



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**COMPARACIÓN DE DOS ESTILBENOS  
COMO FILTROS SOLARES**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**BIÓLOGA**  
**P R E S E N T A**  
**CHRISTIAN BELLO RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ANA MARÍA GARCÍA BORES**



**TLALNEPANTLA, MÉXICO**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la M. en C. Ana María García Bores en el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala, UNAM.

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

Y en el Laboratorio de Microscopia de la FES Iztacala, UNAM.

Y con el apoyo del proyecto DGAPA, PAPIIT IN213309.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por levantarme cada vez que caigo.

A Andy, mi angelito con cuernos, llegaste a mi vida cuando no te esperaba pero si te necesitaba, gracias por existir y ser mi fortaleza, cada día me enseñas algo nuevo.

A mi mamá, la Sra. Martha, no hay palabras que alcancen a expresar lo que siento por ti. Eres una mujer maravillosa que cada día me demuestras que el amor de madre es infinito, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, te admiro mucho.

A mi papá, el Sr. Bello, a pesar de que no estás a mi lado como yo quisiera, no podemos negar que el lazo de sangre es fuerte. Gracias por tu cariño y por tu apoyo.

A mis hermanas Ile y Cyndi, gracias por estar conmigo siempre, su compañía y apoyo ha sido primordial para mí. Entre nosotras nos podemos destruir, pero dejar que alguien más lo haga, nunca.

A Aby, otro angelito con cuernos, niña inteligente y bonita como su tía. A Nes, eres parte de la familia. A Pablo, un amigo que me ha demostrado que el persevera alcanza.

A mi tía Yeyi, mi segunda madre, sabes que te necesito mucho y que en parte lo que soy es gracias a ti. A mi tía Fanny, admiro tu fortaleza y el cariño que me brindas. A Yayas, Frank, Sammy, Jhoss, Cyndi, Richie y a la nueva integrante Donniz, ustedes son más que mis primos. A mis tíos Martin S., Ricardo O. y Martín R.

A Paty (Cucha), tu y yo somos el claro ejemplo de que los polos opuestos se atraen. Yuki, niña valiosa con la cual emprendí este viaje. Javier (Chulo), otro

ejemplo de polos opuestos. Martha, mi niña que fue inocente. Fer (Perralta), una amistad incondicional al final de la carrera. Edgar (Pato), Jorge, Daniel (Dannyboy), Nora, Maribel, Monica, Pilar, Alejandra, Adriana, Erika, Melissa, Fer Contreras, Daniel (Cosa), P. René y a cada amigo con el que viví momentos importantes.

Al P. Pedro, que puedo decir, gracias con toda la extensión de la palabra.

A Fernando M. la vida da muchas vueltas e hizo que de nuevo nos encontráramos.

Al profesor Ángel Duran, tu nombre lo dice todo, eso has sido para mí. Gracias por guiarme, apoyarme y escucharme.

A cada uno de mis profesores que contribuyeron a mi formación profesional y en algunos casos en mi formación personal.

A todos los laboratorios en donde estuve trabajando para la realización de este trabajo, Laboratorio I de la Unidad de Morfofisiología y Función en especial a la M. en C. Rosario González Valle. Al Laboratorio de Microscopia.

Al Laboratorio de Fitoquímica y a toda la gente que trabaja ahí.

A mis sinodales: el Dr. José Guillermo Avila, Dra. Margarita Canales, Dra. Tzasná Hernández y al Biól. José del Carmen Benítez, por haber enriquecido este trabajo con sus excelentes observaciones y sugerencias realizadas al mismo.

Y por último y no por eso menos importante, a mi directora de tesis la M. en C. Ana María García Bores por los consejos, paciencia, apoyo y conocimiento aportado durante la realización de este trabajo. Gracias, es una mujer muy inteligente digna de admirar.

## ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 Estructura y función de la piel .....	2
2.1.1 La epidermis .....	2
2.1.2 La dermis .....	4
2.1.3 La hipodermis .....	5
2.1.4 Funciones de la piel .....	6
2.2 Radiación ultravioleta (RUV) .....	6
2.2.1 Efectos de la RUV .....	8
2.2.2 Fotoprotección .....	10
2.3 Estilbenos .....	11
2.3.1 Resveratrol .....	11
2.3.2 <i>Trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno.....	13
2.3.3 Espectros de absorción del resveratrol y del estilbeno metoxilado.....	13
3. HIPÓTESIS .....	16
4. OBJETIVOS .....	16
4.1 Objetivo general .....	16
4.2 Objetivo particulares .....	16
5. METODOLOGÍA .....	17
5.1 Fotoprotección utilizando bacterias .....	17
5.2 Fotoprotección utilizando animales (cuyos) .....	19

5.2.1	Determinación del FPS en piel de cuyos .....	19
5.2.2	Estudio histopatológico .....	21
5.2.3	Conteo de células de quemadura .....	22
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
6.1	Protección utilizando bacterias .....	23
6.2	Protección utilizando animales (cuyos) .....	27
6.2.1	Determinación del FPS en piel de cuyos .....	27
6.2.2	Estudio histopatológico .....	28
6.2.3	Conteo de células de quemadura.....	38
7.	CONCLUSIONES .....	40
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
	APÉNDICE 1 .....	46

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capas de la piel.....	3
Figura 2. Espectro electromagnético .....	6
Figura 3. Estructura química del resveratrol .....	12
Figura 4. Estructura química del <i>trans</i> -3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno.....	13
Figura 5. Espectro de absorción en la región UV-B del espectro electromagnético del resveratrol.....	14
Figura 6. Espectro de absorción en la región UV-B del espectro electromagnético del <i>trans</i> -3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno...	14
Figura 7. Esquematización de la metodología para la irradiación de <i>E. coli</i> con luz UV-B.....	18
Figura 8. Esquematización de la metodología para la irradiación de <i>S. aureus</i> con luz UV-B.....	20
Figura 9. Efecto letal de la luz UV-B sobre <i>E. coli</i> sin protección (MeOH) .....	23
Figura 10. Efecto fotoprotector del resveratrol en una población de <i>E. coli</i> expuesta a la RUV-B .....	24
Figura 11. Efecto fotoprotector del estilbeno metoxilado en una población de <i>E. coli</i> expuesta a la RUV-B .....	25



<b>Figura 12. Efecto letal de la luz UV-B sin protección (MeOH) y efecto fotoprotector de los estilbenos (resveratrol y estilbeno metoxilado) en una población de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 13. Fotomicrografía de piel de cuyo normal. Tinción H y E, 20x. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 14. Fotomicrografía de piel de cuyo normal. Tinción H y E, 200x.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 15. Fotomicrografía de piel de cuyo irradiada durante 20 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 100X .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 16. Fotomicrografía de piel de cuyo irradiada durante 40 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 50x.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 17. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 80 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 50x.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 18. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 80 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 50x.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 19. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 100 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 100x.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 20. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 120 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 50x.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 21. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbeno metoxilado irradiada durante 80 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 50x.....</b>	<b>35</b>

<b>Figura 22. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbenu metoxilado irradiada durante 100 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 100x.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 23. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbenu metoxilado irradiada durante 120 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 100x.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 24. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbenu metoxilado irradiada durante 140 minutos con luz UV-B. Tinción H y E, 50x.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 25. Media del conteo de células de quemadura en piel de cuyo protegida por resveratrol y estilbenu metoxilado irradiada por luz UV-B.....</b>	<b>38</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1. Picos máximos de absorción en la región UV-B (<math>\lambda</math> máx) del resveratrol y estilbено metoxilado.....</b>	<b>15</b>
<b>Cuadro 2. Descripción de daños que puede tener la epidermis por efecto de la RUV .....</b>	<b>22</b>
<b>Cuadro 3. DEM y FPS del resveratrol y del estilbено metoxilado .....</b>	<b>27</b>

## 1. RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado la incidencia de la radiación ultravioleta (RUV) en la superficie terrestre lo que ha producido un aumento de los efectos agudos (quemaduras solares o eritemas, fotoinmunosupresión, reacciones fotosensibles y alergias) además de crónicos (fotoenvejecimiento y cáncer) en la piel. Para evitar o reducir éstos daños es necesario tomar medidas de fotoprotección. Existen compuestos orgánicos con capacidad fotoprotectora que pueden ser extraídos de plantas como es el caso del resveratrol y del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado) aislados de la corteza de *Yucca periculosa*. Para su evaluación se utilizaron dos modelos biológicos. En el primer modelo de fotoprotección *in vitro* se determinó si las sustancias a evaluar protegen de la muerte celular inducida por la RUV-B en *Escherichia coli*. Los resultados mostraron que el estilbeno metoxilado protege por más tiempo de la muerte celular que el resveratrol. Por otro lado en el modelo *in vivo* se utilizaron cuyos para determinar el factor de protección solar (FPS) de ambas sustancias, estudiar si los estilbenos evitan el daño histopatológico en la piel de cuyos y determinar si existe diferencias entre el número de células de quemadura en ambos tratamientos. El FPS de ambos estilbenos es similar, ambos protegen de daños en la piel causados por la radiación ultravioleta. El estilbeno metoxilado produce más células de quemadura que el resveratrol, habiendo una diferencia significativa. Por lo tanto se concluye que ambos estilbenos poseen capacidad fotoprotectora.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Estructura y función de la piel

La piel es el órgano de mayor extensión del cuerpo, representa del 15 al 20% del peso corporal. Está formada por tres capas principales: la superficial compuesta por epitelio estratificado plano queratinizado llamado epidermis; una de tejido conectivo subyacente, la dermis, y por debajo de esta última, se encuentra la hipodermis, la cual en algunas regiones está formada por tejido adiposo. La hipodermis, a su vez está adherida de forma laxa a una fascia profunda subyacente, o al periostio del hueso (Fawcett, 1995).

#### 2.1.1 La epidermis

La epidermis se divide en varios estratos celulares basados en la diferenciación del queratinocito o queratinización. Este proceso, es una serie compleja de eventos bioquímicos y estructurales genéticamente programados que se producen progresivamente en los queratinocitos posmitóticos (Fitzpatrick, 2005). Cada etapa de diferenciación es más especializada, limita la estructura y función de la célula, además es regulada por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos; por lo tanto es vulnerable a la alteración en cada uno de los niveles (Eckert, 1992). Las capas de la epidermis son las siguientes, empezando por el estrato más profundo (Figura 1):

a) El estrato basal, también denominado estrato germinativo, está representado por una única capa de células cilíndricas que descansan sobre la lámina basal. Contiene a las células madres que, por mitosis, dan origen a las células nuevas llamadas queratinocitos (Ross y col., 1997).

A medida que, por división mitótica, aparecen en este estrato los nuevos queratinocitos, éstos avanzan hacia la próxima capa y comienzan el proceso de migración hacia la superficie. Este proceso finaliza cuando la célula se transforma en célula queratinizada madura, que posteriormente se descamará (Ross y col., 1997).

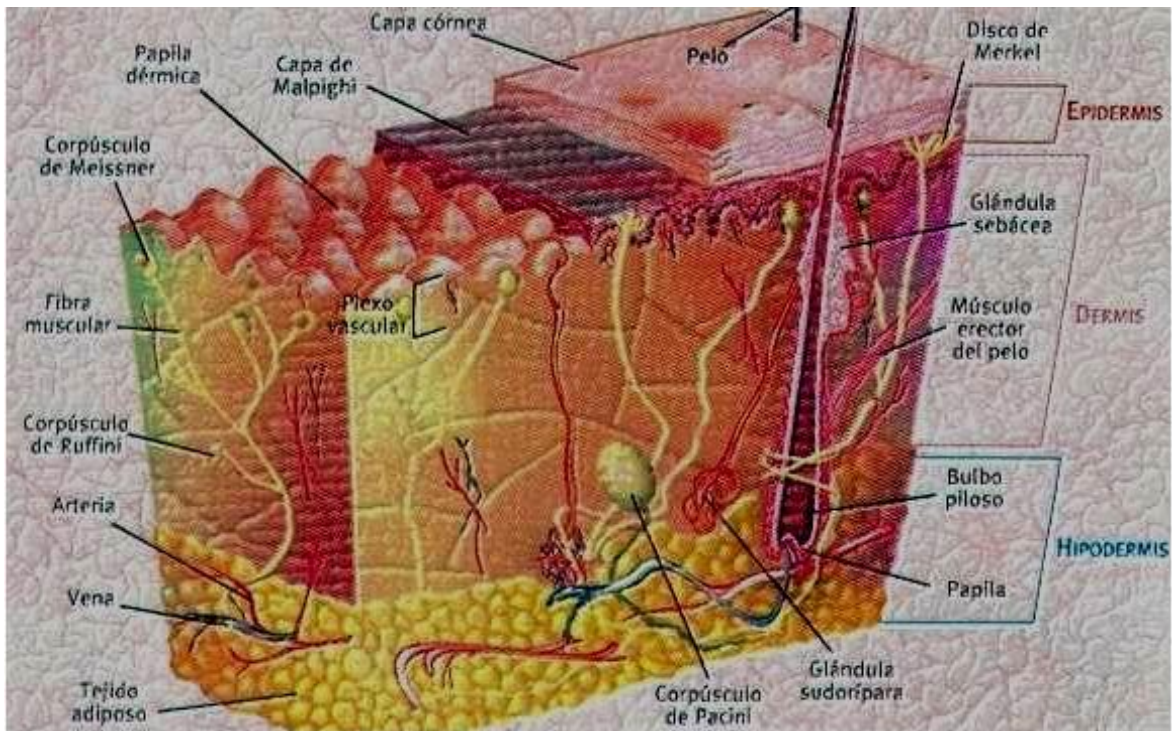


Figura 1. Capas de la piel (<http://www.monografias.com/trabajos29/piel1.jpg>)

b) El estrato espinoso tiene varias capas celulares. Las células son más grandes que las del estrato basal y tienen forma poliédrica que a medida que ascienden se van aplanando, presentando abundantes prolongaciones citoplasmáticas o “espinas”, que le confieren el nombre a esta capa (Ross y col., 1997). Las prolongaciones son uniones llamadas desmosomas que mantienen unidas a las células de este estrato (Fitzpatrick, 2005).

c) El estrato granuloso es la capa más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis. Esta capa varía en su espesor. Las células contienen abundantes gránulos de queratohialina (Ross y col., 1997), que son proteínas ricas en histidina y cistina asociadas con la diferenciación epidérmica (Fitzpatrick, 2005).

d) El estrato córneo es la capa que varía en espesor y es la más ancha en piel gruesa. Se compone de células grandes, aplanadas, anucleadas llenas de queratina, sin organelos citoplasmáticos, muertas, íntimamente unidas entre sí por queratosomas (Ross y col., 1997).

Aunque los queratinocitos son el tipo celular dominante, aproximadamente el 90% del total de las células que forman la piel, se pueden encontrar otro tipo de células aisladas por toda la epidermis (Ross y col., 1997). Un ejemplo son las células de Langerhans que suelen localizarse en las capas superiores del estrato espinoso e intervienen en las respuestas inmunológicas al presentar los antígenos a los linfocitos T. También se encuentran las células de Merkel, que tienen un papel esencial en la percepción sensorial. Otro tipo celular son los melanocitos, que producen la melanina, pigmento clave en el color de la piel (Fawcett, 1995).

### **2.1.2 La dermis**

Por debajo de la epidermis está la dermis. Esta es una capa resistente de tejido conectivo fibroso, filamentoso y amorfo que aloja las redes nerviosas y vasculares y los apéndices formados en la epidermis (Fitzpatrick, 2005). En donde se identifican dos capas: una capa papilar superficial y una capa reticular (Fawcett, 1995).

La capa papilar superficial o laxa, es proximal a la epidermis, se amolda a sus contornos y tiene aproximadamente su mismo espesor (Fitzpatrick, 2005). Está formada por fibroblastos y otras células de tejido conectivo ampliamente dispersas entre haces estratificados al azar de fibras de colágena finas, principalmente colágena de tipo III. Contiene una red laxa de fibras elásticas y muchos capilares (Fawcett, 1995).

La capa reticular o densa, representa la mayor parte de la dermis, está constituida por haces toscos muy empaquetados de fibras más gruesas, principalmente de colágena de tipo I (Fawcett, 1995; Fitzpatrick, 2005).

Los fibroblastos, los macrófagos y los mastocitos son células propias de la dermis; otras, como los linfocitos, células plasmáticas y otros leucocitos derivados de la sangre, pueden ingresar en la dermis como respuesta a diversos estímulos (Fitzpatrick, 2005).

El fibroblasto que es el principal tipo celular de la dermis, tiene como función primordial, la síntesis y la remodelación de las proteínas del tejido conectivo como la fibronectina y la colágena (Fitzpatrick, 2005). La fibronectina la utiliza el fibroblasto para anclarse a la matriz del colágeno. Los fibroblastos secretan colagenasa y gelatinasa para remodelar las fibras de colágeno (Holbrook y Wolf, 1997).

Los macrófagos derivan de precursores celulares de la médula ósea (Fitzpatrick, 2005). Funcionan presentando antígenos a las células linfoides como parte de la respuesta inmune además de fagocitar partículas o patógenos que invaden la dermis, también sintetizan y secretan interleucina I (IL-1), factores de crecimiento, prostaglandinas e interferón (Holbrook y Wolf, 1997).

Los mastocitos están presentes en toda la dermis, pero se concentran alrededor de los vasos sanguíneos. Estas células producen gránulos de sustancias vasoactivas y quimioatrayentes como la histamina. Los mastocitos responden a la luz, frío, trauma agudo, vibración y presión, así como a estímulos químicos e inmunológicos; cuando existe alguno, estos liberan el contenido de los gránulos iniciando la quimiotaxis o la vasodilatación (Holbrook y Wolf, 1997).

### **2.1.3 La hipodermis**

La capa más interna de la piel es la hipodermis, que es una película de células adiposas derivadas del mesodermo y constituye la parte más profunda de la piel, funciona como agente amortiguador entre las capas externas de la piel y las estructuras internas como músculo y hueso. También provee de energía de reserva, confiere movilidad a la piel, aísla y moldea el cuerpo (Holbrook y Wolf, 1997).



#### 2.1.4 Funciones de la piel

La piel tiene diversas funciones importantes, entre ellas; la de barrera que protege al organismo contra agentes físicos, químicos y biológicos del ambiente externo. Interviene en la homeostasis del cuerpo ya que contribuye a mantener constante el ambiente interno, al regular la temperatura corporal y la hidratación. Por otro lado, la función sensorial de la piel es importante pues brinda información sobre el ambiente externo, por lo que es informativa y protectora al mismo tiempo; también tiene funciones de excreción a través de glándulas sudoríparas; además de convertir en vitamina D a las moléculas precursoras de ésta (Ross y col., 1997).

La exposición solar de la piel favorece la fotobiogénesis de la vitamina D. La radiación ultravioleta penetra en la epidermis y transforma el 7-dehidrocolesterol en vitamina D. Otro aspecto importante de la función protectora de la piel es su capacidad para aumentar la producción de melanina, la cual ayuda a controlar los efectos de la radiación durante una exposición prolongada. Sin embargo un exceso de radiación electromagnética emitida por el sol puede ser muy nociva para la piel (Fawcett, 1995).

#### 2.2 Radiación ultravioleta (RUV)

El sol emite un espectro continuo de energía radiante, en el cuál se pueden encontrar la luz ultravioleta, luz visible y el espectro infrarrojo (Figura 2). Aproximadamente el 6% de la radiación solar que alcanza la superficie de la tierra es la radiación ultravioleta, el 48% es luz visible y 46% luz infrarroja (Pathak, 1986).

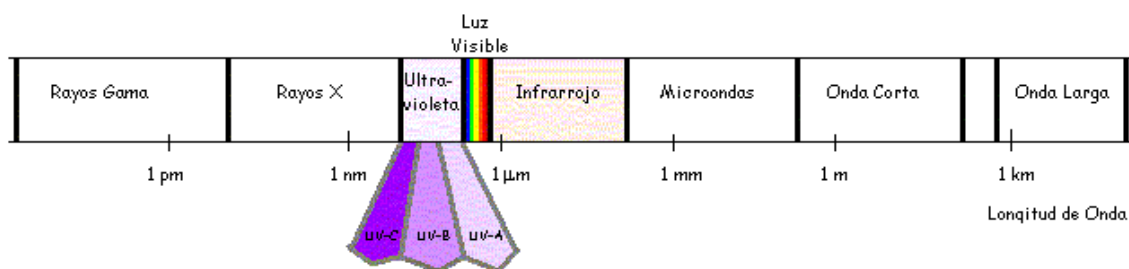


Figura 2. Espectro electromagnético (<http://www.ideam.gov.co/radiacion.htm>)

La luz ultravioleta a su vez se subdivide en tres zonas: UV-A, UV-B y UV-C (Bouzas, 2003).

La zona UV-C, conocida como radiación germicida o radiación ultravioleta corta, se encuentra entre los 200 y 290 nm (Bouzas, 2003). Este tipo de radiación es absorbida por las capas atmosféricas, por lo que no incide en la superficie terrestre, sin embargo puede producirse por fuentes ultravioletas artificiales y ser perjudicial para la piel (García, 1998).

La zona UV-B, se encuentra entre las longitudes de onda comprendidas entre los 290 y 320 nm. Se le conoce como la radiación de quemaduras solares o radiación ultravioleta media (Bouzas, 2003). Esta es responsable de la producción de quemaduras de piel, eritema y edema, también estimula la pigmentación ya que penetra en la epidermis hasta la capa basal e induce la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) (García, 1998). Representa el 0.1% de la radiación electromagnética que alcanza la tierra, pero su energía es 100 veces más eficaz para producir eritema que la UV-A y causa daño directo en el ADN (Bouzas, 2003).

La zona UV-A, denominada radiación ultravioleta de onda larga, tiene longitudes de onda comprendidas entre 320 y 400 nm con un punto máximo en los 340 nm. Este tipo de radiación puede penetrar a las capas más profundas de la piel que son la dermis y la hipodermis. Es la zona responsable del bronceado directo de la piel sin inflamación preliminar, producida por la fotooxidación de la melanina presente en la capa superior de la piel, también produce un eritema débil y produce en mayor concentración EROS que la UV-B, incluyendo el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno (Halliday, 2005). Este tipo de radiación tiene una mayor longitud de onda y por tanto su energía es menor. Representa el 4.9% de la radiación solar que llega a la tierra (Bouzas, 2003).

### 2.2.1 Efectos de la RUV

Las respuestas bioquímicas a la radiación UVB en la piel incluyen cambios en la síntesis de ADN, ARN, aumento en las proteínas, en las actividades enzimáticas, disrupción de lisosomas y generación de mediadores de inflamación (Fitzpatrick, 2005).

La inflamación es la respuesta tisular se caracteriza por el aumento de flujo sanguíneo y paso de leucocitos al tejido, el cual produce tumefacción, enrojecimiento, aumento de la temperatura, dolor y pérdida de la función (Delves y col., 2008).

Los efectos que la radiación UV produce sobre la piel, pueden ser de dos tipos: a) efectos agudos como las quemaduras solares, la fotoinmunosupresión y las reacciones fotosensibles; b) efectos crónicos como el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis (Pathak, 1986).

a) Agudos. Las quemaduras solares, también conocidas como eritemas, son causadas por una lesión temporal en la epidermis debido a la destrucción de células de la capa celular espinosa de la piel. También el daño es provocado por la desnaturalización de sus componentes proteínicos, que provoca la liberación de sustancias similares a la histamina que generan una dilatación en los vasos sanguíneos, causando hinchazón de la piel y estimula la proliferación de células basales. Las quemaduras se deben en un 98% a efectos de la radiación UV-B y 2% a la UV-A (Bouzas, 2003).

La fotoinmunosupresión es una consecuencia de la acción de la radiación UV-B sobre las defensas inmunológicas del organismo, dando lugar a enfermedades recurrentes de la piel. Los efectos a largo plazo de la inmunosupresión inducida por radiación ultravioleta incluyen una posible proliferación de células anormales y en el desarrollo de alguna forma de cáncer (Matsumura y Ananthaswamy, 2004).

Las reacciones fotosensibles son el resultado de cuando se ingieren o se está en contacto con algunos fármacos o productos naturales como los psoralenos y se expone a la RUV, se manifiesta una reacción alérgica como la fotodermatitis (Bouzas, 2003).

b) Crónicos. El fotoenvejecimiento promueve cambios al proceso natural del envejecimiento en las áreas expuestas al sol. Se requieren muchos años de exposición al sol para tener efectos notorios y es una de las consecuencias de la sobre exposición crónica a la radiación UV-A (Wlaschek y col., 2001). Los cambios más importantes del fotoenvejecimiento se producen en la dermis, y se caracterizan por la presencia de material basófilo en la dermis media y superficial, fenómeno conocido como elastosis (Bouzas, 2003).

La fotocarcinogénesis es la suma de una serie de eventos bioquímicos simultáneos y secuenciales que tienen como resultado el desarrollo del cáncer. Esta enfermedad se produce debido a que las células del organismo al perder sus mecanismos normales de control de la reproducción provocan un crecimiento desordenado (Bouzas, 2003).

Las células de cáncer se desarrollan a partir de células normales por un proceso llamado transformación. El primer paso en este proceso es la iniciación, en el cual un cambio en el material genético de la célula la prepara para transformarse en cancerosa. Las mutaciones pueden ser ocasionadas por un agente carcinógeno (químicos, virus, radiación, luz solar, etcétera). No todas las células son igualmente susceptibles a estos agentes, pero una alteración genética o el efecto de algún otro agente, conocido como promotor, puede aumentar la posibilidad de las células para convertirse en cancerosas. El segundo paso en la carcinogénesis es la promoción, donde una célula que ha iniciado su cambio se convierte en cancerosa. Finalmente se tiene un crecimiento anormal del tejido, que da lugar a la formación de un tumor que puede ser benigno o maligno, a este proceso se le denomina progresión, donde una célula con mutaciones acumula otra serie de daños produciendo la

alteración de mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular (Bouzas, 2003).

### **2.2.2 Fotoprotección**

Para evitar o reducir los efectos nocivos de la radiación UV es necesario tomar medidas de protección como evitar la exposición prolongada en las horas de mayor irradiación (10 am a 3 pm), emplear ropa protectora como sombreros, paraguas y lentes de sol, así como administrar tópicamente productos químicos que aumenten las defensas naturales de la piel y el empleo de filtros solares (García, 1998).

Los filtros solares pueden clasificarse de acuerdo al tipo de protección que ofrecen, como bloqueadores físicos y absorbedores químicos (Cancino, 1998; Serpone y col., 2005).

Los bloqueadores físicos son sustancias que reflejan o dispersan la radiación ultravioleta, generalmente son monóxidos metálicos. Ejemplos de estos bloqueadores físicos incluyen al óxido de zinc, dióxido de titanio y petrolato rojo. Este tipo de filtros se presenta en cantidades suficientes, van a reflejar toda la radiación UV, visible e infrarroja. Comúnmente, se utilizan en conjunción con los absorbedores químicos para aumentar la protección solar (Cancino, 1998).

Los filtros químicos son fotoprotectores orgánicos que actúan absorbiendo la radiación UV-B (Cancino, 1998). Son generalmente compuestos aromáticos conjugados con grupos carbonilo, que absorben la energía de fotones de las radiaciones UV (Gasparro, 1997).

Los compuestos orgánicos con capacidad fotoprotectora pueden ser extraídos de plantas, ya que estas contienen metabolitos secundarios que junto con otros compuestos le brindan protección contra la radiación ultravioleta. Un ejemplo son los compuestos encontrados en las plantas del género *Yucca*.

Del extracto metanólico de la *Y. periculosa* se han aislado estilbenos como el resveratrol, el *trans*-3, 3',5, 5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado) y el 4, 4'-dihidroxiestilbeno (Torres y col., 2003). Este tipo de compuestos tienen dos anillos aromáticos conjugados lo que potencialmente les brinda capacidad fotoprotectora.

## 2.3 Estilbenos

Los estilbenos son compuestos fenólicos formados por la condensación del ácido p-hidroxicinámico con tres moléculas de malonil coenzima A, mediante la acción de la estilbeno sintetasa (Gorham, 1989; Frémont, 2000). Desempeñan un papel muy importante en las plantas, especialmente en el período de transición de albura a duramen; estos compuestos también pueden ser producidos en respuesta a lesiones o a la colonización por patógenos microbianos (Celimene y col., 2001; Torres y col., 2003).

Compuestos del tipo de los estilbenos han sido encontrados en muchas familias de plantas, como Vitaceae, Gnetaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Moraceae y Cyperaceae. Este tipo de sustancias presentan diversos efectos biológicos, que incluyen la actividad antioxidante, antifúngica (Counet y col., 2004; Ferré-Filmon y col., 2004), previenen el desarrollo de la aterosclerosis y de enfermedades coronarias. Muchos estudios también han demostrado el potencial quimiopreventivo para el cáncer (Piacente y col., 2004; Afaq y col., 2005), el cual se centra en revertir, detener o retrasar las etapas de la carcinogénesis (Pezzuto, 2006).

### 2.3.1 Resveratrol

El *trans*-3,5,4'- tetrahidroxiestilbeno (resveratrol) es una fitoalexina natural que se encuentra en las plantas como una respuesta defensiva contra las infecciones por hongos y otros factores de estrés ambientales (Pezzuto, 2006). Se encuentra presente en las uvas, cacahuates y en otras plantas (Dong, 2003; Afaq y col., 2005).

En la medicina tradicional japonesa y china, el resveratrol ha sido utilizado para luchar contra la dermatitis, favus y gonorrea. En estas culturas, lo extraen de la raíz de *Polygonum cuspidatum*, llamándolo Ko-jo-kon en japonés (Afaq y col., 2005).

El resveratrol tiene propiedades antitumorales, anti-inflamatorias y antioxidantes (Burns y col, 2002). Se ha empleado para tratar diversos tipos de cáncer como el de mama, de pulmón, de próstata, pancreático, etcétera. La forma de su administración y dosis son diversos, en la mayoría de los casos el resultado ha sido la reducción en el crecimiento de tumores, además de prevenir la formación y desarrollo de los mismos (Lin y Tsai, 1999; Gusman y col., 2001; Athar y col., 2007).

Uno de los mecanismos moleculares propuestos para explicar las propiedades quimioprotectoras del resveratrol es porque induce la activación del p53 que es un gen supresor tumoral, el cual desempeña un papel importante en la apoptosis y control del ciclo celular (Dong, 2003).

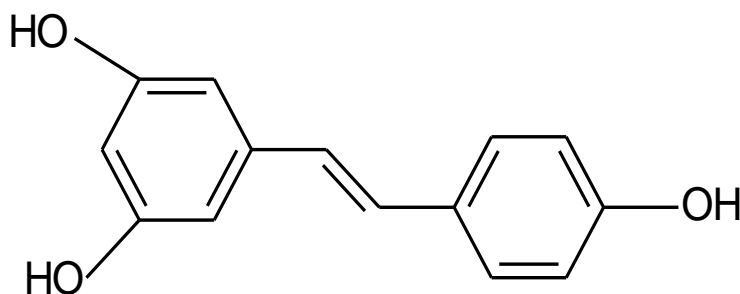


Figura 3. Estructura química del resveratrol

### 2.3.2 *Trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno

El *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado) retarda el crecimiento y desarrollo del gusano *Spodoptera frugiperda*, insecto considerado como plaga del maíz (Torres y col., 2003).

También se ha reportado que el estilbeno metoxilado tiene actividad antiplaquetaria, reduciendo la agregación de las plaquetas activadas con trobina y ADP (Olas y col., 2002); disminuye la adhesión plaquetaria a la colágena y el fibrinógeno (Olas y col., 2005); reduce las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (Olas y col., 2003). También inhibe la carbonilación de proteínas y reduce la oxidación de los grupos tiol, disminuye la lipoperoxidación y los daños al ADN en plaquetas tratadas con compuestos de selenio y platino (Olas y col., 2006).

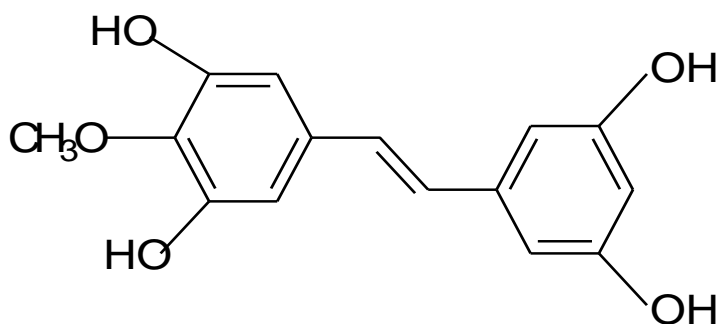


Figura 4. Estructura química del *trans*-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno

### 2.3.3 Espectros de absorción del resveratrol y del estilbeno metoxilado

Los espectros de absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético del resveratrol (Figura 5) y del estilbeno metoxilado (Figura 6) demuestran que sus picos máximos de absorción ( $\lambda$  máx) (Cuadro 1), se encuentran en la zona UV-B (280-320 nm) (García, en proceso).



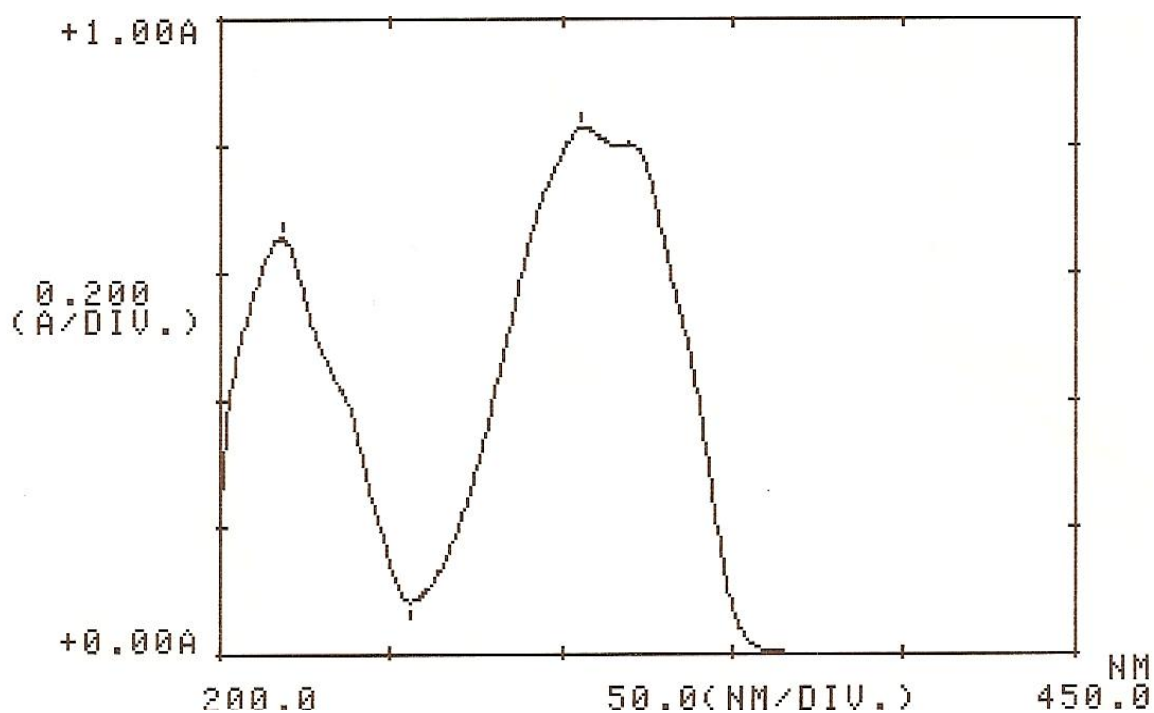


Figura 5. Espectro de absorción en la región UV-B del espectro electromagnético del resveratrol.

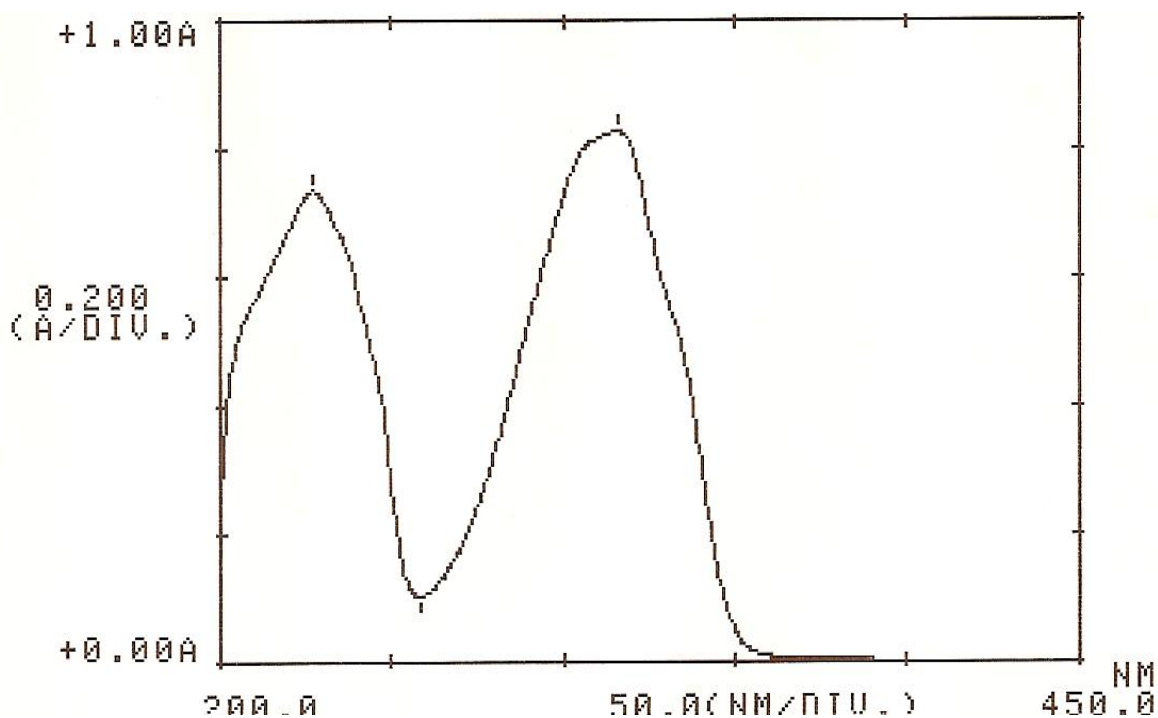


Figura 6. Espectro de absorción en la región UV-B del espectro electromagnético del *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxi-4'-metoxiestilbene.

Cuadro 1. Picos máximos de absorción en la región UV-B ( $\lambda$  máx) del resveratrol y estilbeno metoxilado

COMPUESTO	$\lambda$ máx. (nm) en la región UV-B
Resveratrol	305.5
Estilbeno metoxilado	316.0

Lo anterior indica que el resveratrol y el estilbeno metoxilado son sustancias que potencialmente tienen capacidad fotoprotectora. Por este motivo en el presente trabajo se comparó el potencial como filtros solares del *trans*-3,5,4'-tetrahidroxiestilbeno y del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno.

### 3. HIPÓTESIS

El resveratrol y el estilbeno metoxilado por presentar en su estructura química dos anillos aromáticos que son capaces de absorber la luz UV-B pueden tener capacidad fotoprotectora y así disminuir la tasa de mortalidad de una suspensión bacteriana y evitar el daño causado por la radiación solar ultravioleta en la piel de los cuyos.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

- Comparar en modelos biológicos la actividad fotoprotectora del *trans*-3,5,4'-tetrahydroxiestilbeno (resveratrol) y del *trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxi-4'-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado).

#### 4.2 Objetivo particulares

- Evaluar *in vitro* la actividad fotoprotectora en la región UV-B del resveratrol y del estilbeno metoxilado en un modelo bacteriano.
- Determinar en conejillos de indias (cuyos) el factor de protección solar (FPS) del resveratrol y del estilbeno metoxilado.
- Estudiar histopatológicamente los tejidos protegidos con las sustancias fotoprotectoras y los no protegidos.
- Comparar la formación de células de quemadura en los tejidos protegidos con resveratrol y estilbeno metoxilado.

## 5. METODOLOGÍA

El *trans*-3,5,4'-tetrahidroxiestilbeno (resveratrol) y el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado) fueron proporcionados por el laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO de la FES Iztacala. La eficacia de ambas sustancias como filtros solares se evaluó de acuerdo a dos modelos:

- Protección utilizando bacterias.
- Protección utilizando animales (cuyos)

### 5.1 Fotoprotección utilizando bacterias

El primer modelo utilizado fue el propuesto por Avila, 2002. En dicho modelo, las suspensiones bacterianas fueron expuestas a la radiación ultravioleta con y sin protección. La RUV es letal para las células bacterianas por lo que se puede determinar el efecto fotoprotector de los estilbenos al comparar la constante de mortalidad (K) calculada a partir de curvas de sobrevivencia. La bacteria que se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se preparó un inóculo con una concentración aproximada de  $10^8$  bacterias/ml. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, la pastilla se resuspendió en 100 ml de búfer de fosfatos (PBS) a pH 7, obteniendo de esta forma la suspensión bacteriana a irradiar.

Los estilbenos se colocaron en cubetas de cuarzo estériles a una concentración de 2.0 mg/ml. El control negativo fue metanol (MeOH), solvente empleado para diluir las muestras a evaluar.

Las unidades experimentales se formaron al unir una cubeta de cuarzo con la sustancia a evaluar y otra con la suspensión bacteriana. Una vez unidas, se colocaron a 15 cm de una lámpara de luz UV-B (312 nm Spectroline EB-280C) y fueron irradiadas a diferentes tiempos. A esta distancia en dosis de irradiación de  $0.60 \text{ Joule/cm}^2$  (medido con un radiómetro Spectroline DM-300HA) con intensidad de campo de  $130 \text{ Watt/m}^2$ .

En los experimentos sin protección, la suspensión bacteriana fue irradiada durante diez minutos. Se tomaron 9 muestras de 100  $\mu$ l cada 30 segundos, para realizar el conteo de microorganismos sobrevivientes mediante la técnica de dilución (Eisenstadt y col., 1994). En los experimentos con protección, los tiempos de irradiación fueron de 2.5, 5, 10, 15, 30, 60 y 90 minutos. Las muestras se tomaron en cada uno de los tiempos de irradiación (Figura 7).

Los resultados se expresaron graficando el logaritmo del número de sobrevivientes con relación al tiempo de irradiación haciendo una curva de sobrevivencia. Se realizaron nueve repeticiones por cada experimento.

El análisis estadístico entre los tratamientos se determinó mediante la prueba de t para hacer la comparación de pendientes.



Figura 7. Esquematzación de la metodología para la irradiación de *E. coli* con luz UV-B

## 5.2 Fotoprotección utilizando animales (cuyos)

El segundo modelo propuesto por Bissett y col., 1989, permitió determinar en el dorso de los cuyos con y sin protección el factor de protección solar (FPS) y de realizar un estudio histopatológico para comparar el daño producido por la RUV-B en los diferentes tratamientos.

Los tratamientos consistieron en tres grupos con cinco cuyos hembras de la cepa Hartley, cada uno con un peso aproximado de 500 g. El primer grupo recibió la aplicación tópica de 0.2 g de gel Soavence forte que se utilizó como vehículo en los siguientes tratamientos, en cada una de las ventanas de exposición. Al segundo y tercer grupo se les aplicó tópicamente 2 mg/cm<sup>2</sup> de *trans*-3, 3',5, 5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno y del resveratrol en el vehículo ya mencionado respectivamente.

### 5.2.1 Determinación del FPS en piel de cuyos

Las zonas dorsales de los cuyos (hembras peso promedio de 500 g) se afeitaron con una rasuradora eléctrica y se depilaron empleando una crema depiladora Veet para piel sensible. Posteriormente, se lavó la zona depilada. Después de 24 horas, la piel de la zona dorsal de cada cuyo se cubrió dejando ventanas de exposición de 2 cm<sup>2</sup> donde se aplicaron 2 mg/cm<sup>2</sup> de las sustancias a evaluar o del vehículo (resveratrol, estilbeno metoxilado y Soavence forte). Las ventanas de exposición se prepararon con cinta adherible y papel aluminio, tres de cada lado de la zona de la espina dorsal.

El lapso de tiempo entre el tratamiento tópico y la irradiación con luz UV-B fue de aproximadamente de 15 minutos. Los animales se colocaron en sujetadores a 15 cm de separación de la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La energía de irradiación a esta distancia es de 0.60 Joule/cm<sup>2</sup> (intensidad de campo 130 watt/m<sup>2</sup>) calculada con un radiómetro calibrado (Spectroline DM-300HA).

Los animales se irradiaron a diferentes lapsos de tiempo (20, 80, 100, 120, 140 minutos). Concluido cada tiempo se cerró la ventana de exposición correspondiente (Figura 8).

La formación del eritema (enrojecimiento en cuatro puntos) se evaluó 24 horas después del experimento, usando como referencia la piel adyacente no expuesta del animal y la del grupo testigo. El valor de 1 DEM (dosis eritematogénica mínima) que corresponde al tiempo de irradiación que provoca enrojecimiento detectable en el área expuesta, se determinó previamente y corresponde a 20 minutos de exposición a la dosis antes mencionada.

El factor de protección solar se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

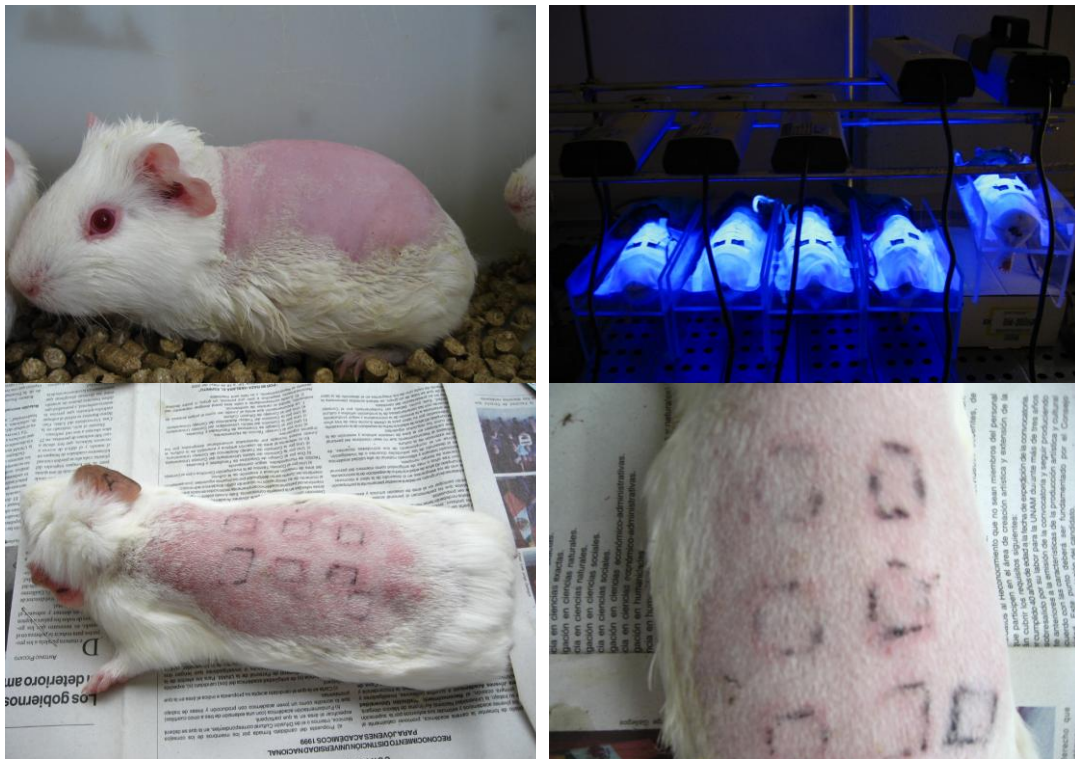


Figura 8. Esquematización de la metodología para la irradiación de cuyos con luz UV-B

El análisis estadístico entre los tratamientos se determinó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

### **5.2.2 Estudio histopatológico**

A partir de los experimentos para la determinación del FPS de cada una de las sustancias se tomaron biopsias de aproximadamente 25 mm<sup>2</sup> del área no expuesta a la RUV sin vehículo y con vehículo, de la dosis eritematogénica, una anterior (suberitematogénica) y una posterior (hipereritematogénica).

Las muestras se conservaron en formaldehído al 10% en buffer de fosfatos 0.1M pH 7 durante 24 horas. Posteriormente, fueron procesadas según la técnica histológica estándar para incluir las muestras en parafina y realizar cortes histológicos a 5µm (Elenitsas y col., 1997). Los cortes se tiñeron con eosina y hematoxilina (Apéndice1).

El estudio histopatológico consistió en la evaluación de los cambios degenerativos y necróticos así como la ausencia o presencia del estrato córneo, hiperqueratosis, ortoqueratosis, paraqueratosis, atrofia del epitelio, hiperplasia, acantólisis, disqueratosis, espongiósis (Cuadro 2) a nivel de la epidermis. De la dermis se evaluaron los cambios infamatorios como edema, infiltrado inflamatorio y el número de células de quemadura. El diagnóstico se basó en lo reportado para quemadura por irradiación de luz UV-B de tipo agudo comparándolo con el tejido de piel de cuyo sin protección con relación a los tejidos protegidos con las sustancias fotoprotectoras (Lowe y Friedlander, 1997; McGregor y Hawk, 2001).



Cuadro 2. Descripción de daños que puede tener la epidermis por efecto de la RUV (Fitzpatrick, 2005).

DAÑO	EXPLICACIÓN
Hiperqueratosis	Engrosamiento del estrato córneo
Ortoqueratosis	Estrato córneo puede parecer cualitativamente similar a la capa espinosa normal
Paraqueratosis	Cornificación defectuosa y acelerada que conduce a la retención de núcleos picnóticos de células epidérmicas
Acantólisis	Perdida primaria de cohesión de las células epidérmicas
Disqueratosis	Cornificación prematura de células individuales en las capas viables de la epidermis
Espongiosis	Pérdida secundaria de cohesión entre células por flujo tisular en la epidermis

### **5.2.3 Conteo de células de quemadura**

Las células de quemadura se derivan de los queratinocitos dañados y representan células en un proceso apoptótico con citoplasma hialino eosinófilico, núcleo picnótico y están adyacentes a células aparentemente normales. Para cuantificar las células de quemadura se utilizó el objetivo 40x y se contó en 10 campos en forma aleatoria por corte, se realizó el estadístico de Mann-Whitney para saber si entre las sustancias había diferencia significativa en la producción de estas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Protección utilizando bacterias

Este modelo se realizó para determinar si los estilbenos protegían a un sistema biológico de la muerte celular provocada por luz UV-B, los experimentos se realizaron con poblaciones similares de la bacteria *Escherichia coli*.

Se evaluó el efecto fotoprotector del resveratrol y del estilbeno metoxilado, así como una población de bacterias sin protección, cabe destacar que como se describió en la metodología, en los experimentos sin protección se utilizó únicamente metanol (Avila, 2002).

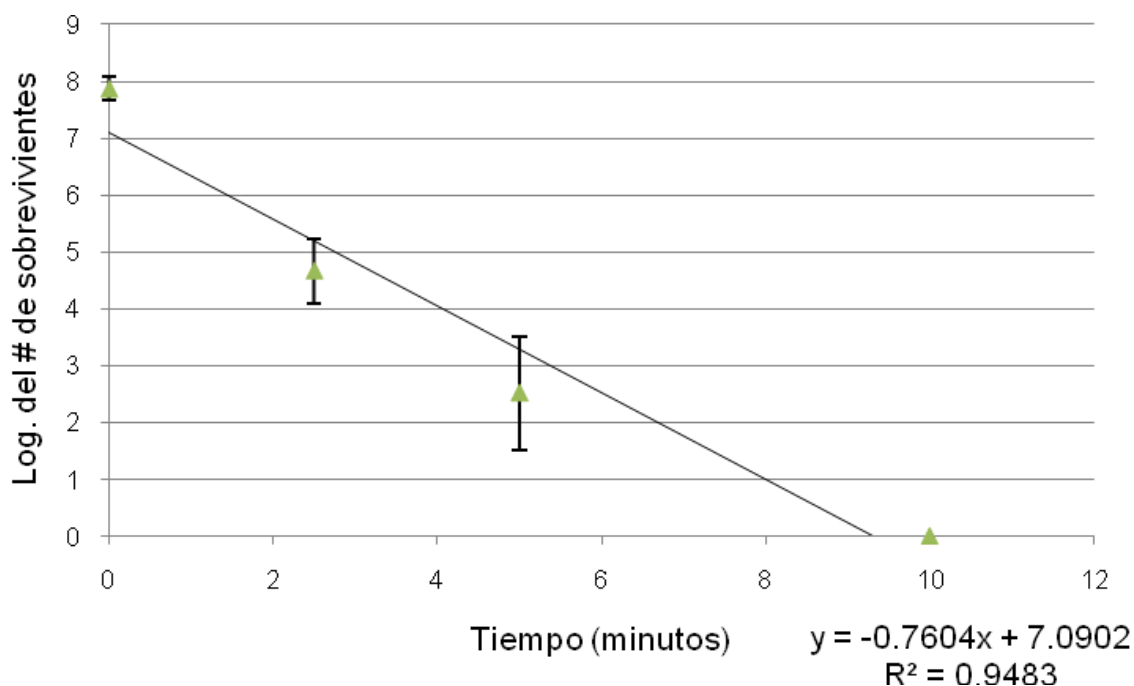


Figura 9. Efecto letal de la luz UV-B sobre *E. coli* sin protección (MeOH)

En la figura 9 se observa como la RUV-B provoca la muerte de toda la población bacteriana a los 10 minutos de exposición sobre *E. coli* sin protección.

A diferencia de los experimentos sin protección, en la figura 10 se observa que el resveratrol protege a la población de *E. coli* del efecto letal de la radiación ultravioleta puesto que la muerte de la población ocurre hasta los 60 minutos. Aunado a lo anterior, el estilbeno metoxilado protegió a las poblaciones bacterianas hasta un intervalo de 30 a 60 minutos, alcanzando la mortalidad de toda la población a los 90 minutos (Figura 11). En ambos casos la forma de las curvas fue similar a la reportada en la literatura cuando se utiliza la luz UV-B como agente bactericida (Davis y Dulbecco, 1996).

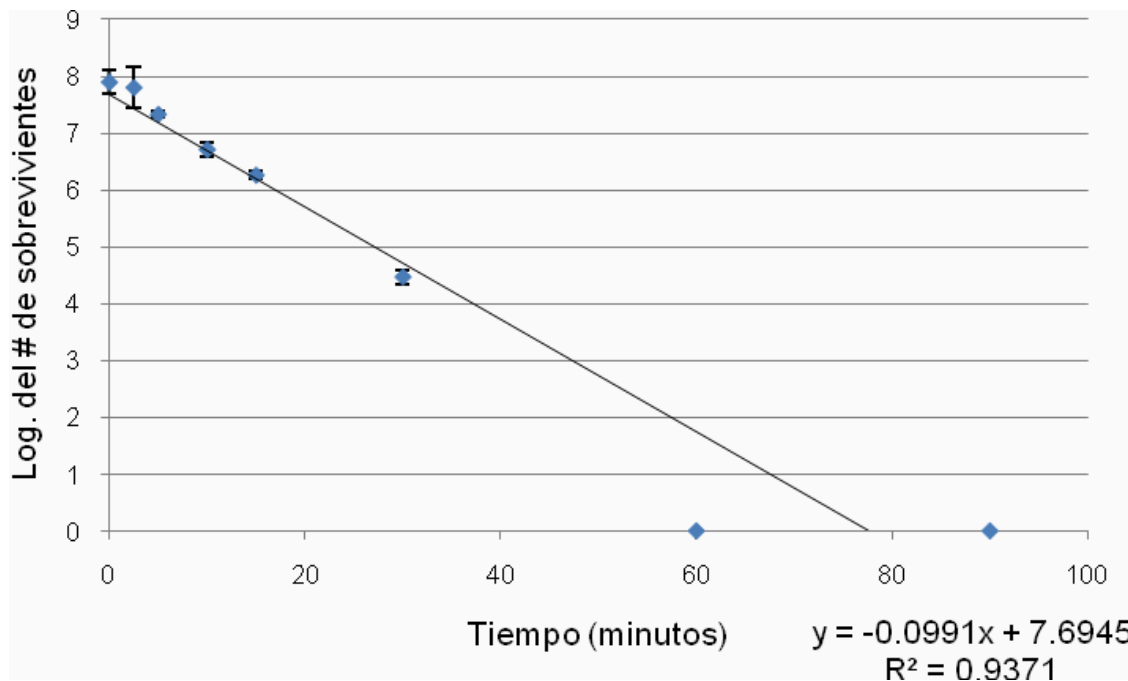


Figura 10. Efecto fotoprotector del resveratrol en una población de *E. coli* expuesta a la RUV-B

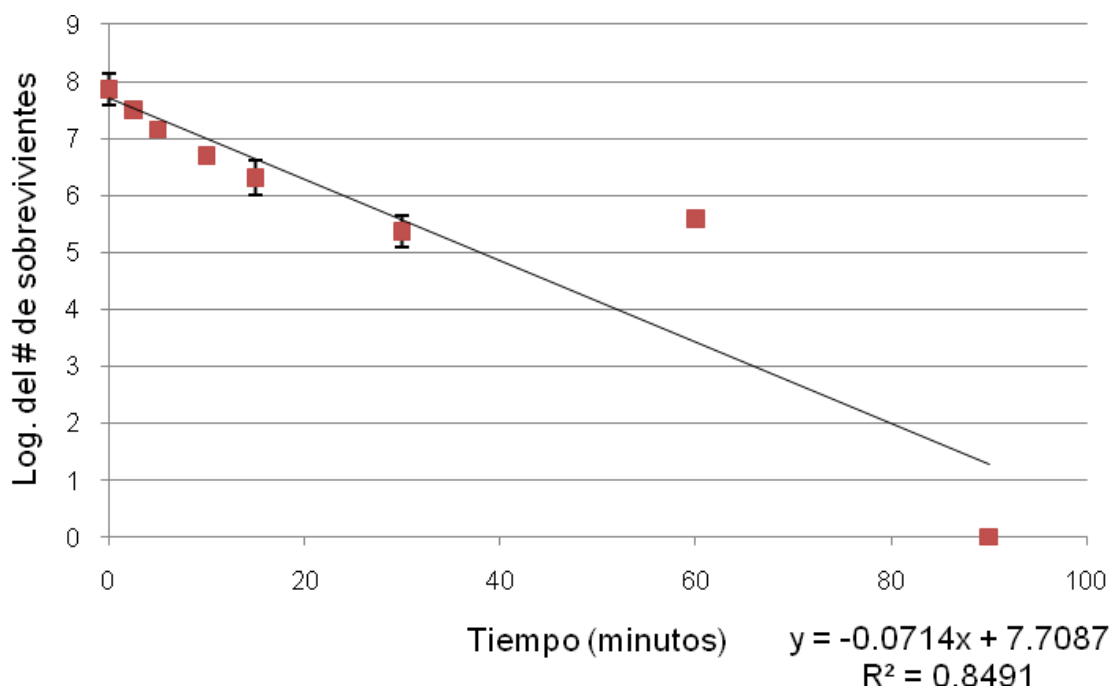


Figura 11. Efecto fotoprotector del estilbenu metoxilado en una población de *E. coli* expuesta a la RUV-B

Al hacer la prueba de t para encontrar las diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes (K) se encontró que el estilbenu metoxilado ( $t=2$ ,  $P=0.046$ ) protege más tiempo a las bacterias de la radiación UV-B que el resveratrol.

En la Figura 12 observamos que la curva de supervivencia bacteriana sin protección, solo con MeOH, es una curva de impacto único, ya que viene dada por la acción de un único cambio que afecta una estructura fundamental del microorganismo. Las curvas de supervivencia del resveratrol y del estilbenu metoxilado, son curvas de impacto múltiple, ya que es necesario que se acumulen varios daños en estructuras celulares determinadas y que exista una disminución de la capacidad de reparación del organismo para que el daño sea letal en la población bacteriana (Davis y Dubelcco, 1996).

La luz ultravioleta produce cambios fotoquímicos en las biomoléculas bacterianas provocando la muerte celular. Se estima que la exposición de un cultivo bacteriano a la RUV produce la disminución rápida de la población debido a las alteraciones directas en el material genético y la producción de especies reactivas de oxígeno las cuales reaccionan con otros componentes celulares (proteínas, lípidos, etc.) alterando su función y contribuyendo al daño celular.

Tanto el resveratrol como el estilbeno metoxilado son compuestos que contienen anillos aromáticos conjugados con un grupo carbonilo en su estructura química, por lo cual pueden absorber la RUV. Estas moléculas conjugadas contienen los sistemas que permiten la deslocalización de electrones sobre la absorción de un fotón de luz ultravioleta (Gasparro, 1997). Por ello, estos estilbenos son capaces de absorber la RUV e impiden la muerte de la población bacteriana a diferencia de lo obtenido en los experimentos sin protección donde la muerte celular ocurre a los 10 minutos de exposición.

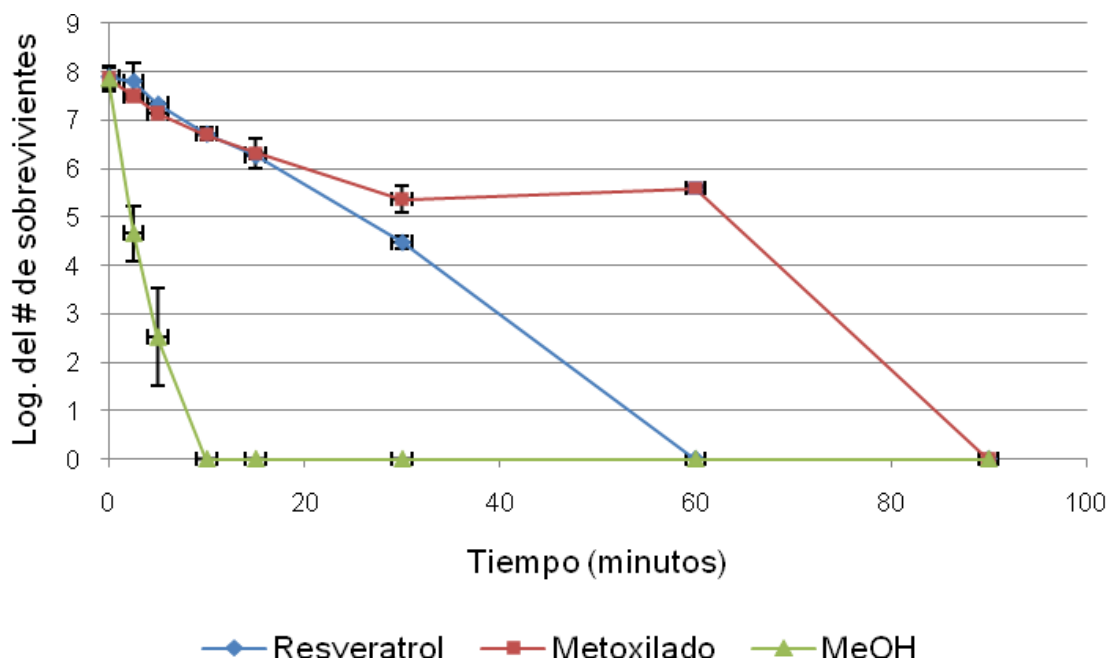


Figura 12. Efecto letal de la luz UV-B sin protección (MeOH) y efecto fotoprotector de los estilbenos (resveratrol y estilbeno metoxilado) en una población de *E. coli*

Avila en el 2002, determinó que el etil-hexil.(p) metoxinamato (escalol), un filtro solar comercial, protege de la muerte celular a la población de *E. coli*, teniendo una muerte bacteriana a los 60 minutos de exposición a la RUV. Tanto el resveratrol y el estilbено metoxilado tienen capacidad fotoprotectora y podrían ser utilizados como filtros solares, ya que el resveratrol protege al cultivo bacteriano de manera similar que escalol y por ende el estilbено metoxilado protege más que este filtro.

## 6.2 Protección utilizando animales (cuyos)

### 6.2.1 Determinación del FPS en piel de cuyos

De acuerdo a lo reportado en Avila, 2002, en este modelo biológico la dosis eritematogénica mínima (DEM), que es la dosis de irradiación para producir enrojecimiento detectable es de 20 minutos.

Los cuyos protegidos con resveratrol presentaron una DEM de 100 minutos y un factor de protección solar (FPS) de 5, mientras que los cuyos protegidos con estilbено metoxilado tuvieron una DEM 108 minutos y un FPS de 5.4 (Cuadro 3).

Cuadro 3. DEM y FPS del resveratrol y del estilbено metoxilado

Compuesto	1 DEM (min.)	FPS
Resveratrol	100	5
Estilbено metoxilado	108	5.4

Se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar las diferencias en la protección de los estilbenos. Se determinó que el resveratrol confiere significativamente menor protección que el estilbeno metoxilado.

El eritema se ha empleado como marcador de daño de la radiación UV para evaluar la capacidad fotoprotectora de diversas sustancias, debido a que se detecta con facilidad y puede monitorearse a lo largo del tiempo (Rosen, 1997; McGregor y Hawk, 2001).

La aparición del eritema depende de la energía total administrada que puede aumentar por el tiempo de exposición o la intensidad de la radiación, así cuando se aplica en la piel alguna sustancia con propiedades fotoprotectoras, el tiempo necesario para producir eritema, aumenta, ya que la cantidad de energía que penetra en la piel se ve reducida por las sustancias. Lo anterior lo pudimos observar al aplicar el resveratrol y el estilbeno metoxilado en la piel de cuyo, de tal forma que la DEM fue más alta que en los cuyos sin irradiar (20 min) (Rosen, 1997).

No existen diferencias significativas en el FPS del escalol, resveratrol y el estilbeno metoxilado. Debido a lo anterior se puede afirmar que las sustancias evaluadas en el presente estudio tienen las mismas propiedades fotoprotectoras que el filtro solar comercial.

### **6.2.2 Estudio histopatológico**

De acuerdo con el estudio histopatológico, la piel de cuyo normal (sin irradiar) presenta un epitelio que consta de 4 estratos en 5 a 8 capas de células, células de langerhans, la dermis laxa y la dermis densa, en donde se observa las glándulas sebáceas, pelos, músculos erector de pelo y capilares (Figura 13 y 14).



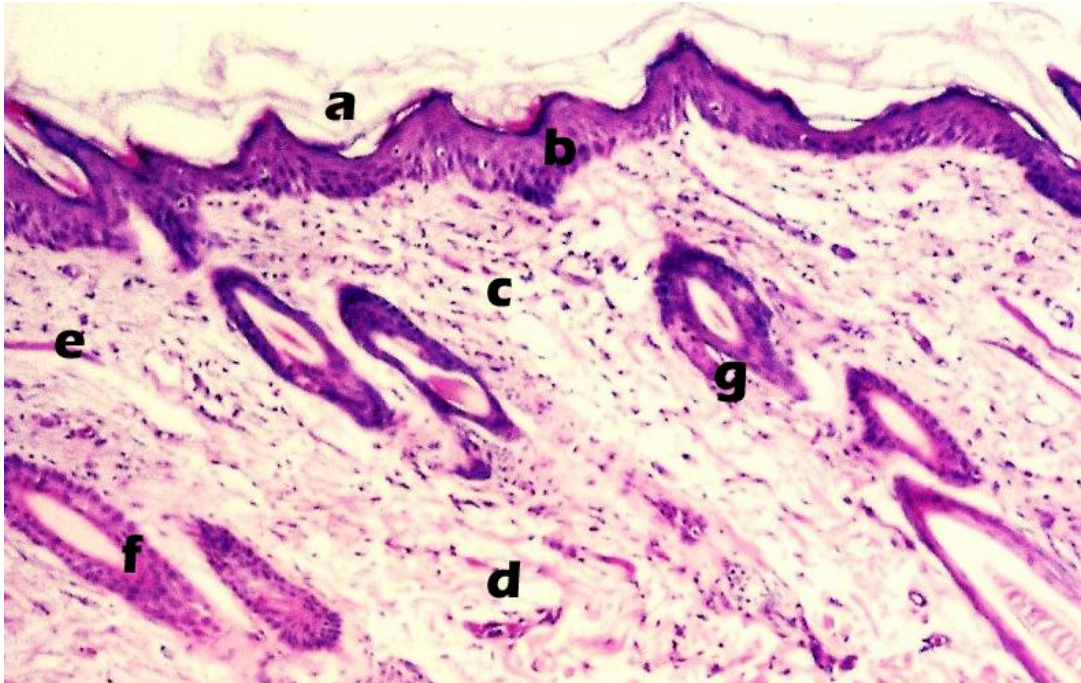


Figura 13. Fotomicrografía de piel de cuyo normal en la que se observa el a) estrato córneo, b) epitelio, c) dermis laxa, d) dermis densa, e) músculo erector del pelo, f) pelo, g) glándula sebácea. Tinción H y E, 20x.

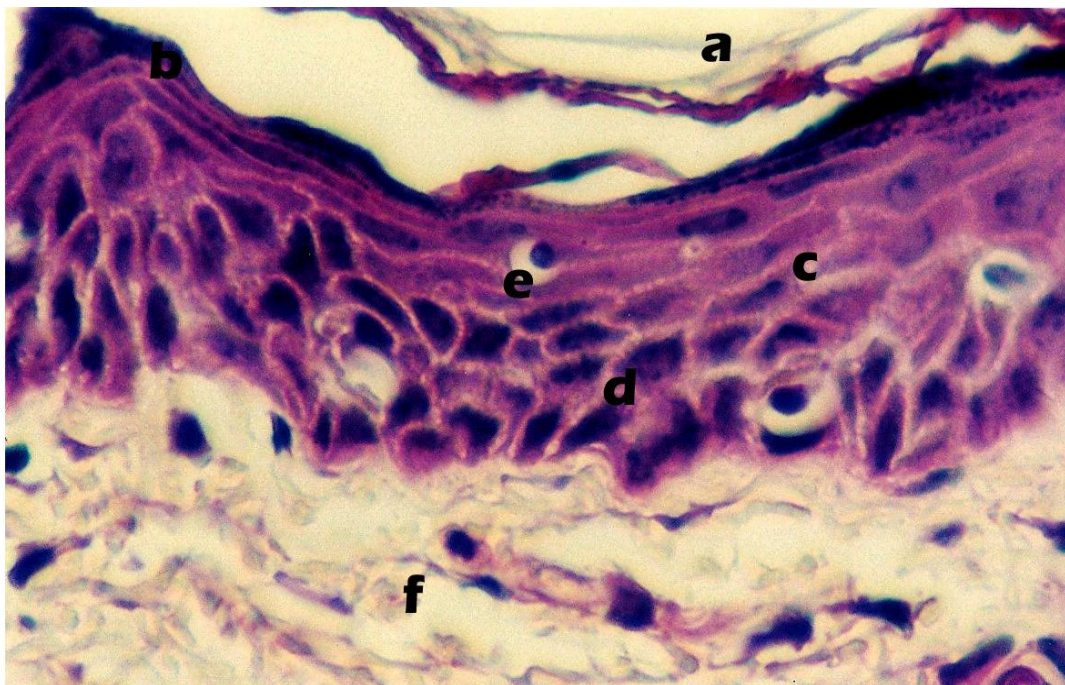


Figura 14. Fotomicrografía de piel de cuyo normal en la que se observa 5 a 8 capas de células en el epitelio y sus estratos a) estrato córneo, b) estrato granuloso, c) estrato espinoso, d) estrato basal o germinativo, e) célula de langerhans, f) dermis laxa. Tinción H y E, 200x.



La piel de cuyo sin protección irradiada durante 20 minutos por la luz UV-B, presenta una dermatitis severa difusa. Con infiltrados inflamatorios representativos, mayormente neutrófilos y algunos macrófagos; congestión focal; no se observa la diferencia de la dermis laxa y la densa; edema moderado a severo multifocal; necrosis multifocal severa en el epitelio del pelo y en el músculo erector del pelo; teniendo necrosis y apoptosis severa multifocal en el epitelio (Figura 15).

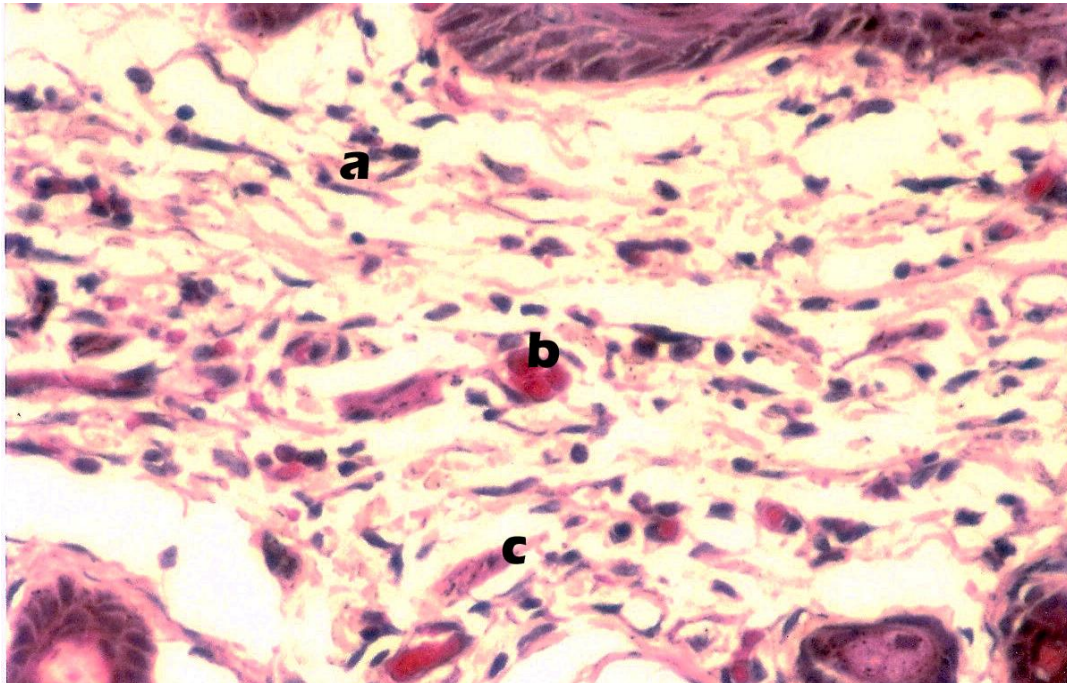


Figura 15. Fotomicrografía de piel de cuyo irradiada durante 20 minutos con luz UV-B en la que se observa una dermatitis severa difusa con a) infiltrados inflamatorios representativos, b) congestión, c) músculo erector con necrosis. Tinción H y E, 100x.

En la piel de cuyo sin protección irradiada por 40 minutos por RUV-B, se observa una dermatitis severa difusa. Con edema severo difuso; infiltrados inflamatorios representativos, neutrófilos; congestión multifocal; necrosis en el epitelio del pelo de manera severa y difusa; necrosis difusa severa en el músculo erector del pelo; necrosis y apoptosis severa difusa en el epitelio (Figura 16).

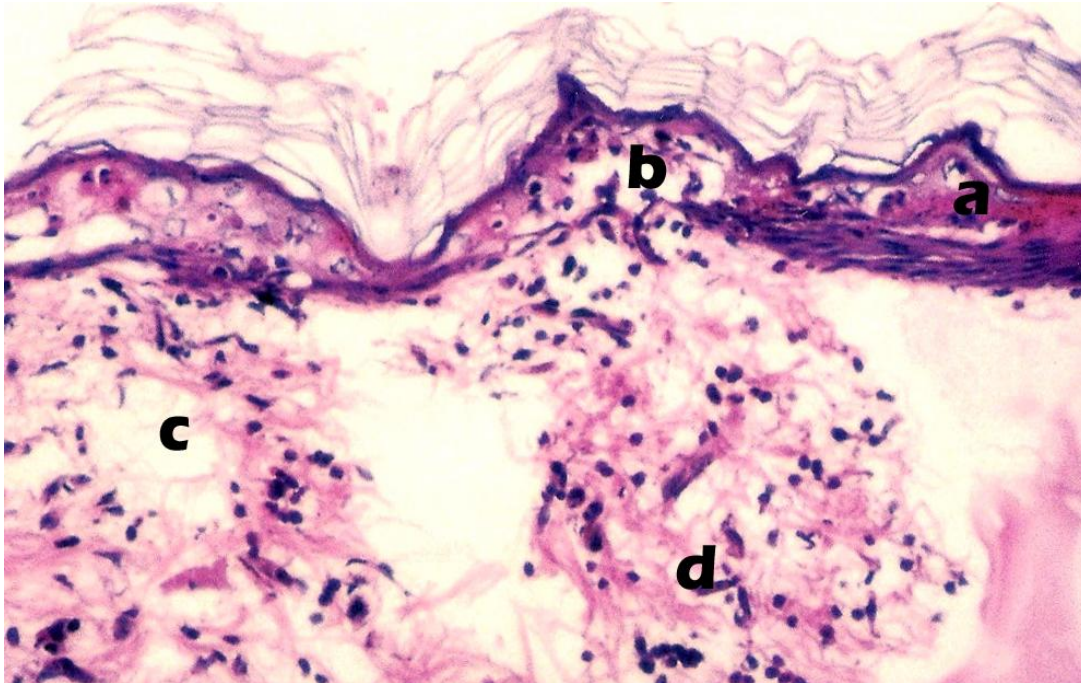


Figura 16. Fotomicrografía de piel de cuyo irradiada durante 40 minutos con luz UV-B en la que se observa una dermatitis severa difusa con a) apoptosis, b) necrosis en el epitelio, c) edema severo difuso, d) necrosis en el músculo erector. Tinción H y E, 50x.

En la piel de cuyo expuesta a la RUV-B durante 80 minutos y protegida con resveratrol no presentó eritema visible a las 24 horas de haber sido expuesto a la luz. Sin embargo, en el estudio histopatológico se observó una dermatitis leve. Con edema leve multifocal; infiltrados inflamatorios escasos, neutrófilos; presentando necrosis leve focal en el epitelio de la vaina del pelo (Figura 17).

En los cortes de piel de cuyo protegidos con resveratrol irradiada con luz UV-B durante 80 minutos y 100 minutos que presentaron eritema visible a las 24 horas después de irradiar, se observa una dermatitis leve a moderada difusa. Con necrosis leve a moderada multifocal, disqueratosis multifocal, espongiósis leve focal y gran cantidad de cuerpos apoptóticos (células de quemadura) en el epitelio; edema leve difuso; infiltrado inflamatorios leves, neutrófilos; congestión focal leve; atrofia y necrosis multifocal en el músculo erector de pelo; necrosis moderada



multifocal del epitelio de pelo; célula sebácea con cambios degenerativos de manera focal (Figura 18 y 19).

En una dosis posterior a la DEM en los animales protegidos con el resveratrol, es decir a los 120 minutos de haber sido irradiados con luz UV-B, la piel de cuyo presenta una dermatitis moderada difusa. Con espongiosis moderada, necrosis moderada multifocal y gran cantidad de células de quemadura; edema moderado difuso; infiltrados inflamatorios representativos, neutrófilos; necrosis severa multifocal en el epitelio de pelo; necrosis severa y atrofia en el músculo erector de pelo (Figura 20).

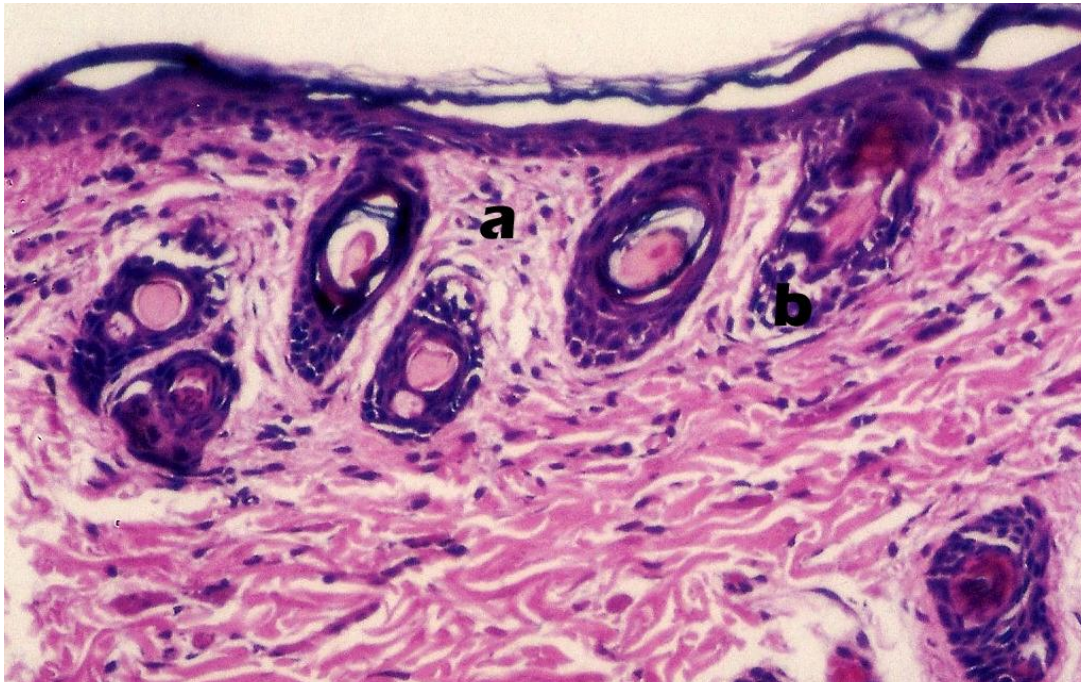


Figura 17. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 80 minutos con luz UV-B, sin eritema visible a las 24 hrs, después de exposición, en la que se observa una dermatitis leve, presentando a) edema leve multifocal, b) necrosis leve focal en el pelo. Tinción H y E, 50x.

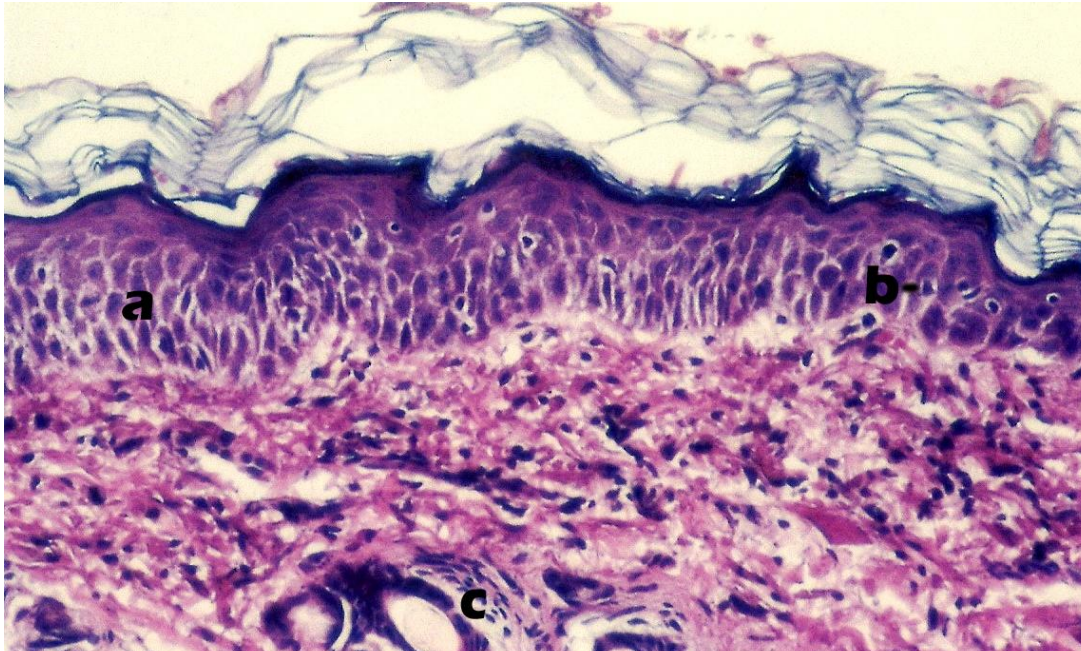


Figura 18. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 80 minutos con luz UV-B, en la que se observa una dermatitis leve a moderada difusa presentando a) espongiosis, b) células de quemadura, c) necrosis moderada multifocal en el epitelio de pelo. Tinción H y E, 50x.

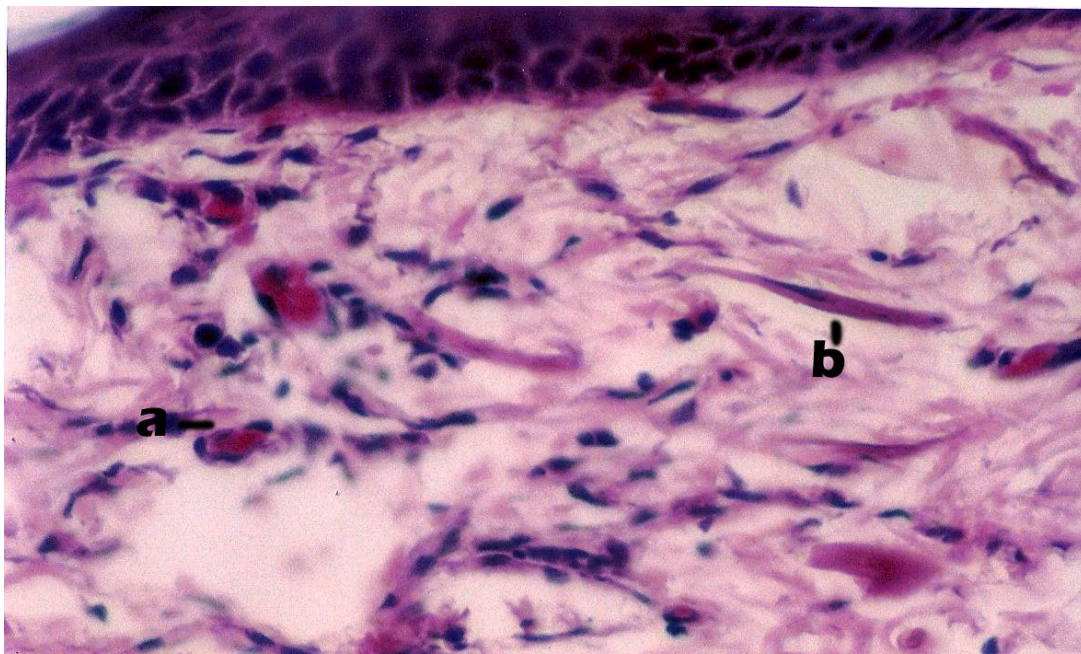


Figura 19. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 100 minutos con luz UV-B, en la que se observa una dermatitis leve a moderada difusa presentando a) congestión, b) atrofia y necrosis del músculo erector de pelo. Tinción H y E, 100x.



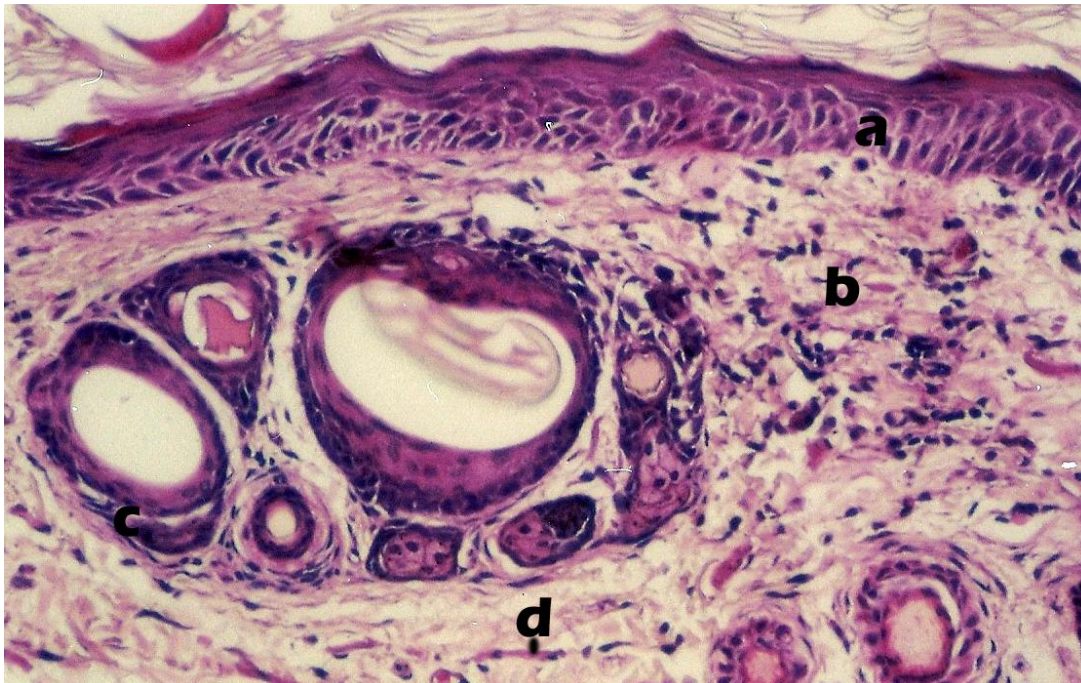


Figura 20. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con resveratrol irradiada durante 120 minutos con luz UV-B, en la que se observa una dermatitis moderada difusa presentando a) espongiosis, b) edema moderado difuso, c) necrosis en el epitelio de pelo, d) atrofia y necrosis en el músculo erector de pelo. Tinción H y E, 50x.

En los cortes de cuyo expuestos a la RUV-B durante 80 minutos y protegidos con estilbena metoxilado, no presentaron eritema visible a las 24 horas de haber sido expuestos a la radiación. Presentaron en el estudio histopatológico estos animales presentaron una dermatitis leve difusa. Con atrofia moderada difusa y necrosis moderada focal en el epitelio; atrofia del músculo erector de pelo; células sebáceas con cambios degenerativos; edema moderado multifocal; infiltrados inflamatorios leves, neutrófilos; estrato córneo disgregado leve difuso (Figura 21).

La piel de cuyo protegida con estilbena metoxilado irradiada con luz UV-B durante 100 y 120 minutos presentó eritema visible a las 24 horas después de irradiar e histológicamente se observa una dermatitis leve a moderada difusa. Con necrosis leve a moderada multifocal, espongiosis leve focal, disqueratosis multifocal y células de quemadura moderadas de forma multifocal en el epitelio; edema

moderado multifocal; infiltrado inflamatorios leves, neutrófilos; congestión leve focal; atrofia y necrosis multifocal en el músculo erector de pelo; necrosis moderada multifocal del epitelio de pelo; célula sebácea con cambios degenerativos focalizados; estrato córneo disgregado (Figura 22 y 23).

A los 140 minutos de haber sido irradiados con RUV-B, una dosis posterior a la DEM en los cuyos protegidos con el estilbena metoxilado, la piel de cuyo a nivel histológico presentó una dermatitis moderada multifocal. Con atrofia moderada a severa, espongiosis moderada multifocal, necrosis moderada multifocal y gran cantidad de células de quemadura en el epitelio; edema moderado difuso; infiltrados inflamatorios representativos, neutrófilos; congestión moderada; necrosis severa multifocal en el epitelio de pelo; necrosis severa y atrofia en el músculo erector de pelo; estrato córneo disgregado moderado difuso (Figura 24).

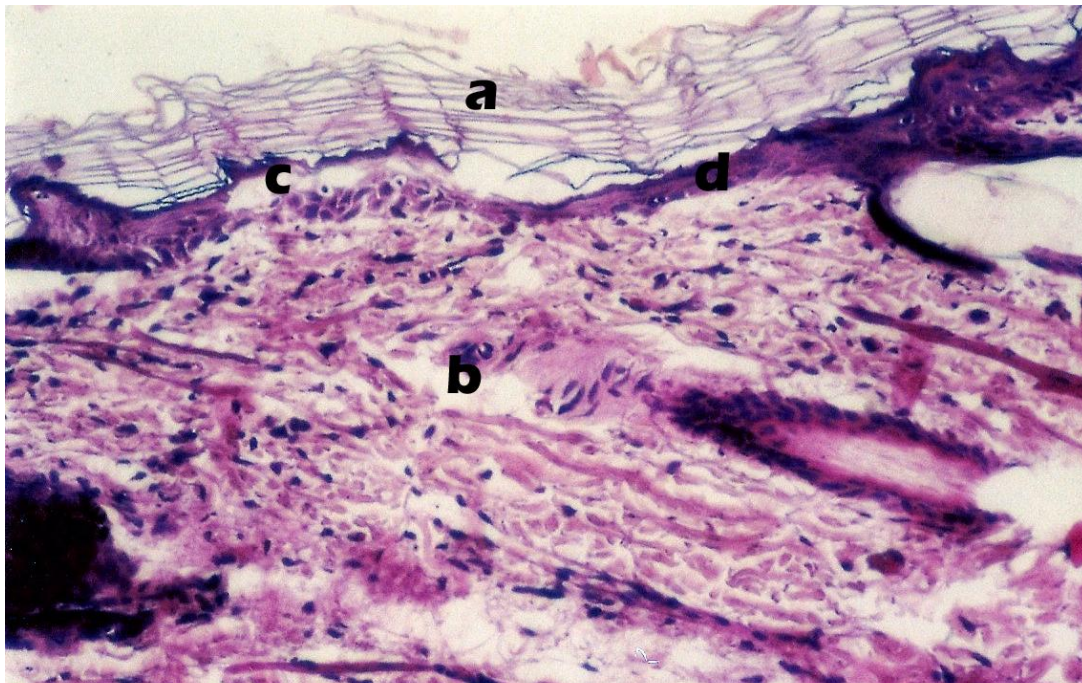


Figura 21. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbena metoxilado irradiada durante 80 minutos con luz UV-B, sin eritema visible a las 24 hrs, después de exposición, en la que se observa una dermatitis leve difusa, presentando a) estrato córneo disgregado, b) edema moderado multifocal, c) necrosis moderada focal, d) atrofia en el epitelio. Tinción H y E, 50x.



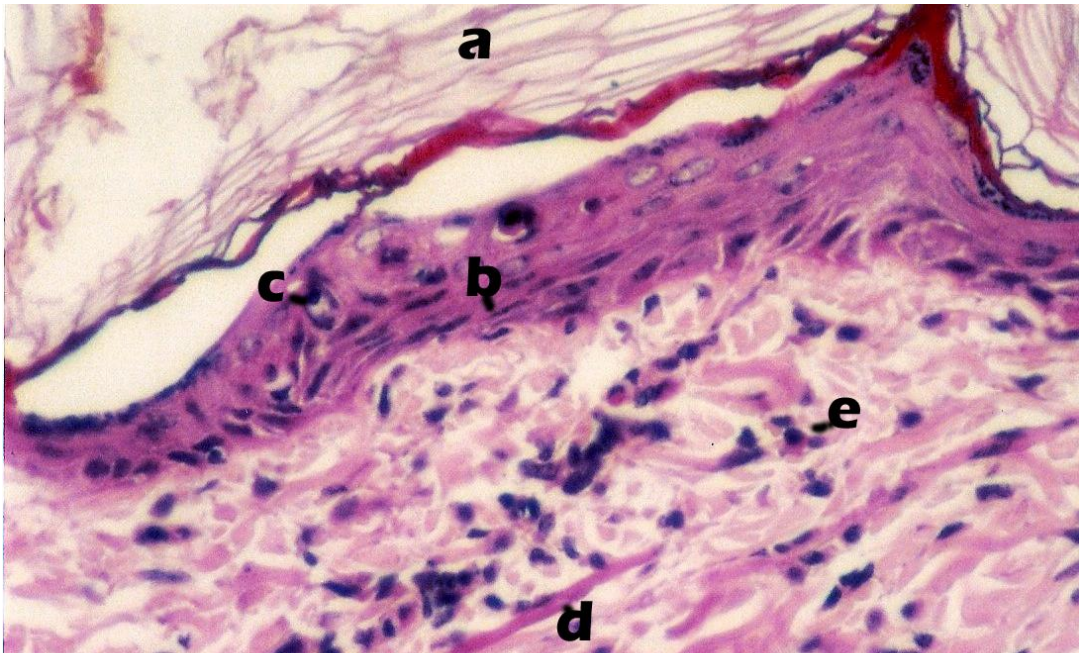


Figura 22. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbeno metoxilado irradiada durante 100 minutos con luz UV-B, en la que se observa una dermatitis leve a moderada difusa presentando a) estrato córneo disgregado, b) disqueratosis, c) células de quemadura, d) atrofia y necrosis en el músculo erector de pelo, e) infiltrado inflamatorio, neutrófilos. Tinción H y E, 100x.

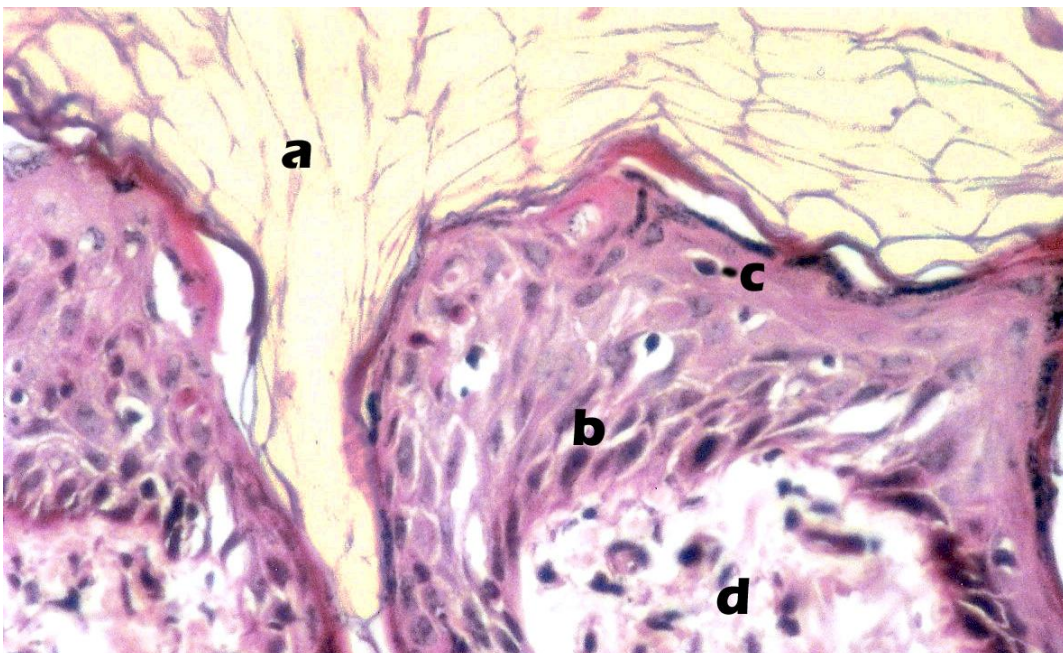


Figura 23. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbeno metoxilado irradiada durante 120 minutos con luz UV-B, en la que se observa una dermatitis leve a moderada difusa presentando a) estrato córneo disgregado, b) espongiosis, c) células de quemadura, d) edema moderado multifocal. Tinción H y E, 100x.

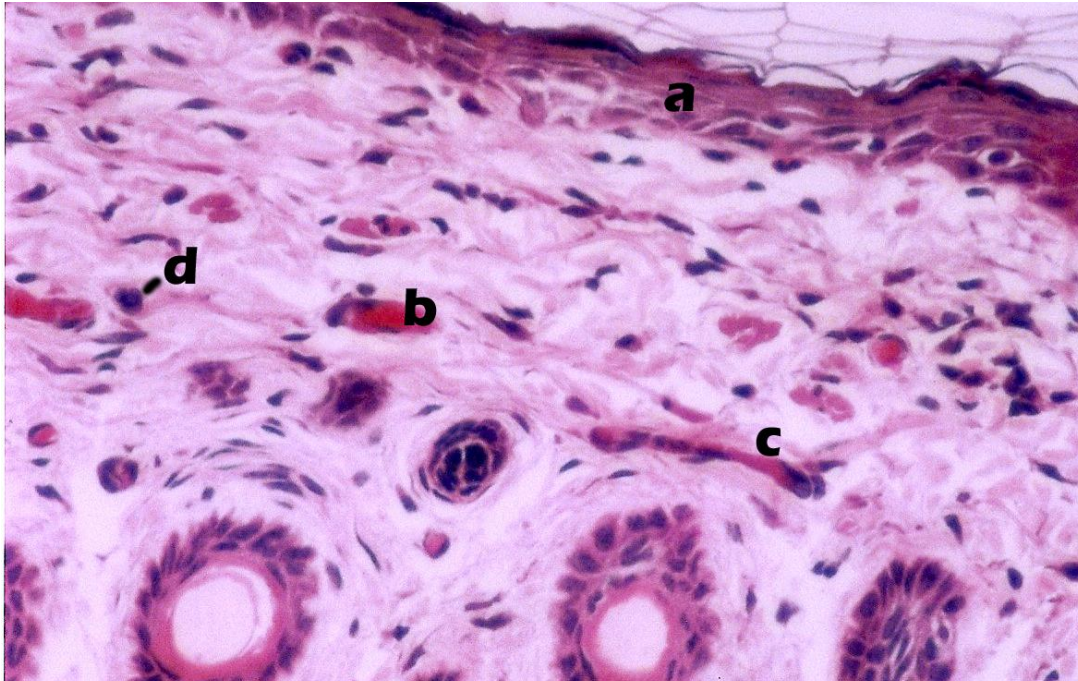


Figura 24. Fotomicrografía de piel de cuyo protegida con estilbeno metoxilado irradiada durante 140 minutos con luz UV-B, en la que se observa una dermatitis moderada multifocal, presentando a) atrofia en el epitelio, b) congestión, c) atrofia y necrosis del músculo erector de pelo, d) infiltrado inflamatorios, neutrófilos. Tinción H y E, 50x.

En los cortes histológicos de los animales irradiados sin protección se observó un daño severo en el epitelio debido a la necrosis. Cabe resaltar que a diferencia de lo anterior, en los animales protegidos con el estilbeno metoxilado y el resveratrol presentaron menos daño histológico en el epitelio y en la dermis.

En los tejidos protegidos con resveratrol y estilbeno, se observa que una dosis antes de que se forme el eritema visible, existen signos de un proceso inflamatorio leve como es el edema y los infiltrados inflamatorios celulares, siendo una respuesta para limitar o contrarrestar el daño causado por la RUV-B (Delves y col., 2008).



En la dosis de irradiación después de haberse formado el eritema visible en la piel con ambos estilbenos, el daño no es tan grave como en el tejido no protegido. Lo anterior nos demuestra que la capacidad fotoprotectora de las sustancias disminuye conforme se aumenta el tiempo de exposición a la RUV. Este fenómeno se presenta en varios filtros solares comerciales como el escalol y el padimato-O (Gasparro, 1997; Serpone y col., 2005).

### 6.2.3 Conteo de células de quemadura

El resveratrol tiene una media de 5.48 células de quemadura por 10 campos observados y el estilbeno metoxilado tiene una media de 8.46 células (Figura 25), habiendo una diferencia estadísticamente significativa en su producción de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney.

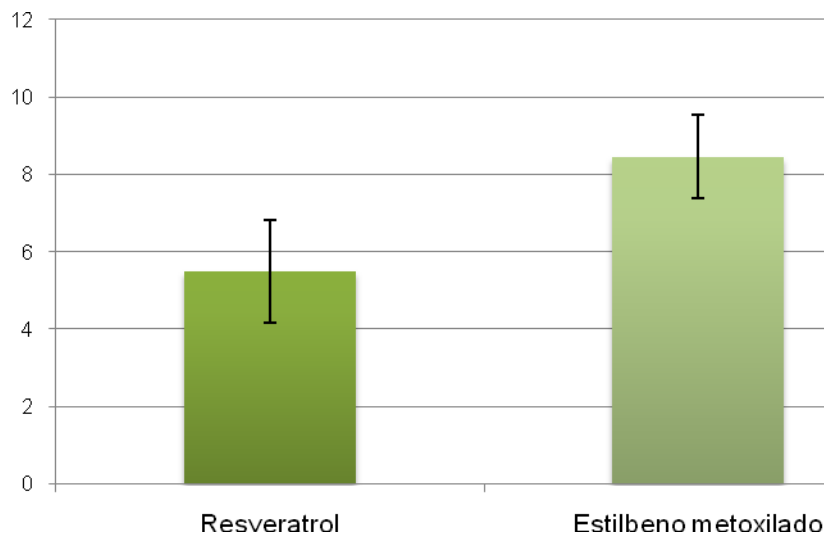


Figura 25. Media del conteo de células de quemadura en piel de cuyo protegida por resveratrol y estilbeno metoxilado irradiada por luz UV-B

Al tener una media mayor de células de quemadura el estilbeno metoxilado protege más que el resveratrol de los daños agudos producidos por la RUV. Las células de quemadura o células disqueratósicas tienen núcleo picnótico y citoplasma eosinofilo (Lowe y Friedlander, 1997). Este tipo de células aparentemente aparecen dentro de los primeros 30 minutos de exposición a la luz UV-B y con un pico máximo entre las 24 a las 48 horas, posteriormente éstas forman una banda suprabasal a las 72 horas (Cortes, 2006). Las células de quemadura derivan de los queratinocitos dañados que experimentan apoptosis (Middelkamp-Hup y col., 2004) como mecanismo protector contra los efectos carcinogénicos de la RUV (Laethem y col., 2005).

## 7. CONCLUSIONES

- El resveratrol y el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno protegen a las bacterias del efecto letal de la RUV-B.
- El *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno presento mayor efecto protector que el estilbeno, protegiendo por mayor tiempo la irradiación UV-B a las bacterias.
- El resveratrol y el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno tienen un FPS similar al escalol (filtro comercial), protegiendo aproximadamente 100 minutos de la formación del eritema.
- El resveratrol y el *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno protegen a la piel del daño inducido por la RUV-B a nivel histológico.
- La aplicación tópica del *trans*-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado) genera una mayor producción de células de quemadura que el resveratrol.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afaq, F., Adhami, V.M. y Mukhtar, H. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 57: 153-173.
- Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R. y Kim, A. 2007. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224(3):274-283.
- Avila, A.J.G. 2002. Estudio fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*. Evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM. México.
- Bissett, D.L., D.P. Hannon y Orr, T.V. 1989. Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochemistry and Photobiology*. 50(6): 763-769.
- Bouzas, R.R. 2003. Filtros solares, sus innovaciones y perspectiva económica. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Facultad de Química. UNAM. México.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J. y Crozeir, A. 2002. Plant Foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3337-3340.
- Cancino, R.M. 1998. Efectos de la radiación solar y filtros solares sobre la piel. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM. México.
- Celimene, C.C., Smith, D.R., Young, R.A. y Stanosz, G.R. 2001. *In vitro* inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes. *Phytochemistry*. 56:161-165.
- Cortes, L.N. 2006. Efecto de la administración de ácido ascórbico sobre el daño agudo por UVA en pacientes de fototerapia. Tesis de Especialidad en Dermatología. Facultad de Medicina. UNAM. México.
- Counet, C., Callemien, D. y S. Collin. 2004. Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chemistry*. 98:649-657.

- Davis, R.D. y Dulbecco, R. 1996. Aspectos moleculares de la replicación y variación del ADN. En: Davis, R D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. (eds). Tratado de Microbiología. 4ª edición. Masson. México. pp. 175-176.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R. y Roitt, I. M. Roitt. Inmunología Fundamentos. 11ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina-México. 528 pp.
- Dong, Z. 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. Mutation Research. 523 (524): 145-150.
- Eckert, R.L. 1992. The structure and function of skin. In: Mukthar, H. (Ed), Pharmacology of the skin. Boca Raton, USA. pp. 3-12.
- Eisenstadt, E., Carlton, B., C. and Brown, B., J. 1994. Gene mutation. In: Gerhardt, P. (Ed). Methods for general and molecular bacteriology. ASM, Washington D.C. USA. pp. 297-303.
- Elenitsas, R., Van Belle, P. y Elder, D. 1997. Laboratory methods. In: Elder, D. (Ed). Lever's histopathology of the skin. Eight edition. Lippincott-Raven Philadelphia. USA. pp 51-60.
- Fawcett, D.W. 1995. Tratado de Histología. 2ª edición. Interamericana-McGraw Hill. Madrid, España. pp. 577-611.
- Ferré-Filmon, K., Delaude, L., Demonceau, A. y Noels, A.F. 2004. Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins. Coordination Chemistry Reviews. 24:2323–2336.
- Fitzpatrick, T.B. 2005. Dermatología en medicina general. Tomo 2. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina - México. 946 pp.
- Frémont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. Life Sciences. 66(8):663-673.
- García, B.A.M. 1998. Evaluación de un filtro solar de *Yucca filifera*. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM. México.

- García, B.A.M. Estudio de la actividad fotoprotectora y antioxidante de la corteza de *Y. periculosa* Baker. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas. FES Iztacala UNAM. México. En proceso.
- Gasparro, F.P. 1997. Sunscreen photobiology: Molecular, cellular and physiological aspects. Springer. Germany. 194 pp.
- Gorham, J. 1989. Stilbenes and phenanthrenes. In: Harborne, J.B. and Dey, P.M. (Eds). Methods in plant biochemistry. Academia Press. USA. pp. 159-196.
- Gusman, J.H., Malonne, y Atassi, G. 2001. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. Carcinogenesis 22(8):1111-1117.
- Halliday, G.M. 2005. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. Mutation research. 571 (1-2): 107-120.
- Holbrook, K.A. y Wolf, K. 1997. Estructura y desarrollo de la piel. Dermatología en Medicina General. Tomo I. Editorial Médica Panamericana. México, D. F. pp. 101-149.
- Laethem, A.V., Claerhout, S., Garmynb, M. y Agostinis, P. 2005. The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. 37:1547–1553.
- Lin, J.K, y Tsai, S.H. 1999. Chemoprevention of cáncer and cardiovascular disease by resveratrol. Proc. Natl. Sci. Counc. 23(3):99-106.
- Lowe, N.J. y Friedlander, J. 1997. Sunscreens: Rationale for use to reduce photodamage and phototoxicity. In: Lowe, N.J., Shaath, N.A. and Pathak, M.A. (Eds). Sunscreens. Development, evaluation and regulatory aspects. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp 35-58.
- McGregor, J. M. y Hawk, J.L.M. 2001. Efectos agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Fitzpatrick, T.B (Ed). Dermatología en Medicina General. Tomo 2. 5ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina - México. 946 pp.
- Matsumura, Y. y Ananthaswamy, H.N. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. Toxicology and Applied Pharmacology. 195(3):298-308.

- Middelkamp-Hup, M.A., Pathak, M.A., Parrado, C., Goukassian, D., Rius-Díaz, F., Mihm, M.C., Fitzpatrick, T.B. y González, F. 2004. Orally administered *Polypodium leucotomos* extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin, *J. Am. Acad. Dermatol.* 51:910–918.
- Olas, B., Wachowicz, B., Majsterek, I., Blasiak, J., Stochmal, A. y Oleszek, W. 2006. Antioxidant properties of trans-3, 3', 5, 5'-tetrahydroxi-4'-methoxystilbene against modification of variety of biomolecules in human blood cells treated with platinum compounds. *Nutrition.* 22 (11-12): 1202-1209.
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A. y Oleszek, W. 2002. Anti-platelet effects of different phenolic compounds from *Yucca schidigera* Roezl. bark. *Platelets.* 13(3):167-173.
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A. y Oleszek, W. 2003. Inhibition of oxidative stress in blood platelets by different phenolics from *Yucca schidigera* Roezl. bark. *Nutrition.* 19(7-8):633-640.
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A. y Oleszek, W. 2005. Inhibition of blood platelet adhesion and secretion by different phenolics from *Yucca schidigera* Roezl Bark. *Nutrition.* 21(2):199-206.
- Pathak, M. A. 1986. Sunscreens: Topical and systemic approaches for the prevention of acute and chronic sun-induced skin reactions. *Dermatology Clinical.* 4:321-334.
- Pezzuto, J.M. 2006. Resveratrol as a cancer chemopreventive agent. In: B.B. Aggarwal and S. Shishodia (Eds.), *Resveratrol in Health and Disease*, New York, New York: Marcel Dekker, Inc, pp. 233-383.
- Piacente, S., Montoro, P., Oleszek, W y Pizza, C. 2004. *Yucca schidigera* bark: Phenolic constituents and antioxidant activity. *Journal of Natural Products.* 67:882-885.
- Rosen, Ch., F. 1997. Sunscreens and the prevention of erythema. In: Gasparro, F.P. (Ed). *Sunscreen photobiology: Molecular, cellular and physiological aspects.* Springer. Germany. 194 pp.

- Ross, M.H., Romrell, L.J. y Kaye, G.I. 1997. Histología. 3<sup>ra</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. México, D. F. pp. 308-389.
- Serpone, N., Dondi, D. y Albin, A.. 2005. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganic Chemical Acta*. 360: 794-802.
- Torres, P., Avila, J.G., Romo de Vivar, A., García, A.M., Marin, J.C., Aranda, E., y Céspedes, C.L. 2003. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry*. 64(2):463-473.
- Wlaschek, M., Tanchcheva-Poor, I., Naderi, L., Schneider, L.A., Ma, W., Razi-Wolf, Z., Schuller, J. y Scharffetter-Kochanek, K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol.*, B 63:41– 51.
- <http://www.monografias.com/trabajos29/piel1.jpg> (Fecha de consulta 13 de agosto de 2009).
- <http://www.ideam.gov.co/radiacion.htm> jpg (Fecha de consulta 13 de agosto de 2009).



## APÉNDICE 1

### TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

La tinción de Hematoxilina-Eosina se trata de una coloración donde se establece un contraste entre los dos colorantes para poner de manifiesto estructuras de diferente composición química.

#### Método

##### DESPARAFINAR

- 1.- Xilol 1 - 5 minutos
- 2.- Xilol 2 - 5 minutos

##### HIDRATAR

- 3.- Alcohol etílico absoluto - 3 minutos
- 4.- Alcohol etílico al 90 % 1 - 3 minutos
- 5.- Alcohol etílico al 90 % 2 - 3 minutos
- 6.- Alcohol etílico al 80 % - 3 minutos
- 7.- Alcohol etílico al 70 % - 3 minutos
- 8.- Agua corriente - 3 minutos

##### TINCIÓN

- 9.- Hematoxilina de Harris - 5 minutos
- 10.- Agua corriente - segundos
- 11.- Alcohol ácido al 1 % - segundos
- 12.- Agua corriente - segundos
- 13.- Agua amoniacal - segundos
- 14.- Agua corriente - segundos
- 15.- Eosina - 4 minutos

DESHIDRATAR

- 16.- Alcohol etílico al 96 % - 30 segundos
- 17.- Alcohol etílico absoluto 1 - 4 minutos
- 18.- Alcohol etílico absoluto 2 - 4 minutos

ACLARAR

- 19.- Xilol 1 - 5 minutos
- 20.- Xilo 2 - 5 minutos

MONTAJE

- 21.- Montaje con resina histológica