



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**FOTOPROTECCIÓN DE *Buddleja cordata* EN
REGIONES ESPECÍFICAS DEL GEN p53 DE
RATONES SKH-1 IRRADIADOS CON LUZ
ULTRAVIOLETA**

TESIS

Que para obtener el título de:
Bióloga

PRESENTA

Lorena Arianne Márquez Ponce

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Adriana Montserrat Espinosa González



Los Reyes Iztacala,

Tlalnepantla, Estado de México 2018



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.

Índice	Pág.
Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	I
Lista de Abreviaturas.....	II
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico.....	3
3.1 La piel.....	3
3.2 Radiación Solar.....	4
3.2.1 La radiación ultravioleta (RUV).....	5
3.2.2 Respuesta cutánea a la RUV.....	6
3.3 El gen supresor de tumores p53.....	9
3.3.1 Regulación de la activación de p53 y sus principales genes blanco.	11
3.3.2 p53 y carcinogénesis.....	13
3.4 Mecanismos de reparación.....	14
3.4.1 Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	14
3.4.2 Reparación por escisión de bases (BER).....	16
3.4.3 Reparación de Mismatch (MMR).....	18
3.5 Fotoprotección.....	19
3.5.1 Fotoprotección con productos naturales: polifenoles.....	20
3.5.2 <i>Buddleja cordata</i>	22
3.5.3 Verbascósido.....	24
3.6. Modelo de ratones SKH-1.....	26
4. Justificación.....	28
5. Hipótesis.....	27
6. Objetivos.....	27
7. Estrategia metodológica.....	30
7.1 Muestras de piel.....	30
7.2 Detección del transcrito de p53 (RNAm).....	31
7.3 PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	32
8. Resultados.....	33

8.1 Niveles del transcrito de p53.....	33
9. Discusión.....	34
10. Conclusiones.....	41
11. Referencias.....	42

Índice de Tablas.

Tabla 1. Condiciones del PCR para obtener el cDNA.....	31
Tabla 2. Características de los oligos del gen p53.....	32
Tabla 3. Condiciones del qRT-PCR.....	32

Índice de Figuras.

Figura 1. Representación de las capas de la epidermis.....	3
Figura 2. Representación de las capas de la piel.....	4
Figura 3. Espectro electromagnético.....	5
Figura 4. Formación de dímeros de pirimidina.....	7
Figura 5. Mapa del gen y proteína de p53.....	9
Figura 6. Estructura atómica de los dominios de p53.....	11
Figura 7. Vía de señalización para la activación de p53 y sus genes blanco principales.....	13
Figura 8. Sub-vías del mecanismo de reparación NER, la vía de reparación global (GGR-NER).....	16
Figura 9. Sub-vías del mecanismo de reparación BER.....	18
Figura 10. Vía del sistema de reparación Mismatch.....	19
Figura 11. Estructura química del anillo fenólico.....	21
Figura 12. Estructura química de los principales grupos de flavonoides.	21
Figura 13. Mapa de distribución de <i>B. cordata</i>	23
Figura 14. <i>Buddleja cordata</i>	24
Figura 15. Biosíntesis del verbascósido.....	25
Figura 16. Estructura química del verbascósido.....	26
Figura 17. Modelo de estudio ratón SKH-1.....	27
Figura 18. Unidades de expresión relativa (UER).....	33
Figura 19. Prueba de agrupamiento de Tukey.....	34
Figura 20. Respuesta dérmica de ratones SKH-1 a la RUV ante un experimento crónico (32 semanas)	37

Lista de abreviaturas

6-4 PP	Fotoproductos de pirimidina 6-4 pirimidona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ATR	Ataxia telangiectasia y relacionada a Rad3
VER	Reparación por escisión de bases
C-	Control negativo (muestras sin irradiar)
C+	Control positivo (muestras irradiadas sin protección)
CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
CHEK1	Gen de checkpoint quinasa 1
Dewar PP	Fotoproducto Dewar
DPC o CDPs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
EMBC	Extracto metanólico de <i>Buddleja cordata</i>
FPS	Factor de protección solar
GGR-NER	Reparación NER genómica global
Hr	Hairless
J/m²	Juls por metro cuadrado
MMR	Reparación de Mismatch
mRNA	RNA mensajero
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
Nm	Nanómetros
Pe_{eff}	Eficiencia del PCR
PKCδ	Quinasa C δ
QA	Queratosis actínica
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA_m	RNA mensajero
RPA	Proteína de replicación A
RUV	Radiación Ultravioleta

T	Testigo
TCR-NER	Reparación NER acoplado a la transcripción
UER	Unidades de expresión relativas
UVA	Radiación ultravioleta A
UVB	Radiación ultravioleta B
UVC	Radiación ultravioleta C
V	Verbascósido
$\lambda(\text{max})$	Máximo de absorción

1. Resumen

La piel es la principal barrera de protección contra agentes ambientales como la radiación ultravioleta (RUV), la cual genera daños a nivel histológico y molecular, si no son reparados, se desencadena la aparición de mutaciones puntuales en genes diana como p53, gen supresor de tumores considerado importante en el estudio de la fotoprotección. Una estrategia dentro de este campo es la búsqueda de sustancias que prevengan los efectos de la RUV. *Buddleja cordata*, es una especie que tiene actividad fotoprotectora y antioxidante debido a compuestos polifenólicos como el verbascósido. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *B. cordata* y el verbascósido, por medio de la expresión del transcrito (RNAm) de regiones específicas del gen p53 de ratones SKH-1 irradiados con RUV. Se realizó la extracción de RNA de muestras de piel de un experimento de exposición crónica a la RUV (32 semanas). Se llevó a cabo qRT-PCR con el fin de amplificar las regiones del gen p53 seleccionadas, β -actina fue utilizada como el gen control. Se calculó el nivel de expresión del transcrito y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey. p53 mostró niveles basales en la piel sana del C- (no irradiado) y se sobreexpresó en el C+ (muestras irradiadas sin protección). Las muestras irradiadas y protegidas con el fotoprotector comercial Parsol® (T) y el verbascósido (V) fueron agrupadas sin mostrar diferencias significativas con el C-, mientras que EMBC (extracto metanólico de *B. cordata*) se localizó en un nivel intermedio entre el C- y el C+, al mostrar una expresión de p53 diferente del C+ y similar tanto al C- como al T, los grupos protegidos con EMBC y/o V demuestran que *B. cordata* posee capacidad fotoprotectora, esto debido a compuestos como el verbascósido, que debido a su estructura química conformada por un fenilpropanoide (fotoestabilidad), un feniletanoide (antioxidante) y azúcares β - [D]- glucopiranosas y ramnosas (antiinflamatorios), ha sido asociado con la disminución del daño ocasionado por la RUV a nivel histológico, molecular y desarrollo de fotocarcinogénesis, por lo cual se sugieren tanto el extracto metanólico de *B. cordata* como al verbascósido como agentes fotoprotectores.

2. Introducción

La energía electromagnética que incide en la Tierra, está compuesta principalmente por el espectro de luz ultravioleta (200 a 400 nm), luz visible (400 a 760 nm) e infrarroja (760 a 1,800 nm). La radiación ultravioleta (RUV), se divide según su longitud de onda: UVC (200-280 nm) que no incide sobre la superficie terrestre; UVB (280-320 nm), que induce daño al DNA, inmunosupresión y carcinogénesis; y UVA (320-400 nm), que genera daño oxidativo al DNA, elastosis solar y el incremento de la pigmentación de la piel (Cheng et al., 2016; Kochevar et al., 2014; Krutman, 2000).

Cuando la RUV incide sobre la piel, es absorbida por moléculas cromóforas como el DNA, formando dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC o CDPs) y fotoproductos de pirimidina 6-4 pirimidona (6-4 PP), el efecto acumulativo de estas modificaciones desencadena mutaciones en diversos genes, de entre los que destaca el gen supresor de tumores p53, sus alteraciones son frecuentemente detectadas en tumores de piel de ratón. La sobreexpresión del transcrito de p53 indica daño genómico por acción de la RUV, por lo cual este gen representa un papel central en el estudio del daño al DNA y su prevención (Liu et al., 2007; Cabrera y López, 2006; Ichihashi et. al., 2003; Rebel et al., 2005).

La fotoprotección es un conjunto de medidas preventivas frente a los efectos negativos de la RUV sobre la piel, tales como el eritema, inmunosupresión, fotoenvejecimiento y carcinogénesis. Diversos estudios demuestran que los metabolitos secundarios presentes en plantas como los polifenoles, tienen la capacidad de prevenir los daños ocasionados por la RUV. *Buddleja cordata*, es una planta que ha generado interés debido a la presencia de polifenoles con propiedades fotoprotectoras, destacando entre sus compuestos el verbascósido (Guerra, 2018; Espinosa, 2016; Cheng et al., 2016; Avila et al., 2014; Afaq, 2011).

3. Marco teórico

3.1 La piel

La piel, es el órgano más grande del cuerpo, permite la interacción del organismo con el entorno y está formada por componentes epiteliales, mesenquimales, glandulares y neurovasculares. La piel se encuentra organizada en tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis (Chu, 2014).

La epidermis, de origen ectodérmico, es un epitelio escamoso pluriestratificado, se caracteriza por ser la capa más externa de la piel, manteniendo contacto constante con el ambiente; se divide en cuatro estratos principales: basal o germinativo, que es el más interno de la epidermis y consta de una única capa de células basófilas (queratinocitos mitóticamente activos) siendo responsable de la renovación de la epidermis; estrato espinoso, formado por células de forma poliédrica, las cuales se desplazan hacia la capa más externa diferenciándose y desarrollando gránulos laminares; el estrato granuloso, sitio de generación de numerosos componentes estructurales que formarán la barrera epidérmica; estrato córneo, un epitelio estratificado formado por células anucleadas, queratinizadas y aplanadas, aporta la mayor protección mecánica y química de la piel (Chu, 2014; Arenas, 2009) (fig. 1).

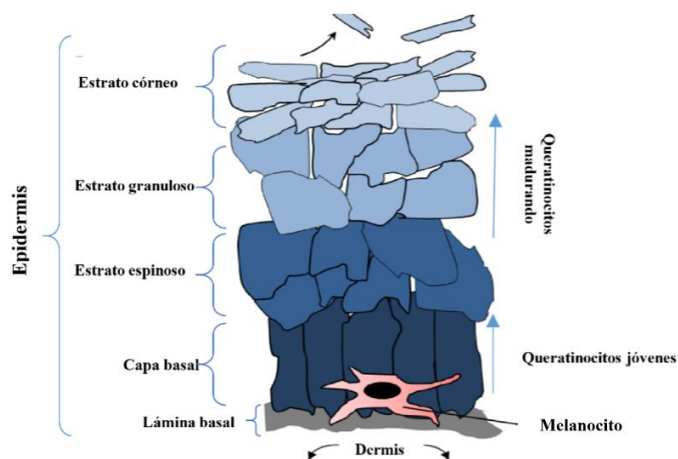


Fig.1 Representación de las capas de la epidermis. A partir de lo más exterior se observa el estrato córneo, granuloso, espinoso, capa basal y lámina basal. Modificado de D'Orazio 2013.

La dermis delimita a la epidermis y alberga estructuras cutáneas que incluyen folículos pilosos, nervios, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, contiene células inmunes y fibroblastos que participan activamente en muchas respuestas fisiológicas de la piel. La dermis puede ser dividida en dos capas: dermis papilar que comprende la región subepidérmica y la dermis reticular, que tiene una disposición entrelazada de las fibras de colágena con las que cuenta. La hipodermis es un tejido subcutáneo, la capa más interna de la piel, está formada por tejido conjuntivo laxo en el que se localizan células adiposas, su grosor difiere dependiendo de su localización en el cuerpo, esta capa conecta a la dermis con los tejidos subyacentes (Chu et al., 2014 Iglesias, 2004) (fig. 2).

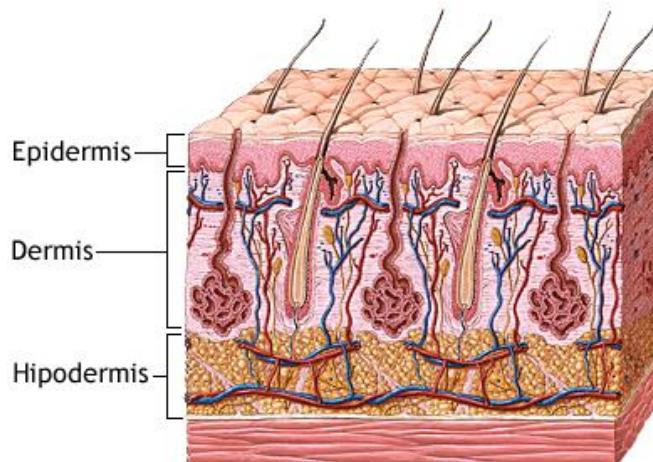


Figura 2. Representación de las capas de la piel. Se observa la epidermis, la dermis y la hipodermis. Modificado de (ADAM, 2018).

3.2 Radiación solar

La radiación solar es el resultado de reacciones termonucleares que generan energía, se encuentra integrada por diferentes longitudes de onda: luz ultravioleta (200 a 400 nm), luz visible (400 a 760 nm) e infrarroja (760 a 1,800 nm), también se encuentran longitudes de onda cortas (ionizantes), y largas (microondas y radiofrecuencia) (Kochevar et at. 2014) (Fig. 3).

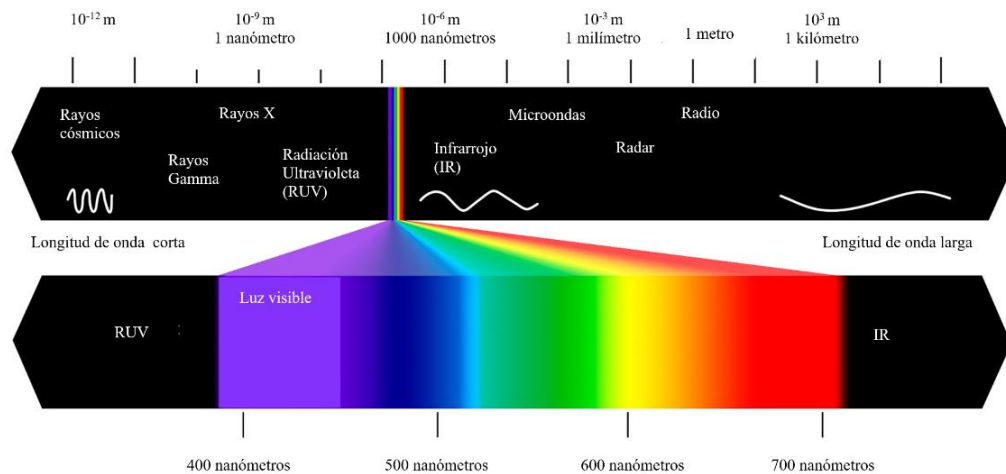


Figura 3. Espectro electromagnético (<https://sites.google.com/site/year7eclassroom/lesson-5-properties-of-light-reflection>).

La radiación solar se modifica de manera importante por su paso a través de la atmósfera, solo dos tercios de la energía solar es capaz de atravesarla, llegando a nivel de corteza, además, la distancia de la tierra con respecto al sol varía 3.4% de forma anual, mientras que la variación dentro del efecto de modificación por parte de la atmósfera es mucho mayor (Stratton et al., 2005).

3.2.1 La radiación ultravioleta (RUV)

La RUV representa una pequeña porción del espectro electromagnético y se divide según sus propiedades electro-físicas en: ultravioleta C (UVC), con la longitud de onda más corta y mayor energía, que comprende entre los 200 y 290 nm y no incide en la superficie terrestre ya que es directamente absorbida por la atmósfera; ultravioleta B (UVB) que va de 290 a 320 nm e induce mutaciones y efectos inmunosupresores que son causales de la carcinogénesis cutánea; y la luz ultravioleta A (UVA) también denominada radiación de onda larga, su longitud de onda se encuentra entre los 320 y los 400 nm y genera el bronceado de la piel y daño oxidativo que puede producir inestabilidad genómica persistente, la UVA a su vez se subdivide en UVAI (340-400 nm) y UVAIL (320-340 nm) (Scheinfeld, 2006).

3.2.2 Respuesta cutánea a la RUV

La RUV, tiene una gran variedad de efectos biológicos en la piel, pueden ser clasificados en agudos (una dosis única) y crónicos (exposición repetida). Dentro de los efectos agudos se encuentra la, el bronceado de la piel, producción de vitamina D₃, quemadura solar, la inmunosupresión y la generación de fotoproductos del DNA (Chu et al., 2014).

El bronceado o melanogénesis es una respuesta a la RUV y se debe al aumento de la actividad y número de melanocitos es visible de 3 a 4 días posteriores a la exposición y depende del color de piel y la dosis recibida. La producción de vitamina D₃ es vital para la salud ósea, su biosíntesis cutánea es el único beneficio establecido de la exposición aguda a la RUV. La quemadura solar o eritema es la reacción más evidente y se caracteriza por la aparición de inflamación y enrojecimiento cutáneo. La inmunosupresión, cumple una función importante para dar paso a la carcinogénesis al favorecer la aparición y el crecimiento de tumores (Kochevar et al., 2014; D'Orazio, 2009).

Cuando la RUV incide sobre la piel, interactúa con moléculas cromóforas a este tipo de radiación, tales como el DNA y RNA, esto se debe a que los grupos aromáticos de sus bases nitrogenadas tienen la capacidad de absorber eficientemente la RUV, promoviendo la formación de enlaces entre las bases nitrogenadas de nucleótidos adyacentes, dando como resultado la formación de dímeros (Kochevar et al., 2014).

Los dímeros de pirimidina–ciclobutano (CPDs) son los fotoproductos predominantes causados por RUV, pueden llevar a mutaciones de tipo C-T y se forman cuando los fotones son absorbidos por los dobles enlaces C=C de las posiciones 5-6 de dos pirimidinas adyacentes. La redistribución de los electrones resulta en un anillo que enlaza las dos posiciones 5 y las dos posiciones 6,

formando un ciclobutano unido covalentemente. El segundo fotoproducto más común es el fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP), se constituye a partir de la ruptura de un doble enlace C=C en posición 6 y un doble enlace C=O en posición 4 de la pirimidina adyacente, dando como resultado un enlace covalente entre estas dos bases (fig. 4). También se encuentra el fotoproducto Dewar (Dewar PP), que es un isómero de valencia de 6-4PP que se forma vía fotoisomerización en presencia de longitudes de onda de onda de 280 a 360 nm (Marrow y Meunier, 2008; Pattison y Davies, 2006).

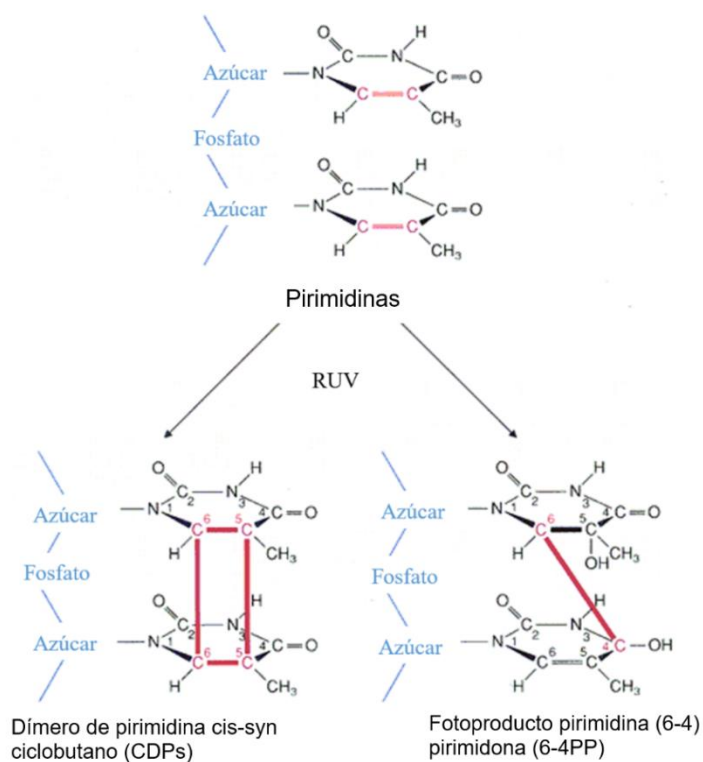


Figura 4. Formación de dímeros de pirimidina (http://www.biorom.uma.es/contenido/av_bma/apuntes/T8/t8_repar.htm)

Dentro de los efectos crónicos de la RUV se encuentra el fotoenvejecimiento y la carcinogénesis (Uitto, 2008).

El fotoenvejecimiento es un proceso en el cual se producen modificaciones en los componentes de la matriz extracelular, produciendo cambios en el metabolismo del colágeno y probablemente de la elastina, este tipo de daño se caracteriza por ser observable macroscópicamente (Uitto, 2008).

El cáncer de piel se puede clasificar según el tipo celular implicado, el tipo no melanoma y el tipo melanoma. Dentro del tipo no melanoma se encuentran los carcinomas basocelulares y espinocelulares (CBC y CEC), los cuales pueden mantenerse benignos y ser tratados. También se conoce un precursor del CEC, la queratosis actínica (QA). El cáncer tipo melanoma puede fácilmente propagarse al sistema linfático y al torrente sanguíneo causando mayor número de muertes. (Pearon y John 2006; Tri y Jaeyoung, 2006).

La fotocarcinogénesis, es un proceso con múltiples pasos, se considera que el desarrollo de tumores consiste en 3 fases: (I) iniciación, durante esta fase, la RUV produce alteraciones genéticas en proto-oncogenes (genes cuyo producto promueve la proliferación celular) y en genes supresores de tumores como p53, esto es irreversible y predispone a la célula afectada a la transformación neoplásica posterior, (II) promoción, que consiste en la expansión clonal de las células iniciadas las cuales pueden permanecer benignas hasta la experimentación de una mayor proliferación que permita el desarrollo de neoplasia y (III) progresión, en la cual las células se desprenden del tumor primario e invaden otros órganos y tejidos (metástasis), convirtiéndose en un tumor maligno (Devi, 2005).

Se ha observado que en los cánceres cutáneos tanto en humano como en ratón, la RUV causa mutaciones características en el gen p53. El 71% de estas mutaciones son transiciones de tipo C-T y CC-TT localizadas en los sitios afectados por dímeros de pirimidina, estos sitios de alta probabilidad de mutación son denominados "Hot spots" a su vez, se ha determinado que el 97% de las

mutaciones reportadas para p53 se encuentran entre los exones 5-8 (Benjamin y Ananthaswamy 2006; Bolshakov et al., 2003; Greenblatt et al., 1994).

3.3 El gen supresor de tumores p53

El gen p53 tiene una función central en el mantenimiento de la integridad celular, la inducción de estrés genómico causado por la RUV causa la sobreexpresión del transcrito con el fin de generar una mayor concentración de la proteína P53, que es un factor de transcripción que transactiva genes relacionados con la respuesta al daño al DNA, por lo cual p53 es el gen utilizado como indicador de daño para el desarrollo de este trabajo.

En humanos p53 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), consta de 11 exones, produce un transcrito de RNAm de 2,8 kb, a partir del cual se codifica una proteína de 393 aminoácidos llamada P53 con un peso molecular de 43.700 KDa, el nombre de la proteína que codifica, hace referencia a su masa molecular aparente, ya que en un gel ADA-PAGE, migra como una proteína de 53KDa, esto debido a la gran cantidad de residuos de prolina que contiene, los cuales hacen que migre de una manera más lenta, aparentando un

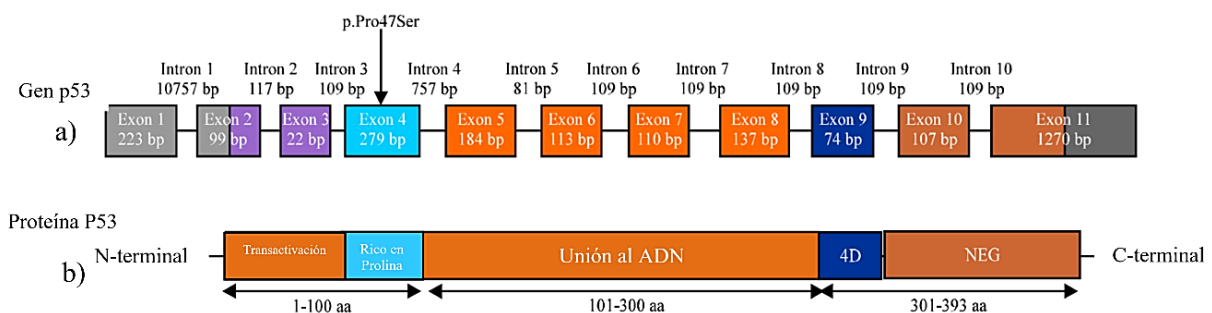


Figura 5. (a) Mapa del gen p53, se observan los intrones, exones y las pares de bases que lo conforman. (b) Mapa de la proteína P53, se observa el dominio de transactivación (1-100 aminoácidos), dominio de unión al DNA (101-300 aminoácidos), dominio de tetramerización y de regulación negativa (4D y NEG) de 301-393 aminoácidos (Chandel et al., 2013).

mayor peso molecular. En ratón *Mus musculus*, p53 se encuentra localizado en el cromosoma 11 y cuenta con 12 exones (López et al., 2001; NCBI, 2018) (fig. 5).

La proteína P53 contiene 393 aminoácidos, se encuentra activa en forma de tetrámero y consiste en 4 dominios: (I) transactivación N-terminal (TAD), (II) unión al DNA, (III) tetramerización y (IV) regulatorio (fig. 6). El dominio de transactivación se encuentra en la región N-terminal, es el sitio de unión para una gran variedad de proteínas que pueden ser tanto co-activadores transcripcionales como reguladores negativos, tiene una función importante para la activación de la proteína ya que su fosforilación tiene como resultado la liberación de P53 de su regulador negativo MDM-2, además es seguido por una región rica en prolina (Joerger y Fersht, 2008; Moll y Petrenko, 2003).

El dominio de unión al DNA es crucial para el reconocimiento y unión de la proteína P53 a secuencias específicas dentro del genoma, localizadas en las regiones promotoras de los genes blanco que son regulados por p53, los residuos resultantes a partir de esta región, se encuentran modificados en cánceres humanos, constituyendo una zona de "Hot spots" (Bai y Wei, 2006).

El dominio de tetramerización tiene como función la interacción entre las unidades monoméricas de la proteína, el dominio c-terminal realiza funciones regulatorias, los residuos de c-terminal sufren modificaciones post-traduccionales como fosforilación y acetilación (Joerger y Fersht, 2008; Bai y Wei, 2006).

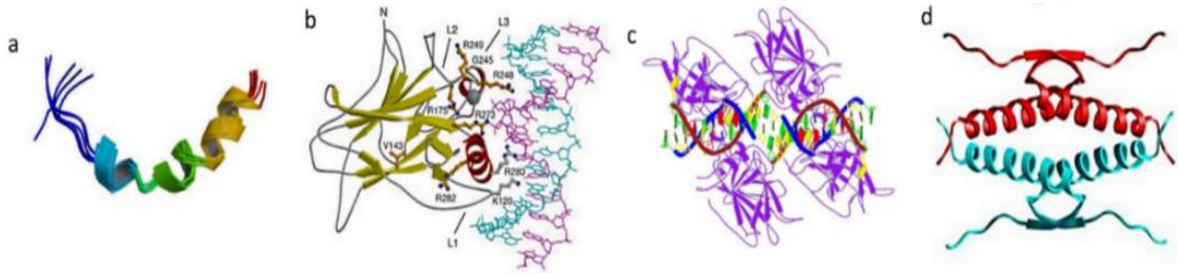


Figura 6. Estructura de los dominios de p53. a) Dominio N-terminal unido a Msm2 (Código PDB, 1Q2F) (Rosal, 2004). b) Dominio central de P53 unido a una molécula de DNA (código PDB: 1TSR (Cho et al., 1994). c) Cuatro dominios centrales unidos a una molécula de DNA (código PDB: 2ADY (Kytainer et al., 2006; Melero 2010). d) Dominio de tetramerización (código PDB, 1C26) (Jeffrey, 1995; Chen et al., 2010).

3.3.1 Regulación de la activación de p53 y sus principales genes blanco

Los fotoproductos generados por la RUV provocan daños estructurales en el DNA, como consecuencia, se activa la cascada de ATR/CHEK1 (proteína serina-treonina relacionada con ataxia telangiectasia mutada y Rad3/Punto de control proteína serina-treonina quinasa). La activación de esta cascada es un proceso complejo en el cual la proteína de replicación A (RPA) reconoce y se asocia a los sitios de daño al DNA, esta asociación recluta a ATRIP (proteína de interacción con ATR), la unión de ATRIP con RPA recluta a ATR y habilita la formación de un complejo ATR-ATRIP, esto a su vez permite la activación de ATR y su función fosforiladora (Acevedo et al., 2016; Zou and Edellge, 2003).

Los sustratos principales de ATR son la cinasa del punto de control del ciclo celular CHK1 y la proteína del gen supresor de tumores p53, que una vez activada (tanto por ATR como por CHK1) se emplea como un activador transcripcional de genes implicados en la detención del ciclo celular, senescencia celular, apoptosis y reparación del DNA (KEGG, 2018).

La manera clásica de entender la función transactivadora de la proteína P53, se basa en 3 pasos básicos: (I) la estabilización de P53, (II) la unión a una región específica del DNA y (III) la activación transcripcional de sus genes blanco. La

estabilización se lleva a cabo por la interrupción de la unión de la proteína P53 con su regulador negativo Mdm2 (ortólogo de Hdm2 en humanos), impidiendo su degradación por ubiquitinación, esto ocurre cuando quinasas como ATM, CHK-2, DNA-PK, ATR y CHK-1 (siendo ATR y CHK1 las que actúan por daño voluminoso (fotoproductos) causados por RUV) modifican post-traduccionamente a P53, fosforilando el extremo N-terminal (Kruse y Gu 2009).

Una vez estabilizada P53 tiene la capacidad de unirse a regiones promotoras de sus genes blanco, esto puede ocurrir por medio de su dominio de unión al DNA, o por medio del dominio carboxilo terminal, que se ha determinado facilita la búsqueda de P53 por sus genes blanco posterior a la señal de estrés (Hainaut y Hollstein 2000).

P53 es estabilizada y activada como respuesta al estrés genómico, sin embargo, esta proteína se mantiene unida (en bajos niveles) al DNA de células sanas, por ejemplo, Espinosa en 2003 demuestra que los niveles basales de p53 controlan la expresión de algunos genes así como el ensamblaje del complejo e iniciación de p21 (Espinosa et al., 2003; Zilfou y Lowe, 2009).

Posterior a su estabilización y unión a la región específica del DNA, la proteína P53 tiene la capacidad de activar o reprimir a sus genes blanco. La selección del promotor se encuentra regulada por numerosos factores, incluyendo las modificaciones post-traduccionales en P53, como la fosforilación, ubiquitinación, metilación, acetilación y sumolación, las cuales forman un código que determina a qué promotores de los genes blanco se unirá la proteína P53 (Kruse y Gu, 2009; Zilfou y Lowe, 2009).

Los genes blanco de P53, tienen funciones muy importantes para el mantenimiento de la integridad celular, dentro de las más importantes se encuentran: el arresto del ciclo celular, responsable de evitar la propagación de mutaciones mediante la división de células dañadas, senescencia, autofagia, reparación del DNA,

regulación negativa de P53 y apoptosis (Matsumura y Honnavara, 2004; Zilfou y Lowe, 2009) (fig. 7).

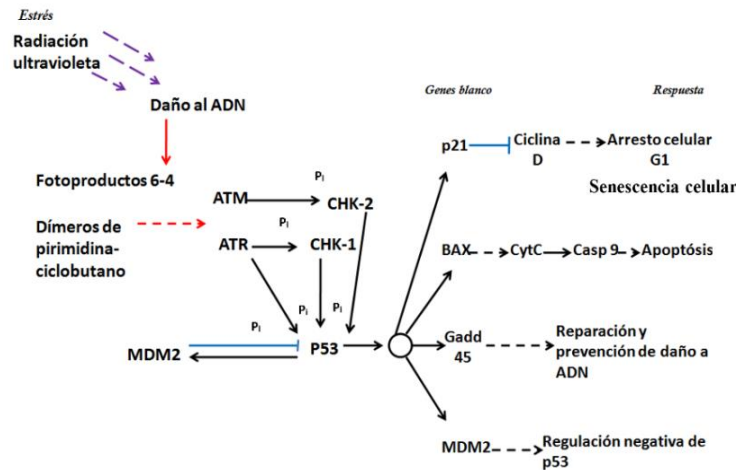


Figura 7. Vía de señalización para la activación de p53 y sus genes blanco principales modificada de (KEGG 2018).

Como parte de la vía de señalización de p53, existen genes que tienen como función el arresto del ciclo celular, tales como p21, 14-3-3- δ , Reprimo, Gadd45 y B99 (KEGG, 2018) (fig. 7).

Dentro de las diferentes vías de señalización que utiliza la célula para iniciar el proceso de apoptosis, la vía dependiente de P53 es de gran importancia, ya que se activa cuando se produce una cantidad de lesiones en el DNA que resulta grave para el mantenimiento su integridad. Dentro de los genes cuya expresión se encuentra regulada por P53 y que tienen influencia dentro de la vía apoptótica se encuentran Bax, Fas, Fas-L, IGF, BP3, PIGs y Dr5, todos estos genes proapoptóticos, son regulados positivamente por P53 (Herrera, 2004).

3.3.2 p53 y carcinogénesis

La exposición crónica a la RUV, da lugar a un tumor benigno en la piel (como la queratosis actínica) formado a partir de la expansión clonal de células epidérmicas portadoras de modificaciones en diferentes genes como p53. La exposición

crónica a la RUV, permite dar progresión tumoral mediante la selección de clones de células resistentes a la apoptosis (Cabrera y López, 2006).

El papel central que tiene la inactivación de p53 en la carcinogénesis de piel fue por primera vez demostrado por los hallazgos de Jiang y colaboradores, observando que los ratones con modificaciones en p53 tipo p53^{-/-} o p53^{+/-} y expuestos a RUV, desarrollaban más tempranamente tumores de piel que los ratones no modificados, concluyendo que la exposición prolongada a la RUV tiene un efecto carcinogénico debido a la acumulación de mutaciones en p53 (Jiang et al., 1999; Cabrera y López, 2006).

3.4 Mecanismos de reparación

Las células de mamíferos cuentan con diversos sistemas de reparación que son capaces de proteger a las células del daño ocasionado por la RUV, removiendo las lesiones antes mencionadas. Dependiendo del tipo de daño en el DNA, una o más vías de reparación son activadas. Las principales vías de reparación de daño al DNA provocado por RUV, son la reparación por escisión de nucleótidos (NER), el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER), la reparación de bases en disposición "mismatch" (mismatch repair) y la reparación del rompimiento de doble cadena (Matsumura y Ananthaswamy, 2004).

3.4.1 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

Los fotoproductos como CPDs y 6-4PP, activan la vía de reparación NER, la cual, tiene como tarea la remoción de estas lesiones (Matsumura y Ananthaswamy, 2004; Lehmann, 1995; Laats, et al., 1999).

Los fotoproductos son eliminados por medio de dos sub-vías pertenecientes a NER: los daños existentes en genes transcripcionalmente activos se remueven mediante un mecanismo rápido que se encuentra acoplado a la transcripción

(TCR-NER), y la sub-vía de reparación genómica global (GGR-NER) que se encarga de los daños que se encuentran en otras partes del genoma, este sistema es caracterizado por ser más lento que el anterior. Estas dos vías únicamente se diferencian en el primer paso de NER, que es el reconocimiento del daño al DNA. En la sub-vía TCR-NER la polimerasa II (de elongación de RNA) que se “atasca” al encontrarse con el daño voluminoso, reconoce el daño, mientras que en la sub-vía GGR-NER, los daños se reconocen por medio del complejo proteico XPC/HHR23B (Matsumura y Ananthaswamy, 2004) (fig. 8).

Una vez que el daño se reconoce, el complejo TFIIH, que consta de 9 subunidades y está involucrado en la iniciación de la transcripción de la RNA polimerasa II, actúa de la misma manera en las dos sub-vías, este, contiene a las helicasas XPB y XPD, las cuales se encargan de mediar la separación de las cadenas de DNA en el sitio de la lesión. XPA es otra proteína importante, que verifica el daño en la cadena ya abierta, además de ser crucial en el ensamblaje del resto de la maquinaria de reparación. La proteína de replicación A (RPA), tiene como función la estabilización del complejo con la cadena del DNA abierta, además de dirigir el posicionamiento de XPG y el complejo ERCC1-XPF, endonucleasas responsables de la escisión a los extremos de la lesión (de 24 a 32 nucleótidos dentro de los cuales se contiene la o las lesiones). Posterior a la remoción de los nucleótidos, los factores generales de la replicación rellenan el espacio generado, cerrando y reparando así la cadena dañada, dando por terminado el mecanismo de reparación NER (Laat et al., 1999).

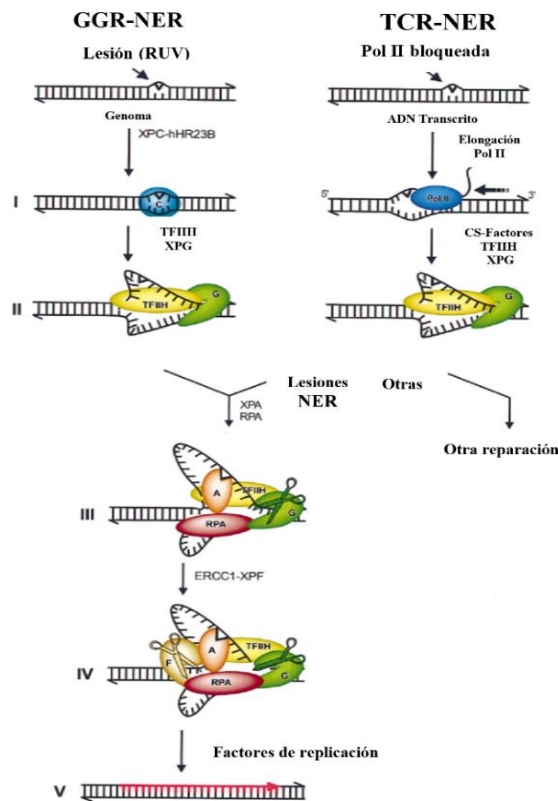


Figura 8. Sub-vías del mecanismo de reparación NER, la vía de reparación global (GGR-NER). Se encarga de los daños producidos en cualquier parte del genoma, la vía de reparación acoplada a la transcripción, repara los daños ocasionados en el mRNA transcripcional (Laat et al., 1999).

3.4.2 Reparación por escisión de bases (BER)

El mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) adquiere importancia debido a que tiene una estrecha relación con el fotoenvejecimiento y la carcinogénesis. BER se encarga de corregir las lesiones pequeñas en las bases nitrogenadas del DNA, las cuales no producen una distorsión importante en su estructura helicoidal (Jeppesen, et al., 2011; Lindahl, 1993).

El mecanismo BER se lleva a cabo en el núcleo y en la mitocondria, es iniciado por al menos 11 glicosilasas distintas, enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos que unen el azúcar y la base nitrogenada dañada, dejando un sitio apurínico. Los pasos subsecuentes son la escisión, síntesis de reparación y ligación, estos son referidos como “los pasos comunes de NER”, sin embargo en

la realidad, diferentes mecanismos de reparación toman lugar, dependiendo del estado fisiológico de la célula (Krokan y Bjoras, 2013).

La remoción de la base afectada se lleva a cabo por acción de la glicosilasa específica del daño producido en esta molécula. Estas enzimas contienen un amino y/o carboxi terminal en mamíferos, no localizados en células procarióticas estas extensiones son utilizadas para cuestiones de “targeting” celular (Krokan y Bjoras, 2013; Hegde et al., 2008).

Posterior a la unión de la glicosilasa, puede llevarse a cabo un proceso posterior llamado vía corta o BER de un nucleótido único, en el cual una sola hendidura es realizada y subsecuentemente llenada y ligada o la vía larga, en la cual se produce una hendidura de entre 2 y 10 nucleótidos, que posteriormente es rellenada y ligada. La vía que ocurre con mayor frecuencia es la corta (Krokan y Bjoras, 2013; Hegde et al., 2008; Lindahl, 2001) (fig. 9).

La vía larga ocurre por lo general en células que se encuentran en proliferación, utilizando una amplia gama de proteínas de replicación para el procesamiento posterior a la acción de la glicosilasa y APE1, estos elementos incluyen a DNA polimerasa ϵ/δ , PCNA, FEN1, y LIG1 (Krokan y Bjoras, 2013).

La elección entre utilizar la vía corta o larga depende del tipo de glicosilasas que se unen durante la iniciación de la reparación por BER, además del tipo y estadio del ciclo celular (Krokan y Bjoras, 2013; Bauer et al., 2011).

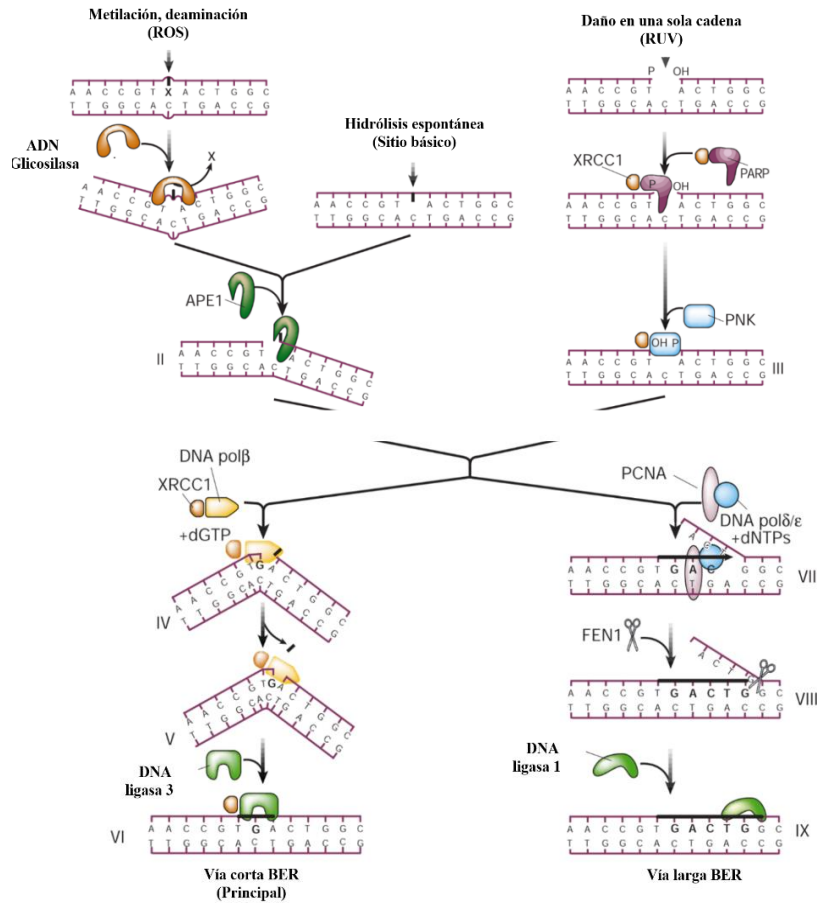


Figura 9. Sub-vías del mecanismo de reparación VER (Hoeijmakers 2001).

3.4.3 Reparación de Mismatch (MMR)

Los motivos de secuencia específicos compuestos de repeticiones de dinucleótidos son inestables en algunos cánceres humanos. Este tipo de fenotipo es causado por bases apareadas erróneamente (Mismatch), la MMR se encarga de remover los nucleótidos mal apareados por las DNA polimerasas, este tipo de defectos incrementa las tasas de mutación. Existen 4 pasos delimitados dentro de la MMR: (1) reconocimiento de las bases en mismatch; (2) reclutamiento de factores de MMR adicionales; (3) búsqueda de una señal que identifica la cadena nueva mal sintetizada, seguido de la degradación del mismatch; y (4) la re-síntesis de los nucleótidos que se escindieron, las proteínas participantes y el mecanismo Mismatch pueden observarse en la figura 10 (Hoeijmakers, 2001).

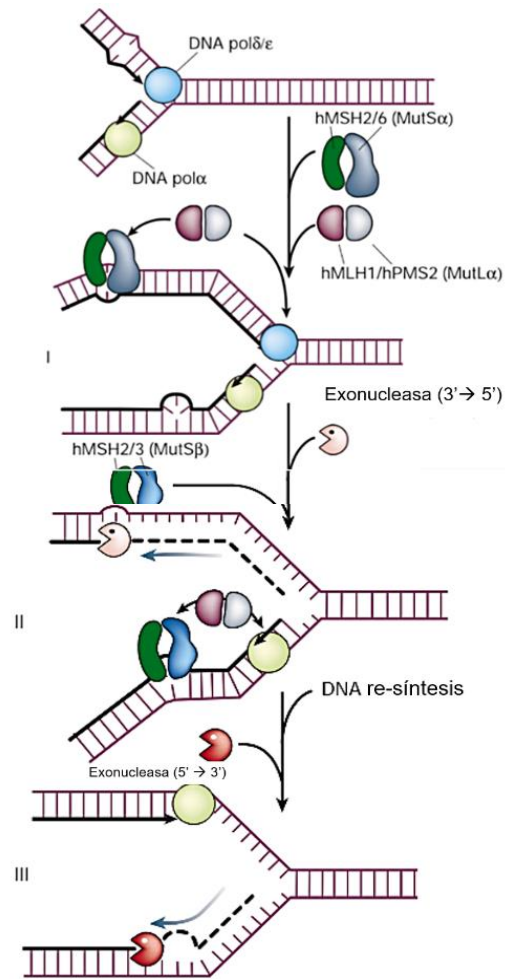


Figura 10. Vía y proteínas involucradas en el sistema de reparación de Mismatch (Hoeijmakers, 2001).

3.5 Fotoprotección

La fotoprotección es una actividad preventiva y terapéutica frente a los efectos de la RUV sobre la piel, como son la inflamación, eritema, fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis. Dentro de las medidas preventivas se incluye evitar la exposición durante las horas de mayor irradiación solar (12-16 Hrs.), utilizar sombrillas, sombreros, vestimenta de tela gruesa y gafas de sol, así como el uso de un fotoprotector adecuado (características) (Arribas, 2016; D'Orazio, 2009).

Los fotoprotectores tópicos son preparaciones de aplicación externa, contienen moléculas orgánicas que tienen la capacidad de absorber, reflejar o dispersar los fotones de la RUV deteniendo de manera parcial, la interacción de la RUV con la piel. Estos pueden clasificarse como inorgánicos y orgánicos (Guerra, 2018).

Los filtros solares inorgánicos o físicos, reflejan y dispersan la luz, actuando como una pantalla sobre la piel. Protegen de la RUV, son inertes, resistentes al agua y tienen menos riesgos de alergias o fotosensibilidad, sin embargo son poco aceptados desde el punto de vista cosmético, ya que tienen un tamaño de partícula considerable, dejando un rastro blanco en la piel, además, este tipo de fotoprotectores es la principal causa de dermatitis de contacto fotoalérgico, por lo cual, es necesario generar nuevas alternativas que cumplan con las necesidades actuales (Guerra, 2018; Mejía et al., 2014; Gilaberte y Gonzáles, 2010).

Los filtros solares orgánicos interactúan directamente con la RUV absorbiendo el espectro de la UVA y UVB, además, cuentan con una mejor aceptación cosmética, algunos ejemplos son los cinamatos, Tinosorb o BEMT (Bis- Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina) y Mexoryl® o SX (benzotriazol lipofílico). La potencia fotoprotectora de un fotoprotector tópico se marca numéricamente mediante el índice de factor de protección solar (FPS), que hace referencia al poder de reducción de los efectos de la RUV de un fotoprotector sobre la piel. (Guerra, 2018; Gilaberte y Gonzáles, 2010).

3.5.1 Fotoprotección con productos naturales: polifenoles

Dentro de los fotoprotectores orgánicos se incluye la búsqueda y el uso de sustancias que las planta sintetizan como defensa ante el estrés, provocado por las condiciones ambientales en las que se encuentran, estas sustancias son conocidas como metabolitos secundarios, dentro de los cuales, debido a su amplia distribución y propiedades farmacológicas destacan los polifenoles, estos metabolitos secundarios son caracterizados y clasificados de acuerdo a la

presencia, número y conformación estructural de sus anillos fenólicos (Afaq, 2011; Mejía et al., 2014; White, 2012; Gilaberte y Gonzáles 2010) (fig. 11).

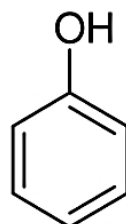


Figura 11. Estructura química del anillo fenólico.

Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico), estilbenos, lignanos, flavonoides y alcoholes fenólicos (Quiñones et al., 2012) (fig. 12).

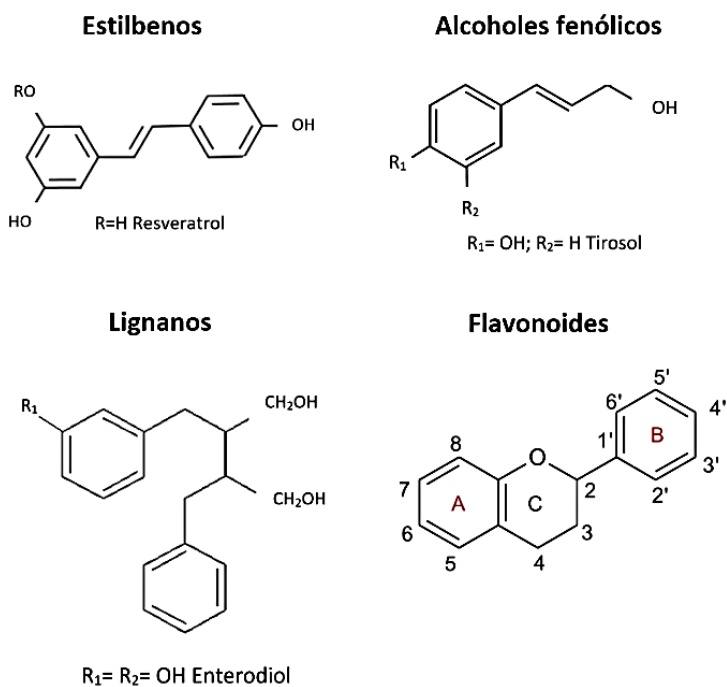


Figura 12. Estructura química de los principales grupos de polifenoles (Modificado de Quiñones et al., 2012).

Dentro de las propiedades que se atribuyen a los polifenoles destacan su actividad antioxidante y su capacidad para absorber RUV, por lo cual presentan propiedades fotoprotectoras (Fagundo et al., 2015; Afaq, 2011).

Buddleja cordata es una planta de uso en la medicina tradicional que posee polifenoles en abundancia, otorgándole a su extracto propiedades farmacológicas, generando así interés dentro del campo de la fotoprotección (Alipieva et al., 2014; Espinosa, 2016; Avila et al., 2014; Clarenc, 2012; García y Avila, 2008).

3.5.2 *Buddleja cordata* (Kunth)

El género *Buddleja* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, comprende de alrededor de 100 especies arbóreas y arbustivas. Aproximadamente, el 50% de los taxa crece en el continente americano y en México existen alrededor de 15 especies con representantes de alta distribución. Esta especie crece en bosques de *Quercus*, de coníferas, mesófilo de montaña y vegetación secundaria. Una característica importante de *B. cordata* es su capacidad para tolerar condiciones de sequía, por lo que también puede desarrollarse en matorrales xerófilos y en suelos erosionados, en altitudes de 1500 a 3000 m s. n. m. Se distribuye desde el norte de México hasta Guatemala (Romero, 2003) (fig. 13).

B. cordata es comúnmente llamada “Tepozán” es una especie con arbustos dioicos con una altura de 1 a 20 metros, es de crecimiento rápido y se ha utilizado como planta ornamental (Romero 2003) (fig.14).

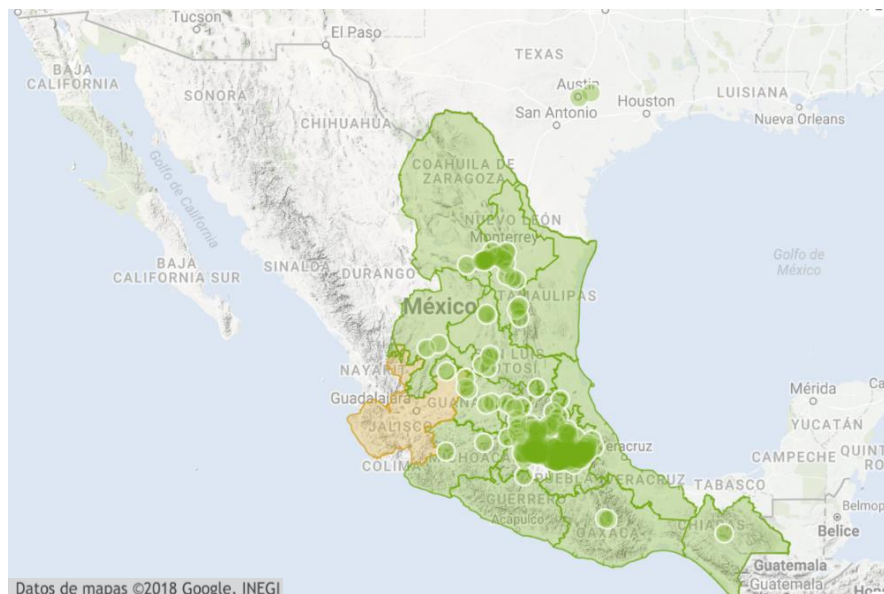


Figura 13. Mapa de distribución de *Buddleja cordata* en México (<http://www.naturalista.mx/taxa/154027-Buddleja-cordata>).

En México, *B. cordata* se utiliza de manera tradicional, sus hojas se preparan en infusión para tratar zonas inflamadas, además, además dentro de sus propiedades biológicas registradas se encuentran las analgésicas, bactericidas, amebicidas, reparador del útero, de la bilis y ojos, también se ha utilizado como antitumoral, contra las úlceras y antiinflamatoria (Alonso, et al., 2011; Adedapo, et al., 2009).

Se ha reportado que el extracto metanólico de esta especie tiene absorbancia dentro del rango de la RUV y que presenta actividad antioxidante, secuestrando radicales hidroxilo de manera significativa, además, este extracto ha mostrado sus actividad fotoprotectora reduciendo la aparición de eritema, producción de células de quemadura solar, congestión del vaso y engrosamiento epidérmico, en piel de ratones irradiados con RUV, teniendo la capacidad de penetrar en la piel de los ratones sin mostrar genotoxicidad (Espinosa 2016; Avila et al., 2014).

Las propiedades farmacológicas de *B. cordata* se han asociado principalmente con los compuestos del tipo fenilpropanoide, a su vez, estudios fitoquímicos reportan que entre los componentes aislados de *B. cordata* se encuentran fenilpropanoides

tales como el verbascósido, al cual se le han reportado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antineoplásicas y fotoprotectoras (Espinosa, 2016; Avila et al., 2014; Alipieva et al., 2014; Clarenc, 2012).



Figura 14. *Buddleja cordata*. a) Árboles b) Inflorescencia (<http://www.naturalista.mx/taxa/154027-Buddleja-cordata>).

3.5.3 Verbascósido

El verbascósido es un glicósido fenil etanoide y uno de los disacáridos ésteres cafeoílicos más extendidos en la naturaleza, siendo encontrado en más de 200 plantas dentro de las cuales se encuentra el género *Buddleja* (Filho et al., 2012; Taskova et al., 2009).

El verbacósido se forma en las plantas por la vía del ácido shikímico. El proceso enzimático comienza con la producción de fenilalanina y tirosina. El hidroxitirosol del verbascósido es biosintetizado a partir de la tirosina, a través de la tiramina, mientras que la parte cafeica se sintetiza a partir de la fenilalanina a través de la vía del cinamato. La dopamina se incorpora a través de la oxidación de aldehído para convertirse en alcohol; y finalmente se lleva a cabo la β -glicosilación (Peñarrieta et al., 2014; Saimaru y Orihara, 2010) (fig. 15).

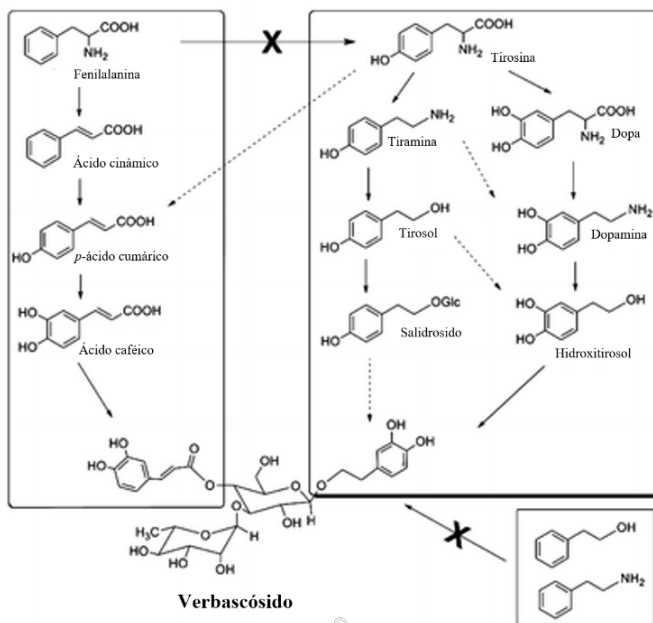


Figura 15. Biosíntesis del verbascósido (Saimaru y Orihara, 2010).

El verbascósido ha sido detectado en raíces, tallos, hojas y flores de diversas especies de plantas, siendo las hojas la parte en donde se acumula mayor concentración de este compuesto (Kirmizibekmez, et al., 2012; Georgiev, et al., 2011).

De acuerdo con varios estudios, las plantas con altas concentraciones de verbascósido han sido utilizadas en la medicina tradicional, como tratamiento antiinflamatorio, microbial, anti-infeccioso. Metabolitos secundarios como el verbascósido, tienen la capacidad de modificar la interacción de la RUV con la piel a diferentes niveles: (a) absorbiendo la RUV (acción de pantalla solar); (b) interrumpiendo la inducción de radicales libres que reaccionen con los componentes de la piel (antioxidante o secuestrador de radicales libres); (c) induciendo el sistema endógeno de antioxidantes en los queratinocitos; (d) atenuando la respuesta inflamatoria; y (e) modulando la respuesta antiestrés de la célula (Alipieva et al., 2014).

Se ha propuesto al verbascósido como candidato para la protección de la piel ante el fotodaño y consecuentemente para la fotoprotección, ya que este compuesto, tiene la capacidad de absorber dentro del rango de la RUV, por lo cual, es un cromóforo para esta radiación, se sugiere que su efecto fotoprotector se debe a su estructura química conformada por un fenilpropanoide (confiere fotoestabilidad), un feniletanoide (antioxidante) y azúcares β - [D]- glucopiranososa y ramnosa (antiinflamatorios) (Espinosa, 2016; Alpieva et al., 2014; Avila et al., 2014) (fig. 16).

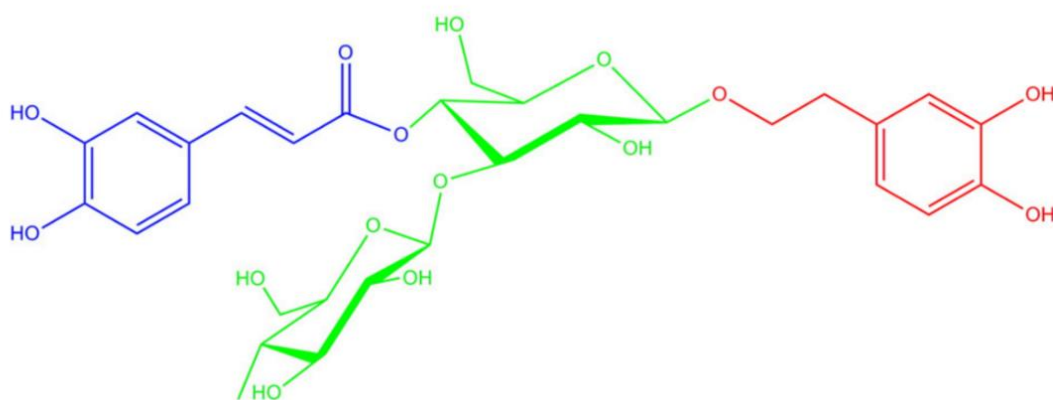


Figura 16. Estructura química del verbascósido. El ácido caféico (fenilpropanoide) se muestra en azul, en rojo el 4,5 hidroxifenil etanol (feniletanoide) y en verde la β (D)- glucopiranososa y ramnosa (Alpieva et al., 2014).

3.6. Modelo de estudio (ratones SKH-1)

Los ratones SKH1 son la cepa más utilizada en la investigación de fotobiología, los tumores inducidos en estos ratones aparecen tanto a nivel morfológico como molecular como respuesta a la exposición crónica a la RUV; El gen Hr (Hairless), codifica a un co-represor transcripcional en la piel de mamíferos, en el ratón se identificaron varios alelos Hr nulos e hipomórficos que dieron como resultado la falta de pelo en animales homocigotos para este alelo (Benavides, 2009) (fig. 17).

El modelo de ratón SKH-1 ha demostrado ser importante para el estudio de la fotoprotección, debido a que esta cepa de ratones muestra características

similares al foto-daño humano, como lo es el engrosamiento epidérmico, infiltración de la dermis con células inflamatorias, células apoptóticas, inducción de tumores y pérdida de colágeno, además de no poseer pigmentación y ser inmunológicamente competentes (Lee et al., 2003; Kim et al., 2003).

Se ha demostrado que la RUV induce lesiones como dímeros de pirimidina-ciclobutano y fotoproductos 6-4 en el DNA de la piel de los ratones SKH-1, haciendo de esta cepa, un modelo viable para el estudio de compuestos tópicos que protejan la piel contra el daño ocasionado por la RUV (Benavides et al., 2009; Wilgus, 2003).

Estos ratones han sido ampliamente utilizados para la evaluación de protectores solares, la aplicación de agentes tópicos y exposición a la RUV, ya que muestran mayor sensibilidad a la RUV y la respuesta cutánea puede ser fácilmente observada (Espinosa, 2016; Sharma et al., 2011).



Figura 17. La cepa de ratones SKH-1 se caracteriza por la pérdida del pelo, la no pigmentación de la piel y el ser inmunocompetentes. <https://www.criver.com/products-services/find-model/skh1-hairless-mouse?region=3611>

4. Justificación

El interés por la búsqueda de plantas con capacidad fotoprotectora ha aumentado en los últimos años debido a que metabolitos secundarios como los fenilpropanoides tienen la capacidad de absorber, reflejar o dispersar los fotones provenientes de la RUV. Ejemplo de ello es *B. cordata*, comúnmente conocida como “Tepozán”, que es utilizada para tratar quemaduras solares y tumores. Además, se ha comprobado que uno de sus compuestos principales, el verbascósido, es responsable de diversas actividades biológicas, dentro de las cuales destaca su actividad fotoprotectora, antiinflamatoria y antitumoral. Estudios previos de fotoprotección contra la carcinogénesis cutánea han demostrado a nivel histológico que la aplicación tópica, tanto del extracto metanólico de *B. cordata* como del verbascósido, presenta actividad fotoprotectora y dado que el cáncer de piel es una enfermedad crónica producida por la exposición a la RUV y que se ha demostrado la relación directa entre la exposición a la RUV y el incremento en el transcrito de p53, en este trabajo nos preguntamos si esa respuesta se verá reflejada a nivel molecular, utilizando como sensor de daño el nivel de expresión del transcrito del gen supresor de tumores p53, generando información acerca del potencial de estas sustancias para prevenir los daños ocasionados por la RUV.

Consecuentemente, se planteó la siguiente pregunta científica:

¿La expresión del transcrito de p53 será diferente en piel de ratones expuestos a la RUV con o sin protección del EMBC y/o verbascósido? ¿Cómo será con respecto a un fotoprotector comercial Parsol®?

5. Hipótesis

La exposición crónica a la RUV de piel de ratones SKH-1 dará como resultado la sobreexpresión del transcrito de p53 en la piel sin protección, en contraste con la piel protegida con el EMBC y/o el verbascósido.

6. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *B. cordata* y uno de sus compuestos más abundantes, el verbascósido, por medio de la expresión del transcrito (RNAm), de regiones específicas del gen p53 en piel de ratones SKH-1 irradiados con RUV.

Objetivos particulares

- Determinar el nivel de expresión del transcrito de p53 (mRNA) en muestras de piel de ratones expuestos de manera crónica a la RUV.
- Comparar la expresión relativa de p53 de la piel de ratones irradiados y protegidos con extracto metanólico de *B. cordata* y/o verbascósido con la de un fotoprotector comercial.

7. Estrategia Metodológica

7.1 Muestras de piel

Las muestras de piel que se utilizaron en este trabajo provienen de un experimento crónico de fotoprotección previo, en el cual, se utilizaron ratones SKH-1 que fueron expuestos a RUV con y sin protección del EMBC y/o verbascósido durante 32 semanas, tiempo suficiente para el establecimiento de un modelo de carcinogénesis cutánea, dentro del cual se incluyen las etapas de iniciación, promoción y progresión. Los grupos experimentales fueron los siguientes: sin ningún tratamiento (C-), piel irradiada sin protección (C+) y tres grupos experimentales: verbascósido + RUV (V), EMBC + RUV (EMBC) y un grupo testigo: Parsol® + RUV, cada grupo tuvo una n=5.

Durante este experimento, la parte dorsal de los ratones de los grupos C+ y C- fue tratada tópicamente con 200µL de etanol al 70%, cubriendo un área aproximada de 6 cm², mientras que a los ratones de los grupos restantes se les aplicaron 200µL de *B. cordata*, verbascósido o Parsol®, disueltos en etanol al 70% con una concentración final de 2mg/mL.

El modelo de carcinogénesis cutánea se desarrolló en dos fases, una de iniciación y una de promoción y progresión: Fase de iniciación de la carcinogénesis cutánea: Los ratones correspondientes a todos los grupos con excepción el C- fueron expuestos a RUV (6 mJ/cm²) por un minuto al día durante diez días, utilizando una lámpara de luz UV-B, (310 nm, Espectroline). Posteriormente se aplicaron las sustancias de los diferentes tratamientos (EMBC, V y T).

Fase de promoción y progresión de carcinogénesis cutánea: Posterior a la fase de iniciación, los ratones fueron irradiados durante un minuto, tres veces por semana, durante 32 semanas (Espinosa, 2016).

7.2 Detección del transcrito de p53 (RNAm)

El aislamiento del RNA se llevó a cabo por medio del Kit de extracción QIAGEN Allprep®, y se siguieron las indicaciones del fabricante. Este kit se caracteriza por su capacidad para extraer moléculas de RNA mayores a 200 nucleótidos, esto proporciona un enriquecimiento para la extracción de RNA mensajero (RNAm) ya que los tipos de RNA 5.8S rRNA, 5S rRNA y tRNAs son selectivamente excluidos.

La obtención del cDNA se realizó por medio del Kit de síntesis de c-DNA de **Thermo SCIENTIFIC™** RevertAid First Strand cDNA Synthesis, utilizando oligo dT y siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C para su posterior uso.

Para confirmar la efectividad de los oligos, se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) punto final, con las condiciones en la tabla 1:

Paso	Temperatura, °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Alineamiento	58	30 s	
Extensión	72	45 s	

Las regiones seleccionadas para el diseño de los oligos que amplificaron las regiones del gen p53 fueron los exones 7 y 8, ya que al formar parte del dominio de unión al DNA son consideradas “Hot spots” o bien, regiones con alta probabilidad de mutaciones que generan carcinogénesis por efecto de la RUV (Bai y Wei, 2006).

Los oligos fueron diseñados mediante el software Geneious® 9.1 para obtener un amplicón de entre 80 y 120 pb, la T_m (temperatura de alineamiento) óptima fue de

60°C y el porcentaje de G-C que representa las uniones más fuertes con 3 enlaces, se mantuvo entre en 50% para asegurar su estabilidad y unión con el DNA molde. Las secuencias de los oligos pueden observarse en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los oligos del gen p53.

Secuencia de oligo	Secuencia del amplicón
FW: 5' -TGTTTCCTCTTGGGCTTAGGG - 3' RV: 5' - CTGTTCCCAACCCCTCTTGTC - 3'	TGTTTCCTCTTGGGCTTAGGGACGTCTCTTATCTGT GGCTTCTCGGGGTTCTGTAAGTGGACCTTTGGCTG CAGATATAGACAAGAGGGGTTGGGAACAG

7.3 PCR en tiempo real (qRT-PCR)

La qRT-PCR se realizó por medio del Kit **Thermo SCIENTIFIC™** Maxima SYBR Green qPCR, el cual se caracteriza por el empleo una polimerasa termoestable (hot-start DNA polymerase) y un intercalante fluorescente SYBR Green. Se realizaron tres replicas por tratamiento; las condiciones de amplificación se observan en la tabla 3:

Paso	Temperatura, °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	45
Alineamiento/extensión	60	1 min	

La fluorescencia fue detectada durante el paso de alineamiento/extensión.

Para calcular el nivel de expresión del transcrito de p53 se utilizó la fórmula: $E = Peff^{(-\Delta Ct)}$, en donde Peff es la eficiencia del PCR, calculada mediante el programa LinRegPCR (desarrollado por Ruijter, 2009), posteriormente se determinaron las unidades de expresión relativa (UER) que se refieren a la expresión de p53 en cada uno de los tratamientos, con respecto al gen constitutivo actina.

Finalmente se llevó a cabo una prueba estadística ANOVA y con el fin de dilucidar cuales son los tratamientos con diferencias estadísticamente significativas, se aplicó una prueba de TUKEY ($p < 0.01$).

8. Resultados

8.1 Niveles del transcrito de p53

Los grupos evaluados fueron: el C- (etanol), C+ (etanol + RUV), T (Parsol ® + RUV), EMBC (extracto metanólico de *B. cordata* + RUV) y V (verbascósido + RUV). El nivel del transcrito de p53 se determinó en unidades de expresión relativa (UER), la expresión relativa de p53, de cada tratamiento se observan en la figura 18.

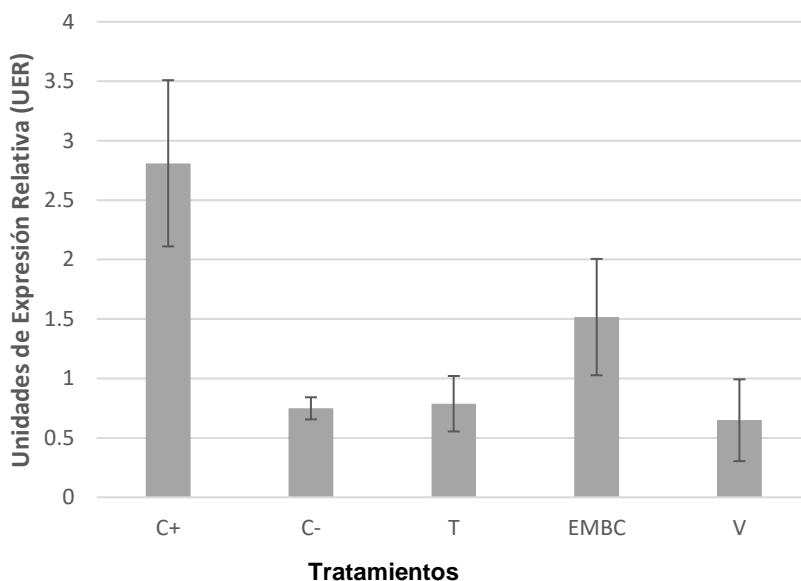


Figura 18. Unidades de expresión relativa (UER) de p53 de ratones SKH-1. Se muestra el C+, C-, T, EMBC y V, se puede observar un mayor nivel de expresión en la piel del C+, mientras que los tratamientos se mantienen cercanos al C-.

El grupo que presentó mayor nivel de expresión del transcrito de p53 fue C+ (2.80 UER), seguido de EMBC (1.52 UER), T (0.78 UER), C- (0.75 UER) y finalmente V (0.64 UER). El análisis estadístico ANOVA ($\alpha=0.05$), demostró que no existen diferencias significativas entre el C-, el grupo T y V, y que el EMBC, es diferente

de todos los tratamientos, la manera en la que se agrupan se muestra en la figura 19.

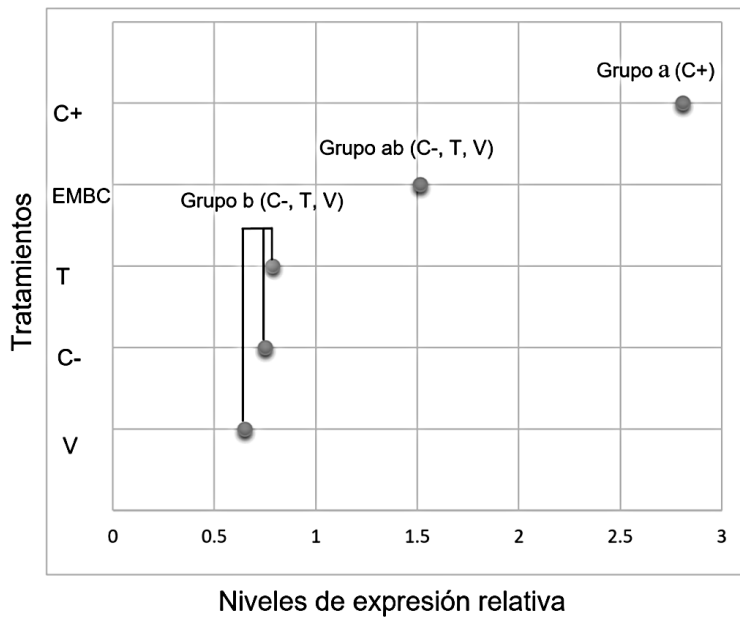


Figura 19. Prueba de agrupamiento de Tukey. El C+ (grupo a), se separó del resto de tratamientos, EMBC (grupo ab), mostró actividad diferente de C+ y el resto de los tratamientos, T y V (grupo b) no mostraron diferencias significativas con el C-, demostrando efecto fotoprotector.

9. Discusión

En este trabajo se encontró que el nivel de expresión relativa del transcrito del gen p53 de piel de ratones SKH-1 irradiados con RUV y sin protección, es significativamente mayor al de la piel de ratones no irradiada -por lo cual- se sugiere que el daño genotóxico por RUV tiene como resultado la sobreexpresión de p53. Por otro lado, se encontró que la piel irradiada con RUV y protegida con parsol®, EMBC o con V, posee un nivel de expresión igual a la piel del C- (con excepción de EMBC que se encuentra en un nivel intermedio), y significativamente menor que la piel del C+ demostrando la actividad fotoprotectora de los tratamientos al prevenir la sobreexpresión del transcrito de p53.

La expresión del transcrito de p53 del C-, fue de 0.75 UER, la piel de los ratones de este grupo se mantuvo sana y sin exposición a la RUV, técnicamente, al no haber daño histológico ni genotóxico provocado por la RUV, se esperaría que no hubiera expresión, ya que la proteína que se traduce a partir del transcrito de p53 (P53), regula la transcripción de genes de respuesta al estrés genómico. Sin embargo, Espinosa y colaboradores en 2003, demuestra que la proteína producida por este mensajero participa activamente en varios procesos, como el ensamblaje del complejo de iniciación del promotor de p21, por lo cual, células sin daño al DNA, requieren niveles basales del transcrito de p53, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo.

Liu y colaboradores en 2007 y 2009, realizaron trabajos en los cuales demuestran que el daño genotóxico provoca un aumento considerable en la cantidad del transcrito de p53, reportando que la quinasa PKC δ induce la transcripción de este gen, aumentando la cantidad de mRNA y que esta inducción está directamente relacionada con la respuesta al daño al DNA.

Saldaña en 2011, realizó una revisión en la cual reporta que transactivadores de p53 como son PKC δ y RREB-1, son activados como respuesta al daño al DNA, teniendo como resultado, al igual que en este estudio, un incremento en la cantidad de transcritos de p53 que concuerda con aumento significativo de la expresión del transcrito de p53 observado en este estudio.

La sobreexpresión del transcrito de p53, es la respuesta a nivel molecular cuando existe daño al DNA. Investigaciones previas reportan que el daño crónico al DNA provocado por la RUV, produce daños a nivel histológico y la aparición de carcinogénesis cutánea (Espinosa, 2016; Lui et. al, 2009).

Espinosa en 2016 realizó un estudio en el cual demostró que la exposición crónica de piel de ratones SKH-1 a la RUV tiene como consecuencia tres principales tipos de lesiones epidérmicas:

- a) Hiperplasia, que se caracteriza por un aumento en el grosor de la epidermis, presencia de espongiosis leve a moderada y extensión focal a multifocal;
- b) Queratosis actínica, en la cual la parte basal de la epidermis muestra atipia citológica asociada con hiperplasia de células basales o atrofia, elongaciones epidérmicas hacia la dermis y paraqueratosis;
- c) Carcinoma cutáneo, caracterizado por la presencia de células atípicas en todos los niveles de la epidermis, desorganización de los núcleos, displasia escamosa amplia que ocupa el grosor del epitelio, pérdida de la integridad de la membrana basal con invasión a la dermis, zonas amplias de queratinización, necrosis variable y angiogénesis.

Al irradiar a los ratones sin protección, se indujo la sobreexpresión de p53. Por tratarse de una exposición crónica, el gen p53 pudo presentar mutaciones en los exones 7 y 8, zonas importantes, ya que codifican para el dominio de unión al DNA de la proteína P53, provocando la pérdida del control sobre el arresto del ciclo celular, la reparación del DNA y la vía apoptótica, comprometiendo la reparación y la estabilidad celular (Guthrie, 2017). Además de que la RUV, ocasionó el

desarrollo de carcinoma cutáneo tal y como muestran los resultados obtenidos por Espinosa et al., en 2015 (fig. 20).

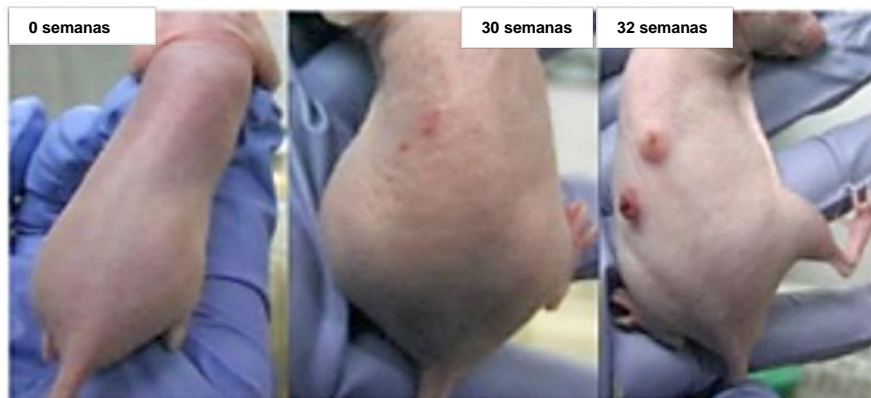


Figura 20. Respuesta cutánea de ratones SKH-1, a la exposición de RUV en un experimento crónico (32 semanas), realizado por Espinosa et al., 2015).

La expresión del transcrito de p53 en el tratamiento T (0.78 UER), con el filtro solar parsol® + RUV, fue similar a la obtenida en la piel sana del C- (0.75 UER) y diferente del C+ (2.80 UER), al prevenir el daño al DNA y la sobreexpresión de p53. El parsol® presentó actividad fotoprotectora. Espinosa en 2016, realizó pruebas de fotoprotección en la línea celular HaCaT irradiadas con RUV, reportando al parsol® como agente fotoprotector, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo. Sin embargo, se ha demostrado que este filtro comercial es incompatible con filtros a la UVA, como la avobenzona, debido a que al estar en contacto con este compuesto, se produce una inestabilidad en las moléculas del parsol® teniendo como resultado su prematura degradación y presentando limitantes para este fotoprotector, por lo cual, el uso de productos naturales adquiere interés dentro de la fotobiología (Kullavanijaya y Lim, 2005).

La protección a la UVA adquiere gran importancia porque este tipo de radiación representa la mayor parte de la RUV que entra en contacto con la piel (90%), penetrando tanto la epidermis como la dermis (White, 2012).

El grupo EMBC (1.52 UER), protegido con extracto metanólico de *Buddleja cordata*, presentó actividad fotoprotectora al mostrar niveles de expresión estadísticamente distintos de todos los grupos estudiados. El nivel de expresión de p53 del grupo protegido con EMBC se encuentra intermedio entre el de los ratones sin irradiar y el grupo irradiado sin protección con desarrollo de carcinoma, por lo cual el EMBC presenta actividad fotoprotectora (fig. 19).

Mensah 2001, realizó un trabajo en el cual se comprobó la actividad antioxidante del extracto de *B. globosa*, dentro de los resultados obtuvieron que bajas concentraciones del extracto poseen actividad antioxidante que está estrechamente relacionada con la actividad fotoprotectora obtenida en este estudio, ya que los compuestos antioxidantes desempeñan un papel en la modulación de la iniciación del proceso de carcinogénesis, protegiendo a la célula contra el daño al DNA, teniendo como resultado una probable reducción en la expresión del transcrito de p53 tal y como se observa en este trabajo (García y Avila, 2008).

Avila y colaboradores en 2005, realizaron un estudio en donde se determinó la actividad fotoprotectora del extracto metanólico de *Buddleja scordioides*, y de dos de sus compuestos: la linarina y el verbascósido. Utilizando un modelo de *Escherichia coli*, obtuvieron que el extracto posee la menor actividad fotoprotectora de sus tratamientos, y lo atribuyen a una baja concentración de los componentes fotoprotectores en el extracto. Esto coincide con lo obtenido en este estudio ya que basados en el nivel de expresión del transcrito de p53, la piel de ratones protegida con EMBC obtuvo los niveles de expresión de p53 más altos de los tratamientos. Sin embargo, es significativamente distinto de la piel de ratones irradiados y no protegidos, por lo cual el EMBC si presentó actividad fotoprotectora.

Espinosa et al., en 2015, demostraron que el extracto metanólico de *B. cordata* tiene la capacidad de prevenir el daño crónico en ratones SKH-1, reduciendo la presencia de lesiones en la piel en un 90% de acuerdo con su análisis histológico, estos resultados de fotoprotección se confirman en este trabajo a nivel molecular, generando así más información acerca de los procesos por los cuales se lleva a cabo la fotoprotección con extractos naturales de aplicación tópica.

La actividad fotoprotectora de *B. cordata* se atribuye a la presencia de una gran cantidad de compuestos, como los fenilpropanoides, entre los cuales, por su actividad y abundancia en esta especie, destaca el verbascósido (Espinosa, 2016; Avila, 2014; Kostyuk, et al., 2008).

La piel de los ratones del grupo experimental V (tratada con verbascósido) obtuvo un nivel de expresión del transcrito de p53 de 0.64 UER. Estos resultados no mostraron diferencias significativas con la piel sana del C- y el grupo tratado con PARSOL[®], comprobando que la aplicación tópica de este compuesto en piel de ratón expuesta a la RUV, previene los daños al DNA que provocan la sobreexpresión de p53.

Avila y colaboradores en 2005 demostraron la actividad fotoprotectora del verbascósido aislado a partir de *B. scordioides*, cabe mencionar que este compuesto obtuvo mayor actividad con respecto a compuestos como la linarina, acetado de linarina y el extracto metanólico de la planta. En este trabajo el verbascósido obtuvo el menor nivel de expresión de p53 y al igual que en el trabajo de Avila y colaboradores, la mayor actividad fotoprotectora ante la RUV.

El verbascósido tiene actividad fotoprotectora, ya que tiene la capacidad de absorber en la región donde se encuentra el rango de la RUV, siendo un cromóforo a esta (Alpieva et al., 2014; Esposito, et al., 2010; Kostyuk, et al., 2008).

La estructura del verbascósido lo hace un compuesto con la capacidad de prevenir el daño que la RUV desencadena en las células, debido a que el fenilpropanoide (ácido cafeico), que se encuentra unido a uno de los grupos azúcares es fotoestable, otorgándole la cualidad de no ser degradado por efecto de la energía proveniente de la luz, la parte central del compuesto formada por β -[D]-glucopiranososa y ramnosa (azúcares), otorga al verbascósido la capacidad de mediar rutas moleculares, promoviendo efecto antiinflamatorio, además el 4,5 hidroxifenil etanol (feniletanoide) que se encuentra unido a uno de los azúcares, tiene capacidad antioxidante, potenciando de manera efectiva su actividad fotoprotectora, ya que la RUV también produce radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales contribuyen en la formación de una gran variedad de condiciones como eritema, fotocarcinogénesis y daño en las membranas celulares, por lo cual se propone al verbascósido como un fotoprotector potencial ante los daños ocasionados por la RUV, sugiriendo la continuación trabajos de fotoprotección relacionados con este compuesto (Alipieva et al., 2014; Espinosa 2016; Avila 2014).

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se propone el seguimiento de la investigación sobre las propiedades fotoprotectoras de los diversos extractos de plantas y compuestos aplicados tópicamente, mediante el cálculo del nivel de expresión del transcrito de p53. Como perspectiva se plantea la posibilidad de estudiar más plantas que tengan un historial medicinal en la etnobotánica mexicana.

Bajo el contexto de este trabajo también se propone el estudio de genes dentro de la vía de p53, que tengan funciones implicadas en el mantenimiento de la integridad celular ante el daño provocado por la RUV, esto con el fin de correlacionar los niveles de expresión del transcrito de diversos genes en la piel de ratones irradiados con RUV y así generar un mejor entendimiento acerca de la manera en que la vía p53 es orquestada.

10. Conclusiones

La expresión del transcrito de p53 fue más elevada en el grupo irradiado sin protección. Esta sobreexpresión sugiere un mayor nivel de daño al DNA inducido por la RUV.

La piel de ratones SKH-1 protegida con el extracto metanólico de *B. cordata* y/o el verbascósido, presentó niveles de expresión del transcrito de p53 estadísticamente bajos, en comparación con la piel de los ratones SKH-1 no protegida. Esto sugiere que los extractos presentan actividad fotoprotectora, teniendo un nivel de protección similar al del compuesto comercial parsol®.

11. Referencias

Acevedo, J., Yan, S. y Michael, W.M. 2016. Direct Binding to Replication Protein A (RPA)-coated Single-stranded DNA Allows Recruitment of the ATR Activator TopBP1 to Sites of DNA Damage. *The journal of biological chemistry*. 291 (25): 13121-13131. doi: 10.1074/jbc.M116.729194

ADAM. 2017. Capas de la piel. Medline Plus. Health Illustrated Encyclopedia. Recuperado de:https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/8912.htm.

Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Koduru, S., Masika, P. J. y Afolayan, A. J. 2009. Assessment of the medicinal potentials of the metanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9: 21. doi:10.1186/1472-6882-9-21

Afaq, F. 2011. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 508 (2): 144-151. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.007

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 (6): 1065-1076. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.07.001

Alonso, C. A., Villarreal, M., Salazar, O. L., Gómez, S. M., García, C. A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 945-972. doi:10.1016/j.jep.2010.11.055

Arenas, R. 2013. Atlas de dermatología: diagnóstico y tratamiento. 3^{ra} Edición. Mc Graw Hill Interamericana. pp 416.

Arribas, D. B. 2016. Modelo de Tratamiento Experimental de la Fotocarcinogénesis por Irradiación Ultravioleta Crónica en Ratones SKH-1. Tesis de doctorado. Universidad de Murcia. Escuela internacional de Doctorado. España.

Avila, A. J. G., Espinosa, G. A. M., Matamoros, De M. y C., Benitez, F. J. Del C., Tzasaná, H. D., Flores, M. S., Campos, C. J., Muñoz, L. J. L. y García, B. A. M. 2014. Photoptottection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. BMC Complementary and Alternative Medicine. 14: 281.

Bai, L. y Wei, G. Z. 2006. p53: Structure, Function and Terapeucic Applications. Journal of Cancer Molecules 2(4): 141-153.

Bauer, M., Goldstein, M., Christmann, M., Becker, H., Heylmann, D. y Kaina, B. 2011. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. Proceeding of the National Academy of Sciences. 108: 21105 - 21110.

Benavides, F., Oberyszyn, T. M., VanBuskirk, A. M., Reeve, V. E. y Kusewitt. D. F. 2009. The hairless mouse in skin research. Journal of dermatological Science. 53 (1): 10-18. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.08.012.

Benjamin, C. L. y Ananthaswamy, H. N., 2006. p53 and the pathogenesis of skin cáncer. Toxicology and Applied Pharmacology 224: 241-248. doi:10.1016/j.taap.2006.12.006

Bolshakov, S., Walker, C. M., Storm, S. S., Selvan, M. S., Clayman, G. L., El-Naggar, A., Lippman, S. M., Kripke, M. L. y Ananthaswamy, H. N. 2003. p53 Mutations in Human Aggressive and Nonaggressive Basal and Squamous Cell Carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 9: 228-234.

Cabrera, M. C. M. y López, N. M. A. 2006. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*. 29 (7): 292-298.

Chandel, N., Chauhan, A. y Guleria, K. 2013. The ProSer Polymorphism of TP53: A Systematic Review. *International Journal of Cancer Research* 9 (1): 1-8. doi: 10.3923/ijcr.2013.1.8

Chen, Y., Dey, R., Chen, L. 2010. Crystal structure of the p53 core domain bound to a full consensus site as a self-assembled tetramer. *Structure*., 18, 246–256. doi:10.1016/j.str.2009.11.011.

Cheng, C. E. L., Ching, S. W., Shu, M. H., Chin, H. W., Hsiao, C. L., Yu, T. P., Pao, S. H., Hui, J. Y. y Gwo, S. C. 2016. Irradiance-dependent UVB Photocarcinogenesis. *Scientific Reports*. 6, 37403; doi: 10.1038/srep37403

Chu, D.H. 2014. Desarrollo y estructura de la piel. En: Wolf, K., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrist, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo I. 8ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

Clarenc, A. R. 2012. Evaluación del contenido del verbascósido, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en plantas de *Buddleja cordata* Kunth propagadas in vitro. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México.

D' Orazio, J., Jarret, S., Amaro, O. A. y Timothy, S. 2013. UV Radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 12222-12248. doi: 10.3390/ijms140612222

Devi, P. U. 2005. Basics of carcinogénesis. En: *Health Administrator, The official Journal of the Indian Society of Health Administrators*. 1: 16-24.

Espinosa, G. A. M. 2016. Evaluación del efecto fotoquimioprotector del verbascósido en ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta. Tesis de Doctorado en Ciencias. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Espinosa, G. A. M., García, B. A. M., Benítez, F. J. C., Sandoval, C. E., Gonzáles, V. M. R., Céspedes, C. L. y Avila, A. J. G. 2015. Photoprotective effect of verbascoside from *Buddleja cordata* in SKH-1 mice exposed to acute and chronic UV-B radiation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 15 (5): 288 - 300.

Espinosa, J. M., Verdun, R. E. y Emerson, B. M. 2003. p53 Functions through Stress- and Promoter- Specific Recruitment of Transcription Initiation Components before and after DNA Damage. *Molecular Cell*. 12: 1015-1027.

Fagundo, M. A., Rodríguez, G. M., González, K., Iglesias, V., Hernández, R., Concepción, A. R., Odalys, V. M. 2015. Photoprotective and photorepair action of marine angiosperm extracts, *Thalassia testudinum* Banks ex König (Hydrocharitaceae) and *Syringodium filiforme* Kützing (Cymodoceaceae). *Rev. Mar. Cost.* 8 (1): 51-62. doi: 10.15359/revmar.8-1.4

Filho, A. G., Morel, A. F., Adolpho, L., Ilha, V., Giralt, E., Tarragó. T. 2012. Inhibitory effect of verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. *Phytotherapy Research*. 26: 1472–5. doi: 10.1002/ptr.4597

Stratton, M. S., Stratton, P. S., Moore, K. R., Einspahr, J. G., Bowden, T. G. y Albert, M. D. Strategies in Skin Cancer Chemoprevention. 2005. En: Kelloff, G. J., Hawk, E. T. y Sigman, C. C. Cancer Chemoprevention. Volumen 2. Editorial: Humana Press.403.

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

Georgiev, M. I., Alipieva, K., Orhan. I., Abrashev, R., Denev. P., Angelova, M. 2011. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. Food Chemistry. 128:100-5. doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.083

Gilaberte, Y. y González, S. 2010. Update on photoprotection. Actas Dermo-Sifiliográficas. 101(8): 659-72.

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. y Harris, C. C. 1994. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. Cancer Research. 53: 4855-4878.

Guerra, T. A. 2018. Indicaciones y aplicaciones de la fotoprotección. Medicina. 12 (47): 2811-4.

Guthrie, D. W. 2017. Functional consequences of inducible genetic elements from the p53 SOS response in a mammalian organ system. Experimental Cell Research 359. 50-61.10.1016/j.yexcr.2017.08.010

Hainaut, P., Hollstein, M. 2000. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. Advances Cancer Research. 77: 81–137.

Hegde, M. L., Hazra, T. K. y Mitra, S. 2008. A Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*. 18: 27–47.

Herrera, P. J. C., Vásquez, P. G., Ramírez, C. J. L., Muñetón, P. C. M. 2004. Papel del gen TP53 en la oncogénesis. *Salud UIS* 36: 88-99.

Hoejmakers, J. H. J. 2001. Genome maintenance mechanisms for precening cáncer. *Insight review articles. Macmillan magazines Ltd. Nature*. 411.

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

Iglesias D. L., Guerra, T. A. y Ortiz, R. P. L. 2004, *Tratado de Dermatología*. 2^{da} Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 1-11.

Jeppesen, D. K., Bohr, V. A. y Stevnsner, T. 2011. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobioly*. 94: 166 –200. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.04.013.

Jiang, W., Ananthaswamy, H. N., Muller, K. H. y Kripke. M. L. 1999. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*. 18: 4247-4253.

Joerger, A.C. y Fersht, A. R. 2008. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annual Review of Biochemistry*. 77: 557-82. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.060806.091238

KEGG. 2018. p53 Signaling Pathway-Homo sapiens (human). *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Recuperado de <https://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04115.html>.

Kim, T. H., Ananthaswamy, H. N., Kripke, M. L. y Ullrich, S. E. 2003. Advantages of using hairless mice versus haired mice to test sunscreen efficacy against photoimmune suppressions. *Photochemistry and Photobiology*. 78(1): 37-42.

Kirmizibekmez, H., Ariburnu, E., Masullo, M., Festa, M., Capasso, A., Yesilada, E. 2012. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Sideritis trojana*. *Fitoterapia* 83: 130-6. doi:10.1016/j.fitote.2011.10.003

Krokan, H. E. y Bjoras, M. 2013. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a012583

Kruse, J. P., Gu, W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609–622. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.050

Krutmann, J. 2000. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *Journal of Dermatological Science*. 23: S22-S26.

Kochevar, I. E., Taylor, C. R. y Krutmann, J. 2009. Fundamentos de fotobiología y fotoimmunología cutáneas. Transtornos secundarios a radiación ultravioleta. En: Goldsmith, L. A., Katx, S. I., Gilcherest, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. J. y Wolf, K. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. Tomo 2. 7ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

Kullavanijaya, P. y Lim, H. W. 2005. Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 52 (6): 937-958. doi:10.1016/j.jaad.2004.07.063

Laat, W. L., Jaspers, G.J. y Hoeijmakers, H.J. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes and development* 13:768.

Lee, J. K., Kim, J. H., Nam, K. T. y Lee, S. H. 2003. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice. *Journal of Dermatological Science*. 32(3): 171-179 doi: 10.1016/S0923-1811(03)00094-X

Lehmann, A. R. 1995. Nucleotide excision repair and the link with transcription. *Trends in Biochemical Sciences*. 20: 402 – 405.

Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 362: 709–715.

Lindahl, T. 2001. Keynote: Past, present, and future aspects of base excision repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 68: 18-30.

Liu, H., Hew, H. C., Lu, Z. G., Yamaguchi, T., Miki, Y. y Yoshida. K. 2009. DNA damage signalling recruits RREB-1 to the p53 tumour suppressor promoter. *Biochem Journal*. 422 (3): 543-51. doi:10.1128/MCB.01126-07

Liu, H., Lu, Z. G., Miki, Y. y Yoshida, K. 2007. Protein Kinase C δ Induces Transcription of the TP53 Tumor Suppressor Gene by Controlling Death-Promoting Factor Btf in the Apoptotic Response to DNA Damage. *Molecular And Cellular Biology*. 27 (24): 8480–8491; doi: 10.1128/MCB.01126-07

López, M., Anzola, M., Cuevas, S.N., Aguirre, J.M., Martínez, P. M. 2001. p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta Médica de Bilbao* 98: 21-27.

Marrow, L. y Meunier, J. R. 2008. Skin DNA photodamage and its biological Consequences. *The American Academy of Dermatology, Inc*. 58: S139-48. doi:10.1016/j.jaad.2007.12.007

Matsumura, Y. y Ananthaswamy H. N. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195: 298-308.

Mejía, G. J. C., Aehortúa, L., Puertas, M. Á. M. 2014. Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología CMQ*. 12 (4): 272-281.

Mensah, A. Y., Sampson, J., Houghton, P. J., Hylands, P. J., Westbrook, J., Dunn, M., Hughes, M. A. y Cherry, G. W. 2001. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ehnopharmacology*. 77 (2-3): 219-26.

Moll, U. M. y Petrenko, O. 2003. The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research*. 1: 1001-1008.

NCBI. 2018. Trp53 transformation related protein 53 [*Mus musculus* (house mouse)]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22059>.

Pattison, D. I. y Davies, M. J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. En: *Cancer: Cell Structures, Carcinogenesis and Genomic Instability*. Switzerland.

Pearon, L. G. y John, Yoon. (2006). Carcinoma basocelular. En: Friedman, R. J., Dzubow, L. M., Reintgen, D. S., Bystry, J. C. *Cáncer de Piel*. Editorial: Elsevier Saunders. 61.

Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. K. Bravo, J. A. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*. 31 (2): 68-81.

Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixadre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27 (1): 76-89.

Rebel, H., Kram, N., Westerman, A., Banus, S., Henk, J. K. y Gruijil, F. R. 2005. Relationship between UV-induced mutant p53 patches and skin tumours, analysed by mutation spectra and by induction kinetics in various DNA-repair-deficient mice. *Carcinogenesis*. 26 (12): 2123-2130; doi:10.1093/carcin/bgi198

Romero, R. S., Aguilar, R. S., Rojas, Z. E. C. 2003. *Buddleja cordata* H.B.K. ssp. *Cordata* (Buddlejaceae): propagación y anatomía de la madera. *Polibotánica*. 16: 63-77.

Saldaña, R. y Recillas, T. 2011. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. 6 (9): 1068-1077, DOI: 10.4161/epi.6.9.16683

Sharma, M.R., Werth, B. y Werth, V. P. 2011. Animal Models of Acute Photodamage: Comparisons of Anatomic, Cellular and Molecular Responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c Mice. *Photochemistry and Photobiology*. 87 (3): 690-698. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00911.x.

Saimaru, H. y Orihara, Y. 2010. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea*. *Journal of Natural Medicine*. 64 (2): 139-145. doi: 10.1007/s11418-009-0383-z.

Scheinfeld, N. y DeLeo, V. (2006). Factores eriológicos en e cáncer de piel: ambientales y biológicos. En: Friedman, R. J., Dzubow, L. M., Reintgen, D. S., Bystry, J. C. *Cáncer de Piel*. Editorial: Elsevier Saunders. 61.

Taskova, R. M., Gotfredsen, C. H., Jensen, S.R., 2005. Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). *Phytochemistry*. 66: 1440-7. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.04.020

Tri H. N. y Jaeyoung Y. (2006) Carcinoma epidermoide. En: Friedman, R. J., Dzubow, L. M., Reintgen, D. S., Bystry, J. C. *Cáncer de Piel*. Editorial: Elsevier Saunders. 61.

Uitto, J. M. D. 2008. The Role of Elastin and Collagen in Cutaneous Aging: Intrinsic Aging versus Photoexposure. *Journal of Drugs in Dermatology*. 7 (2): 12-16.

White, P. O., Tribou, H. y Baron, E. 2012. Protective Mechanisms of AREEN Tea Polyphenols in Skin. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2012/560682

Wilgus, T. A., Koki, A. T., Zweifel, B. S. 2003. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Molecular Carcinogenesis*. 38: 49-58. doi: 10.1002/mc.10141

Zilfou, T. J. y Lowe S. W. 2009. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspect Biology*. a001883 doi: 10.1101/cshperspect.a001883

Zou L. y Elledge, S. J. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300: 1542-1548.

