



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS COMO
MARCADOR DEL EFECTO FOTOPROTECTOR DEL
EXTRACTO METANÓLICO DE *Buddleja cordata* Y DEL
VERBASCÓSIDO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

Karen Elizabeth Sánchez Hernández

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Adriana Montserrat Espinosa González



Los Reyes Iztacala

Tlalnepantla, Estado de México, mayo 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mis papás por su paciencia y apoyo a lo largo de mi carrera; porque sin ustedes no hubiera sido posible realizar mi sueño de ser Bióloga.

A mis hermanos por su amor y comprensión. A Karla por enseñarme a pelear y a salir adelante a pesar de los obstáculos.

A mi prima Paola por ser mi mejor amiga, apoyarme y aconsejarme desde niñas; por su gran apoyo y opinión en la redacción de mi tesis. Gracias por ser una segunda hermana y escucharme siempre que tengo dudas o problemas.

Juan Carlos gracias por tanto cariño, comprensión y apoyo siempre que lo necesito; por enseñarme a ver la vida de una manera positiva y diferente. Gracias por tantos momentos y experiencias inolvidables; por los consejos, detalles y cuidados que tienes conmigo; por la relación tan especial que compartimos y por motivarme a seguir adelante siempre. Muchas gracias por ser mi complemento.

A mis amigos de la FESI por tantas alegrías dentro y fuera de la facultad, por tantas anécdotas en las prácticas de campo. Gracias Daniel por ser mi amigo desde el principio y no huir de mi forma grosera de contestar. Irma y Madeline gracias por ser mis amigas incondicionales, por compartir tantos momentos en el salón de clase mientras platicábamos dibujando, y en las practicas mientras caminábamos y aprendíamos.

A la Dra. Montse por ser más que una asesora una confidente. Gracias por todo el apoyo personal y académico.

A todos los profesores y compañeros del laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia, por el conocimiento compartido, por los momentos entretenidos y por el apoyo de todos, gracias.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	4
3.1 Radiación ultravioleta (RUV)	4
3.2 La piel	7
3.3 Efectos de la RUV en las proteínas	9
3.4 Fotoprotección	12
3.5 Técnicas para evaluar el efecto fotoprotector de los productos naturales	16
3.6 Modelos experimentales en fotoprotección	20
4. Justificación	21
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	22
6.1 General	22
6.2 Particulares	22
7. Materiales y métodos	23
7. 1 Extracción de proteínas	24
7. 2 Electroforesis en gel de poliacrilamida	25
7.3 Electroforesis bidimensional	25
8. Resultados y discusión	27
8.1 Electroforesis unidimensional desnaturizante	27
8.2 Electroforesis bidimensional 2-D SDS PAGE	32
9. Conclusión	42
10. Referencias	43
11. Anexos	52
11.1 Anexo I. Extracción de proteínas	52
11.2 Anexo II. Gel de poliacrilamida	53
11.3 Anexo III. Tinción de geles de poliacrilamida	54
11.4 Anexo IV. Calculo del peso molecular relativo (<i>PMr</i>)	55
11.5 Anexo V. Cálculo del punto isoeléctrico (<i>pI</i>)	56

“EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS COMO MARCADOR DEL EFECTO FOTOPROTECTOR DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Buddleja cordata* Y DEL VERBASCÓSIDO”

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Fitoquímica y Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Dra. Adriana Montserrat Espinosa González y la asesoría del Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras.





1. Resumen

La radiación ultravioleta (RUV) tiene un papel importante en el balance de energía de numerosos procesos biológicos. Éstos pueden ser nocivos y tener consecuencias directas en las biomoléculas como en el ADN, lípidos y proteínas, lo que a largo plazo puede llevar a desarrollar fotoenvejecimiento y cáncer de piel. Una de las formas de prevenir el cáncer de piel y que ha tomado importancia en los últimos años, es el uso de fotoprotectores de origen vegetal. *Buddleja cordata* es una planta con propiedades biológicas notables como: analgésicas, diuréticas y antisépticas atribuidas a los compuestos que presenta, entre los que destaca el verbascósido, fenilpropanoide ampliamente distribuido en plantas, como las del género *Buddleja*. Este género está compuesto por árboles o arbustos dicóicos, ampliamente distribuidos en el mundo, algunos con propiedades antioxidantes, antihemolíticas, analgésicas, antiinflamatorias y antimicrobianas.

En este trabajo se probó la actividad fotoprotectora del extracto metanólico de *Buddleja cordata* (EMBC) y del verbascósido en piel de ratones SKH-1 mediante la expresión diferencial de proteínas. Se encontró que existe un patrón característico de bandas proteicas cuando la piel de ratón SKH-1 no es expuesta a la RUV. Algunas bandas proteicas del grupo sin irradiación dejaron de observarse en el grupo que no fue protegido y que fue expuesto a la RUV y se recuperó de forma parcial el patrón original de bandeo en los grupos experimentales (EMBC y verbascósido, irradiados), lo cual es evidencia del efecto fotoprotector de estas sustancias.



2. Introducción

El Sol emite energía que abarca todo el espectro electromagnético desde las radiaciones menos energéticas como ondas de radio (>1800 nm), infrarrojo (760-1800 nm) y la luz visible (400-700 nm), hasta las más energéticas, compuestas por la radiación ultravioleta (RUV) (100-400 nm), los rayos X (10-100 nm) y rayos gama (<10 nm). Aproximadamente un 66% de la radiación solar alcanza la Tierra, la RUV sólo representa un 5% de esta radiación (Riveros *et al*, 2014).

En función de su longitud de onda (λ) la RUV se clasifica en 3 tipos: RUV-A ($\lambda = 320-400$ nm), RUV-B ($\lambda=280-320$ nm) y RUV-C ($\lambda = 200-280$ nm). Más del 95% de la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre es RUV-A y sólo el 5% RUV-B. Sin embargo, los efectos en la piel son en un 80% causados por RUV-B y en un 20% por RUV-A (Reyes y Vitale, 2012; Meunier, 2008).

Los efectos de la RUV pueden ser benéficos o nocivos. Entre los procesos benéficos encontramos: mejora del estado de ánimo, fototerapias y la biosíntesis de vitamina D (Maverakis *et al.*, 2009). Los efectos nocivos se dividen en corto plazo o agudos; que incluyen: inflamación, quemadura solar, fotodermatosis, inmunosupresión y eritema (Bernerd, 2010). Los efectos a largo plazo o crónicos; son el cumulo de daños directos a biomoléculas como el ADN, lípidos y proteínas, que pueden llevar a un proceso de fotoenvejecimiento y posteriormente pueden producir cáncer de piel (Filip *et al.*, 2011).

El daño en las proteínas ocasionado por la RUV puede afectar de manera directa el equilibrio del ciclo celular, ya que las proteínas se encuentran entre sus principales reguladores. Una falla en la regulación del mecanismo de control del ciclo celular como la activación, desactivación, disminución o aumento en la expresión o la mutación de alguna de las proteínas que controlan el ciclo, ocasiona una proliferación excesiva y como consecuencia, la posible aparición de un proceso maligno que llevará a cáncer de piel (Malumbres y Barbacid, 2009).

La RUV también puede dañar las fibras de colágena, generar una excesiva producción de elastina anormal y un incremento en la velocidad de transcripción en los niveles de diferentes metaloproteinasas de matriz (MMPs). La sobreexpresión de las MMPs está relacionada con la capacidad de las células tumorales para invadir tejidos. En cáncer de



piel se ha observado el incremento en los niveles de MMP-1, MMP-9 y MMP-3 (Brenneisie, 2002).

Una de las formas de minimizar los efectos nocivos de la RUV sobre biomoléculas como las proteínas, es el uso de fotoprotectores solares. Los fotoprotectores tópicos contienen moléculas o complejos moleculares, que pueden absorber, reflejar o dispersar fotones de la radiación solar con mayor o menor eficacia (Reyes y Vitale, 2012). Los fotoprotectores de origen natural han demostrado prevenir el daño causado por la exposición a la RUV en diversos modelos biológicos como los animales de experimentación (Gilaberte y González, 2010).

Existe un buen número de sustancias procedentes del reino vegetal, que por su estructura química presentan diversas propiedades fotoprotectoras como los polifenoles, carotenoides y fenilpropanoides. A este último grupo pertenece el verbascósido presente en numerosas especies vegetales entre los que destaca el género *Buddleja* (Avila *et al.*, 2005).

El verbascósido es un glucósido fenilpropanoide presente en diferentes especies vegetales, al cual se le han atribuido diversas actividades biológicas; como antiinflamatorio, neuroprotector, antitumoral y antibacteriano, así como propiedades antioxidantes y fotoprotectoras (Espinosa, 2016; Alipieva *et al.*, 2014).



3. Marco Teórico

3.1 Radiación ultravioleta (RUV)

La RUV se refiere al campo de la radiación electromagnética con longitud de onda más corta que la luz visible (400nm), pero más larga que los rayos X (100nm). En función de su longitud de onda la radiación ultravioleta se clasifica en 3 tipos: RUV-A ($\lambda = 320-400$ nm), RUV-B ($\lambda = 280-320$ nm), y RUV-C ($\lambda = 200-280$ nm). La RUV-C es extremadamente energética debido a su longitud de onda; a pesar de su alta energía esta radiación es eficazmente absorbida por la capa de ozono y normalmente no llega a la superficie terrestre. Sin embargo las radiaciones RUV-A y RUV-B llegan a la superficie de la Tierra en cantidades suficientes para tener importantes consecuencias biológicas en la piel (Matsumura y Ananthaswamy, 2004) (Fig. 1).

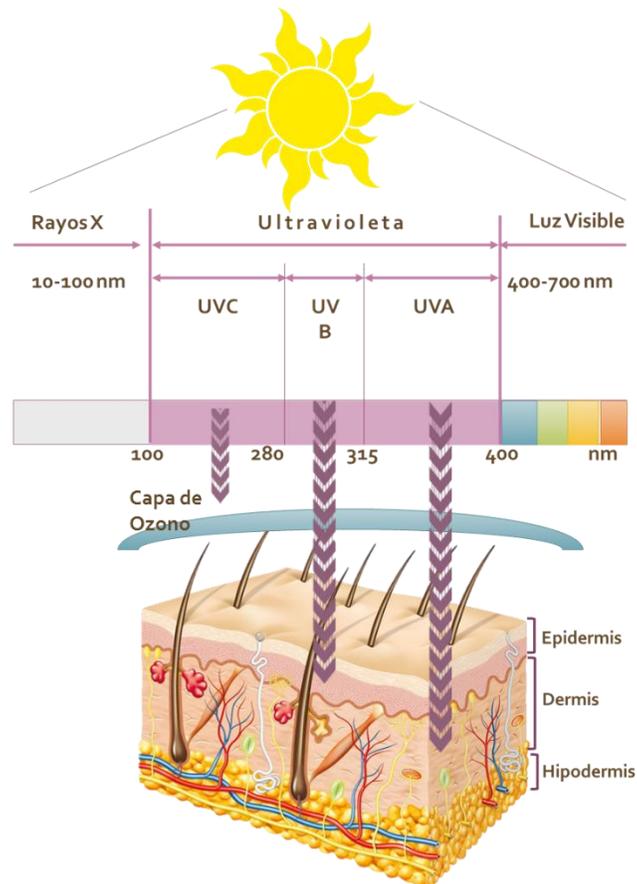


Figura 1. Radiación ultravioleta y su penetración en las diferentes capas de la piel (Modificado de Gupta *et al*, 2013).



La RUV-A comprende del 90-95% del espectro solar ultravioleta y puede penetrar en la piel hasta 1000 μm (dermis). La exposición a la RUV-A induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden causar daño a macromoléculas como lípidos, ADN y proteínas (Nichols y Katiyar, 2010).

La RUV-B constituye aproximadamente un 5% de la radiación UV total que llega a la Tierra, y es la principal responsable de cáncer de piel. La RUV-B puede penetrar en la piel de 160-180 μm (epidermis), además de inducir efectos biológicos directos e indirectos que incluyen estrés oxidativo, daño al ADN, múltiples efectos en el sistema inmunológico y oxidación de proteínas, así como inducir genes que sobreexpresan algunas MMPs (Nichols y Katiyar, 2010; Brenneisen *et al.*, 2002).

La RUV en exposiciones cortas también tiene consecuencias positivas en el ser humano, como: una mejor apariencia debido al bronceado, estado de ánimo mejorado y un aumento en los niveles de vitamina D. Además la RUV se utiliza para el tratamiento de algunas enfermedades cutáneas por medio de la fototerapia (Grant, 2007; Wirz-Justice *et al.*, 1996).

3.1.1 Efectos benéficos de la RUV

Pequeñas dosis de RUV son benéficas para el ser humano y esenciales para la producción de vitamina D; encargada de la absorción y metabolismo del calcio y aumentar la salud musculoesquelética. La exposición a la RUV-B comprendida entre los 295-330 nm causa la formación de pre-vitamina D₃, cuando la RUV-B incide en la piel, convierte el compuesto 7-dehidrocolesterol en vitamina D₃, la cual es transportada al hígado y convertida en 25-hidroxitamina D, ó 25(OH)₂D₃. Esta forma de vitamina D se transporta a los riñones, donde se convierte en 1,25-dihidroxitamina D, ó 1,25(OH)₂D₃, la forma biológicamente activa de la vitamina D (D'Orazio *et al.*, 2013; Grant, 2007).

La RUV también se ha relacionado con el aumento de energía y mejora en el estado de ánimo. Wirz-Justice y colaboradores realizaron un estudio a personas con trastorno afectivo estacional, el resultado fue una mejora en el estado de ánimo de los pacientes, cuando eran expuestos a la luz solar (Wirz-Justice *et al.*, 1996).

La RUV también se utiliza para tratar diversas enfermedades; la fototerapia es una modalidad terapéutica en la que se utiliza RUV-B y RUV-A para tratar el raquitismo, psoriasis, el eczema, dermatitis atópica, enfermedades de la piel como esclerosantes



morfea, escleroderma, vitiligo, y la micosis fungoide. La fototerapia se puede dividir en UVB de banda ancha (290-329 nm), UVB estrecha (310-315 nm), UVB monocromática (308 nm de un láser), UVA (320-400 nm) y UVA-1 (340- 400 nm). Estos tratamientos se realizan bajo supervisión médica y la ponderación de sus ventajas frente a los riesgos de la exposición a la RUV es cuestión de juicio clínico (Juzeniene y Moan, 2012; Sivamani *et al.*, 2009).

3.1.2 Efectos nocivos de la RUV

La RUV provoca alteraciones funcionales y estructurales en la piel. Las radiaciones con longitud de onda más corta son las más energéticas y las de mayor actividad biológica. Los efectos nocivos de la radiación son en un 80% causado por la RUV-B y solo un 20% por los RUV-A. La exposición prolongada a la RUV puede producir efectos agudos y crónicos en la piel (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014).

Los efectos agudos o a corto plazo ocurren inmediatamente después de la exposición y provocan: daño directo a biomoléculas, inflamación, quemadura solar, fotodermatosis e inmunosupresión, estos efectos se describen a continuación:

- ▣ Quemadura solar: La quemadura solar es uno de los principales efectos agudos de la RUV y se caracteriza por un enrojecimiento de la piel causado por vasodilatación e inflamación (Matsumara y Ananthaswamy, 2004).
- ▣ Fotodermatosis: Las características clínicas de las fotodermatosis son diversas e incluyen: erupciones en la piel, purito y dolor en las áreas expuestas a radiación solar o radiación artificial (Bylaite *et al.*, 2009)
- ▣ Inmunosupresión: La pérdida de la respuesta inmune por RUV se lleva a cabo a partir de la absorción de fotones por cromóforos de la piel y resulta en cambios locales y sistémicos. Los mecanismos de la inmunosupresión local pueden dividirse en: efectos directos sobre la actividad de antígenos de las células de Langerhans y otros antígenos de la piel; producción local de citocinas inmuno-moduladoras TNF- α ; infiltración de macrófagos en la piel y la isomerización del ácido urocánico, resultando en un mal funcionamiento de las células de Langerhans y mastocitos (Ichihashi *et al.*, 2003).

Las consecuencias crónicas o a largo plazo son provocadas por la acumulación de daño directo a las biomoléculas como el ADN, lípidos y proteínas, que pueden llevar procesos de fotoenvejecimiento y cánceres cutáneos (Reyes y Vitale, 2012).



El fotoenvejecimiento es un proceso complejo y multifactorial, que resulta en varios cambios funcionales y estéticos de la piel, como la aparición de arrugas y flacidez en el rostro. Histológicamente, la piel fototevejecida puede mostrar una pérdida de la polaridad de las células de la epidermis y una maduración desordenada de los queratinocitos. Además de presentar alteraciones en los componentes de la matriz extracelular como: la acumulación de elastina desorganizada y pérdida de colágena intersticiales, las principales proteínas estructurales del tejido conjuntivo dérmico. La RUV también provoca la producción de ERO, que desencadenan la producción de citocinas, activan las vías de transducción de señales citoplasmáticas en fibroblastos residentes que están relacionados con el crecimiento, diferenciación, senescencia y degradación del tejido conectivo, llevando a fotoenvejecimiento y alteración de los componentes estructurales de la piel (Wlaschek *et al.*, 2001).

El cáncer de piel es otra consecuencia crónica asociada a la exposición de RUV, se define como una serie de cambios en los que células anormales se dividen sin control y pueden invadir tejidos cercanos. La RUV provoca daños en el ADN y mutaciones genéticas, que posteriormente conducen a cáncer de piel. Los cánceres de piel se dividen principalmente en melanómicos y no melanómicos. El cáncer no melanómico se subdivide en: carcinoma de células basales (CCB) y carcinoma de células escamosas (CCE). El CCB se origina en la capa de células basales de la epidermis y en las células foliculares. El CCE se desarrolla a partir de queratinocitos dérmicos y folículos pilosos. Ambos carcinomas están relacionados a la exposición acumulativa de la RUV. Se producen con mayor frecuencia en zonas del cuerpo expuestas crónicamente al Sol, es decir: la cara, los antebrazos y el dorso de las manos (Narayanan *et al.*, 2010).

3.2 La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo, constituye el revestimiento externo del organismo y recubre la totalidad de su superficie; como superficie externa, es blanco de gran número de estímulos ambientales. Desde el punto de vista histológico la piel se divide en tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (Arenas, 2013) (Figura 2).

La epidermis constituye la superficie visible del órgano cutáneo y está constituida por un epitelio poliestratificado. Tiene un grosor medio de 200 μm y en ella se diferencian cinco estratos: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo. La epidermis presenta cuatro tipos



celulares, queratinocitos, melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans. Debajo de la epidermis se encuentra la dermis, el componente conectivo de la piel. El grosor medio de la epidermis se encuentra la dermis, el componente conectivo de la piel. El grosor medio de la dermis es de 1-2 mm, aunque en algunas zonas de la piel puede alcanzar los 3 mm, en su constitución se distinguen dos capas de tejido conjuntivo fibroso: el estrato papilar y el estrato reticular. En esta capa de la piel se pueden identificar tres tipos celulares: fibroblastos, mastocitos e histiocitos (Kochevar y Taylor, 2009).

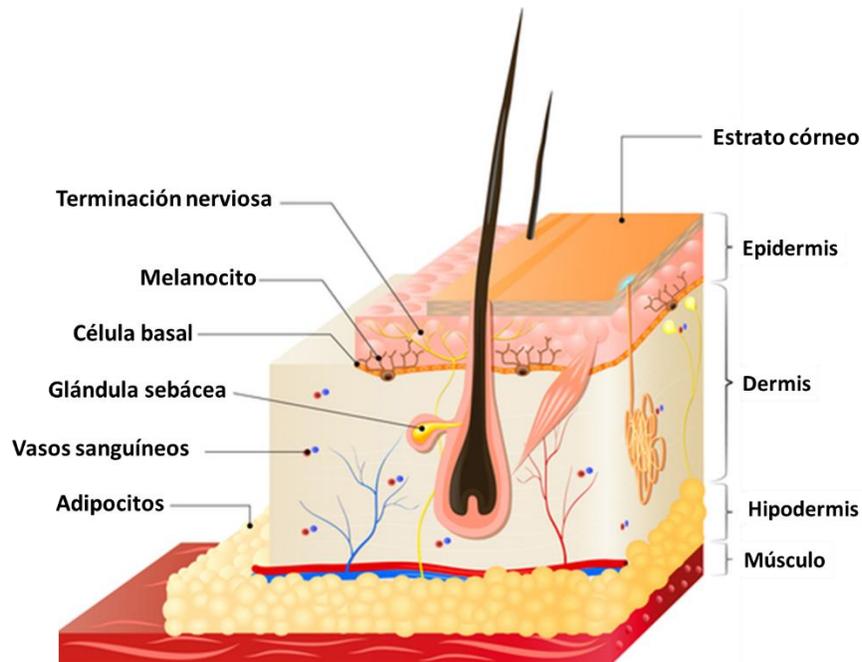


Figura 2. Estructura general de la piel.

La hipodermis o tejido celular subcutáneo está formado por lóbulos de adipocitos, que son células redondas con núcleo periférico y citoplasma lleno de lípidos, que sirven como reserva energética y aislantes de calor (Peña, 2007).

3.2.1 Proteínas de la piel

La piel está compuesta por agua, minerales, carbohidratos, lípidos, y proteínas. Las proteínas, son uno de los componentes epidérmicos más importantes por las funciones estructurales y protectoras que desempeñan (Arenas, 2003). Las proteínas principales de la piel se describen a continuación:

Colágena: El término colágena se designa a una familia de al menos 27 proteínas fibrosas, que forman parte de la matriz extracelular del tejido conectivo. Las fibras de colágena son



sintetizadas por los fibroblastos y se encuentran en todos los tejidos y órganos del cuerpo de los animales. En la piel humana, la colágena representa aproximadamente el 80% del peso seco de la dermis. La función fisiológica clásica de la colágena cutánea consiste en conferir a la piel las propiedades elásticas que le permiten actuar como órgano protector contra los traumatismos externos. Además de ejercer importantes funciones biológicas responsables de la regulación de numerosas actividades celulares y tisulares (Kochevar y Tylor, 2014).

Elastina: La elastina representa casi el 5% de la dermis, es una proteína elástica que mantiene la tensión cutánea normal. Es la proteína encargada de brindarle a la piel la capacidad de extenderse sin romperse y permanecer elástica. Al mezclarse con el colágena tiene la propiedad de retener el agua y atrapar enzimas, responsables de transportar los nutrientes (Castelo-Bramco, 2010).

Queratina: Existen alrededor de 30 tipos de queratinas que se clasifican como queratinas duras y blandas. Las diferencias físicas entre la queratina blanda de la epidermis y la queratina dura de pelos y uñas se deben, fundamentalmente, a variaciones tanto en su composición de aminoácidos como en sus enlaces moleculares. Una función importante de la queratina es mejorar la capacidad de las células para soportar traumatismos (Fortoul y Castell, 2010).

3.3 Efectos de la RUV en las proteínas

Estrictamente hablando el término cromóforo se refiere al grupo de átomos conjugados de una molécula capaces de absorber luz. La piel está compuesta de moléculas que actúan como cromóforos como el ADN, esteroides y proteínas que al absorber la RUV pasan de un estado basal a un estado excitado (Young, 1997).

Los cromóforos de la piel tienen un espectro de absorción característico que depende de su estructura molecular. Las proteínas tienen dos máximos de absorción, uno de 280 nm, debido a los aminoácidos aromáticos como el triptófano, tirosina y fenilalanina, y otro a 230 nm, debido a los enlaces peptídicos (Escalas, 2014).

Muchas enzimas son inactivadas por exposición a la RUV. Además las proteínas oxidadas pueden comportarse de manera muy diferente a sus contrapartes no expuestas a la RUV, los cambios incluyen: aumento en la susceptibilidad de la proteína oxidada a las enzimas



proteolíticas; alteraciones en las propiedades mecánicas como el colágeno; cambios en la conformación; aumento de la hidrofobicidad; alteración en las propiedades de dispersión de luz y rotación óptica; y cambios en la unión de cofactores e iones metálicos (Pattison, y Davies, 2006; Davies, 2004).

La foto-oxidación directa de la proteína, genera estados excitados o radicales como resultado de la fotoionización. Una proteína excitada por la RUV puede tener efectos nocivos sobre las estructuras de la molécula. La fotooxidación primaria también puede ser seguida por la oxidación indirecta de la proteína a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estudios *in vitro* describen el papel de los radicales libres en la carcinogénesis por medio del daño al ADN y modificaciones estructurales y funcionales de las proteínas (Kerwin y Remmele, 2006; Sander *et al.*, 2002).

3.3.1 Consecuencias de la foto-oxidación de proteínas

Las proteínas son las principales dianas celulares para la foto-oxidación, debido a su alta abundancia y la presencia de cromóforos endógenos dentro de su estructura. El daño inducido en las proteínas se produce a través de múltiples vías. El daño directo inducido principalmente por RUV-B se limita esencialmente a un pequeño número de residuos de aminoácidos aromáticos, esto ocurre por los estados excitados de estos aminoácidos. El daño indirecto de la proteína puede ocurrir por acción de ERO en los aminoácidos aromáticos (Pattison *et al.*, 2012).

Aunque el daño inicial se limita a los residuos aromáticos, existen múltiples procesos secundarios que ocurren durante y después de la exposición a la radiación; y pueden resultar en daños a otros sitios intra e inter moleculares. El daño secundario puede surgir a través de ERO y por la formación de foto-productos (Davies, 2003). Estos procesos pueden resultar en:

- ▣ Desnaturalización de la proteína: La foto-oxidación de algunas proteínas puede dar lugar a una mayor susceptibilidad al despliegue y cambios conformacionales, exposición de residuos hidrofóbicos, alteración en la dispersión de la luz y las propiedades de rotación óptica. Se ha demostrado que las proteínas con residuos aromáticos expuestos en su estructura tiene un impacto estructural más evidente (Pattison *et al.*, 2012; Davies, 2003).



- ▣ Agregación de proteínas: La formación de agregados de alta masa molecular (dímeros y especies superiores) es una consecuencia común de la foto-oxidación proteica. Los agregados pueden surgir de reacciones radical-radical, también se ha demostrado que otras múltiples reacciones conducen a la formación de enlaces cruzados, algunas de las cuales ocurren después del cese de la exposición a la luz UV (Pattison *et al.*, 2012; Davies, 2003).
- ▣ Fragmentación de la proteína: Los radicales formados en el carbono- α de la estructura peptídica, son intermediarios clave en la escisión de la cadena proteica en presencia de O_2 y los peróxidos formados en los residuos histidina y tirosina son capaces de generar tales radicales al menos en péptidos pequeños. Por lo tanto, la oxidación inicial en sitios de la cadena lateral proteica puede dar como resultado una división posterior en la cadena central (Pattison *et al.*, 2012; Davies, 2003).
- ▣ Inactivación de enzimas: Las enzimas cuyo sitio activo contiene residuos cisteína, metionina, triptófano, histidina o tirosina son más susceptibles a la foto-inactivación. La fotooxidación directa de estos residuos es sólo una causa de inactivación enzimática, ya que varios estudios han demostrado que los peróxidos de proteína reactivas, formados principalmente en los residuos histidina, triptófano y tirosina, pueden llevar a una inactivación secundaria (Pattison *et al.*, 2012; Davies, 2003).

La fotooxidación de las proteínas ocurre principalmente en los tejidos mayormente expuestos a la luz solar, siendo la piel y los ojos los órganos principales. La exposición a largo plazo de la piel a la RUV resulta en una menor elasticidad, una mayor textura fibrosa y cambios en la pigmentación. Los niveles elevados de proteínas oxidadas se encuentran en tejido enfermo y patologías relacionadas con la edad. Además, existe una correlación entre el fotodaño en la piel y la oxidación de las proteínas, por lo que puede ser un factor fisiopatológico relevante en el fotoenvejecimiento y cáncer de piel (Sander *et al.*, 2002).

3.3.2 Proteínas y cáncer

La expresión desregulada y la sobreexpresión de genes; y la pérdida o producción defectuosa de algunas proteínas contribuyen a la proliferación sin control de células cancerígenas. El ciclo celular se regula de manera positiva para producir la proliferación celular, y de manera negativa para inhibirla. Entre las principales moléculas que regulan positivamente el ciclo celular se encuentran las proteínas cinasas dependientes de ciclinas



(CDK), las ciclinas y los proto-oncogenes; y negativamente participan las proteínas supresoras de tumores y las proteínas inhibidoras de las CDK, entre otras (Malumbres y Barbacid, 2009).

Una falla en la regulación de los mecanismos de control del ciclo celular llevan a una proliferación celular excesiva y como consecuencia a la aparición del cáncer. La mayoría de las enfermedades malignas muestran defectos en al menos una de las proteínas reguladoras del ciclo celular (Lopez, 2003).

Otro grupo de proteínas relacionadas en procesos de carcinogénesis cutánea son las metaloproteinasas de matriz (MMPs), estas proteínas pertenecen a una gran familia de endopeptidasas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} . Las MMPs son responsables de la remodelación tisular y la degradación de la matriz extracelular (MEC), incluyendo colágena, elastina, glicoproteínas de la matriz, y proteoglicanos, además de intervenir en procesos fisiológicos de organogénesis, cicatrización e involución uterina (Verma y Hansch, 2007).

La RUV-B induce la expresión de ciertos miembros de la familia de MMPs, que degradan la colágena y otras proteínas de la matriz extracelular que componen el tejido dérmico (Quan *et al.*, 2009). El aumento en los niveles de las MMPs esta correlacionado con la capacidad de las células tumorales para la formación de angiogénesis, invasión del tejido circundante y metástasis (Kerkelä y Saarialho-Kere, 2003).

3.4 Fotoprotección

La fotoprotección es una estrategia preventiva y terapéutica fundamental frente al fotoenvejecimiento y el cáncer de piel provocados por efecto de la luz solar. Existen diferentes factores que modifican la absorción de la luz en la piel, estos incluyen: los naturales como el ozono, contaminantes, nubes y niebla. Los de origen biológico, como la presencia de cromóforos epidérmicos, –como la melanina–. Los físicos que incluyen ropa, sombreros, maquillajes, lentes de sol, y filtros de RUV, así como los fotoprotectores solares tópicos (Kullavanijava y Lim, 2005).

Los fotoprotectores tópicos contienen moléculas o complejos moleculares que pueden absorber, reflejar o dispersar fotones de RUV. Un fotoprotector novedoso es aquel que puede prevenir, mejorar o incluso reparar los daños cutáneos inducidos por la radiación solar. Sus efectos protectores incluyen: 1) absorción directa de fotones; 2) inhibición de la



inflamación crónica; 3) modulación de la inmunosupresión; 4) inducción de apoptosis; 5) actividad antioxidante directa y 6) antioxidante indirecta (Dinkova-Kostova, 2008).

Los fotoprotectores tópicos proveen una protección temporal de la RUV. Los ingredientes activos son clasificados en orgánicos e inorgánicos con base a su composición química y mecanismo de acción. Los filtros orgánicos son compuestos aromáticos que funcionan mediante la absorción de la RUV y los filtros inorgánicos son minerales que absorben, reflejan y dispersan la RUV (Mancebo *et al.*, 2014) (Fig. 3).

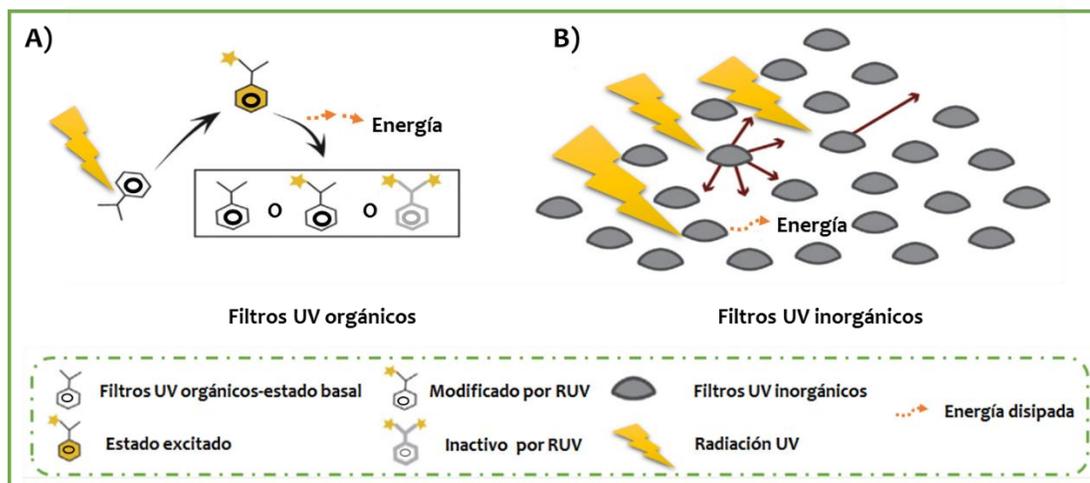


Figura 3. Mecanismos de acción de los fotoprotectores solares. A) Los fotoprotectores orgánicos absorben la energía de la RUV causando que los electrones en el fotoprotector pasen a un estado excitado. Cuando los electrones pasan a su estado basal, se libera energía en forma de calor, este cambio de estado tiene el potencial de causar modificaciones químicas. B) Los filtros inorgánicos pueden absorber, reflejar y dispersar la RUV (Modificado de Mancebo *et al.*, 2014).

3.4.1 Fotoprotectores de origen vegetal

Actualmente ha aumentado la tendencia en todo el mundo de desarrollar filtros solares de alta protección, utilizando bajas concentraciones de protectores solares químicos y ampliar el uso de filtros con productos de origen natural debido a sus amplias actividades biológicas. El término "producto natural" es generalmente considerado como sinónimo de "metabolito secundario", estas son sustancias orgánicas de peso molecular relativamente pequeño y de diversidad estructural considerable (Saewan y Jimtaisong, 2014; Kinghorn *et al.*, 2009).

Estudios en modelos animales y humanos han probado que los polifenoles tienen beneficios potenciales en la piel como: fotoprotección y evitar el envejecimiento, debido a que estas



moléculas presentan actividad antiinflamatoria, antioxidante y propiedades de reparación del ADN por daños causados por RUV (Mena y Mena, 2014).

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas y generalmente están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o agresión por patógenos. Surgen de un intermediario común, que puede ser la fenilalanina a través de la vía del ácido shikímico. Se dividen según su estructura química en diferentes grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides y lignanos. Se distribuyen ampliamente en frutas, verduras, frutos secos, semillas, flores, corteza y plantas (Nichols y Katiyar, 2010).

En los últimos años ha crecido el interés en la producción de protectores tópicos de polifenoles extraídos de plantas para la protección solar de la piel, ya que se ha demostrado que los polifenoles inhiben la proliferación celular y la angiogénesis, inducen la apoptosis y tienen actividades antioxidantes (Potapovich *et al.*, 2013). Se han probado extractos de diferentes plantas y semillas como fotoprotectores solares con un alto grado de efectividad entre los que destacan los extractos de té verde, semillas de uva, lavanda, y plantas del género *Buddleja*. Ejemplo de estas últimas son *Buddleja scordioides* y *Buddleja cordata* ambas fueron utilizadas en extracto metanólico y demostraron actividad fotoprotectora en diferentes modelos de estudio (Avila *et al.*, 2014; Avila *et al.*, 2005).

Buddleja cordata comúnmente llamada “Tepozan” es una especie de distribución amplia en México y comprende alrededor de 100 especies arbóreas y arbustivas (Figura 4). El 50% de las taxa crece en el continente americano y en México existen aproximadamente 15 especies con algunos representantes de amplia distribución. Esta especie comprende árboles y arbustos dioicos de 1 a 20 m de alto y de crecimiento rápido, que se ha utilizado como planta ornamental. Se distribuye en condiciones adversas y ambientes perturbados. En la medicina tradicional se tienen registros sobre su empleo para diversas enfermedades por sus propiedades analgésicas, eupépticas, diuréticas y antisépticas, además, se emplea en el tratamiento de cirrosis, como reparador de la bilis, del útero y ojos; también ayuda a sanar zonas afectadas por tumores y úlceras (Romero *et al.*, 2003). Plantas del género *Buddleja* sintetizan compuestos como flavonoides y fenilpropanoides, y son particularmente abundantes en verbascósido (Avila *et al.*, 2014).

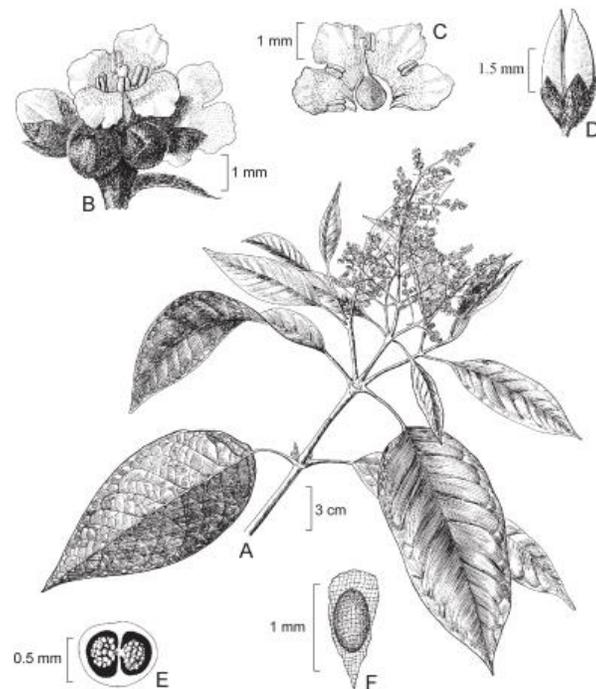


Figura 4. Morfología de *Buddleja cordata* H.B.K. (Ocampo, 2003).

El verbascósido pertenece a la familia de los fenilpropanoides y se caracteriza estructuralmente por estar formado de un ácido cafeico y un tirosol, ambos unidos por una ramnosa y una glucosa (Figura 5). El verbascósido se ha encontrado en más de 200 especies de plantas pertenecientes a 23 familias. Se le han reportado diversas actividades biológicas entre las que destacan antiinflamatorio: inhibe la liberación de histamina y ácido araquidónico por medio de una baja regulación de Ca^{2+} (Song *et al.*, 2012); neuroprotector: disminuye la muerte apoptótica, y el colapso del potencial de membrana mitocondrial en células neuronales PC12 (Guo-Qing *et al.*, 2002); antitumoral: regula la expresión de MMP-s y ERO necesarias para la invasión tumoral (Wartenberg *et al.*, 2003), y antibacteriano: mostró actividad antibacteriana en *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Pendota *et al.*, 2013). Así mismo presenta propiedades antioxidantes y fotoprotectoras ya que su estructura química absorbe luz en la región de la RUV, por lo que puede ser considerado un cromóforo a esta (Espinosa, 2016; Alipieva, 2014).

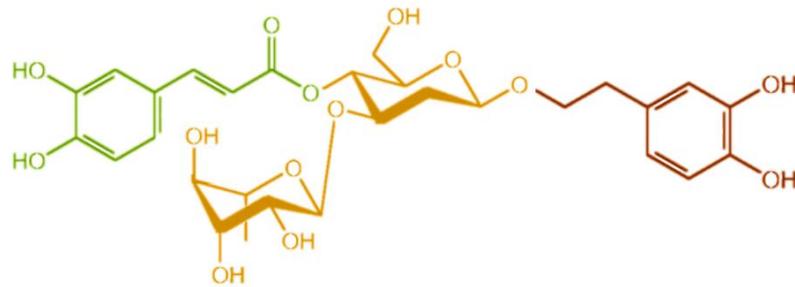


Figura 5. Estructura química de verbascósido. En verde la parte fenilpropanoide, en amarillo azúcares y en rojo la parte feniletanoide (Modificado de Maverakis *et al.*, 2009)

3.5 Técnicas para evaluar el efecto fotoprotector de los productos naturales

Los productos naturales han adquirido considerable atención como agentes protectores, debido a que han demostrado que los fenoles y carotenoides proporcionan fotoprotección a través de la reducción del estrés oxidativo, inflamación e inmunosupresión. Para corroborar las actividades fotoprotectoras de los productos naturales se han utilizado diferentes técnicas, algunas se describen a continuación:

a) Histología

Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través del microscopio. Los pasos metodológicos para el procesamiento histológico son: fijación de la muestra, inclusión; la muestra de tejido se coloca en un disolvente para poder incluir los tejidos en parafina líquida, realización de los cortes con ayuda de un micrótopo, tinción y montaje (Montuega *et al.*, 2009).

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 (Espinosa, 2016).



b) Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica molecular cuyo objetivo es obtener copias de una determinada región de una molécula de ADN. Para efectuar una PCR, se mezcla el ADN “diana” con Taq polimerasa, un par de nucleótidos cebadores y una provisión de nucleótidos. Se requieren cebadores para comenzar las reacciones de síntesis de ADN que llevara a cabo la Taq polimerasa. Al final de la reacción de PCR, la secuencia específica se acumulará en miles de millones de copias (amplicones) (Polymerase Chain Reaction (PCR), 2017). La asociación de ésta con otras técnicas moleculares como el “análisis de curvas de disociación alta resolución (PCR-HRM)” permite un estudio cuantitativo de expresión génica para el diagnóstico de diversas patologías ocasionadas por mutaciones en el ADN. A través del análisis de estas curvas, el sistema de análisis proporcionará una aproximación para detectar mutaciones genéticas por acción de la RUV (Espinosa, 2016).

c) Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis es la migración de moléculas bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo, dependiendo de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (BIO-RAD, Electrophoresis Guide, 2013).

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE-polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE. El SDS se une de forma no covalente a las proteínas confiriéndoles una carga negativa, además de desplegar su estructura terciaria a una estructura más plana. Como resultado las proteínas viajan al polo positivo por acción de la carga negativa que le confiere el SDS y por su tamaño a través de los poros del gel (BIO-RAD, Electrophoresis Guide, 2013).

d) Electroforesis continua y discontinua

En la electroforesis continua se utiliza un solo gel para la separación de biomoléculas, no es común para la separación de proteínas ya que en sistemas continuos, la matriz de separación “única” produce bandas de proteínas difusas. Esta electroforesis es mayormente utilizada para el análisis de ácidos nucleicos (BIO-RAD, Electrophoresis Guide, 2013).



La electroforesis discontinua consta de dos geles: un gel concentrador con poros grandes para que las proteínas viajen rápidamente y un gel separador con poros más pequeños para permitir que las proteínas migren más lentamente. En los sistemas discontinuos, las proteínas primero migran rápidamente a través de los poros del gel concentrador y se ralentizan a la entrada de los poros pequeños del gel de separador. A medida que las proteínas migran a través del gel separador se colocan una encima de la otra para formar una banda definida, lo que mejora la resolución (BIO-RAD, Electrophoresis Guide, 2013).

e) Electroforesis bidimensional 2-D

Es un proceso de separación de alto rendimiento empleado para la caracterización de proteínas a gran escala. Mediante esta técnica las proteínas se someten a dos procesos de separación sucesivos e independientes. En el primero o primera dimensión, se separan los componentes de la muestra por isoelectroenfoque y en el segundo o segunda dimensión, las proteínas se separan según su peso molecular (BIO-RAD, Electrophoresis Guide, 2013) (Figura 6).

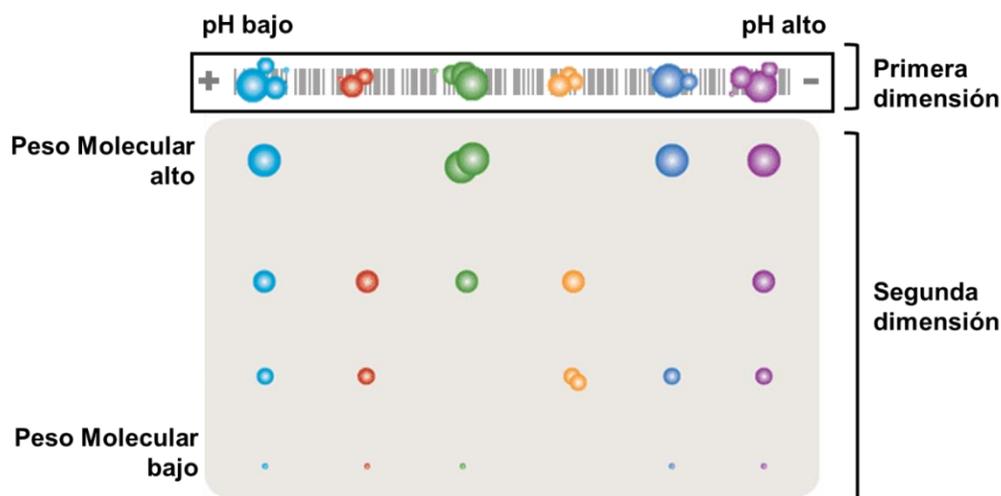


Figura 6. Geles utilizados en la electroforesis 2D (Modificado de BIO-RAD, 2017).

Primera dimensión

Una proteína tiene grupos cargados de ambas polaridades (positivas y negativas), por lo que presenta un punto isoeléctrico (pI), el pH al que es inmóvil en un campo eléctrico. Las tiras de gel utilizadas tienen un gradiente de pH estable que aumenta del ánodo hacia el



cátodo. En esta primera dimensión las proteínas migran (Figura 7) a la posición en la que el pH coincide con su pI , es decir, las proteínas se difunden y se alejan, su carga neta cambia a medida que se mueven a una región de pH diferente y las fuerzas electroforéticas las moverán de nuevo hacia su posición isoeléctrica. Por lo tanto, cada proteína se “enfoca” en una banda estrecha aproximada a su pI . Esta modalidad es llamada isoelectroenfoco (IEF) (Voet y Voet, 2006).

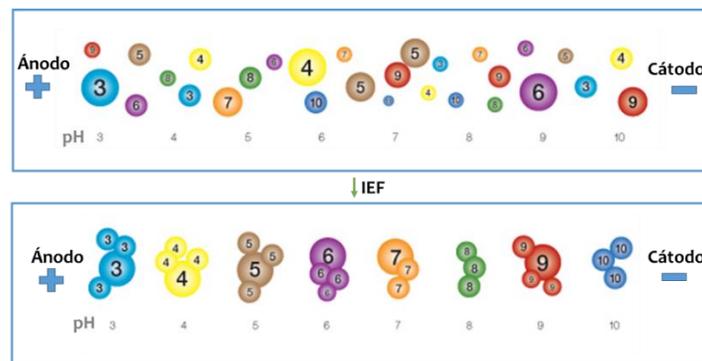


Figura 7. Migración de proteínas a través de las tiras utilizadas en la primera dimensión de la electroforesis 2D por acción del IEF (Modificado de BIO-RAD, 2017).

Segunda dimensión

Las proteínas separadas por IEF son sometidas a SDS-PAGE en dirección perpendicular en la segunda dimensión. En este tipo de electroforesis se utiliza SDS como detergente y como soporte tamizante la poliacrilamida entrecruzante. Los dodecil sulfatos estabilizan la proteína desnaturizada formando una capa de solvatación micelar cargada de SDS alrededor de la cadena polipeptídica. La carga inherente de la cadena polipeptídica es obstruida por moléculas de SDS cargadas negativamente, y cada grupo de proteína-SDS solubilizado tiene la misma carga por unidad de volumen. Las partículas cargadas negativamente se mueven a través del gel de poliacrilamida hacia el ánodo. La poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, y los complejos proteína-micela se separan en función de su tamaño; las proteínas de mayor tamaño se retrasan (Devlin, 2004).

De esta manera, se combinan dos modos de separación diferentes y se consigue el máximo de resolución posible mediante técnicas electroforéticas.



3.6 Modelos experimentales en fotoprotección

a) Ratón SKH-1

La cepa de ratón SKH-1 es utilizada ampliamente como un modelo para la fotocarcinogénesis humana y también en estudios de fotoquimioprevención de cáncer de piel inducido por luz UV-B. Los ratones de esta cepa tienen una mutación autosómica recesiva en el gen *Hr* que los hace perder el pelo a las 3 semanas de nacidos, es esta característica lo que los hace un modelo favorable para la evaluación de fotoprotectores, pues el pelo puede proteger la piel de la RUV. La piel de ratones SKH-1 se usa ampliamente como un sustituto de la piel humana para medir la penetración percutánea de fármacos *in vitro*. Además de que desarrollan tumores epiteliales parecidos a los presentes en el cáncer de piel humana (Benavides, 2009).

b) Cultivo celular

Se refiere al aislamiento de células de un animal o planta y su crecimiento subsecuente en un ambiente artificial favorable. Las células pueden separarse del tejido directamente o por medios enzimáticos o mecánicos antes del cultivo, o pueden derivarse de una línea celular o cepa celular que ya ha sido establecida. Existen dos tipos básicos de cultivos celulares: los cultivos primarios y las líneas celulares. El cultivo primario es el primer cultivo *in vitro* de células tomadas directamente del organismo, mientras que la línea celular es un subcultivo a partir de un cultivo primario (Cell culture basics, Thermo Fisher, 2015).

Los cultivos celulares permiten simplificar los estudios de citotoxicidad y viabilidad, ya que eliminan las interacciones y variaciones que se presentan al experimentar con organismos completos. En fotoprotección se puede evaluar la viabilidad de las células después de la exposición de las mismas a dosis determinadas de RUV (Espinosa, 2016).



4. Justificación

La radiación ultravioleta es responsable de diversas modificaciones genéticas, que dan como resultado la alteración de biomoléculas que pueden llevar a procesos de fotoenvejecimiento y cánceres cutáneos. Es por esto que es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de fotoprotección. Una de ellas es el uso de fotoprotectores tópicos con sustancias de origen vegetal. Los polifenoles son compuestos de plantas que han demostrado tener actividades fotoprotectoras, antioxidantes y desinflamatorias que contribuyen a la prevención de alteraciones causadas por RUV.

Preguntas científicas

El extracto metanólico de *Buddleja cordata* y uno de sus compuestos más abundantes, el verbascósido, ¿podrán actuar como fotoprotectores tópicos y evitar el daño producido por la RUV-B en las proteínas?, ¿existirá modificación en el patrón de bandeo?

5. Hipótesis

Debido a la capacidad de absorber la RUV y a las propiedades fotoprotectoras del extracto metanólico de *Buddleja cordata* (EMBC) y verbascósido, estas sustancias podrían actuar como fotoprotectoras a la RUV-B evitando cambios en la expresión proteica normal de piel de ratones SKH-1.



6. Objetivos

6.1 General

Evaluar el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *Buddleja cordata* y del verbascósido, en piel de ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta de forma crónica, mediante la expresión diferencial de proteínas.

6.2 Particulares

Identificar si existe un patrón diferencial de proteínas en la piel de ratones SKH-1 con y sin protección del extracto metanólico de *Buddleja cordata* y del verbascósido e irradiados con luz ultravioleta B de forma crónica.

Confirmar que existe una expresión diferencial de proteínas, por la capacidad fotoprotectora del EMBC y verbascósido a las proteínas de la piel, mediante el cálculo del peso molecular relativo y punto isoeléctrico de las proteínas expresadas en la electroforesis de dos dimensiones.



7. Materiales y métodos

Muestras de piel SKH-1

Previamente se realizó un experimento de exposición crónica a RUV que permitió reproducir un proceso de fotocarcinogénesis en ratones SKH-1. Se utilizaron 35 ratones divididos en siete grupos: sin ningún tratamiento, control negativo, control positivo, verbascósido, verbascósido con irradiación UV, EMBC y EMBC con irradiación UV (Tabla 1). La irradiación se realizó en dos etapas, para simular un proceso de fotocarcinogénesis: en la etapa de iniciación se aplicaron 200 μL de etanol, EMBC y verbascósido a su grupo correspondiente, los ratones se irradiaron un minuto diario durante diez días. En la segunda etapa los ratones fueron irradiados con una dosis de 6 mJ/cm^2 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.

Tabla 1: Tratamientos del experimento crónico previo y número de ratones utilizados para cada grupo (Modificado de Espinosa, 2016).

Grupo	Número de ratones
T (Sin ningún tratamiento)	5
C- (Aplicación de etanol)	5
C+ (Aplicación de etanol y RUV)	5
V (Aplicación de verbascósido disuelto en etanol) 2mg/cm ²	5
V+UV (aplicación de verbascósido disuelto en etanol y RUV) 2mg/cm ²	5
EMBC (Aplicación del extracto metanólico de <i>B. cordata</i> disuelto en etanol) 2mg/cm ²	5
EMBC+ UV (Aplicación del extracto metanólico de <i>B. cordata</i> disuelto en etanol y RUV) 2mg/cm ²	5



En este trabajo para la evaluación del EMBC y verbascósido la piel se dividió en 4 grupos (Tabla 2), debido a que fueron los que presentaron mayores diferencias entre grupos: control negativo (C-) solo se le aplicó etanol; control positivo (C+) se le aplicó etanol y se irradió; y dos grupos experimentales; EMBC con irradiación (EMBC/UV) y verbascósido con irradiación (V/UV).

Tabla 2: Tratamientos del experimento crónico y número de muestras obtenidas para la extracción de proteínas totales.

Tratamiento	Número de ratones	Número de muestras obtenidas para la extracción de proteínas
Control - (vehículo/etanol)	5	5
Control + (Etanol/ UV)	5	10
EMBC/UV (EMBC con irradiación)	5	10
V/UV (Verbascósido con irradiación)	5	10

7. 1 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó con los kits AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (50) y TRIzol® Reagent siguiendo el protocolo del fabricante (**Anexo I**) para identificar con cuál de los dos métodos se obtenía un mayor número de bandas en los geles de poliacrilamida. Posteriormente se realizó una cuantificación de proteínas totales a cada una de las muestras. La extracción se realizó por diferencia de masa a partir de centrifugación y filtración, las proteínas precipitaron por acción de las sales presentes en los buffers.

Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas totales de todas las muestras se llevó a cabo con el equipo Qubit Fluorometric Quantitation®. Se prepararon tres tubos cónicos de 0.2 mL, el primero denominado como la "solución de trabajo" fue una dilución 1:200 de Qubit® Protein Reagent en Qubit® Protein Buffer, el segundo fue un estándar o blanco y el tercero contenía la muestra problema. Posteriormente los tubos se colocaron en el vortex de 2-3 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por último se seleccionó el



ensayo de proteínas en el fluorómetro Qubit® y se leyeron las muestras (Thermofisher.com, 2017).

7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para corroborar la integridad de las proteínas después de la extracción, se realizaron geles discontinuos con porcentajes de 5% y 12% en el gel concentrador y en gel separador respectivamente (**Anexo II**). Una vez que el gel polimerizó se cargaron 5 μ L de Buffer de carga y 15 μ L muestra de proteínas. Además de 5 μ L de marcador de peso molecular (BenchMark™ Unstained Protein Ladder) y (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.

Para la tinción, se utilizaron dos reactivos: azul de Comassie y nitrato de plata para corroborar con cuál de los métodos se obtenían bandas más visibles en los geles (**Anexo III**). A continuación se calculó el peso molecular de las bandas (**Anexo IV**) y se analizó la expresión diferencial de los controles y grupos experimentales.

7.3 Electroforesis bidimensional

Las muestras de proteínas fueron previamente liofilizadas y precipitadas con acetona al 100%, posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos para decantar y resuspender la pastilla en un amortiguador de hidratación 2D.

Para la primera dimensión se utilizaron 4 tiras de 7cm con un rango continuo de pH (3-10), una tira por cada control y grupo experimental. Las tiras fueron hidratadas en aceite mineral 18 h antes de colocar las muestras. A cada tira se le agregaron 100 μ g de proteína disuelta en 125 μ l de buffer de rehidratación de urea. A continuación se colocaron las tiras en un equipo “Ettan IPGphor III Isoelectric Focusing System”, el cual se programó en cuatro pasos: el primero tuvo una duración de 1 hora a 250 volts, el segundo y tercer paso duraron 30 minutos a 500 y 1000 volts respectivamente, finalmente el cuarto paso tuvo una duración de 2 horas a 8000 volts.

Terminada la primera dimensión las tiras fueron lavadas en dos diferentes soluciones: la solución I; SDS, 0.01 g/mL de ditioneol y la solución II; SDS, 0.25 g/mL de iodoacetamina. Las tiras fueron colocadas en tubos para centrifuga de 15 mL en agitación suave, se les



agregó solución amortiguadora de equilibrio I por 15 minutos, enseguida se desechó la primera solución y se hicieron dos lavados más con la solución amortiguadora de equilibrio II por 15 minutos cada uno.

Para la segunda dimensión se colocó cada tira horizontalmente en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. En un extremo del gel se colocaron 5 μ l de marcador de peso molecular de 15 a 175 kDa (PiNK Prestained Protein Marker™) con ayuda de un papel filtro, finalmente el gel se selló con agarosa al 0.5% teñida con azul de Bromofenol al 0.1% (Fig 8). Los cuatro geles se corrieron a 150 V durante 1.5 h. Pasado este tiempo los geles se tiñeron con azul de Comassie.

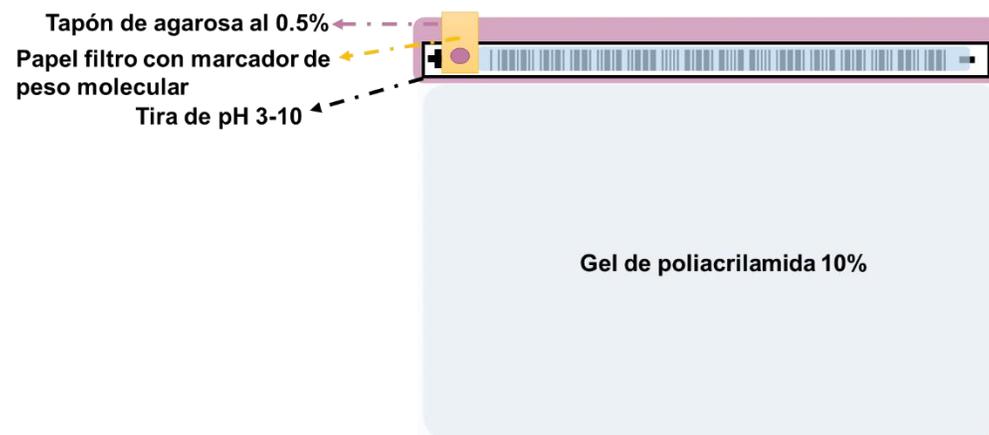


Figura 8: Electroforesis bidimensional (Modificado de Granados, 2015).

El punto isoeléctrico (pI) se calculó por interpolación de puntos con la graduación 3 a 10 de pH (**Anexo V**), y el peso molecular relativo (PMr) se determinó de la misma manera que en los geles de poliacrilamida unidimensionales. A partir de los cálculos del pI y peso molecular de la electroforesis en 2D, se eligieron las proteínas expresadas de forma diferencial en cada control y grupo experimental. Se realizó una búsqueda en la base de datos TagIdent <http://web.expasy.org/tagident/>. EXPASy (Expert Protein Analysis System) (The UniProt Consortium, 2015) plataforma donde se encuentra información sobre función, estructura, dominios, pI y PMr de secuencias proteicas. Esta plataforma identifica las proteínas ingresando los números de pI , PMr y organismo deseado.



8. Resultados y discusión

La cuantificación de proteínas totales de los controles y tratamientos, se realizó con el propósito de conocer las concentraciones de proteínas en los diferentes grupos. Los resultados obtenidos indicaron que la extracción a partir de 50 mg de tejido con mayor cantidad de proteína fue el grupo experimental (EMBC/UV) con 284 $\mu\text{g/mL}$, seguido del segundo grupo experimental (V/UV) con 280 $\mu\text{g/mL}$ y por último con los controles positivo y negativo (C+ y C- con 274 y 278 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La sinergia de compuestos en el EMBC así como la actividad fotoestabilizante del verbascósido posiblemente evitaron cambios conformacionales en las proteínas de la piel por efecto de la RUV; ya que esta radiación provoca la desnaturalización de las proteínas a solo una cadena polipeptídica y por consiguiente la pérdida de sus propiedades biológicas (Neves-Petersen *et al.*, 2012).

Para la tinción de proteínas, se probaron los métodos de tinción azul de Coomassie y nitrato de plata para determinar con cuál de las dos tinciones se obtenía mayor visibilidad de las bandas proteicas. En los geles teñidos con el método azul de Coomassie el patrón de bandeo se observó con mayor facilidad y claridad en comparación con el método de nitrato de plata (Figura 6). Winkler y colaboradores en 2007 probaron tinciones con nitrato de plata, tinción con imidazol y azul de Coomassie en albumina, lactato deshidrogenasa-L y lactoglobulina- β . Reportaron que la tinción de proteínas con nitrato de plata es deficiente, debido a que el procedimiento consta de múltiples etapas y no tiene punto final, esto quiere decir que la tinción termina dependiendo de qué tan visibles sean las bandas la persona que lleve a cabo la tinción, además de que no es adecuada para estudios cuantitativos debido a que las proteínas pueden ser fácilmente sobreteñidas.

Aunque el método de tinción azul de Coomassie resultó más efectivo que el de nitrato de plata, se observó en ambas tinciones una expresión diferencial de proteínas dependiendo del control y del grupo experimental (Figura 9).

8.1 Electroforesis unidimensional desnaturalizante

Se realizaron geles de poliacrilamida de las proteínas extraídas de las muestras de piel de los ratones SKH-1 de los controles y grupos experimentales. Se calculó el peso molecular relativo (*PMr*) de las 35 bandas proteicas más visibles. Los *PMr* obtenidos con el patrón de bandeo, se compararon con los pesos de algunas proteínas relacionadas a daños en la piel



por exposición a la RUV. Al mismo tiempo, se observó un patrón diferencial de bandas entre los cuatro diferentes grupos evaluados (Tabla 3 y Figura 9).

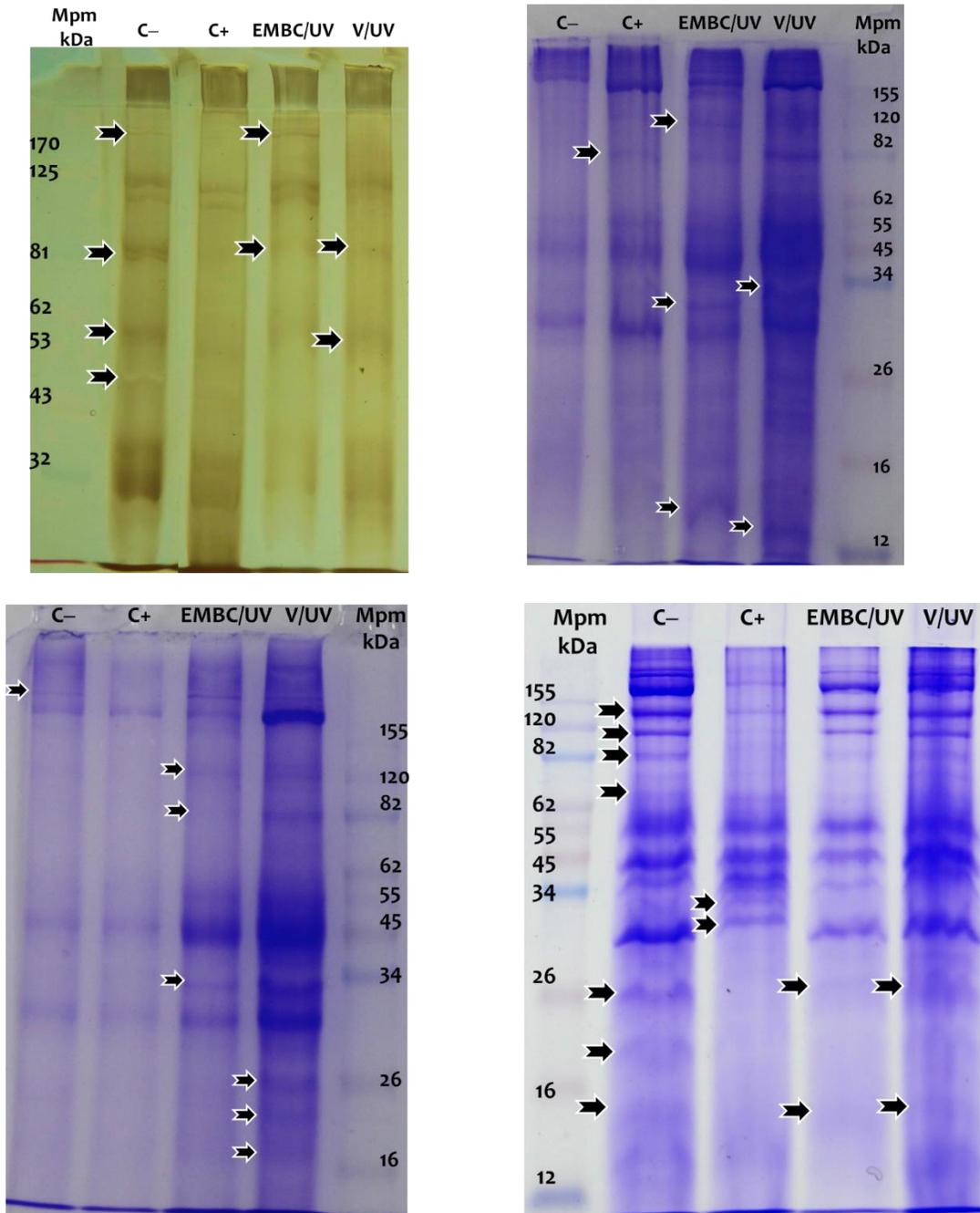


Figura 9: Geles de poliacrilamida unidimensionales (SDS-PAGE). Las flechas indican las bandas diferenciales que se presentaron en cada grupo. C-: control negativo (etanol); C+: control positivo (Etanol/UV); EMBC/UV: Grupo experimental 1 (EMBC irradiado) y Grupos experimental 2 V/UV: Verbascósido irradiado.



Tabla 3: Pesos moleculares de las 35 proteínas observadas en los 6 geles de poliacrilamida SDS-PAGE unidimensionales.

	<i>PMr</i>	C-	C+	EMBC/UV	V/UV	
1	13.04	--	--	--	✓	Nitrato de plata
2	14.46	--	--	✓	--	
3	15.42	✓	--	✓	✓	
4	18.01	--	--	--	✓	
5	19.43	✓	--	--	✓	
6	20.72	--	--	--	✓	
7	23.83	--	--	--	✓	
8	26.92	✓	--	✓	✓	
9	31.31	--	✓	--	--	Azul de Coomassie
10	32.04	--	--	✓	--	
11	32.16	--	--	✓	✓	
12	33.31	--	--	--	✓	
13	33.65	--	✓	--	--	
14	37.43	✓	--	✓	✓	
15	47.25	✓	--	--	--	
16	51.16	✓	--	--	✓	
17	56.97	✓	--	✓	✓	
18	57.95	--	--	--	✓	
19	63.63	--	--	--	✓	
20	70.10	✓	--	--	--	
21	72.02	--	✓	--	--	
22	80	--	✓	✓	✓	
23	8	--	--	✓	--	
24	91.64	✓	--	✓	✓	
25	91.85	✓	--	✓	✓	
26	94.46	--	✓	--	--	
27	110.51	✓	--	✓	✓	
28	111.55	✓	✓	✓	✓	
29	118.38	--	--	✓	✓	
30	120	--	--	✓	--	
31	126.25	✓	✓	✓	✓	
32	132.57	✓	✓	✓	✓	
33	134.36	✓	✓	✓	✓	
34	>170	✓	--	✓	--	
35	196.22	✓	--	✓	✓	



De los 35 *PMr* calculados se obtuvieron 6 bandas que posiblemente coinciden con el *PMr* de algunas MMPs y los inhibidores tisulares de MMPs (TIMs); proteínas implicadas en procesos de carcinogénesis cutánea. La sobreexpresión de algunas MMPs puede resultar en diversas condiciones patológicas, como la inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis (Verma y Hansch, 2007). Además los TIMPs son inhibidores endógenos de las MMPs y son importantes reguladores de la remodelación de tejidos y el comportamiento celular (Brew y Nagase, 2010). Los datos referentes a estas proteínas se describen a continuación:

La exposición a los rayos ultravioleta daña las fibras de colágena, generan una excesiva producción de elastina anormal e incrementa el nivel de diferentes metaloproteinasas (MMPs) como la colagenasa intersticial (MMP-1), la estromelisina-1 (MMP-3), y la gelatinasa (MMP- 9) (Taihao *et al.*, 2009).

La banda número diecisiete con un peso molecular de 56.97 kDa, presente en el C- y en ambos grupos experimentales se aproxima al *PMr* de la MMP-1, la cual tiene un peso que va de los 52-57 kDa (Taihao *et al.*, 2009). La MMP-1 se expresa *in vivo* en muchas situaciones fisiológicas, como la reparación de tejidos y es expresada por queratinocitos basales en sitios de reepitelización activa (Reunanen *et al.*, 2000).

La banda número veinticinco obtuvo un *PMr* de 91.64 kDa, peso que se acerca al de MMP-9 que es de 92 kDa (Mackay *et al.*, 1993). Esta MMP desempeña una importante función en la degradación final de la colágena. Además esta relacionada con la reducción de metástasis en células tumorales (Egeblad y Werb, 2002; Pérez-García, 2004). Esta banda al igual que la anterior se expresó en el C- y en los grupos experimentales (Tabla 3).

La banda veintiuno con *PMr* de 72.02 kDa se observó únicamente en el control negativo. Su peso molecular coincidió con la MMP-2; proteína que se encarga de la degradación de componentes de las membranas basales, desempeña un papel crucial en procesos de invasión tumoral e infiltración tisular de linfocitos T, procesos inflamatorios y angiogénesis (Hase *et al.*, 2000; Uniprot.org, 2015).

La banda veintidós con *PMr* de 80 kDa se presentó en el control negativo y en los grupos experimentales, lo que podría indicar que esta proteína es sobreexpresada por acción de los rayos ultravioleta. El *PMr* de esta banda concordó con el de la linkina; proteína que



promueve la adhesión entre las células y regula la dinámica de los microtúbulos (Kato *et al.*, 2014).

La banda número siete con un *PMr* de 23.83 kDa se expresó únicamente en el grupo experimental de verbascósido. Ésta banda tiene un peso similar a las TIMP-3 y TIMP-4 con pesos moleculares de 24 y 23 kDa respectivamente. Se ha demostrado que la TIMP-3 tiene propiedades inductoras de apoptosis, asimismo su sobreexpresión da como resultado la apoptosis de células de cáncer de pulmón A549 y un aumento en la expresión de p53, “proteína supresora de tumores” (Sun, 2010). Conjuntamente la TIM-4 es altamente expresada en tejidos en estado normal. La posible expresión de éstas proteínas en el grupo V/UV, podría indicar que el verbascósido induce la sobre expresión de estas proteínas en situaciones de “estrés” como la RUV.

Finalmente, la banda número ocho con *PMr* de 26.92 kDa se presentó en el control negativo y en los grupos experimentales. Coincide con el peso de la TIMP-1 (25-38 kDa). Se ha demostrado en estudios con ratones transgénicos que la sobreproducción de TIMP-1 desaceleró la carcinogénesis en la piel (Sun, 2010), además inhibió el crecimiento de tumores por la supresión de angiogénesis (Ikenaka *et al.*, 2003).

La relación en condiciones de reparación y disminución de metástasis de la MMP-1 y MMP-9 (Reunanen *et al.*, 2000; Pérez-García, 2004) presentes en el control negativo y en los grupos experimentales nos podrían indicar una protección por parte de los tratamientos experimentales de EMBC y verbascósido, debido a que la metástasis es un paso importante para la progresión en procesos carcinogénicos (Hanahan y Weinberg, 2011).

Los resultados obtenidos en la electroforesis unidimensional sirvieron como referencia para demostrar que existía una expresión diferencial proteica en los grupos de piel de ratone que no fue irradiados, en comparación con los grupos experimentales irradiados con y sin protección.

Para confirmar que la expresión de proteínas es diferente por acción de los rayos ultravioleta se realizó una electroforesis bidimensional para obtener resultados más amplios y confiables.



8.2 Electroforesis bidimensional 2-D SDS PAGE

Una vez realizada la electroforesis de dos dimensiones se obtuvo el *PMr* y *pl* de las 22 proteínas más visibles de los controles y grupos experimentales. Además se corroboró el posible papel de las proteínas identificadas como diferenciales, es decir las proteínas que se observaron en el control negativo y dejaron de observarse en los otros grupos experimentales y control positivo; en procesos que participan en la carcinogénesis y daño a la piel como; proliferación de células de la piel, angiogénesis, procesos inflamatorios, apoptosis, invasión tumoral, metástasis y reparación de tejidos (Tabla 4, Figura 10).

La búsqueda de las funciones de las posibles proteínas se llevó a cabo en la plataforma UniProt (Universal Protein Resource) <http://www.uniprot.org/>, en ésta se ingresó el peso molecular en Daltons, punto isoeléctrico y nombre científico del organismo (*mus musculus*).

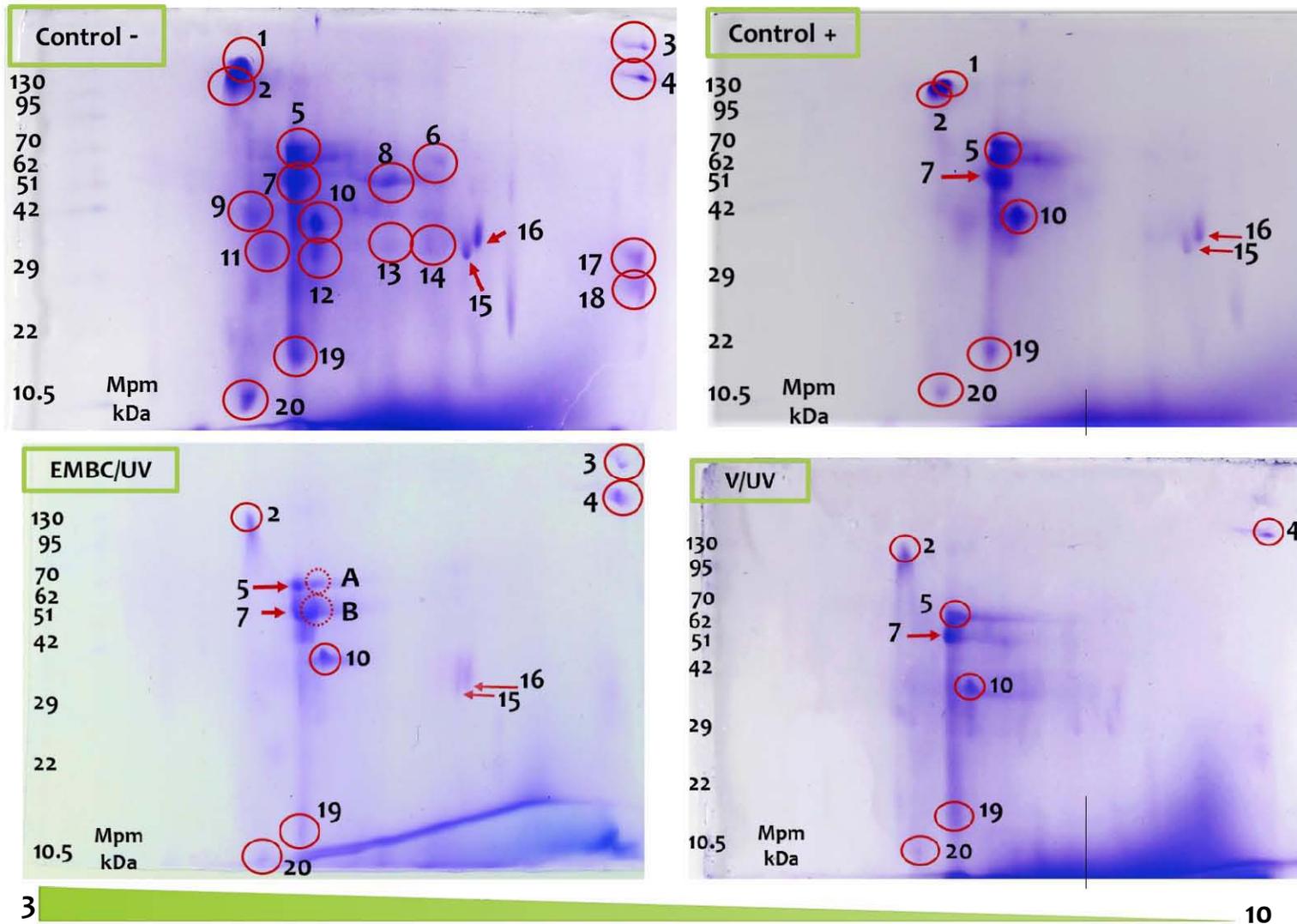


Figura 10: Geles de poliacrilamida corridos en 2D (SDS-PAGE). Se muestran las proteínas expresadas en cada control y grupo experimental encerradas en círculos. Marcador de peso molecular (Mpm).



Tabla 4: Valores del PMr y pI de las proteínas obtenidas de la electroforesis bidimensional 2-D SDS PAGE.

	PMr	pI	Posibles proteínas diferenciales	C-	C+	EMBC/UV	V/UV
1	138.54	4.24	•Protocaderina-15. •Fibulina-2.	✓	✓	--	--
2	128.56	4.23	•Tronbospondina 2. • Receptor acoplado a proteína G-98.	✓	✓	✓	✓
3	159.28	9.89	•Colágena IV.	✓	--	✓	--
4	125.40	9.89	• Ubiquitina E3 ligasa.	✓	--	✓	✓
5	73.58	4.87	•Antígeno CD44.	✓	✓	✓	✓
6	68.62	6.97	•Polisistina-2. •Receptor nuclear.	✓	--	--	--
7	51	5	•Istmina-1. •Beclina-1.	✓	✓	✓	✓
8	51	6.34	•Lactaderina.	✓	--	--	--
9	42	4.31	•Colagenasa Interstitial B.	✓	--	--	--
10	42.11	5.26	•Stromelisina-2. •Metaloproteinasas 10.	✓	✓	✓	✓
11	34.33	4.55	•SPARC.	✓	--	--	--
12	33.15	5.26	•Apolipoproteína E.	✓	--	--	--
13	36.99	6.31	•Lumican.	✓	--	--	--
14	35.37	6.87	•Monoglicerido lipasa. • Factor homólogo ETS.	✓	--	--	--
15	33.15	7.32	• Integrina α -8.	✓	✓	✓	--
16	36.26	7.58	• Proteína Tob2. • Glutamil hidrolasa γ .	✓	✓	✓	--
17	32.99	9.76	• Factor de transcripción eritroide.	✓	--	--	--
18	25.97	9.84	• Factor de crecimiento de fibroblastos 12.	✓	--	--	--
19	14.86	4.95	• Interleucina-31.	✓	✓	✓	✓
20	10.64	4.21	• Proteína AF1q. • Paratimosina.	✓	✓	✓	✓
A	70.47	5.28	• Proteína Nrros.	--	--	✓	--
B	53.97	5.24	• Proteína GC.	--	--	✓	--



De los 22 *pI* y *PMr* calculados (Figura 10 y Tabla 4) se llevó a cabo una aproximación de las posibles proteínas implicadas en respuesta inmune, procesos inflamatorios, regulación de la proliferación celular, regulación de la angiogénesis, vías de señalización en la superficie celular, respuestas al vehículo, entre otras; en seguida se describen sus funciones principales.

La primera proteína con un *PMr* de 138 kDa y de *pI* de 4.24 coincidió con dos posibles proteínas: la protocaderina-15 y fibulina-2, expresada únicamente en los controles negativo y positivo. La protocaderina-15 está implicada en procesos como el mantenimiento de células fotorreceptoras, morfogénesis de los epitelios y percepción sensorial de estímulos luminosos (Pcdh15 gene & protein, 2015). La familia de las fibulinas participa en el montaje y estabilización de las estructuras de la matriz extracelular y también se han implicado en la regulación de la organogénesis, la vasculogénesis, fibrogénesis y tumorigénesis (Kadoya *et al.*, 2005).

La proteína número dos obtuvo valores de 128.56 kDa de *PMr* y *pI* de 4.23. Éstos coincidieron con las proteínas tronbospondina 2 y receptor-G acoplado a proteína 98. La proteína número dos pudo observarse en todos los grupos. La tronbospondina 2 tiene funciones de adhesión celular y regulación negativa de la angiogénesis (Thbs2 gene & protein, 2015). El receptor acoplado a proteína G-98 participa en las vías de señalización de receptores de superficie celular: una serie de señales moleculares iniciadas por la activación de un receptor en la superficie de una célula. El receptor acoplado a proteína G-98 también está implicado en el establecimiento de la localización de proteínas, es decir el movimiento dirigido de una proteína a una ubicación específica (Gpr98 gene & protein, 2015).

La tercera proteína se calculó con un peso molecular relativo de 159.28 kDa y un *pI* de 9.89, tiene valores similares a la colágena IV, proteína importante en la constitución de la matriz extracelular. Además de participar en la regulación negativa de angiogénesis (Col4a3 gene & protein, 2015). La expresión de esta proteína en el control negativo y en el grupo experimental de EMBC/UV es muy importante porque demuestra la actividad fotoprotectora del EMBC en la piel de ratón, ya que la colágena es una de las proteínas principales dañadas por RUV. La exposición crónica de la piel a los rayos ultravioleta causa importantes cambios histopatológicos entre los que destacan la degeneración basófila de la colágena



(Taihao *et al.*, 2009). Además que la actividad regulatoria de la angiogénesis, hacen de la colágena una proteína importante para el control del crecimiento de tumores, pues se ha demostrado que el aumento de angiogénesis es uno de los eventos principales para el mantenimiento de tumores en procesos carcinogénicos (Hanahan y Weinberg, 2011).

La cuarta proteína con *PMr* de 125.40 kDa y *pl* de 9.89 coincidió con la ubiquitina E3 ligasa. La ubiquitina tiene una importante función de vigilancia del recambio proteico de la célula, regula estrictamente la degradación de proteínas específicas, el ciclo celular y la apoptosis. Tiene un importante papel en la degradación de proteínas como CDKs, p53, p21, p27 entre otras implicadas en el control del ciclo celular (Topors gene & protein, 2015). La regulación de estas proteínas es de suma importancia para la inhibición del cáncer ya que el gen que codifica la proteína Tp53 es uno de los más mutados en gran proporción de cánceres humanos (Tokino y Nakamura, 2000). Además de que los defectos del ciclo celular asociados a tumores, son a menudo mediados por alteraciones en la actividad de algunas CDKs (Malumbres y Barbacid, 2009). La presencia de esta proteína en el control negativo y en ambos grupos experimentales reafirma la protección del EMBC y del verbascósido, ya que se ha demostrado que la desregulación de la ubiquitina E3 ligasa contribuye a la carcinogénesis. Además estudios recientes han demostrado la efectividad del uso de ubiquitinas para terapias contra algunos tipos de cáncer (Sun, 2006).

La proteína cinco con peso molecular de 73.58kDa y un *pl* de 4.87 puede corresponder a la proteína antígeno CD44 coincidió con dichos valores; ésta proteína está relacionada con la curación de heridas implicadas en respuestas inflamatorias. Igualmente actúa como receptor del ácido hialurónico, mismo que juega un papel importante en la migración celular, el crecimiento tumoral y la progresión (Cd44 gene & protein, 2015). La proteína número cinco se presentó en todos los grupos.

La proteína número seis con *PMr* de 68.62 kDa y *pl* de 6.97 concordó con dos proteínas. La primera polisistina-2, implicada en múltiples procesos como; regulación positiva del arresto del ciclo celular, regulación del potencia de membrana y respuesta a estrés osmótico, este último podría ser explicado por la penetración del vehículo en la membrana (Pkd2 gene & protein, 2015). La segunda proteína fue receptor nuclear encargado de regular procesos apoptóticos y fagocitosis (Nr4a1 gene & protein, 2015). Esta proteína se observó solo en el control negativo (Tabla 4, Figura 10).



La séptima proteína con un *PMr* de 51 kDa y *pI* 5 se ajustó a los valores de dos proteínas implicadas en procesos relacionados con carcinogénesis; la proteína Istimina-1 que actúa en la regulación negativa de angiogénesis (Xiang *et al.*, 2011). La segunda proteína fue beclina-1, implicada en diversos procesos como regulación negativa de la proliferación celular y metabolismo de especies reactivas de oxígeno, además de estar relacionada en respuesta a alguna droga (Bcn1 gene & protein, 2015). Esta proteína se pudo observar en todos los grupos.

La proteína ocho con valores de 51 kDa y *pI* 6.34 fue semejante a la lactacaderina (Tabla 3). Ésta proteína tiene funciones implicadas en angiogénesis, adhesión celular y regulación positiva de la fagocitosis (Hanayama *et al.*, 2002), además de ser un componente extrínseco de la membrana plasmática (Mfge8 Mus musculus P21956, 2016).

La novena proteína con *PMr* de 42 y *pI* de 4.31 coincidió con la colagenasa intersticial B, encargada de la escisión de la triple hélice de colágeno, además de actuar como metaloproteasa en componentes de la matriz extracelular (Mmp1b gene & protein, 2015). Ambas proteínas se pudieron observar únicamente en el control negativo.

La décima proteína con *PMr* de 42.11 kDa y *pI* 5.26 coincidió con la stromelisin-2 o MMP-10; es una proteína implicada en la degradación de la fibronectina, gelatinas de tipo I, III, IV, y V; y en menor grado catabolismo del colágeno tipo III, IV, y V (Mmp10 gene & protein, 2015). Además de actuar como regulador de la migración celular (Nishino *et al.*, 2002). Esta proteína se observó en todos los grupos (Tabla 4, Figura 10).

La proteína número once tuvo un *PMr* de 34.33 kDa y un *pI* 4.55, valores que se ajustaron al de la proteína SPARC, ésta se localiza en la membrana basal y en el espacio extracelular, cuenta con múltiples funciones entre las que destacan; unión de la matriz extracelular y del colágeno, regulación negativa de la proliferación de células endoteliales, regulación negativa de la angiogénesis, traducción de señales y cicatrización de heridas. Además la proteína SPARC responde a cualquier proceso que resulta en un cambio de estado o la actividad de una célula por estímulo de etanol (Manabe *et al.*, 2008; Sparc gene & protein, 2015).

La décimo segunda proteína con *PMr* de 33.15 y *pI* 5.26 fue parecida a los valores de la apoloproteína E, que actúa como reguladora negativa de la proliferación de células endoteliales y en la regulación negativa a respuestas de procesos inflamatorios. Además



de mantener a los lípidos en un estado de equilibrio interno permite su movimiento dirigido dentro, fuera o dentro de una célula, o entre células (Cabana *et al.*, 2004; Apoe gene & protein, 2015).

La décimo tercera proteína con valores de *PMr* 36.99 y *pl* 6.31 fueron similares a la proteína lumican, encargada de la unión u organización de las fibras de colágeno (Lum gene & protein, 2015).

La proteína catorce con *PMr* de 35.37 kDa y *pl* de 6.87 coincidió con los valores de dos proteínas: la monoglicerido lipasa y el factor homólogo ETS, la primera con una función regulatoria de respuestas inflamatorias (Comelli *et al.*, 2007), y la segunda proteína actúa como activador de transcripción en la regulación de la diferenciación celular epitelial y la proliferación (Ehf gene & protein, 2015). Las proteínas doce, trece y catorce se observaron únicamente en el control negativo (Tabla 4, Figura 10).

La proteína quince con *PMr* de 33.15 y *pl* de 7.32 fue parecido al de la integrina alfa-8, desempeña funciones relacionadas con la matriz extracelular, está encargada de las uniones célula-matriz, organización de la matriz extracelular, además de encargarse de la localización y transporte de glicoproteínas y lipoproteínas (Fujiwara *et al.*, 2001; Itga8 gene & protein, 2016).

La proteína dieciséis con valores de 36.26 kDa de *PMr* y *pl* de 7.58 concordó con las proteínas Tob2 y glutamil hidrolasa gama; la proteína Tob2 es un miembro de la familia de proteínas antiproliferativas Tob/BTG que actúan regulando negativamente la proliferación celular inhiben la progresión del ciclo celular de la fase G0/G1 a la fase S (Tob2 gene & protein, 2016). Adicionalmente Ajima y colaboradores en 2008 reportaron su papel como receptor para la unión de vitamina D. Por otro lado la glutamil hidrolasa gama responde a cualquier cambio en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas y expresión de genes, como consecuencia de un estímulo por etanol (Ggh gene & protein, 2016).

Las proteínas quince y dieciséis se pueden observar en ambos controles y en el grupo experimental de EMBC/UV.

La proteína diecisiete con *PMr* 32.99 y *pl* 9.76 ajustó con el factor de transcripción eritroide, ésta proteína tiene un papel de regulación negativa de proliferación celular, además de



estar relacionada la homeostasis del número de células dentro de un tejido (Gata1 gene & protein, 2015).

La proteína dieciocho con peso molecular de 25.97 kDa y 9.84 *pI* fue el factor de crecimiento de fibroblastos 12, ésta poseen actividades de supervivencia mitogénica y está involucrada en una variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis y la reparación de tejidos entre otros (Fgf2 gene & protein, 2016). Ambas proteínas se observaron únicamente en el control positivo.

Las proteína diecinueve con valores de *PMr* y *pI* de 14.86 y 4.95 respectivamente, tuvo valores parecido a la interleucina-31, las interleucinas promueven el crecimiento, diferenciación y activación celular, además de ser mediadoras importantes de la comunicación entre células inmunes e inflamatorias (Il31 gene & protein, 2016), conjuntamente su homeostasis en los tejidos participa en una efectiva respuesta inmune en la piel (Dillon *et al.*, 2004).

La vigésima proteína obtuvo un *PMr* de 10.64 y un de *pI* 4.21 estos valores fueron similares al de las proteínas AF1q y paratimosina. La AF1q desarrolla un papel regulador en procesos apoptóticas, regulando las vías extrínsecas e intrínsecas de apoptosis (Mllt11 gene & protein, 2015); la paratimosina está involucrada en el desarrollo o funcionamiento del sistema inmunológico (Ptms gene & protein, 2016). Las proteínas diecinueve y veinte se observaron en todos los grupos.

Las proteínas A y B mencionadas a continuación se presentaron únicamente en el tratamiento experimental de EMBC/UV.

La proteína A obtuvo un *PMr* de 70.47 kDa y un *pI* de 5.28, dichos valores concordaron con la posible proteína Nrros, ésta limita la generación de ROS por los fagocitos durante las respuestas inflamatorias, por lo tanto juega un papel importante durante la defensa inmune del huésped; ya que el exceso de ROS puede causar daños colaterales al tejido durante el proceso inflamatorio (Noubade *et al.*, 2014). La presencia de esta proteína en el tratamiento experimental de EMBC/UV podría ser una de las promotoras de la capacidad del EMBC para mantener la viabilidad de celular (Espinosa, 2016).

La proteína B con valores de 53.97 y 5.24 de *PMr* y *pI* respectivamente coincidió con la proteína GC, esta proteína participa en el transporte y almacenamiento de la vitamina D.



Además aumenta la activación de macrófagos durante la inflamación, éstas células son importantes en procesos inmunitarios, mediadores de a inflamación dependiente de fagocitosis (Nagasawa *et al.*, 2005). Esta proteína se presentó únicamente el en grupo experimental de EMBC/UV; la disminución de daños histológicos en piel de ratones SKH-1 como la inflamación por acción del EMBC (Espinosa 2016), puede deberse a la presencia de la proteína B y al antígeno CD44 antes mencionado. Ambos tienen papeles regulatorios en procesos inflamatorios y éste último en la curación de heridas causadas por inflamación.

La expresión diferencial de proteínas que se observó en los geles bidimensionales, se confirmó con el cálculo de los *PMr* y *pl* obtenidos en la electroforesis bidimensional. La expresión de diferentes proteínas en todos los grupos puede deberse a la sinergia de los compuestos contenidos en el EMBC y a la actividad del verbascósido, así como a sus propiedades fotoprotectoras. Avila y colaboradores en 2014 reportan que los principales compuestos del EMBC son verbascósido, linarina y siringina; los compuestos de verbascósido y linarina proveen al extracto absorbancia en todo el espectro UVB, adicionalmente a la siringina se le atribuyen propiedades antiinflamatorias (Choi *et al.*, 2004) y antitumorales (Zhang *et al.*, 2007).

Las propiedades antiinflamatorias y antitumorales del EMBC son características de un buen fotoprotector pues Carrascosa en 2011 menciona que los fotoprotectores deben tener funciones como; efectos antiinflamatorios, antioxidantes, inmunomoduladores o inhibidores de la carcinogénesis.

El verbascósido posee distintas características fotoprotectoras las cuales han sido probadas en queratinocitos humanos, como la inhibición de respuestas inflamatorias y metabólicas mediadoras de foto-oxidación en la piel, aporta foto estabilidad y efectos antioxidantes (Alipieva *et al.*, 2014).

La actividad antioxidante otorga una protección importante a las proteínas ya que la absorción de los rayos UV por aminoácidos como triptófano, tirosina, histidina, fenilalanina, cisteína y cistina dan como resultados estados de excitación y radicales libres (Pattison y Davies, 2006). La actividad antioxidante del verbascósido en conjunto con la actividad antiinflamatoria del EMBC, les otorga una gran capacidad fotoprotectora, ya que la formación de radicales libres y aldehídos producidos durante inflamaciones crónicas pueden inducir daño al ADN: incluyendo mutaciones genéticas; modificaciones



estructurales, funcionales y postraduccionales de proteínas clave relacionadas con el cáncer (Hussain *et al.*, 2003).

Espinosa en 2016 reportó actividades fotoprotectoras en líneas celulares HaCaT del EMBC y verbascósido. Estas sustancias mantienen la viabilidad celular y aportan fotoprotección en líneas celulares HaCaT expuestas a RUV-B, disminuían daños histológicos causados por RUV y disminuían las mutaciones de p53 en células de piel protegidas.

Las propiedades mencionadas de los grupos experimentales podrían explicar la expresión de bandas diferenciales en cada control y grupo experimental. La recuperación parcial de bandas proteicas en los grupos experimentales de verbascósido y EMBC, son una posible prueba de sus capacidades fotoprotectora sobre la piel de los ratones SKH-1 y por lo tanto candidatos viables para la producción de fotoprotectores tópicos de origen vegetal.



9. Conclusión

- ▣ Se logró observar la expresión de 22 proteínas en los geles 2D SDS-PAGE, de las muestras de piel de ratón SKH-1, correspondientes a los diferentes tratamientos.
- ▣ La piel de ratón SKH-1 irradiada y sin irradiación tiene un patrón diferencial de bandeo proteico.
- ▣ La aplicación tópica del EMBC y/o del verbascósido en ratones SKH-1 expuestos a la RUV recupera parcialmente el patrón de bandeo proteico expresado en los grupos no irradiados.



10. Referencias

Ajima, R., Akiyama, T., Usui, M., Yoneda, M., Yoshida, Y., Nakamura, T., Minowa, O., Noda, M., Tanaka, S., Noda, T. y Yamamoto T. 2008. Osteoporotic bone formation in mice lacking *tob2*; involvement of *Tob2* in RANK ligand expression and osteoclasts differentiation. *FEBS Letters*. 582:1313-1318.

Alipieva, K., Liudmila, K., Orhan, I. E. y Georgiev, M. I. 2014. Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*. 32: 1065–1076.

Arenas, G. R. 2013. *Dermatología: Atlas, diagnóstico y tratamiento*. Quinta edición. McGraw Hill.

Avila, A. J. G., Catañeda, C. M. C., Beitez, F. J. C., Durán, D. A.-Barroso, V. R., Martínez, C. G., Muñoz, L. J. L., Marínez, C. A. y Romo de Vivar, A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*. 76: 301-309.

Avila, A. J. G., Espinosa, G. A. M., De Maria, C. 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. *Complementary and Alternative Medicine*. 14: 281.

Baron, E.D. y Suggs, A. K. 2014. Introduction to photobiology. *Dermatologic clinics*. 32(3):255-66.

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.

Bernerd, F. 2010. Expresión génica de la fotoprotección. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*. 38:167-169.

BIO-RAD. 2014, *A guide polyacrylamide gel electrophoresis and detection handbook*.

Brenneisen, P., Sies, H. y Sharfetter-Kochanek, K. 2002. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases. From induction via signaling to initial events. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 973: 31-43.

Brew, K. y Nagase, H. 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica*. 1803: 55–71.

Bylaite, M., Grigaitiene, J. y Lapinskaite, G. S. 2009. Photodermatoses: classification, evaluation and management. *British Journal of Dermatology*. 161: 61-68.

Cabana, V. G., Feng, N., Reardon, C. A., Lukens, J., Webb, N. R., de Beer, F. C. y Getz, G. S. 2004. Influence of apoA-I and apoE on the formation of serum amyloid A-containing lipoproteins *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Lipid Research*. 45:317-325.

Catelo-Branco, C. 2010. *El envejecimiento de la piel y mucosas: fundamentos clínicos y enfoque integral*. Editorial Médica Panamericana.



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 Med* 70:1027–1032.

Comelli, F., Giagnoni, G., Bettoni, I., Colleoni, M. y Costa, B. 2007. The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and anti-nociceptive effect in a murine model of acute inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 152:787-794.

D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. y Scott, T. 2013. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(6): 12222–12248.

Davies, M. J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 305: 761–770.

Davies, M. J. 2004. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 3(1):17-25.

Devlin, T. M. 2006. *Bioquímica*. 4ª edición. Editorial Reverte, S. A.

Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., Bort, S., Mudri, S., Kuijper, J. L., Bukowski, T., Shea, P., Dong, D. L., Dasovich, M., Grant, F.J., Lockwood, L., Levin, S. D., LeCiel, C., Waggle, K., Day, H., Topouzis, S., Kramer, J., Kuestner, R., Chen, Z., Foster, D., Parrish-Novak, J. y Gross, J. A. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nature Immunology*. 5:752-760.

Dinkova-Kostova, A. T. 2008. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms. *Planta Médica*. 74(13):1548-59.

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

Escalas, T. J. 2014. *Fotodermatología*. Editorial Médica Panamericana.

Espinosa, G. A. M. 2016. Evaluación del efecto fotoquimioprotector del verbascósido en ratones skh-1 irradiados con luz ultravioleta. (Tesis doctoral). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

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

Filip, A., Daicoviciu, D., Clichici, S., Bolfa, P., Catoi, C., Baldea, I., Bolojan, L., Olteanu, D., Muresan, A. y Postescu, I. D. 2011. The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 105: 133–142.

Fortoul, T. y Castell, A. 2010. *Histología y Biología Celular*. Mc. Graw Hill. México. 370 p.



Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D.K., Linton, J.M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L.F. y Watt, F.M. 2011. The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* .144:577-589.

Garrido, P. A., Teijón, R. J. M., Blanco, G. D., Villaverde, G. C., Mendoza, O. C. y Ramírez, R. J. 2006. *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid. 2ª edición. Editorial TÉBAR.

Gilaberte, Y. y González, S. 2010. Novedades en fotoprotección. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 101 (8): 659–672.

Gilaberte, Y., Aguilera, J., Carrascosa, J. M., Figueroa, F. L., Romaní de Gabriel, J. y Nagore, E. 2011. La vitamina D: evidencias y controversias. *Actas Dermo-sifiliográficas*. 102(8):572---588.

Granados, H. C. V. 2015. *Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de abscisión del fruto de Vanilla planifolia G. Jack (Orchidaceae)*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Grant, W. B. 2007. Roles of solar UV radiation and vitamin D in human health and how to obtain vitamin D. *Expert Review of Dermatology*. 2(5), 563-577.

Guo-Qing, S., Jin-Rong, Z., Xiao-Ping, P., Jian, M. y Chang-Ling L. 2002. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*. 451: 119–124.

Gupta, A., Avci, P., Dai, T., Huang, Y. Y. y Hamblin, M. R. 2013. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Advances in Wound Care*. 2(8): 422-437.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646—674.

Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. y Nagata, S. 2002. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. 417: 182-187.

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: 267-273.

Hussain, S. P., Hofseth, L. J. y Harris, C. C. 2003. Radical causes of cancer. *Nature reviews Cancer*. 3(4):276-85.

Ichihashi, M., Ueda, M. A., Budiyanto, T. B., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. y Horikawa, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 189: 21-39.

Ikenaka, Y., Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Noguchi, R., Yanase, K., Tsujinoue, H., Namisaki, T., Imaz, U. H., Masaki, T. y Fukui., H. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (timp-1) inhibits tumorgrowth and angiogenesis in the timp-1 transgenic mouse model. *International Journal of Cancer*. 105: 340–346.



Juzeniene, A. y Moan, J. 2012. Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. *Dermato-Endocrinology*. 4:2, 109-117.

Kadoya, K., Sasaki, T., Kostka, G., Timpl, R., Matsuzaki, K., Kumagai, N., Sakai, L. Y., Nishiyama, T. y Amano S. 2005. Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis. *British Journal of Dermatology*. 153. 607–612.

Kato, M., Tsui-Fen, C., Collin, Z. Y., DeModena, J. y Sternberg, P. W. 2014. LINKIN, a new transmembrane protein necessary for cell adhesion. *Cell Biology. Developmental Biology and Stem Cells*. 1-26.

Kerkelä, E. y Saarialho-Kere, U. 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Experimental Dermatology*. 12: 109–125.

Kerwin, B. A. y Remmele, R. L. 2006. Protect from light: photodegradation and protein biologics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96(6):1468-79.

Kinghorn, A. D., Chin, Y. W. y Swanson, S. M. 2009. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 12(2):189-96.

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.

Kochevar, I. E., Taylor, C. R. y Krutmann, J. 2014. Fundamentos de fotobiología y fotoimmunología cutáneas. 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.

Kullavanijaya, P. y Lim, H. W. 2005. Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 52(6): 937-958.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. 2000. *Biología celular y molecular*. Cuarta edición. Edición. Editorial Medica Panamericana.

López, R. M. 2003. La regulación del ciclo celular y cáncer. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 6(1): 40-44.

Mackay, A. R., Gomez, D. E., Cottam, D. W., Rees, R. C., Nason, A. M. y Thorgeirsson, U. P. 1993. Identification of the 72-kDa (MMP-2) and 92-kDa (MMP-9) gelatinase/type IV collagenase in preparations of laminin and Matrigel. *Biotechniques*. 15(6):1048-51.

Malumbres, M. y Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 9: 153-166.

Manabe, R., Tsutsui, K., Yamada, T., Kimura, M., Nakano, I., Shimono, C., Sanzen, N., Furutani, Y., Fukuda, T., Oguri, Y., Shimamoto, K., Kiyozumi, D., Sato, Y., Sado, Y., Senoo, H., Yamashina, S., Fukuda, S., Kawai, J., Sugiura, N., Kimata, K., Hayashizaki, Y. y



- Sekiguchi K. 2008. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:12849-12854.
- Mancebo, S. E., Hu, J. Y. y Wang, S. Q. 2014. Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies. *Dermatologic Clinics*. 32(3):427-38.
- 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 Autoimmunity*. 34(3): 247-257.
- Meunier, L. 2008. Fotoprotección (interna y externa). *EMC Dermatología*. 42: 1-15.
- Montuega, B. L., Ruiz, F. J. E. y Calvo, A. G. 2009. Técnicas en histología y biología celular. 2ª edición. ELSEVIER MASSON.
- Nagasawa, H., Uto, Y., Sasaki, H., Okamura, N., Murakami, A., Kubo, S., Kirk, K. L. y Hori H. 2005. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer Research*. 25: 3689-3696.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., y Fox J. L. 2010. Ultraviolet radiation and skin cáncer. *International Journal of Dermatology*. 49: 978-986.
- Neves-Petersen, M. T., Prakash, G. G. y Petersen, S. B. 2012. UV Light Effects on Proteins: From Photochemistry to Nanomedicine. *Molecular Photochemistry*.
- 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.
- Nishino, K., Yamanouchi, K., Naito, K. y Tojo, H. 2002. Matrix metalloproteinases regulate mesonephric cell migration in developing XY gonads which correlates with the inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 by sry. *Development, Growth & Differentiation*. 44, 35–43.
- Noubade, R., Wong, K., Ota, N., Rutz, S., Eidenschenk, C., Valdez, P. A., Ding, J., Peng, I., Sebrell, A., Caplazi, P., Voss, J., Soriano, R. H., Sai, T., Lu, R., Modrusan, Z., Hackney, J. y Ouyang, W. 2014. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. *Nature*. 509: 235-239.
- Ocampo, A. G. 2003. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán.
- Pattison, D. I. y Davies, M. J. 2006. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*. (96):131-57.
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. y Davies, M. J. 2012. Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 11(1):38-53.



Pendota, S. C., Aderogba, M. A., Ndhlala, A. R. y Van Staden, J. 2013. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. leaf extracts and isolated compounds. *Journal Ethnopharmacology*. 148: 515–20.

Peña, A. D. 2007. Atlas de dermatología en piel. Médica Panamericana.

Pérez-García, L. J. 2004. Metaloproteinasas y piel. *Actas Dermosifiliográficas*. 95(7): 413-23.

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

Polymerase Chain Reaction (PCR), 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.

Potapovich, A. I., Kostyuk, V. A., Kostyuk, T. V., de Luca, C. y Korkina, L. G. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research*. 62:773–780.

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J. J. y Fisher, G. J. 2009. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 14: 20–24.

Ravanat, J. L., Douki, T. y Cadet, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 63: 88–102.

Reunanen, N. y Kähäri, V. M. Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>.

Reyes, E. y Vitale, M. A. 2012. Advances in photoprotection. Molecular mechanisms. *PIEL*. 28(4): 235-247.

Riveros, R. D., Váldez, B. M., Arancibia, B. C. A. y Bonifaz, A. R. 2012. La radiación solar. Editorial Terracota. Mexico.

Romero, R. S., Aguilar, R. S. y Rojas, Z. E. C. 2003. *Buddleja cordata* h.b.k. ssp. *Cordata* (Buddlejaceae): propagación y anatomía de la madera. *Polibotanica*. 16: 63-78.

Saewan, N. y Jimtaisong, A. 2014. Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14: 47–63.

Sander, C. S., Chang, H., Salzman, S., Müller, C. S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P. y Thiele, J. J. 2002. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*. 118(4):618-25.

Sarkany, R. P. E. 2011. Ultraviolet Radiation and the Skin. *Encyclopedia Environ Health*. 469-482.



- Sivamani, R. K., Crane, L. A. y Dellavalle, M. D. 2009. The benefits and risks of ultraviolet (UV) tanning and its alternatives: the role of prudent sun exposure. *Dermatologic Clinics*. 27(2): 149-154.
- Song, H.S., Choi, M.Y., Ko, M.S., Jeong, J.M., Kim, Y.H. y Jang, B.H. 2012. Competitive inhibition of cytosolic Ca²⁺-dependent phospholipase A2 by acteoside in RBL-2H3 cells. *Arch Pharm Res*. 35:905–10.
- Sun, J. 2010. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Are Essential for the Inflammatory Response in Cancer Cells. *Journal of Signal Transduction*. 1—7.
- Taihao, Q., Zhaoping, Q., Wei, X., Yuan, S., John, J. V. y Gary, J. F. 2009. Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. *Investig Dermatol Symp Proc*. 14(1): 20–24.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2015. *Cell Culture Basics Handbook*.
- ThermoFisher.com. (2017). Qubit Assays | Thermo Fisher Scientific. [en línea] Disponible en: <https://www.thermoFisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotopeanalysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays.html>. [Consultado 25 Junio. 2016].
- Tokino, T. y Nakamura, Y. 2000. The role of p53-target genes in human cancer. *Critical Reviews in Oncology: Hematology*. 33: 1—6.
- Verma, R. P. y Hansch, C. 2007. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15: 223–2268.
- Voet, D y Voet, J. G. 2006. *Bioquímica*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. 1776 p.
- Wartenberg, M., Budde, P., De Marees, M., Grunheck, F., Tsang, S.Y. y Huang, Y. 2003. Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation culture of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional Chinese medicine. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 83: 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, 2095–2099.
- Wirz-Justice, A., Graw, P., Kräuchi, K., Sarrafzadeh, A., English, J., Arendt, J. y Sand, L. 1996. 'Natural' light treatment of seasonal affective disorder. *Journal of Affective Disorders*. 12; 37(2-3):109-20.
- Wlaschek, M., Tantcheva-Poór, I., Schneider, L. A., Naderi, L., Razi-Wolf, Z., Schüller, J. y Scharffetter-Kochanek, K. 2001. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clinical and Experimental Dermatology*. 26: 592-599.
- Xiang, W., Ke, Z., Zhang, Y., Cheng, G. H., Irwan, I. D., Sulochana, K. N., Potturi, P., Wang, Z., Yang, H., Wang, J., Zhuo, L., Kini, R. M. y Ge, R. 2011. Isthmin is a novel secreted



angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 15(2): 359-74.

Young, A. R. 1997. Chromophores in human skin. *Physics in Medicine and Biology*. 42: 789-802.

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*. 21: 1113–1115.

UNIPROT: Universal Protein Resource. <http://www.uniprot.org/>. [Consultado 3 de Mayo 2016].

Pcdh15 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99PJ1>. [Consultado 3 de Mayo 2016].

Thbs2 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q03350>. [Consultado 3 de Mayo 2016].

Gpr98 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8VHN7>. [Consultado 3 de Mayo 2016].

Col4a3 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9QZS0>. [Consultado 5 de Mayo 2016].

Topors gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q80Z37>. [Consultado 5 de Mayo 2016].

Cd44 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/A2APM4>. [Consultado 14 de Mayo 2016].

Pkd2 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/O35245>. [Consultado 14 de Mayo 2016].

Nr4a1 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P12813>. [Consultado 14 de Mayo 2016].

Bcn1 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/O88597>. [Consultado 14 de Mayo 2016].

Mfge8 Mus musculus P21956. 2016. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P21956>. [Consultado 14 de Mayo 2016].

Mmp1b gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9EPL6>. [Consultado 23 de Julio 2016].

Mmp10 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/O55123>. [Consultado 23 de Julio 2016].



Sparc gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P07214>.
[Consultado 23 de Julio 2016].

ApoE gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08226>.
[Consultado 23 de Julio 2016].

Lum gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P51885>.
[Consultado 23 de Julio 2016].

Ehf gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/O70273>.
[Consultado 28 de Septiembre 2016].

Itga8 gene & protein. 2016. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/A2ARA8>.
[Consultado 28 de Septiembre 2016].

Tob2 gene & protein. 2016. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9JM55>.
[Consultado 28 de Septiembre 2016].

Ggh gene & protein. 2016. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Z0L8>.
[Consultado 19 de Noviembre 2016].

Gata1 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P17679>.
[Consultado 19 de Noviembre 2016].

Fgf2 gene & protein, 2016. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P15655>.
[Consultado 19 de Noviembre 2016].

Il31 gene & protein, 2016. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6EAL8>.
[Consultado 25 de Enero 2017].

Mlit11 gene & protein. 2015. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P97783>.
[Consultado 25 de Enero 2017].

Ptms gene & protein. 2016. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9D0J8>.
[Consultado 25 de Enero 2017].



11. Anexos

11.1 Anexo I. Extracción de proteínas

Previo a iniciar la extracción de proteínas se agregaron 25 mg de piel de ratón SKH-1 a un tubo eppendorf con perlas del kit UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit Sample, después se le agregaron 600 µl de Buffer RLT que inactiva inmediatamente DNAsas, RNAsas y proteasas para asegurar el aislamiento de ADN, ARN y proteínas. Posteriormente se centrifugó el lisado durante 3 minutos a 12 000 rpm.

AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (50)

Después de centrifugado, el lisado se transfirió a una columna AllPrep para decantar y seguir con otra centrifugación de 30 segundos a 10 000 rpm.

Al filtrado obtenido se le agregó 430 µL de Etanol absoluto para proporcionar condiciones de apropiadas de unión para el ARN y se transfirió a una columna RNeasy, en esta columna los contaminantes quedaron atrapados en el filtro mientras el RNA pasó al sobrenadante y se centrifugó por 15 segundos a 10 000 rpm.

Posteriormente, al filtrado se le agregaron 600 µL de buffer APP para que las proteínas precipitarán y se centrifugó por 10 minutos a 12 000 rpm para que éstas sedimentarán. A continuación se le agregaron 500 µL de Etanol 70%, se decantó y se dejó secar la pastilla 10 minutos; después se le agregaron 113 µL de buffer ALO y 87 µL de urea al 110% para disolver el sedimento proteínico.

Finalmente, se incubó 5 min a 95°C, se centrifugó 1 minuto a 12 000 rpm y se transfirió el sobrenadante en donde se encontraban las proteínas disueltas en el Buffer ALO y en la urea.

TRIZOL® Reagent

El reactivo TRIZOL® es una solución monofásica de fenol tiocianato de guanidina que facilita el aislamiento de biomoléculas como ARN, ADN y proteínas. Para la extracción de proteínas en este experimento se agregó reactivo TRIZOL, cloroformo y se dejó homogenizar para que se separará en una capa superior transparente acuosa que contenía ARN, una interfase, y una capa orgánica inferior roja que contenía el ADN y las proteínas.



Las proteínas se precipitaron a partir del sobrenadante de fenol-etanol mediante precipitación con isopropanol, finalmente las proteínas se lavaron para eliminar las impurezas y después se resuspendieron para su almacenamiento y uso.

11.2 Anexo II. Gel de poliacrilamida

El gel separador (12.5%) se preparó primero mezclando los componentes de la tabla 4, una vez mezclados se vertió lentamente dentro de las dos láminas de vidrio del sistema para electroforesis (Mini Protein 3, SIGMA) para formar la placa del gel, rápidamente se le agregó un poco de agua destilada para hacer que la superficie del gel quedará lo más plana posible.

Después de unos minutos cuando el gel separador ya había polimerizado, se retiró el agua con ayuda de un papel y se procedió con la preparación del gel concentrador (5%), una vez listo, éste se agregó sobre el gel separador ya sólido e inmediatamente después se colocó el peine para la formación de los pozos donde se colocaron las muestras.

Cuando el gel concentrador polimerizó se retiró el peine y se verificó que los pozos estuvieran bien formados; posteriormente se ensambló el aparato electroforético y se llenó el recipiente con el buffer de corrida (Tabla 5). Se cargaron 5 μ L de buffer de carga y 15 μ L muestra de proteínas, además de 5 μ L de marcador de peso molecular (BenchMark™ Unstained Protein Ladder).

Tabla 5: Preparación de gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Gel 5%	
Monómero	1.67 ml
Amortiguador 2	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Agua bidestilada	5.7 ml
Persulfato de amonio 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l
Gel 12.5%	
Monómero	4.15 ml
Amortiguador 1	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Agua bidestilada	3.2 ml



Persulfato de amonio 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l
<i>Tabla 5: Preparación del buffer de corrida.</i>	
Trimetamina	30.3 gr
Glicina	144 gr
SDS	10 g
Agua desionizada	1000 mL

11.3 Anexo III. Tinción de geles de poliacrilamida

Azul de Coomassie

Una vez transcurridos los 90 minutos el gel se retiró de la cámara electroforética y se sumergió durante una noche en azul de Coomassie en agitación lenta. Posteriormente el gel se paso a un recipiente con agua destilada para limpiar el exceso de colorante y que las bandas fueran visibles.

Nitrato de plata

El gel se mantuvo en solución fijadora durante 1 h en agitación lenta, después el gel se lavó tres veces en solución de lavado, 5, 10 y 15 min respectivamente. Inmediatamente después se enjuagó con solución de tiosulfato unos segundos y con agua mili Q tres veces. Posteriormente el gel se incubó durante 20 min en solución de nitrato de plata, enseguida se enjuagó 3 veces en agua destilada. Para la visualización de las proteínas se agregó una solución de revelado hasta observar claramente las bandas proteicas, finalmente se incubó 5 min en solución de fijación y se sumergió nuevamente en solución de lavado hasta visualizar las bandas proteicas.

Tabla 6: Componentes de las soluciones utilizadas para la tinción de los geles de poliacrilamida.

Soluciones	Elementos
Solución de Fijación	Ácido acético 12%
	Etanol 50%
	Formaldehído 37%
Solución de Lavado	Etanol 50%



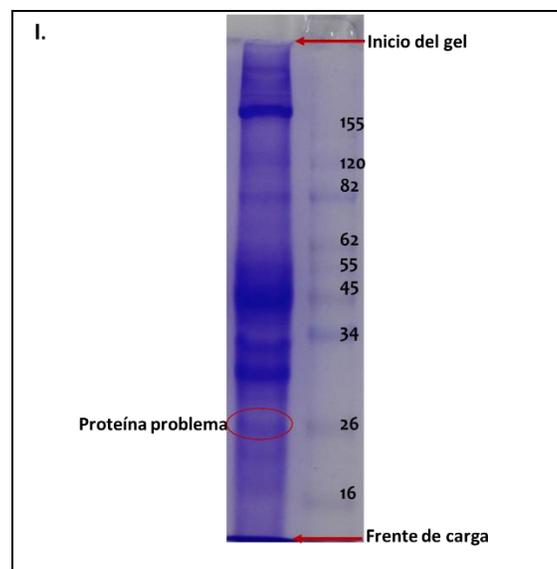
Solución de Nitrato de plata	AgNO ₃ 2 gr/L Formaldehido 37% 0.75 ml/L
Solución de Revelado	Na ₂ CO ₃ (3%) 30 gr/L Tiosulfato de sodio 20 gr/L Formaldehído 37%.0.5 ml/L

11.4 Anexo IV. Calculo del peso molecular relativo (*PMr*)

Al realizar el gel se calculó el Rf (distancia de migración relativa) y el peso molecular de las bandas de proteínas de la siguiente forma.

- I. Se calculó el Rf de cada banda "estándar" del marcador de peso molecular (BenchMark™ Unstained Protein Ladder) y de la proteína problema, midiendo la distancia desde el inicio del gel hasta la banda a medir y se dividió por la distancia de migración del frente de carga como lo indica la siguiente formula:

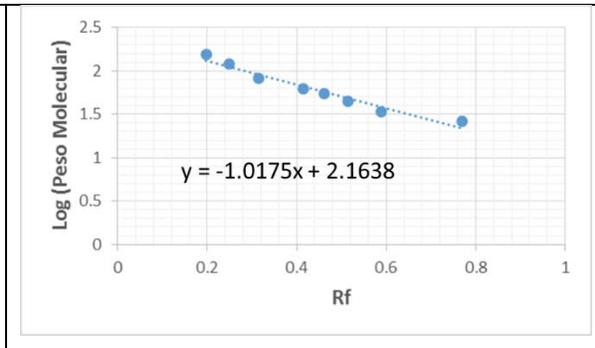
$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{Distancia de migración del frente de carga}}$$



- II. Se obtuvo el logaritmo de los pesos moleculares de las bandas estándar (Bandas del marcador de peso molecular) y sus Rf para representarlos en un gráfico de dispersión.



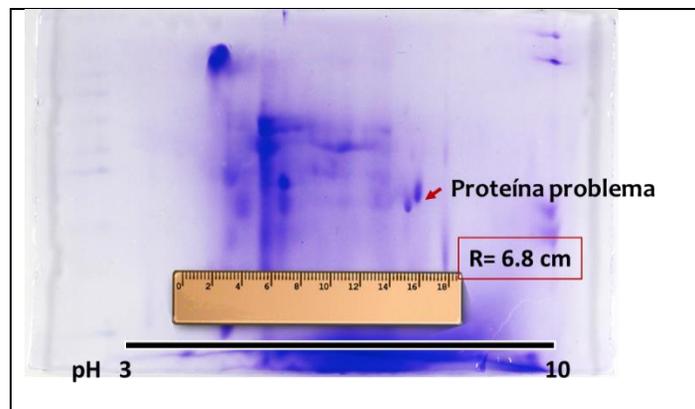
II.	Escalera	Rf	Log
	155	0.19772999	2.1903317
	120	0.24970131	2.07918125
	82	0.31541219	1.91381385
	62	0.41457587	1.79239169
	55	0.46236559	1.74036269
	45	0.51553166	1.65321251
	34	0.58900836	1.53147892
	26	0.76941458	1.41497335
	Proteina problema	0.77299881	X



- III. Posteriormente se interpolaron los valores del gráfico con el Rf de la proteína problema para obtener su peso molecular. Por ejemplo la proteína problema tiene un Rf de 0.7729. Usando la ecuación de la gráfica lineal podemos calcular $(-1.0175)(0.7729) + 2.1638 = 1.377273716$. Después se obtiene la relación inversa $10^{1.377273716} = 23.83$ kDa es el peso molecular de la proteína problema.

11.5 Anexo V. Cálculo del punto isoeléctrico (pI)

- I. Se midió en cm la el total de migración del rango de pH 3-10 de las tiras en la corrida de la primera dimensión.



- II. Se midieron las migraciones en cm de todas las proteínas y se hizo una regla de 3. Por ejemplo la proteína problema migro 4.45 cm, se multiplicó esta cantidad por 7 (intervalo de pH entre 3 y 10) y se dividió entre el resultado de la migración de 6.8 cm. Más los 3 rangos de pH faltantes y se obtuvo un valor final de 7.58.