 2005. p53 in cancer: A paradigm for modern management of cancer. *Surgeon*. 3(3):197-205.

Stevens, A., Lowe, J. S. y Young, B. 2003. Wheater. *Histopatología Básica. Atlas y texto en color*. 4ta edición. ELSEVIER. Madrid, España. 295 p.

Stevenson, D. E., Hurst, R. D. 2007. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more?. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64(22): 2900-2916.

Svobodová, A., Zdarilová, A. y Vostálová, J. 2009. *Lonicera caerulea* and *Vaccinium myrtillus* fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage. *Journal of Dermatological Science*. 56(3): 196-204.

Talorete, T. P., Bouaziz, M., Sayadi, S. e Isoda, H. 2006. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology*. 52(3): 189-198.

Taskova, R. M., Gotfredsen, C. H. y Jensen, S. R. 2005. Chemotaxonomic markers in *Digitalideae* (Plantaginaceae). *Phytochemistry*. 66(12):1440-1447.

Taylor, L. P. y Grotewold E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*. 8(3): 317-323.

Tedesco, A. C., Martínez, L. y González, S. 1997. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30(5): 561-575

Thitilertdecha, P., Guy, R. H. y Rowan, M. G. 2014. Characterisation of polyphenolic compounds in *Clerodendrum petasites* S. Moore and their potential for topical delivery through the skin. *Journal of Ethnopharmacology*. 154(2): 400–407.

Thitilertdecha, P., Rowan, M. G. y Guya. R. H. 2015. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant – *Clerodendrum petasites* S. Moore. *International Journal of Pharmaceutics* 478(1): 39–45.

Tokino, T. y Nakamura, Y. 2000. The role of p53-target genes in human cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 33(1),1-6.

Tomas, D. 2009. Apoptosis, UV-radiation, precancerosis and skin tumors. *Acta medica et biologica*. 63(2) 5-8.

Torres, J. L., Lozano, C., Julià, L., Sánchez-Baeza, F. J., Anglada, J. M., Centelles, J. J. y Cascante, M. 2002. Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10(8): 2497-2509.

Torres, J. L., Varela, B., García, M. T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J. J., Cascante, M., Sort, X. y Bobet, R. 2002b. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(26): 7548-7555.

Trujillo, O., Vanezi, P. y Cermignani, M. 1996. Photometric assessment of skin colour and lightness using a tristimulus colorimeter: reliability of inter and intra-

investigator observations in healthy adult volunteers. *Forensic Science International*. 81(1): 1-10.

Tsoyi, K., Park, H. B., Kim, Y. M., Chung, J. I., Shin, S. C., Lee, W. S., Seo, H. G., Lee, J. H., Chang, K. C. y Kim, H. J. 2008. Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression and PGE2 production through regulation of the nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(19): 8969-8974.

Uitto, J. 2008. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *Journal of drugs in dermatology*. 7(2):12-16.

UNIPROT: Universal Protein Resource. <http://www.uniprot.org/>.

Valenzuela, L. K. y Espinoza, P. M. 2012. Oxidative stress, solar radiation skin carcinogenesis and chemoprotection with polyphenols. *PIEL*. 27(8): 446-452.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. y Berneman, Z. N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. 36(3):131-149.

Vertuani, S., Beghelli, E., Scalambra, E., Malisardi, G., Copetti, S., Dal Toso, R., Baldisserotto, A. y Manfredini, S. 2011. Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules*. 16(8): 7068–7080.

Vink, A. A. y Roza, L. 2001. Biological consequences of cyclobutano pyrimidine dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 65(2-3): 101-104.

Vogelstein, B., Lane, D., y Levine A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*. 408(6810): 307-310.

Vollhardt, K. P. C. y Schore, N. E. 2002. *Organic chemistry. Structure and function*. 3ra edición. W. H. Freeman and company. Estados Unidos. 1203 p.

Vostálová, J., Zdarilová, A. y Svobodová, A. 2010. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*. 302(3): 171-181.

Vreeswijk, M. P. G., Meijers, C. M., Giphart-Gassler, M., Vrielin, H., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. y Loenen, W. A. 2009. Site-specific analysis of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in nucleotide excision repair-proficient and -deficient hamster cells: Lack of correlation with mutational spectra. *Mutation Research*. 663(1-2): 7-14.

Walker, S. L., Hawk, J. L. M. y Young, A. R. 2005. Efectos agudos y crónicos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Freedberg, I., Eisen, A., Wolf, K., Austen K. F., Goldsmith, L. A. y Katz, S. I. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo II. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

Wang, Z. Y., Huang, M. T., Ferraro, T., Wong, C. Q., Lou, Y. R., Reuhl, K., Iatropoulos, M., Yang, C. S. y Conney, A. H. 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(5): 1162-1170.

Wang, Y. N., Wu, W., Chen, H. C. y Fang, H. 2010. Genistein protects against UVB-induced senescence-like characteristics in human dermal fibroblast by p66Shc down-regulation. *Journal of Dermatological Science*. 58(1): 19-27.

Wartenberg, M., Budde, P., De Mareés, M., Grünheck, F., Tsang, S. Y., Huang, Y., Chen, Z. Y., Hescheler, J. y Sauer, H. 2003. Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology*. 83(1): 87-98.

Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S. y Sickmann, A. 2007. Silver- and Coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis*: 28(12): 2095–2099.

- Wissing, S.A. y Müller, R. H. 2002. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. 81(3): 225-233.
- Wong, M. L. y Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 39 (1): 75-85.
- Wulf, H.C., Sandy-Møller, J., Kobayasi, T., Gniadecki, R. 2004 Skin aging and natural photoprotection. *Micron*. 35(3):185–191.
- Yaar, M. y Gilchrest, B. A. 2013. Envejecimiento de la piel. En: Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. J. y Wolf, K. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo I. 8ª Edición. Editorial Medica Panamericana.
- Yaar, M., y Gilchrest, B. A. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *The British Journal of Dermatology*. 157(5): 874-887.
- Yamaguchi, Y., Brenner, M. y Hearing, V. J. 2007. The regulation of skin pigmentation. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(38): 27557-27561.
- Yamamoto, T., Lewis J., Wahata, J., Dickinson, D., Singh, B., Bollag W. B., Ueta, E., Osaki, T., Athar, M., Shuster, G. y Hsu, S. 2004. Roles of catalase and hydrogen peroxide in green tea polyphenols-induced chemopreventive effects. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308(1): 317-323.
- Yang, B., Kotani, A., Arai, K. y Kusu, F. 2001. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 17(5): 599-604.
- Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M. y Teruel, J. A. 2004. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer*. 49(2): 191-199.
- Young, H. y Yaar, M. 2013. Biología de los melanocitos. En: Goldsmith L.A., Katz, S. I., Gilchrest, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. J. y Wolf, K. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo I. 8ª Edición. Editorial Medica Panamericana.

Yue, H. L., Zhao, X. H., Mei, L. J. y Shao, Y. 2013. Separation and purification of five phenylpropanoid glycosides from *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo by a macroporous resin column combined with high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*. 36(18): 3123–3129.

Zaid, M. A., Afaq, F., Syed, D. N., Dreher, M. y Mukhtar H. 2007. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx, *Photochemistry and Photobiology*. 83(4): 882–888.

Zamzami, N. y Kroemer, G. 2005. p53 in apoptosis control: An introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331(3): 685-687

Zhang, W., Zhang, W.D., Zhang, C., Liu, R.H., Li, T.Z., Fu, P. y Shan, L. 2007. Antitumor activities of extracts and compounds from the roots of *Daphne tangutica*. *Maxim. Phytotherapy Research: PTR*. 21(11):1113–1115.

Zheng, J., Piao, M. J., Kim, K. C., Yao, C. W., Cha, J. W., Shin, J. H., Yoo, S. J. y Hyun, J. W. 2014. Photo-protective effect of americanin B against ultraviolet B-induced damage in cultured human keratinocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 38(3): 891-900.

Zhou, M. J., Zheng, L., Guo, L., Liu, W. L., Lv, C., Jiang, L. H., Ou, C. S. y Ding, Z. H. 2012. Differential responses to UVB irradiation in human keratinocytes and epidermoid carcinoma cells. *Biomedical Environmental Sciences*. 25(5): 583- 589.

<http://www.cancer.gov/espanol> Instituto nacional del cáncer

## 11. Apéndice



© 2016

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 15 (5): 288 - 300

ISSN 0717 7917

[www.blacpma.usach.cl](http://www.blacpma.usach.cl)

Artículo Original | Original Article

### Photoprotective effect of verbascoside from *Buddleja cordata* in SKH-1 mice exposed to acute and chronic UV-B radiation

[Efecto fotoprotector del verbascósido de *Buddleja cordata* en ratones SKH-1 expuestos de forma aguda y crónica a la radiación UV-B]

Adriana Montserrat Espinosa-González<sup>1,2</sup>, Ana María García-Bores<sup>1</sup>, José del Carmen Benítez-Flores<sup>3</sup>, César Enoe Sandoval-Pérez<sup>3</sup>, María del Rosario González-Valle<sup>3</sup>, Carlos L. Céspedes<sup>4</sup> & José Guillermo Avila-Acevedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitoquímica, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Distrito Federal, México

<sup>3</sup>Laboratorio 1, UMF, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

<sup>4</sup>Laboratorio de Fitoquímica Ecológica, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad del BioBio, Chillán, Chile

Contactos | Contacts: Adriana M. ESPINOSA-GONZÁLEZ - E-mail address: [oncydium2000@yahoo.com](mailto:oncydium2000@yahoo.com)

Contactos | Contacts: José G. AVILA-ACEVEDO - E-mail address: [tuncomaclovio2000@yahoo.com.mx](mailto:tuncomaclovio2000@yahoo.com.mx)

**Abstract:** Ultraviolet radiation (UVR) is involved in both sunburn and the development of skin cancer, which has a high incidence worldwide. Strategies to reduce these effects include the use of photoprotective substances. The aim of this work was to investigate the photoprotective effect of verbascoside isolated from the methanolic extract of *Buddleja cordata* (BCME) in SKH-1 mice exposed to acute and chronic UV-B radiation. The mouse dorsal area was evaluated macroscopically and microscopically for diagnosis; verbascoside penetration into mouse skin was investigated *in vivo* by the tape stripping method. After acute UV-B exposure, 100% of irradiated mice that had been protected with verbascoside showed no signs of sunburn or of inflammatory processes. After chronic exposure, 100% of unprotected mice showed skin carcinomas; in contrast, in mice topically treated with either BCME or verbascoside, the presence of lesions was decreased by 90%. These results prove that verbascoside penetrates through the skin of mice and suggest that verbascoside and BCME may potentially prevent photodamage on mice's skin after acute and chronic UVR exposure.

**Keywords:** edema, erythema, photocarcinogenesis, sunburn, verbascoside.

**Resumen:** La radiación ultravioleta (RUV) provoca quemaduras solares y el desarrollo de cáncer de piel. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto fotoprotector del verbascósido obtenido del extracto metanólico de *Buddleja cordata* (EMBC) en ratones SKH-1 expuestos a RUV-B de manera aguda y crónica. El diagnóstico histológico se llevó a cabo en la piel de la zona dorsal de los ratones. La penetración del verbascósido fue cuantificada mediante la técnica de la cinta adhesiva. En el experimento agudo, el 100% de los ratones protegidos con verbascósido no evidenciaron signos de quemadura ni procesos inflamatorios. En el experimento crónico los ratones sin protección e irradiados presentaron carcinomas cutáneos. En contraste en los ratones protegidos con EMBC o verbascósido las lesiones disminuyeron un 90% en ambos grupos. El verbascósido penetró en la piel del ratón. Los resultados sugieren que el EMBC y el verbascósido previenen el foto-daño en la piel de ratones expuestos de forma aguda o crónica a la RUV.

**Palabras clave:** edema, eritema, fotocarcinogénesis, quemadura solar, verbascósido

Recibido | Received: May 20, 2015

Aceptado | Accepted: September 9, 2015

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: March 25, 2016

Publicado en línea | Published online: September 30, 2016.

Declaración de intereses | Declaration of interests: This work was partially financed by Grant IN219612 PAPIIT-DGAPA-UNAM.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: AM Espinosa-González, AM García-Bores, JC Benítez-Flores, CE Sandoval-Pérez, MR González-Valle, CL Céspedes, JG Avila-Acevedo. 2016. Photoprotective effect of verbascoside from *Buddleja cordata* in SKH-1 mice exposed to acute and chronic UV-B radiation. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 15 (5): 288 – 300.

## INTRODUCTION

The skin is the largest organ of the body and, among other functions, acts as a barrier to protect organisms from potentially harmful physical, environmental and biological factors (Randhawa *et al.*, 2013). One of the main physical factors that damage human skin is UV radiation. UVR can be classified according to its wavelength as UV-C (200-280 nm), UV-B (280-320 nm) and UV-A (320-400 nm). UV-C radiation does not reach the surface of the Earth, while UV-B has been identified as the primary etiological agent of skin cancer development (Maverakis *et al.*, 2010).

Harmful effects of UV on the skin can be classified as acute or chronic. These effects depend on the wavelength, skin penetration, and particularly radiation exposure time. Acute effects include dermatosis, immunosuppression, hyperplasia and sunburn involving erythema, edema, blistering and pain; later, flaking and peeling of the skin appears. Sunburn is associated with the classic signs of inflammation: redness, heat, pain and swelling (Kullavanijaya & Lim, 2005). Acute exposure to UV induces various disorders in the skin tissues that can be assessed histologically: epidermal thickening (hyperplasia), the presence of keratinocytes with some degree of disturbance, loss of cell polarity, spongiosis (epithelial edema) and increased melanin synthesis. In the dermis, acute UV exposure induces vasodilation, edema and inflammatory infiltration (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

The dose of UV that causes sunburn is sufficient to cause DNA damage directly by inducing the formation of cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts in the epidermal cells. These mutations often appear in genes with pivotal functions in cell proliferation and differentiation control, such as proto-oncogenes and tumor suppressor genes, and they are the leading long-term cause of skin cancer (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

Chronic effects associated with UV include photoaging and photocarcinogenesis. The reduced levels of collagen, elastic net degradation and moisture loss that characterize the former are collectively known as elastosis (Kircik, 2012). At the macroscopic level, very fine wrinkles and skin thinning are observed due to atrophy of the dermis and loss of subcutaneous adipose tissue; blotches on

the skin also appear due to the reorganization of melanocytes (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

Photocarcinogenesis is a complex phenomenon that involves three distinct stages: initiation, promotion and progression. Each is mediated by molecular, biochemical and cellular changes initiated by the fixation of mutations following genetic defects; they lead to cell cycle abnormalities and the consequent formation of malignant, invasive and metastatic tumors (Matsumura & Ananthaswamy, 2004; Afaq *et al.*, 2005). Skin cancer can be differentiated based on the cell type involved: melanoma cancer (MC) arises from transformed melanocytes and non-melanoma cancer (NMC) from keratinocytes. NMC is divided into two types: basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC). Both have low mortality and metastasis rates, although they are the most common skin cancers and can lead to the destruction of the surrounding tissues (Afaq & Mukhtar, 2006; Hong *et al.*, 2008).

In recent years, some compounds of both natural and synthetic origin have gained considerable attention as photoprotective agents. The use of sunscreens made from natural products is an option for skin care to prevent UV damage (Afaq, 2011). It has been shown that substances produced by plants such as phenylpropanoids, flavonoids and polyphenolic compounds have the ability to absorb UV (Kostyuk *et al.*, 2008). Verbascoside is a phenylpropanoid isolated from various plants, belonging mainly to the *Buddleja* genus (Avila *et al.*, 2005; Adedapo *et al.*, 2009). *Buddleja cordata* Kunth (Scrophulariaceae) is a shrub or tree that is widespread throughout Mexico. This plant is distributed from northern Mexico to Guatemala at altitudes between 1500 and 3000 meters above sea level. People have utilized its leaves as a poultice to treat tumors, abscesses, sores and burns. Decoctions of the roots, leaves, and bark of *B. cordata* have diuretic effects when administered orally, whereas topical application is used to heal wounds and rheumatic pains (Adedapo *et al.*, 2009; Alonso-Castro *et al.*, 2011).

Phytochemical studies of *Buddleja* species have shown the presence of compounds such as sesquiterpenes, flavonoids, phenylethanoids, phenylpropanoids and notably verbascoside (Figure

1) (Martínez-Vázquez *et al.*, 1996; Avila *et al.*, 1999; Acevedo *et al.*, 2000). Previous studies have shown that verbascoside has several biological activities, including anti-inflammatory (Martínez-Vázquez *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2013), neuroprotective (Esposito *et al.*, 2010; Kurisu *et al.*,

2013), anti-tumor (Alipieva *et al.*, 2014), antibacterial (Avila *et al.*, 1999) and antioxidant (Alipieva *et al.*, 2014). As verbascoside absorbs light in the UV region, it can also be considered a sunscreen (Kostyuk *et al.*, 2013; Alipieva *et al.*, 2014).

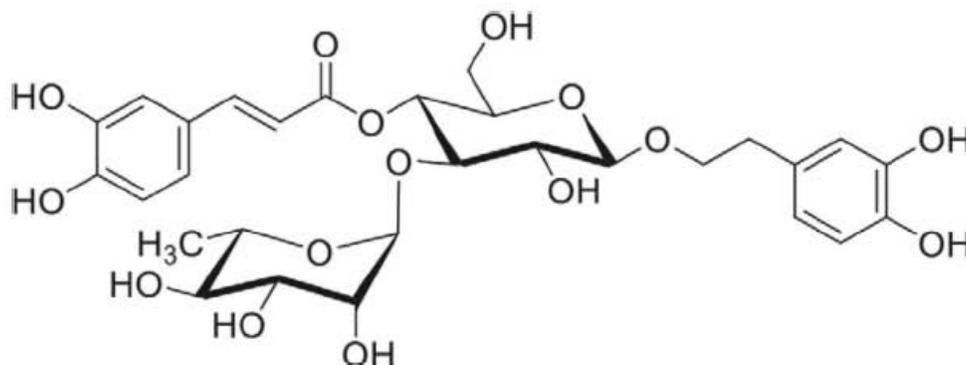


Figure 1  
Chemical structure of verbascoside

Previously, our group showed that methanolic extract of *Buddleja cordata* (BCME) exerts photochemoprotective properties in an animal model using UV-B radiation acute challenge experiments (Avila *et al.*, 2014). In this work, we report the photoprotective effect of verbascoside in acute and chronic challenge experiments, as well as the photoprotective effect of BCME at a chronic level.

## MATERIAL AND METHODS

### BCME preparation and HPLC analysis

*Buddleja cordata* Kunth (Scrophulariaceae) leaves (253 g) were dried, ground and successively extracted with hexane and methanol. The methanolic extract was evaporated under reduced pressure at 55° C to obtain a syrup. The resulting dry residue (29.55 g) was stored at 4° C and is hereafter referred to as *Buddleja cordata* methanolic extract (BCME).

BCME was characterized by HPLC in reverse phase, in agreement with previous work (Avila *et al.*, 2014). Verbasoside (98.75 mg/g), linarin (36.45 mg/g) and syringin are the main compounds present in BCME and served as standards.

### Verbasoside isolation

A 300 g sample of BCME was subjected to column chromatography (CC) on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (19:1) as an eluent, with increasing concentrations of MeOH. Fractions eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1 and 8:2) gave verbascoside (11 g) as a pure amorphous powder,  $[\alpha]_D^{+22}$  -41.5 (MeOH; c 1.1). UV  $\lambda_{max}^{MeOH}$  (nm): 208 (4.30), 217 (4.45), 292 (4.10), 329 (4.25). IR  $\nu_{max}^{KBr}$  (cm<sup>-1</sup>): 3400 (OH), 2932 (C-H), 1701 (conj. ester), 1631 (C=C), 1604, 1521 (aromatic ring). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)  $\delta$  ppm: 0.97 (d, J= 6 Hz, 3H, Me of Rha), 2.70 (t, J=7Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.36 (d, J= 7.2 Hz, 1H, H-1 of Glc), 4.72 (t, J= 9.6 Hz, 1H, H-4 of Glc), 5.03 (d, J= 1.1 Hz, 1H, H-1 of Rha), 6.21 (d, J= 15.8 Hz, 1H, Ar-CH-CH), 6.49-7.01 (6H, aromatic H), 7.47 (d, J= 15.8 Hz, 1H, Ar-CH-CH), 8.69, 8.75, 9.19, 9.62 (4 x OH). Analytical data were identical to the results published for previously isolated verbascoside (Liu & Jia, 1991).

### Experimental animals

The SKH-1 hairless mouse strain is a widely used model for human photocarcinogenesis. Female 5-6



week old, SKH-1 mice (weighing  $26 \pm 5$  g) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) and maintained in a climate-controlled environment with a 12 h light/dark cycle. Five mice were housed per cage and were acclimatized for two weeks before the start of the experiment. Throughout the experimental period, mice had free access to food and water provided through the food chamber on top of the cages. The Institutional Biosecurity and Bioethical Committee approved all animal protocols.

#### ***In vivo* verbascoside penetration study: tape stripping**

Mice were placed in a laminar flux chamber at 21° C and 62% relative humidity for 30 min; an application zone measuring 2x2 cm was marked on the dorsal area of each. Verbascoide was applied to the surface of the skin at 2 mg/cm<sup>2</sup>. Fifteen min after application, the excess substance on the application area was wiped off with a cotton swab; the area was then washed with ethanol 96% and dried. The stratum corneum of the treated areas was removed by four successive tape strippings using Scotch tape strips (19 mm x 32.9 m, 3M, MN, USA). Each stripping was performed in a controlled way, i.e., a 10 g rubber weight was rolled over the tape 10 times prior to removal. The first strip was discarded, and the three subsequent ones were collected and deposited in a 20 mL beaker; 5 mL of ethanol was added to each sample and then stirred with a magnetic bar for 30 min. The absorbance was measured at 320 nm using a double-beam spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda 2S UV/VIS). Verbascoide penetration was calculated from concentration data obtained using a regression analysis performed on absorbance measurements (Wissing & Müller, 2002; Lademann *et al.*, 2009).

#### ***Acute UV-B exposure bioassay***

For acute experiments, the mice were randomly divided into five groups of five animals: untreated (U); negative control treated with ethanol (C-); positive control, treated with ethanol and irradiated UV (C+); experimental group 1, treated with verbascoside (E1-ac); and experimental group 2, treated with verbascoside and irradiated with UV (E2-ac). Control groups were treated topically on the dorsal skin with 200 µL of ethanol. Experimental

groups were treated topically on the dorsal skin with 200 µL of verbascoside dissolved in ethanol at a concentration of 2 mg/mL (Avila *et al.*, 2014).

Fifteen minutes after application of the substances, the C+ and E2-ac groups were irradiated with UV-B lamps (302 nm, UVP, UVM-26, 6 W) positioned 15 cm above their backs for ten minutes. Irradiation at this distance produced a dose of 6 mJ/cm<sup>2</sup>, which was measured using a Spectroline model DM-300HA research radiometer. The parameters evaluated were as follows: erythema, an indicator of sunburn, was observed in unprotected animals 24 h post-irradiation. Animals were subsequently sacrificed by carbon dioxide, and the dorsal skin was dissected and fixed for histological study and diagnosis.

#### ***Chronic UV-B exposure bioassay***

For chronic experiments, the mice were divided into seven groups: untreated (U); negative control (C-); positive control (C+); verbascoside (E1 ch); verbascoside with UV irradiation (E2 ch); BCME (E3 ch); and BCME with UV irradiation (E4 ch).

The experiment lasted 33 weeks, and the mice were administered ethanol, verbascoside and BCME in similar manner to the procedure in the acute experiment. Two UV-B regimens were used. For the first two weeks, the C+, E2 ch and E4 ch groups were irradiated with UV-B daily for one minute at 6 mJ/cm<sup>2</sup> (promotion time). After this time, the mice were irradiated 3 times at week for one minute for 31 weeks (Bissett *et al.*, 1987; Katiyar *et al.*, 1997; Kundoor *et al.*, 2007).

#### ***Assessment of photocarcinogenesis***

The time of appearance and location of tumors were mapped for each mouse. Skin tumor formation, as evidenced by the presence of outgrowths with a diameter of 1 mm or greater, was expressed both as tumor incidence and as average tumor multiplicity (average number of tumors per mouse) for each experimental group. All UV-B irradiated mice bore tumors by week 29; tumor numbers were recorded for 33 weeks. After this time, some groups developed very high tumor numbers; these tumors tended to coalesce, and accurate counting of smaller lesions was no longer possible.

After week 30, tumors progressing to carcinoma (Ca) could still be distinguished from the

larger mass of more benign lesions and could be counted at week 33, after which the study ended. The final tumors were macroscopically classified and confirmed by histological diagnosis as benign wart-like pedunculated, broader-based sessile papillomas, or malignant carcinoma, according to previously described characteristics (Gallagher *et al.*, 1984; Canfield *et al.*, 1988; Hong *et al.*, 2008).

#### *Histological study*

The dorsal skin samples from mice subjected to acute and chronic UV-B exposure bioassays were divided into regions without apparent injury and injured regions and/or tumors. Each skin sample was fixed with 2% paraformaldehyde buffer solution (pH 7.2) for 24 h in a tissue embedding cassette, dehydrated with a sequence of ethanol solutions (70, 80, 95 and 100%, v/v) and embedded in paraffin. Serial sections were cut to a thickness of 5  $\mu\text{m}$ , deparaffined, and stained with hematoxylin-eosin (H&E). Histological changes in each section were observed using multiple microscopic fields and photographed with a photomicroscope (Nikon). Measurements included the epidermal thickness and the number of sunburned cells (400X). Histological diagnosis was performed, comparing the untreated (U) and C- mouse skin samples with the ones from the UV-B irradiated groups. UV-derived histological damage in the epidermis and dermis was classified based on the degree (mild, moderate or severe) and extent (focal, multifocal or diffuse) of the lesions (González *et al.*, 2000). Damage induced by acute UV-B exposure was assessed in both the epidermis and the dermis, including sunburn signs and inflammatory processes. Damage induced by chronic UV-B exposure was assessed in both the epidermis and the dermis. Each injury was described and classified as carcinoma, hyperplasia or actinic keratosis (Rigel *et al.*, 2006).

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed on the collected data. The mean values of C-, C+ and the experimental groups were obtained from descriptive analyses. After histological descriptions, the incidence of damage, injury and/or tumors in both the acute and chronic study were expressed in terms of frequency. The results were analyzed using Student's t test with  $p \leq 0.05$  in Microsoft Excel 2010.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *In vivo verbascoside penetration study*

Verbasoside penetrated  $0.465\% \pm 0.2\%$  ( $9.3 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ ,  $14.4 \pm 2.0 \text{ nmol/cm}^2$ ) into the mouse skin. In a recent study, Thitilertdecha *et al.*, (2014) using a lotion preparation of *Clerodendrum petasites*, determined that verbascoside has a low penetration in human skin  $0.5 \pm 0.03 \text{ nmol/cm}^2$ . Our results suggest that SKH-1 mouse skin is more permeable to verbascoside than human skin, probably because of the thin stratum corneum present in the dorsal area of SKH-1 mice.

### *Acute photoprotection*

Analysis of the histological diagnosis showed that 20% of untreated (U) mice developed edema, which is normal in this animal model. Hyperplasia was observed in 20% of mice of the C- group. Hyperplasia and edema were found in 100% of the histological samples from the irradiated group (C+) and hemorrhage in 20%. Topical application of verbascoside to mouse skin caused a slight increment in hyperplasia (40%). However, edema was lower than in C+ (Figure 2). Therefore, verbascoside protects mice from inflammation generated by UV-B radiation. Figure 3 shows the most representative results of the histological evaluation of SKH-1 hairless mouse skin. The skin from the U, C-, and E1-ac groups showed no histological damage (Figure 3a, Figure 3b and Figure 3c). Skin from UV-B irradiated mice (C+ group) showed severe histological alterations, as previously described for acute UV-B skin damage (González *et al.*, 2000). The histological results revealed edema, apoptotic cells, necrosis, and paraqueratosis. In addition, we found erythrocytes, which are mainly related to congestion in blood vessels (Figure 3d). Furthermore, sunburn cells were observed, namely basal keratinocytes with pyknotic nuclei having an eosinophilic cytoplasm. However, for animals topically treated with verbascoside (E2 ac), skin damage was markedly lower than in the control. Thus, the erythema was eliminated, the collagen fibers were normal, and the vascular damage was reduced (Figure 3e and Figure 3f). Erythema and edema are specific markers of acute UV-B exposure because of the inflammatory reaction. Our results were consistent with the findings reported by Regalado *et al.*, 2011. After acute exposure to UV-B, they found the same histological damage in albino

mouse skin as we did in SKH-1 mice. When they used the lipophilic extract from the seaweed *Thalassia testudinum* Banks & Sol. Ex Koenig

(Hidrocharitaceae) as a photoprotector, the level of protection was also similar to what we obtained in the verbascoside tests.

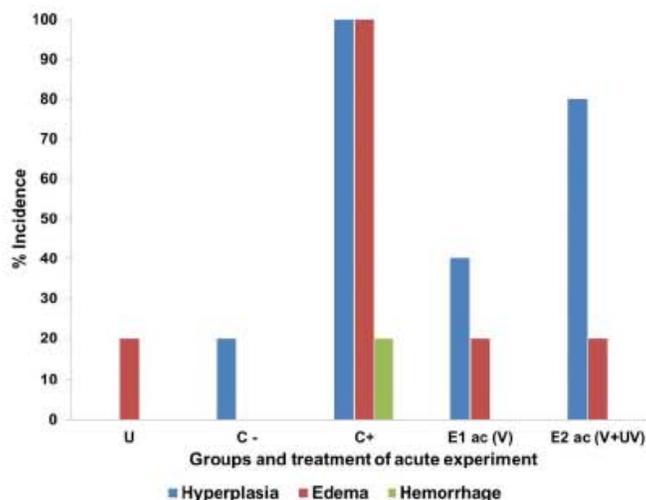


Figure 2

Incidence of lesions according to histological examination in acute bioassay. U: Untreated group, C-: group with ethanol, C+: group mice without protection and irradiated, E1 ac mice with verbascoside and E2 ac mice with verbascoside and irradiated.

#### Chronic photoprotection: Inhibition of carcinogenesis

##### Incidence and multiplicity

The photoprotective effects of verbascoside and BCME against photocarcinogenesis are shown in Figure 4a. In the C+ group, irradiated without protection, tumor onset occurred at week 29 and reached 100% by week 33. Mice treated with verbascoside and BCME before exposure to UV-B showed identical appearance at the onset of tumorigenesis. The occurrence of tumors initiated after 29 weeks, reaching 50% incidence at week 33 in the verbascoside-treated group. In the case of mice treated with BCME, the tumors were also evident from week 29 and reached 40% incidence at week 33. Verbascoide and BCME treatments significantly reduced the number of tumors per mouse compared to C+ throughout the experiment. The mean numbers of tumors at the end of the experiment in the C+, E2

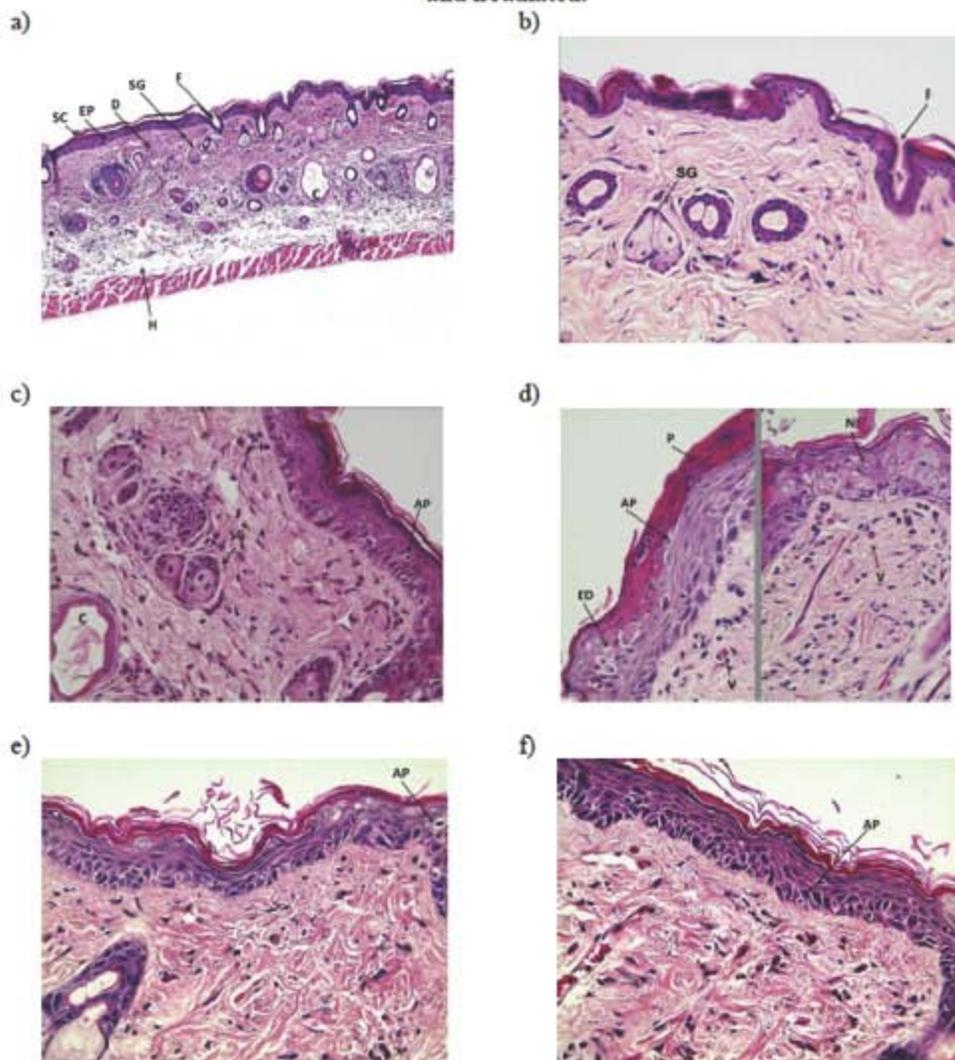
ch (verbascoside+UV) and E4 ch (BCME+UV) treated groups were found to be 15, 8 and 6, respectively (Figure 4b). These results indicated that verbascoside and BCME inhibited skin tumor development in terms of both tumor incidence, to a lesser extent, and tumor multiplicity.

##### Histological diagnosis

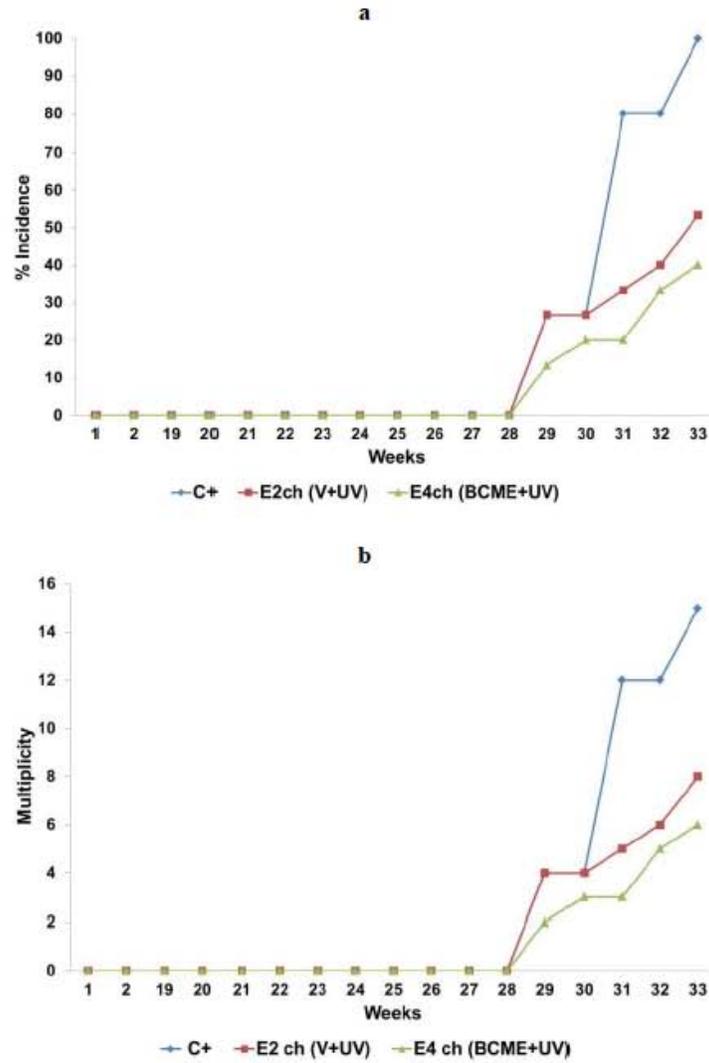
Moreover, histological study showed that 100% of mice in group C+ presented with lesions, corresponding to carcinoma (Ca 100%), hyperplasia (Hp 100%) and actinic keratosis (80%). In E2 ch and E4 ch animals, only 10% of the mice showed carcinomas in both groups. Mice treated with verbascoside (E2 ch) showed lesions classified as hyperplasia (60%) and actinic keratosis (40%), whereas mice administered BCME (E4 ch) typically showed values of 40% and 10%, respectively (Figure 5).

Figure 3

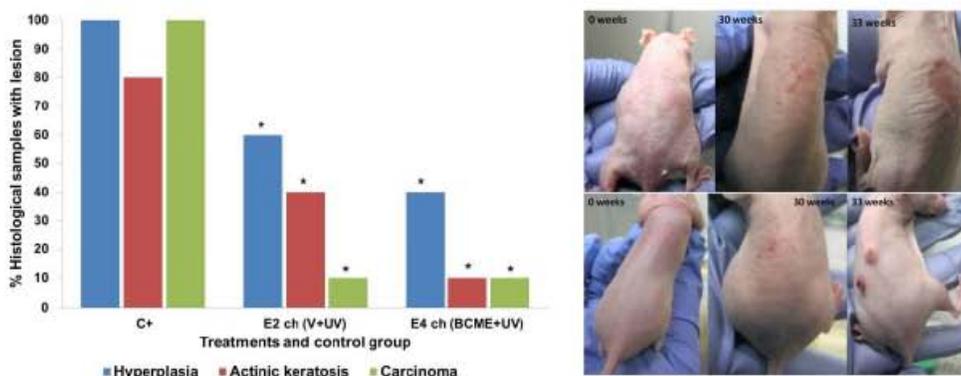
Histological sections representing each group in the acute experiment. a) U: Untreated group, b) C-: group with ethanol, c) E1 ac: group with topical application of verbascoside, d) C+: group without skin protection and irradiated, e) and f) E2 ac: group with verbascoside and irradiated.



AP: apoptotic cells; C: cyst; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; F: follicle; H: hypodermis; N: necrosis; P: paraqueratosis; SC: stratum corneum; SG: sebaceous gland; V: blood vessel. H&E staining, magnification: panel a 100X, panel b-f 400X



**Figure 4**  
**Multiplicity and incidence of skin tumors in mice protected with verbascoside and BCME against chronic UV-B irradiation. Each point represents the mean number of tumors per mouse. C+:** group without UV protection and irradiated; **E2 ch:** group with verbascoside and irradiated; **E4 ch:** group with BCME and irradiated.



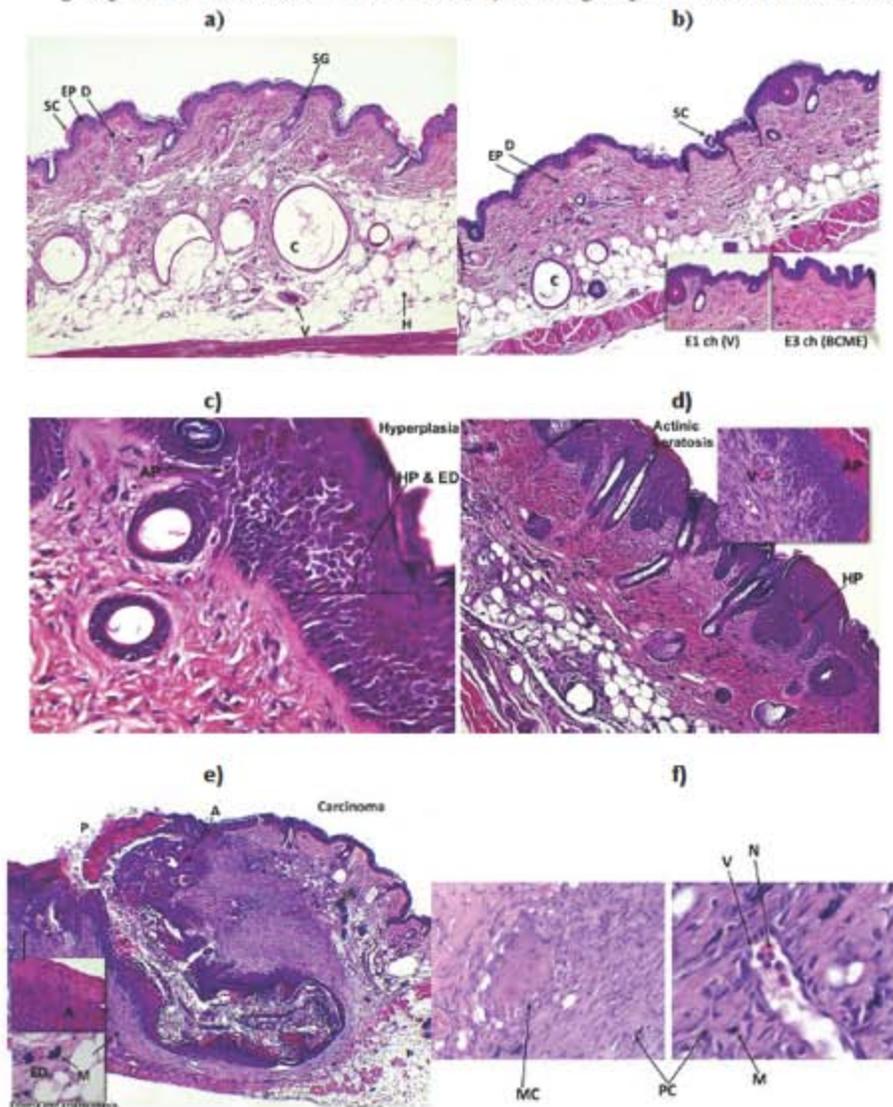
**Figure 5**

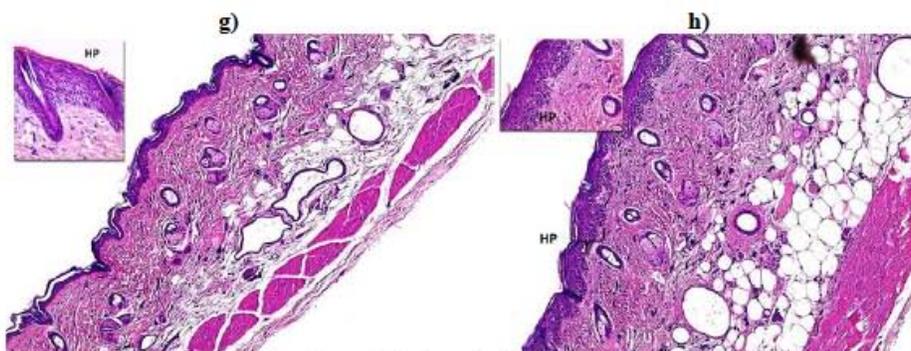
**Histological diagnosis of macroscopic lesions. Data refer to total platelets observed per group. C+:** group without protection and irradiated, **E2 ch:** group with verbascoside and irradiated, **E4 ch:** group with BCME and irradiated (\*  $p \leq 0.05$ ). The images show the progression and different types of injuries sustained in C+ group mice during 33 weeks of the experiment.

Figure 6 shows histological sections of untreated and C- groups considered healthy skin (Panel a and b). The histological sections of types of UV-B injury are shown in Figure 6c, Figure 6d, Figure 6e and Figure 6f. The main feature is the loss of the basal layer and invasion of epithelial cells into the dermis. Furthermore, non-protected mice irradiated chronically with UV-B showed hyperplasia, actinic keratosis and carcinomas, with indicators of carcinoma: angiogenesis, mitotic and pleomorphic cells, mast and neutrophils, the latter in blood vessels. For mice treated with verbascoside and BCME, the main lesion type was benign hyperplasia (Figure 6g and Figure 6h). The difference between these two groups is likely due to the synergistic action of the components of BCME. BCME contains an appreciable quantity of linarin, a compound with anti-inflammatory properties (Martinez-Vazquez *et al.*, 1998), in addition to syringin, a glucoside phenylpropanoid with immunomodulating properties (Sharma *et al.*, 2012). UV-B radiation-induced inflammatory responses lead to increased blood flow and vascular permeability, resulting in edema, erythema, hyperplastic responses, and the activation

of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin (PG) metabolites. Inflammation results in the recruitment of infiltrating leukocytes secreting a variety of proinflammatory cytokines at the UV-irradiated sites and is therefore considered an early event in tumor promotion. Chronic inflammation plays a crucial role in all three stages of tumor development: initiation, promotion, and progression (Kim & He, 2014). Thus, the linarin and syringin present in BCME could inhibit chronic inflammation and thereby act synergistically along with verbascoside, which has sunscreen, antioxidant and anti-inflammatory properties (Alipieva *et al.*, 2014). In experiments with human keratinocyte cultures, Kostyuk *et al.* (2013) showed that verbascoside's molecular characteristics confer the following photoprotective qualities: photostability, direct free radical scavenging and antioxidant effect, rescue of skin antioxidants, and inhibition of UV-derived inflammatory and metabolic responses. Our results indicate that BCME and verbascoside have sunscreen and anti-inflammatory properties *in vivo*. Molecular characteristics of verbascoside contribute to their photoprotection against chronic UV exposure.

**Figure 6**  
**Histological sections representing each group in chronic experiment. a) U: Untreated group, b) C-:**  
**groups E1 ch and E3 ch, c), d), e) and f) C+: group without skin protection and irradiated, g) E2 ch:**  
**group with verbascoside and irradiated, h) E4 ch: group with BCME and irradiated**





A: angiogenesis; AP: apoptotic cells; C: cyst; D: dermis; ED: edema; EP: epidermis; H: hypodermis; HP: hyperplasia; M: mast; MC: mitotic cells; N: neutrophils; P: paraqueratosis; PC: pleomorphic cells; SC: stratum corneum; SG: sebaceous gland; V: blood vessel; Magnification: 100X. Approach 400X, panel f 1000X

## CONCLUSIONS

Our results showed that verbascoside protects against UV-derived damage at both acute and chronic levels. In the acute assay, verbascoside prevented sunburn and histological damage; in the chronic experiments, the results revealed a delay in the onset of tumorigenesis and reduced multiplicity of tumors in BCME- and verbascoside-treated animals. Likewise, lesions in mice treated with BCME and verbascoside were fewer and more benign than in the unprotected controls. This paper is the first report on the photoprotective activity of verbascoside and BCME in a chronic animal model.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The corresponding authors are grateful to Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. This work is part of the Ph. D. requirements for Adriana Montserrat Espinosa-González. The authors are grateful to Edith López Villafranco and Andres Martínez-Cortés for their technical assistance. This work was partially financed by grant IN219612 PAPIIT-DGAPA-UNAM.

## REFERENCES

Acevedo L, Martínez E, Castañeda P, Franzblau S, Timmermann BN, Linares E, Bye R, Mata R. 2000. New phenylethanoids from *Buddleja*

*cordata* subsp. *cordata*. *Planta Med* 66: 257 - 261.

- Adedapo AA, Jimoh FO, Koduru S, Masika PJ, Afolayan AJ. 2009. Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complement Altern Med* 9: 21.
- Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res* 571: 153 - 173.
- Afaq F, Mukhtar H. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol* 15: 678 - 684.
- Afaq F. 2011. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Arch Biochem Biophys* 508: 144 - 151.
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI. 2014. Verbascoside--A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv* 32: 1065 - 1076.
- Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gómez-Sánchez M, Domínguez F, García-Carranca A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol* 133: 945 - 972.

- Avila AJG, de Liverant JG, Martínez A, Martínez G, Muñoz JL, Arciniegas A, Romo de Vivar A. 1999. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 66: 75 - 78.
- Avila AJG, Castañeda CM, Benitez FJ, Durán DA, Barroso VR, Martínez CG, Muñoz LJ, Martínez CA, Romo de Vivar A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* 76: 301 - 309.
- Avila AJG, Espinosa-González AM, de Maria y Campos DM, Benitez-Flores JC, Hernández-Delgado T, Flores-Maya S, Campos-Contreras J, Muñoz-López JL, García-Bores AM. 2014. Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Complement Altern Med* 14: 281.
- Bissett DL, Hannon DP, Orr TV. 1987. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 46: 367 - 378.
- Canfield PJ, Greenoak GE, Macasaet EN, Reeve VE, Gallagher CH. 1988. The characterization of squamous cell carcinoma induced by ultraviolet irradiation in hairless mice. *Pathology* 20: 109 - 117.
- Espósito E, Dal Toso R, Pressi G, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. 2010. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 381: 93 - 105.
- Gallagher CH, Canfield PJ, Greenoak GE, Reeve VE. 1984. Characterization and histogenesis of tumors in the hairless mouse produced by low-dosage incremental ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 83: 169 - 174.
- González S, Vibhagool C, Sherwood M, Flotte TJ, Kollias N. 2000. The phototoxicity of photodynamic therapy may be suppressed or enhanced by modulation of the cutaneous vasculature. *J Photochem Photobiol B* 57: 142 - 148.
- Hong H, Sun J, Cai W. 2008. Anatomical and molecular imaging of skin cancer. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 1: 1 - 17.
- Katiyar SK, Korman NJ, Mukhtar H, Agarwal R. 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst* 89: 556 - 565.
- Kim Y, He YY. 2014. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis* 1: 188 - 198.
- Kircik LH. 2012. Histologic improvement in photodamage after 12 months of treatment with tretinoin emollient cream (0.02%). *J Drugs Dermatol* 11: 1036 - 1040.
- Kostyuk V, Potapovich A, Suhan T, De Luca C, Pressi G, Dal Toso R, Korkina L. 2008. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Med* 74: 509 - 514.
- Kostyuk VA, Potapovich AI, Lulli D, Stancato A, De Luca C, Pastore S, Korkina L. 2013. Modulation of human keratinocyte responses to solar UV by plant polyphenols as a basis for chemoprevention of non-melanoma skin cancers. *Curr Med Chem* 20: 869 - 879.
- Kullavanijaya P, Lim HW. 2005. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol* 52: 937 - 958.
- Kundoor V, Zhang X, Bommareddy A, Khalifa S, Fahmy H, Dwivedi C. 2007. Chemopreventive effects of sarcotriol on ultraviolet B-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Mar Drugs* 12: 197 - 207.
- Kurusu M, Miyamae Y, Murakami K, Han J, Isoda H, Irie K, Shigemori H. 2013. Inhibition of amyloid  $\beta$  aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 1329 - 1332.
- Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW. 2009. The tape stripping procedure—evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 72: 317 - 323.
- Liu ZM, Jia ZJ. 1991. Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis striata*. *Phytochemistry* 30: 1341 - 1344.
- Martínez-Vázquez M, Ramírez Apan TO, Aguilar H, Bye R. 1996. Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *Buddleia cordata*. *Planta Med* 62: 137 - 140.

- Martínez-Vázquez M, Ramírez Apan TO, Lastra AL, Bye R. 1998. A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleja cordata*. *Planta Med* 64: 134 - 137.
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195: 298 - 308.
- Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H. 2010. Light, including ultraviolet. *J Autoimmun* 34: 247 - 257.
- Randhawa M, Southall M, Samaras ST. 2013. Metabolomic analysis of sun exposed skin. *Mol Biosyst* 9: 2045 - 2050.
- Regalado EL, Rodríguez M, Menéndez R, Fernández X, Hernández I, Morales RA, Fernández MD, Thomas OP, Pino JA, Concepción AR, Laguna A. 2011. Photoprotecting action and phytochemical analysis of a multiple radical scavenger lipophilic fraction obtained from the leaf of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Photochem Photobiol* 87: 1058 - 1066.
- Rigel DS, Friedman RJ, Dzubow LM, Reintgen DS, Bystryń RMJC. 2006. *Cáncer de piel*. Ed. 1. Elsevier. Madrid, España.
- Seo ES, Oh BK, Pak JH, Yim SH, Gurunathan S, Kim YP, Lee KJ. 2013. Acteoside improves survival in cecal ligation and puncture-induced septic mice via blocking of high mobility group box 1 release. *Mol Cells* 35: 348 - 354.
- Sharma U, Bala M, Kumar N, Singh B, Munshi RK, Bhalerao S. 2012. Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia*. *J Ethnopharmacol* 141: 918 - 926.
- Thitilertdecha P, Rowan MG, Guy RH. 2014. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant - *Clerodendrum petasites* S. Moore. *Int J Pharm* 478: 39 - 45.
- Wissing SA, Müller RH. 2002. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J Control Rel* 81: 225 - 233.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice

José Guillermo Avila Acevedo<sup>1\*</sup>, Adriana Montserrat Espinosa González<sup>1</sup>, Diana Matamoros De María y Campos<sup>1</sup>, José del Carmen Benitez Flores<sup>2</sup>, Tzasa Hernández Delgado<sup>3</sup>, Saul Flores Maya<sup>4</sup>, Jorge Campos Contreras<sup>5</sup>, José Luis Muñoz López<sup>1</sup> and Ana María García Bores<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** In recent years, there has been considerable interest in using botanical agents to prevent skin damage resulting from solar UV-irradiation. *Buddleja cordata* is a plant that is known as “tepozán”. Some people in Mexico use the leaves of this plant to treat tumours, abscesses, sores and burns. The purpose of this study is to investigate the photoprotective properties of *Buddleja cordata* methanolic extract (BCME) against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice at the macroscopic and histological levels.

**Methods:** BCME was characterised to determine its spectroscopic, chromatographic and antioxidant (DPPH, superoxide and hydroxyl radicals) properties. To conduct the photoprotection studies, BCME was applied topically to the skin of SKH-1 mice before acute exposure to UVB for 10 minutes. The murine skin samples were used for macroscopic and histological studies to assess tissue damage. Penetration of active components of BCME into stratum corneum on the dorsal area of mice was investigated *in vivo* by the tape stripping method. Moreover, genotoxicity of BCME was evaluated in a *Vicia faba* cell root micronucleus model.

**Results:** BCME displayed absorbance over the entire UVB spectrum, and its principal components included verbascoside and linarin. BCME exhibited antioxidant activity and significantly scavenged hydroxyl radicals. BCME reduced erythema, sunburn cell production, vessel congestion and epidermal thickening of UVB irradiated mouse skin. BCME penetrate the skin of mice. BCME did not exhibit genotoxic activity in the micronucleus test.

**Conclusion:** The topical administration of BCME protected against acute UVB-induced damage in mouse SKH-1 skin, and our results suggest that BCME may potentially prevent photodamage.

**Keywords:** *Buddleja cordata*, Phenolics, Antioxidant, UV radiation, Sunburn, Erythema, Photoprotection

## Background

The sun generates various types of radiation via thermo-nuclear reactions, including ultraviolet radiation (UVR). The amount of UVR that crosses the atmosphere and reaches the earth's surface is approximately 6% of the total radiation produced by the sun. The UV spectrum can be divided into UVC (200–280 nm), UVB (280–320 nm) and UVA (320–400 nm) wavelengths. In the

earth's atmosphere, ozone (O<sub>3</sub>), oxygen (O<sub>2</sub>) and water vapour (H<sub>2</sub>O) selectively filter both UVC and UVB radiation. Due to this phenomenon, UVA comprises approximately 95% of the UV radiation that reaches the earth's surface. Currently, almost no UVC radiation penetrates the atmosphere, and approximately 90% of the UVB radiation is absorbed by the ozone layer, depending on the geographic location and time of the day. Because the ozone layer has been depleting by the effects of chlorofluorocarbon (CFC) pollution, more UVB and even some UVC radiation can now reach the earth's surface [1]. UVB has previously been identified as the primary etiologic agent for the development of non-melanoma and

\* Correspondence: tuncomaclovio2000@yahoo.com.mx

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitocímica, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México C.P. 54090, México

Full list of author information is available at the end of the article



melanoma skin cancers. UVB can act as both initiator and promoter of tumours by damaging cellular macromolecules such as DNA. When absorbed by the skin, UVB is able to induce photochemical damage by forming cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts in the DNA of epidermal cells. These photoproducts are the predominant pre-mutagenic events responsible for the initiation of non-melanoma cancers of the skin [2]. DNA damage leads to the altered expression of various gene products involved in protective or reparative processes, such as apoptosis, genomic repair and cell growth arrest. Deregulated sunburn apoptosis, together with the loss of normal function of the product of the p53 gene and immunosuppression, also appear to play an important role in photocarcinogenesis [3]. UVB may initiate the activation of many reactive oxygen species (ROS)-sensitive signalling pathways, thereby causing an increase in the cellular levels of ROS [4]. This increase in oxidative stress results in an imbalance between ROS and the skin's endogenous antioxidant defence system and results in damage to important molecular structures in the cells of the skin, such as DNA, proteins and lipids [5]. Acute exposure to UVB induces sunburn, hyperpigmentation, hyperplasia and inflammatory processes in the skin, including erythema, edema, pain and heat [6]. In recent years, there has been considerable interest in using botanical agents for the prevention of skin damage upon exposure to solar UV-irradiation. The most promising chemical substances are members of the polyphenol family. Recent studies indicate that these substances are photoprotective due to their antioxidant and sunscreen properties. Photochemoprevention, which is defined as the use of agents capable of ameliorating the adverse effects of UVB on the skin by natural compounds, represents a new concept in the attempt to control the process of carcinogenesis. Many photochemoprotective agents have recently been identified from botanical origins and hold promissory value to combat UVR exposure [7].

*Buddleja cordata* H.B.K. ssp. *cordata* (Buddlejaceae) is a shrub or tree that is widespread throughout Mexico [8]. This species grows in quercus, conifers and cloud forests and as secondary vegetation. Because the species is tolerant to drought conditions, it is also found in xerophytic shrublands and eroded soil. This plant is distributed from northern Mexico to Guatemala at altitudes between 1500 and 3000 meters above sea level [9].

In Mexico, *B. cordata* is also known as "tepozan", "matowi" or "wasala", and this plant has been employed for many uses since pre-conquest times. Its use was documented in the Badian codex written by Martin de la Cruz in the 16th century [10]. According to this source, the natives of Mesoamerica used this plant for the treatment of "mentagra" or "chinwelk". In recent times, people have utilised its leaves as a poultice to treat

tumours, abscesses, sores and burns. Decoctions of the leaves, roots and bark are used as a diuretic that is administered orally and applied topically to heal wounds and rheumatic pains [11]. In northern Mexico, the Raramuris (Tarahumara) Indians utilised the wood and bark for treating skin ailments and inflammations as well as for ritualistic medicinal purposes or cultural diseases, such as fright and soul loss [12]. People in Mexico currently use *B. cordata* empirically for the treatment of diseases with cancer symptomatology. Today, such treatments require the use of scientific studies [13].

Previous chemical studies of *B. cordata* have led to the isolation and identification of bioactive flavonoids [14,15], antifungal sesquiterpenoids [16], anti-*Mycobacterium* phenylethanoids [17] and antibacterial phenylpropanoids [18].

Multiple studies have demonstrated the high capacity of several plant polyphenolic compounds (such as flavonoids and hydroxycinnamic acids) to protect living organisms from alterations induced by UV radiation, including skin damage [7]. In particular, there is evidence supporting the notion that phenylpropanoids and flavonoids are endowed with strong photoprotective properties and can efficiently protect skin cells against the deleterious effects of UV light, either as pure molecules or as polyphenolic plant extracts [19].

In a previous research study, we evaluated the photoprotective activity of *Buddleja scordioides* extract and its compounds using bacteria and guinea pigs as experimental systems [20]. The current study was designed to investigate the photoprotective effects of *Buddleja cordata* methanolic extract (BCME) against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice at the macroscopic and histological levels. Moreover, the antioxidant and genotoxic properties of BCME were also evaluated.

## Methods

### Plant material

*B. cordata* leaves were collected in the forested areas of Pedregal de San Angel, near the campus of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The campus is located on the south side of Mexico City. The collection occurred in March 2010 and was authenticated by the corresponding author. A voucher specimen (No. 42663) was deposited at the Ixta Herbarium of the Universidad Nacional Autónoma de México. The plant material was air dried indoors at room temperature before extraction.

### BCME preparation

Leaves of *B. cordata* (253 g) were dried, ground and extracted with hexane and methanol in succession. The methanolic portion was evaporated under reduced pressure at 55°C to obtain a syrup. The resulting dry residue

(29.55 g) was stored at 4°C and is hereafter referred to as *Buddleja cordata* methanolic extract (BCME).

#### UV absorption analysis of BCME

The UV absorption spectrum of BCME was obtained using a UV/VIS spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda 2S UV/VIS). BCME and the commercial organic filter octyl methoxycinnamate (Parsol, ISP VAN DIK) were dissolved in ethanol at a concentration of 60 µg/mL and 10 µg/mL respectively. The samples were placed in a standard quartz cuvette with a 1 cm path length and then quickly scanned with UV light in the range of 200–400 nm.

#### HPLC analysis of BCME

The HPLC system consisted of a Hewlett Packard Series 1100 HPLC instrument with a UV detector set at 320 nm. The column was obtained from Supelco Technologies C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm). The eluent was a mixture of 4% tetrahydrofuran in acetonitrile and water (35:65, v/v) and contained 0.04% phosphoric acid. The flow rate was 1 mL/min, the column temperature and pressure were 23°C and 149 bar, respectively, and the injection volume was 20 µL. Verbascoside, linarin and syringin served as standards.

#### Determination of the total polyphenol content of BCME

The total polyphenol content of the methanolic extract was determined using Folin Ciocalteu's phenol reagent according to the method described previously [21]. The total polyphenols were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of extract.

#### In vitro antioxidant assays

Scavenging of DPPH free radicals was measured using a modification of Lohézic-Le Dévéhat method [22] in which BCME (5–300 µg/mL), gallic acid (0.5–10 µg/mL) and DPPH (250 mM) were dissolved in methanol. At least six different dilutions of extract were tested and allowed to incubate for 20 min in the dark before absorbance was measured at 517 nm in an ELISA lector spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The experiment was conducted in triplicate. The scavenging activity of each concentration was calculated as a percentage of reduction in DPPH concentration as follows:

$$\% \text{ Reduction} = \left[ \frac{(\text{Abs DPPH} - \text{Abs Sample})}{\text{Abs DPPH}} \right] \times 100$$

Where Abs DPPH is the absorbance of the DPPH in methanol, and Abs Sample represents the absorbance of each sample in the presence of each concentration of BCME and gallic acid. Antioxidant activity was expressed as an IC<sub>50</sub> value (inhibitory concentration in µg/mL of sample or positive control necessary to reduce

the absorbance of DPPH by 50% compared to the negative control). The positive control was gallic acid. A lower IC<sub>50</sub> value represents a higher antioxidant activity.

Scavenging of superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) was measured [22] using 96-well microplates and a non-enzymatic technique. The reaction mixture in the sample wells consisted of NADH (78 µM), nitro-blue tetrazolium (NBT) (50 µM), phenazine methosulfate (PMS) (10 µM) and BCME (500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/mL). The reagents were dissolved in 16 mM tris-hydrochloride buffer (pH = 8), except for BCME, which was dissolved in DMSO. After 5 min of incubation at room temperature, the spectrophotometric measurement (Thermo Scientific, USA) was performed at 560 nm against a blank lacking PMS and sample. Gallic acid was used as a positive control. The percentage inhibition at a steady state was used to calculate the IC<sub>50</sub> values for each dilution. This measurement determined the amount of antioxidant required (measured as the concentration of the stock solution added to the reaction mixture) to scavenge 50% of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, with the lowest values representing the best efficiency for scavenging O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. All tests were performed in triplicate, and the results were averaged.

Hydroxyl radical scavenging was measured according to the Halliwell method [23]. Hydroxyl radical (•OH) was generated by a Fenton system (ascorbic acid/FeCl<sub>3</sub> EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Deoxyribose (DR) is degraded to malonaldehyde when exposed to hydroxyl radicals, which generates a pink compound in the presence of thiobarbituric acid at low pH under heat. The reaction mixtures contained the following reagents at the indicated final concentrations (in a final volume of 1 mL): potassium phosphate buffer, pH 7.4 (10 mM), DR (2.8 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.42 mM), BCME at different concentrations, FeCl<sub>3</sub>-EDTA (20 and 100 µM) and gallic acid was used as a positive control. The iron salt was premixed with the chelator and dissolved in water before addition to the reaction mixture. All other components were dissolved in potassium phosphate buffer, pH 7.4 (10 mM). After incubation at 37°C for 1 h, 1 mL of 2.8% (w/v) trichloroacetic acid and 1 mL of 1% (w/v) TBA were added, and the mixture was heated in a water bath at 100°C for 15 min. The absorbance of the resulting solution was measured at 532 nm.

#### Experimental animals and protocol

The SKH-1 hairless mouse strain, a widely used model for human photocarcinogenesis, was used in our study. Female SKH-1 mice at 5–6 weeks of age (weighing 26 ± 5 g) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and maintained in a climate-controlled environment with a 12 h light/dark cycle. Five mice were housed per cage and acclimatized for two weeks before starting the experiment. Throughout the

experimental period, mice had free access to food and water that were provided through the food chamber on top of the cages. The Bioethical Committee/FES Iztacala, UNAM approved all animal protocols.

The SKH-1 mice were randomly divided into five groups of five mice each: untreated (U), negative control (C-), and positive control with UV (C+UV), BCME and BCME irradiated with UV (BMC+UV).

The mice in the negative and positive control groups were treated topically on the dorsal skin with 200  $\mu$ L of ethanol (exposed area: 6 cm<sup>2</sup>). BCME was dissolved in ethanol at a concentration of 2 mg/mL [20]. The BCME groups were treated topically on the dorsal skin with 200  $\mu$ L of the respective test solutions.

Mice that were untreated and pre-treated with ethanol (without UVB irradiation) were used as the normal and negative controls for analysis of normal skin, respectively. A treatment with ethanol and UVB irradiation served as the UVB-induced skin damage positive control. Treatments with BCME served as the experimental groups (without UVB and with UVB irradiation). Fifteen minutes after application of the substances, the C+UV and BCME+UV groups were irradiated with UV-B lamps (302 nm, UVP. UVM-26, 6 W) positioned 15 cm above their backs. Irradiation at this distance produced a dose of 6 mJ/cm<sup>2</sup>, which was measured with a Spectroline model DM-300HA research radiometer. The irradiation-exposure time in acute experiments was ten minutes. After 24 h of irradiation, erythema was measured. Animals were subsequently sacrificed by carbon dioxide asphyxiation, and the dorsal skin was dissected.

#### Erythema measurements

The erythema in mice was calculated by measuring the skin redness of the dorsal area of mice using a colour analyser (Lutron, Mod. RGB-1002). Among the various methods, colourimetry has the advantage of being the simplest and most reproducible method. Redness values were measured 24 hours after irradiation. The results are expressed as redness values for each treatment [24].

#### Histological observation of the skin

Each dorsal skin sample was fixed with 2% paraformaldehyde in phosphate buffer solution (pH 7.2) for 24 h in the tissue embedding cassette, dehydrated with a sequence of ethanol solutions (70%, 80%, 95% and 100%, v/v) and embedded in paraffin. All serial sections were cut to a thickness of 5  $\mu$ m, de-paraffinised, and stained with haematoxylin-eosin (HE). The histopathological changes of each section were observed using multiple microscopic fields and photographed with a photomicroscope (Nikon). Measurements included the epidermal thicknesses and the number of sunburned cells (400X). The histological diagnosis was performed comparing the

untreated and C- mouse skin samples with UVB irradiated groups in accordance with the number of sunburns reported [25].

#### *In vivo* BCME penetration study: tape stripping

Female SKH-1 mice at 5–6 weeks of age ( $n=5$ , weigh on  $26 \pm 5$  g) were placed in a laminar flux chamber at 21°C and 62% relative humidity for 30 min. Application zones measuring  $2 \times 2$  cm<sup>2</sup> was marked for each mouse in dorsal area. The BCME was applied to the surface of the skin at 2 mg/cm<sup>2</sup>. 15 min after an application, the excessive substance on the applied area was wiped off with a cotton swab, followed by washing with ethanol 96% and drying. Stratum corneum of the treated areas was removed by four successive tape strip-pings using Scotch tape strips (19 mm  $\times$  32.9 m, 3 M, MN, USA). Each strip was taken in a controlled way, i.e. a 10 g rubber weight was rolled over it 10 times. The first strip was discarded and the three following strips were collected and deposited in a 20 mL beaker. 5 mL of ethanol were added at each sample and then stirred with a magnetic bar for 30 min. The absorbance was measured at 320 nm using a double-beam spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda 2S UV/VIS) because the BCME main components absorb that wavelength. BCME penetration was obtained in accordance with concentration measurements calculated by regression analysis [26,27].

#### Genotoxicity assay: micronucleus test

Genotoxicity was determinate according to the Ma method [28]. Seeds of *Vicia faba* var. minor that had been previously stored at 4°C were used for this study. Dry seeds of *Vicia faba* were soaked for 24 h in distilled water, the seed coats were removed, and the seedlings were allowed to germinate between two layers of moist cotton. After seven days, the primary roots (approximately 1–2 cm in length) were selected randomly, and 4 seeds were used per treatment. Growing roots were treated for 2, 4, or 8 h with BCME at various concentrations (0.1, 0.2 and 0.4% w/v), followed by a 44 h recovery period. Tap water and 1% glycerine were used as negative controls. The exposure time was 48 h for the negative controls. Each batch was incubated at 22°C. At the termination of the exposure time for each treatment, the roots were cut to approximately 0.5 cm and placed into a Farmer solution (1:3 acetic acid and absolute methanol) at 4°C for 24 hours. The roots were subsequently hydrolysed in 1 N HCl at 55°C to break the bonds of the plant cell wall. The samples were rinsed three times with distilled water to remove the HCl and placed in 70% alcohol at 4°C. The roots were macerated in 45% acetic acid and were then stained for 5 min with 1% orcein acetate for observation via an optical microscope (Nikon). Three thousand cells per experimental group were scored

to determine the mean frequency of micronuclei and the mitotic index. Each experiment was repeated three times. To calculate genotoxicity, the following equations were used: Mitotic Index (MI) TOTAL = number of cells from each phase  $\times$  100/1000 and Micronuclei (MCN) = Number of interphase cells with MCN  $\times$  100/1000.

#### Statistical analysis

A statistical analysis was performed on the collected data. The mean values of the negative and positive controls and the BCME groups were obtained from descriptive analyses, and a One-Way ANOVA test was conducted to obtain *F* values and MS errors. Dunnett's test was used to determine the level of significance in comparison to the negative and positive control values in each experimental series.

## Results and discussion

### BCME characterisation

The presence of phenolic compounds in BCME was quantified using the Folin-Ciocalteu test and yielded 177.13  $\pm$  1.97 mgEq gallic acid/g, which represented 17.71% phenolic compounds present in the extract (Table 1). The content of phenolic compounds in BCME is of the same order of magnitude as that reported for other species of the genus. Mahlke [29] obtained an ethanol extract of *Buddleja thyrsoides* containing 214.07 mg/g, while in Pan [30] an extract of *B. officinalis* containing 113.56 mg/g. *Buddleja* genus plants synthesise phenolic compounds such as flavonoids and phenylpropanoids and are particularly abundant in linarin and verbascoside [14,20]. Verbasco-side and linarin have a strong absorption in the UVB region (291 and 334  $\lambda_{max}$  for verbascoside and linarin, respectively). Because verbascoside also exhibits antioxidant properties, we decided to quantify the content of these compounds in BCME. The results of the HPLC quantitative analysis of BCME are reported in Figure 1. The concentrations of both verbascoside and linarin were significantly high in BCME (98.75 mg/g and 36.45 mg/g, respectively). Syringin was also detected. An efficient photoprotective substance must have a strong absorption in the ultraviolet region to reduce the deleterious effects caused by exposure to sunlight. As observed in Figure 2, BCME exhibited three peaks in the UV region at 224, 290 and 324 nm. These data indicated that BCME absorbed all of the UV-B irradiation and thus displayed a sunscreen

effect because the UVB irradiation is the primary cause of erythema. The results also indicated that BCME at 60  $\mu$ g/mL exhibits similar UV absorption (Abs  $\approx$  0.7) than octyl methoxycinnamate at 10  $\mu$ g/mL. BCME absorbance is significant since it is a mixture whose chromophores (linarin and verbascoside) are diluted in the extract.

### BCME *in vitro* antioxidant activity

Generally, exposure of skin to UV-B radiation results in increased of ROS generation, which contributes to several pathological conditions, including erythema, photocarcinogenesis and photoaging. The antioxidant capacity (IC<sub>50</sub>) of BCME extract was evaluated by DPPH, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and <sup>•</sup>OH radical scavenging assays. The IC<sub>50</sub> values obtained for BCME scavenging effects for the three free radicals are shown in the Table 1. The ability of BCME to scavenge DPPH (IC<sub>50</sub> 64.19  $\mu$ g/mL) and superoxide (IC<sub>50</sub> 133.60  $\mu$ g/mL) radicals was lower than that of gallic acid (IC<sub>50</sub> 2.60 and 30.00  $\mu$ g/mL, respectively). The main antioxidant compound detected in BCME was verbascoside ( $\approx$ 10% of BCME weight). Frum [31] obtained an IC<sub>50</sub> of 7.188  $\pm$  0.12 for verbascoside activity against the DPPH radical. The IC<sub>50</sub> for BCME is consistent with the concentration of verbascoside in BCME.

BCME exhibited excellent <sup>•</sup>OH radical scavenging ability (IC<sub>50</sub> 1.85  $\mu$ g/mL) when compared with gallic acid (IC<sub>50</sub> 335.8  $\mu$ g/mL). Among the ROS, <sup>•</sup>OH is the most reactive species in biological systems and is capable of damaging almost every molecule found in living cells [32], including lipids, polypeptides, proteins and DNA. From the resulting data (Table 1), it is notable that a lesser IC<sub>50</sub> value was obtained for BCME when compared to the IC<sub>50</sub> value of gallic acid (p<0.01). Possible additive or synergistic effects between verbascoside and any component of BCME could explain the observed anti-oxidant IC<sub>50</sub> value of the crude plant extract.

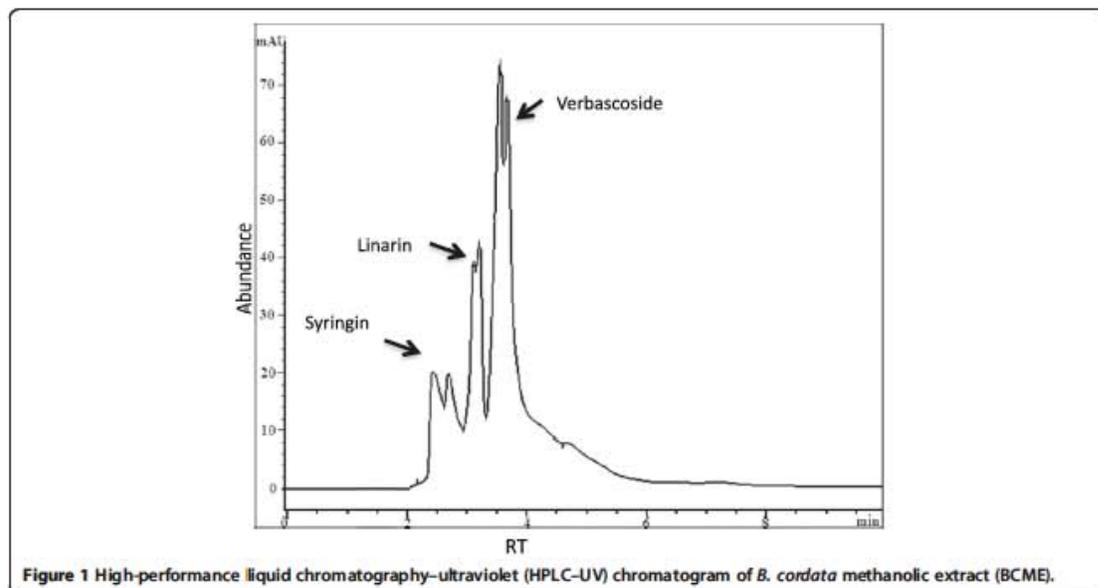
### BCME anti-erythema activity

One of the principal events in acute skin UVB irradiation exposure is the production of erythema (reddish skin). Erythema is visible 24 hours after exposure to UVB. As shown in Figure 3, irradiated unprotected SKH-1 mice exhibited increased skin redness within 24 h of UV exposure. The batches of mice treated with

**Table 1 Total phenolic content, antioxidant properties and penetration of *B. cordata* methanolic extract (BCME)**

Substance	Total phenols (mgEq gallic add)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)			Penetration stripping test	
		DPPH	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	HO <sup>•</sup>	%	$\mu$ g/mL
BCME	177.13 $\pm$ 1.97	64.19 $\pm$ 2.09	133.60 $\pm$ 35.20	1.85 $\pm$ 0.10	0.82 $\pm$ 0.2	33.40 $\pm$ 9.0
Gallic acid	-	2.60 $\pm$ 0.12	30.00 $\pm$ 6.85	335.38 $\pm$ 3.06	-	-

- Not determined.



**Figure 1** High-performance liquid chromatography–ultraviolet (HPLC–UV) chromatogram of *B. cordata* methanolic extract (BCME).

BCME showed less redness than normal, as did the negative and vehicle control groups.

For erythema, the determining factor of skin colour is the extent to which vascular filling occurs, where an increase or decrease in filling results in a greater degree of redness or paleness of the skin, respectively [24]. The presence of sunscreen substances in BCME would cause these differences, as would the presence of compounds exhibiting vasodilator properties, which could also account for the paleness effect.

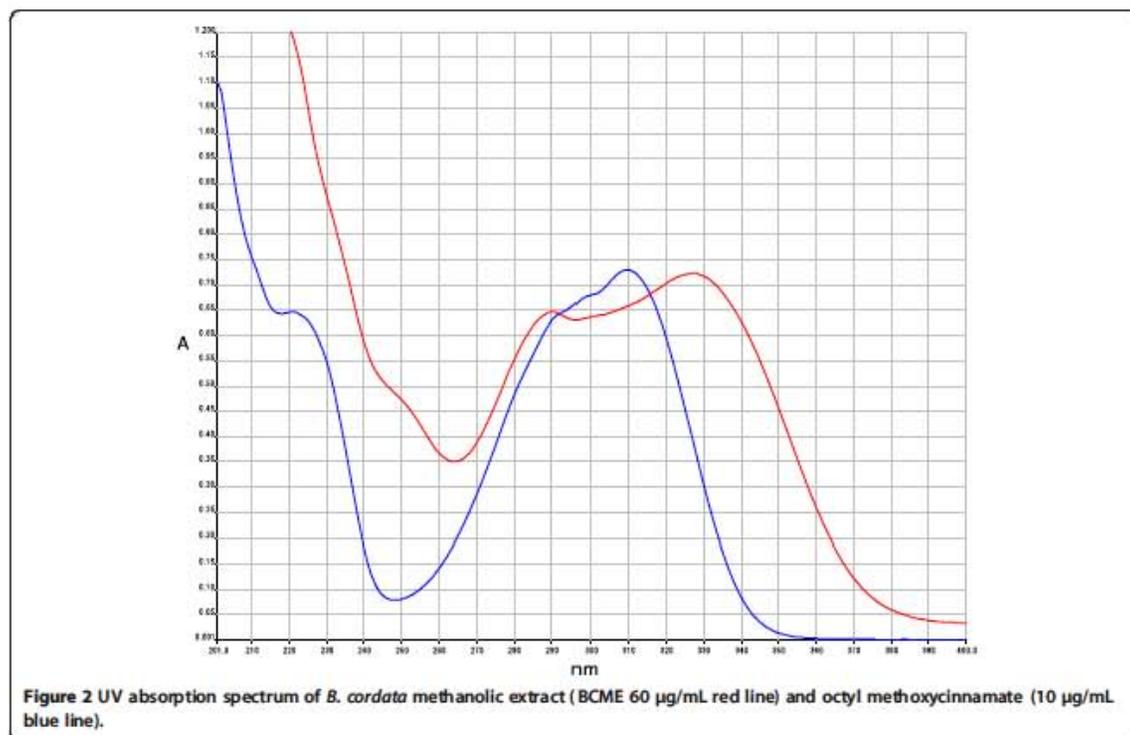
#### Histological analysis

A histological evaluation was performed on the SKH-1 hairless mice exposed to UVB. Figure 4 shows the most representative results of the histological study. The skin of the U, C- and BCME groups showed no histological damage (Figure 4a, b, and e panels). Acute exposure of UVB produced histological changes in the C+UV group: intra-/intercellular edema in the epidermis, number of sunburn cells, thickening of the stratum corneum and epidermis, vessel congestion, and perivascular edema in the dermis (Figure 4c and d). In contrast, skin from BCME+UV mice only showed a slight thickening of the epidermis and did not exhibit the UVB-induced inflammatory changes such as vessel congestion or edema in the epidermis and dermis. However, this group showed fewer numbers of sunburn cells when compared with the C+UV group (Figure 4f). These results correlated with macroscopic observations of erythema, likely because redness is the result of vessel congestion [33]. BCME+UV treated mice showed no edema; thus, it is

likely that the effect is due to the presence of linarin in the BCME. One of the main components of BCME is linarin. Martínez-Vázquez, [15] demonstrated the anti-inflammatory properties of this compound. In our study, we also found that the formation of sunburn cells was reduced in the skin of mice treated with BCME+UV, indicating that few keratinocytes of the epidermis were entering the programmed cell death pathway. Previous studies have demonstrated the antioxidant and photoprotective capabilities of verbascoside [20,31]. The presence of this compound in BCME could explain the reduced presence of sunburned cells on the skin of mice treated with BCME+UV because cells protected from photo-oxidative stress do not initiate an apoptotic pathway. Many agents (such as ultraviolet light filters) affect the transmission of ultraviolet light to human skin. In addition, agents such as antioxidants can modulate the effects of ultraviolet light on the skin. Most of the naturally occurring chemopreventive phenolics exert multifaceted actions, and any clinical applications using these substances should be based on the precise understanding of the physiologically relevant mechanisms of action [2].

#### *In vivo* BCME penetration study

To determine the penetration of the active components of BCME into epidermis, we proceeded to perform an experiment known as tape stripping. At equal that experimental protocol; each mouse was treated topically with 2 mg/cm<sup>2</sup> of the BCME for 15 minutes. Active components of BCME penetrate at 0.82±0.2% (33.4±9.0 µg/cm<sup>2</sup> in weight) (Table 1). According to this result,



the penetration of BCME into the skin could explain the absence of edema and the reduction of sunburn cells. It would think that the amount of active compounds of BCME that penetrates into the skin is low; however the number of molecules able to penetrate is significant according to the Avogadro's number. Thitilertdech et al. [34], determined that verbascoside has a low octanol-water partition coefficient ( $P = 0.03$ ), and performed *in vitro* permeation experiments using pigskin. Their results indicated that verbascoside penetrates into the skin

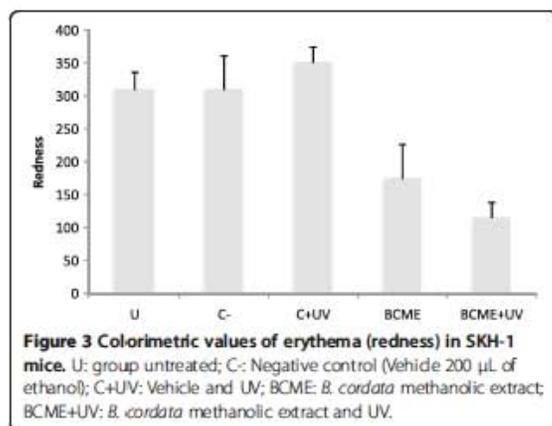
(0.270 nmol/cm<sup>2</sup>). Our results suggest SKH-1 mice skins are more permeable to this kind of compounds than pigskin.

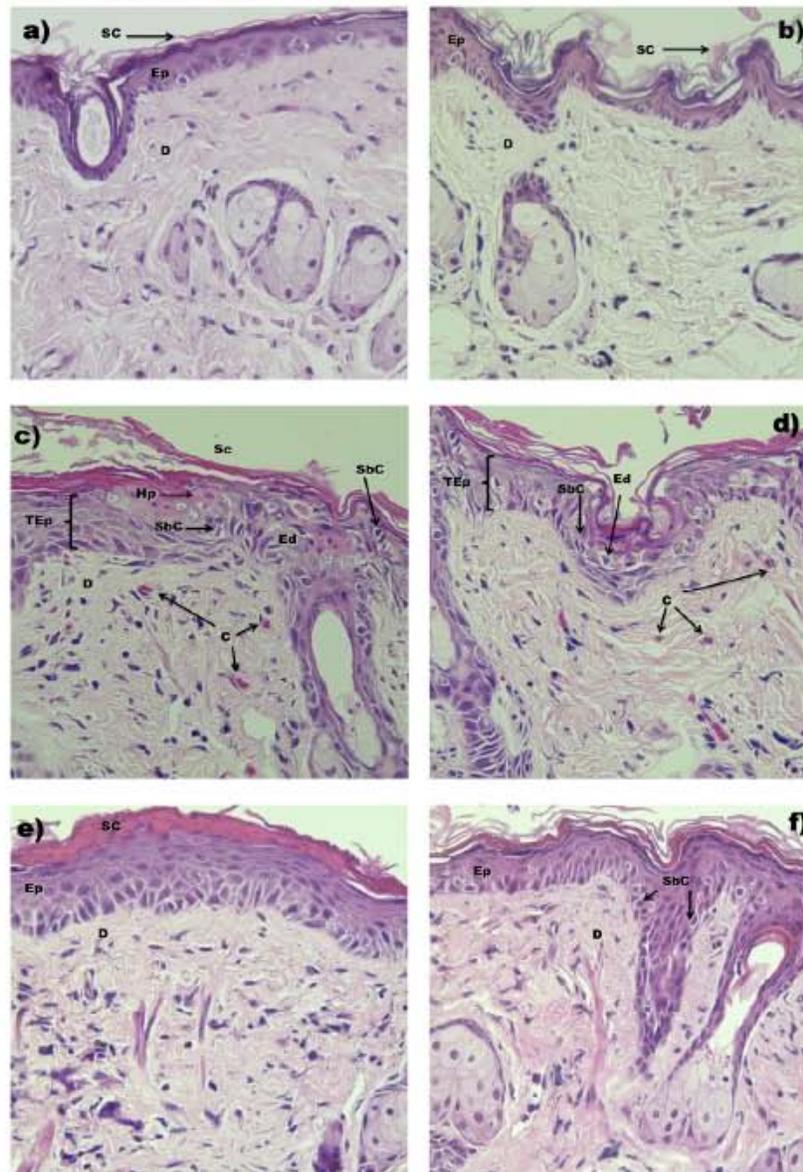
#### Genotoxicity assay of BCME

In this study, the *Vicia faba* micronucleus test, which detects chromosomal breakage and aneuploidy, was employed to evaluate the genotoxic potential of BCME. These bioassays are sensitive, and it is relatively simple to detect the genotoxic effects of several compounds with them. BCME did not significantly affect the cellular division of the roots and had no clastogenic effects on the cells (data not shown). Thus, BCME extract cannot be considered a mutagenic agent. Further studies should be carried out to evaluate the safety of the compounds present in BCME in other toxicological models.

#### Conclusions

UV exposure causes skin damage, and chronic exposure carries a risk of skin cancer. The increase in UVB radiation that reaches the earth's surface enhances the deleterious effects of this radiation on human health. Therefore, new strategies are needed to combat UV skin damage. The development of promising photoprotective agents requires continuous research throughout the development process. In addition, this study is the first report describing the topical administration of BCME, and





**Figure 4** Histology of skin samples from UVB-irradiated SKH-1 mice treated with BCME. H&E; 400X magnifications. **a)** U: group untreated; **b)** C: Negative control (Vehicle 200  $\mu$ L of ethanol); **c and d)** C+UV: Skin without protection (Vehicle and UV) **e)** BCME: *B. cordata* methanolic extract; and **f)** BCME+UV: *B. cordata* methanolic extract and UV. C Vessel congestion; D dermis; ED edema; Ep epidermis; Hp hypertrophy cells; Sbc Sunburn cell; SC stratum corneum; TEp Thickening epidermis.

it was found to protect against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. These results demonstrate that BCME exhibits absorbance in the UVB spectrum, contains significant scavenging ability for the hydroxyl radical and is not a genotoxic agent in the micronucleus test. The present findings demonstrate that BCME is

endowed with good *in vivo* skin photoprotective properties and that this is likely due to the polyphenol content of BCME (verbascoside and linarin). Therefore, these results suggest that BCME may exhibit some potential to prevent photodamage. According to our results, BCME possess sunscreen properties and also it is possible that

the BCME compounds inside the skin of mice carry out photochemoprotective activities. Additional studies to better understand the mechanism of action of BCME responsible for its photoprotective effects are in progress.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

#### Authors' contributions

AMGB and JGAA conceived, designed and performed the experiments. AMGB and JCB performed histological experiments. DM and TH performed and analyzed antioxidant experiments. SF and JC conducted the genotoxic experiments. JLM, AMGB and JGAA wrote the manuscript and analyzed statistical data. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

The authors express their gratitude to Edith López Villafraanco and Andrés Martínez Cortés for their technical assistance. This work was supported by the PAPIIT-DGAPA-UNAM, IN219612 and an internal grant from PAPCA (2013/54), FES-Iztacala UNAM.

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitoquímica, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México C.P. 54090, México. <sup>2</sup>Laboratorio 1, UMF, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Farmacognosia, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México. <sup>4</sup>Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México. <sup>5</sup>Laboratorio de Bioquímica Molecular, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México.

Received: 16 October 2013 Accepted: 23 July 2014  
Published: 3 August 2014

#### References

- Maverakis E, Miyama T, Bowen P, Correa G, Ono Y, Goodarzi H: Light, including ultraviolet. *J Autoimmun* 2010, **34**:1247-1257.
- Matsumura Y, Ananthaswamy H: Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, **195**:298-308.
- Mitchell D, de Greiner R, Crujil F, Guikers K, Breitbart E, Byrom M, Gallmeier M, Lowery M, Volkmmer B: Effects of chronic low-dose ultraviolet B radiation on DNA damage and repair in mouse skin. *Cancer Res* 1999, **59**:2875-2884.
- Ramachandran S, Prasad N, Karthikeyan S: Sesamol inhibits UVB-induced ROS generation and subsequent oxidative damage in cultured human skin dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2010, **302**:733-744.
- Petrova A, Davids I, Rautenbach F, Maimewick J: Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. *J Photochem Photobiol B* 2011, **103**:126-139.
- Hockbeiger P: A History of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochem Photobiol* 2002, **76**:561-579.
- Mena F, Mena A: Skin photoprotection by polyphenols in animal models and humans. In *Polyphenols in Human Health and Disease*, Volume 1. Edited by Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. London: Academic Press; 2014:831-838.
- Rzedowski J, Rzedowski G: *Flora Fanerogámica del Valle de México*, Volume II. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional e Instituto de Ecología; 1986.
- Lesur L: *Árboles de México*. México, D.F.: Editorial Trillas; 2011.
- De La Cruz M: *Libellus de Medicinalibus Indiarum Herbis. Según traducción latina de Juan Bodiano. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores*. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica-Instituto Mexicano del Seguro Social; 1991.
- Martínez M: *Las Plantas Medicinales de México. Tomo I*. 7th edition. México, D.F.: Editorial Botas; 2010.
- Bye R: The medicinal plants of the tarahumara indians. In *Two Mummies from Chihuahua: A Multidisciplinary Study*, Volume 19. Edited by Tyson R, Elerick DV. San Diego, Cal.: San Diego Museum Paper; 1985:77-104.
- Alonso-Castro A, Villarreal M, Salazar-Olivo L, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A: Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol* 2011, **133**:945-972.
- Martínez-Vázquez M, Ramírez Apan TQ, Aguilár M, Bye R: Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract of the flavone linarin of *Buddleja cordata*. *Planta Med* 1996, **62**:137-140.
- Martínez-Vázquez M, Ramírez Apan TQ, Lastra I, Bye R: Comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activity of pectolinarin isolated from *Buddleja cordata*. *Planta Med* 1998, **64**:134-137.
- Houghton PJ, Mensah A, Iessa N, Yong-Hong L: Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry* 2003, **64**:385-393.
- Acevedo I, Martínez E, Castañeda P, Franzblau S, Timmermann BN, Linares E, Bye R, Mata R: New phenylethanoids from *Buddleja cordata* subsp. *Cordata*. *Planta Med* 2000, **66**:257-261.
- Avila JG, De Liverant J, Martínez A, Martínez G, Muñoz JL, Arciniegas A, Romo de Vivar A: Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 1999, **66**:75-78.
- Afaq F: Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Arch Biochem Biophys* 2011, **508**:144-151.
- Avila Acevedo JG, Castañeda C, Benítez F, Durán D, Barroso V, Martínez A, Muñoz L, Martínez G, Romo de Vivar A: Photoprotective Activity of *Buddleja scordiolides* HBK. *Fitoterapia* 2005, **76**:301-309.
- Mandalari G, Tomaino A, Accoraci T, Martorana M, Lo Turco V, Cacciola F, Rich G, Bisignano C, Sajja A, Dugo P, Cross K, Parler M, Waldron K, Wickham M: Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Prunus communis* L.). *J Food Compos Anal* 2010, **23**:166-174.
- Lohász-Le Dévélhat F, Legouh R, Coutreau C, Boustie J, Coiffard L: Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *J Photochem Photobiol B* 2013, **120**:17-28.
- Halliwel B, Gutteridge J, Aruoma O: The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987, **165**:215-219.
- Trujillo O, Vaneris P, Cermignani M: Photometric assessment of skin colour and lightness using a tristimulus colorimeter: reliability of inter and intra-investigator observations in healthy adult volunteers. *Forensic Sci Int* 1996, **81**:1-10.
- Elder D, Benistas R, Jaworsky C, Johnson B: *Lever's Histopathology of the skin*. 8th edition. USA: Lippincott-Raven; 1997.
- Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW: The tape stripping procedure-evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2009, **72**:317-323.
- Wising SA, Müller RH: Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J Control Release* 2002, **81**:225-233.
- Ma T, Xu Z, Xu C, McConnell H, Ravibho E, Arreola G, Zhang H: The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res* 1995, **334**:185-195.
- Mahlke JD, Balignon AA, Mahado MM, Spader T, Alves SH, Canto-Dorow T, Athayde ML: In vitro antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. *Quim Nova* 2009, **32**:277-281.
- Pan Y, He C, Wang H, Ji X, Wang K, Liu P: Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleja officinalis* and its major active component. *Food Chem* 2010, **121**:497-502.
- Frum Y, Viljoen AM, Van Heerden FR: Verbascoside and luteolin-5-O- $\beta$ -D-glucoside isolated from *Halleria lucida* L. exhibit antagonistic antioxidant properties in vitro. *S Afr J Bot* 2007, **73**:583-587.
- Schellmeier HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegathesan J, Clancy R, Pierce JD: A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 2005, **21**:24-28.
- González S, Vibhagool C, Sherwood M, Flotte TJ, Kollias N: The phototoxicity of photodynamic therapy may be suppressed or enhanced by modulation of the cutaneous vasculature. *J Photochem Photobiol B* 2000, **57**:142-148.
- Thitlerdecha P, Guy RH, Rowan MC: Characterisation of polyphenolic compounds in *Clerodendrum petasites* S. Moore and their potential for topical delivery through the skin. *J Ethnopharmacol* 2014, **154**:400-407.

doi:10.1186/1472-6882-14-281

Cite this article as: Avila Acevedo et al.: Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 **14**:281.