



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO FOTOPROTECTOR DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE *Dyssodia tagetiflora* Lag.
EN RATONES SKH-1.**

Tesis

Que para obtener el título de:

Bióloga

Presenta:

Rosa Ivonne González Macías

Directora de tesis:

Dra. Adriana Montserrat Espinosa González



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019



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.

Agradecimientos

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN218616.

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Adriana Montserrat Espinosa González en el laboratorio de Fitoquímica en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), la parte histológica se realizó en el laboratorio de Histología supervisada por el Biol. José del Carmen Benítez Flores y la Mtra. María de Rosario González Valle, en la Unidad de Morfofisiología y Función (UMF) dentro de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Se agradece al comité evaluador de tesis integrado por el Dr. José Guillermo Avila Acevedo jefe del laboratorio de Fitoquímica, Biol. José del Carmen Benítez Flores, la Mtra. María de Rosario González Valle, y a la Dra, Rocío Serrano Parrales.

Índice

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
2.1. Fotoprotección.....	7
2.2. Fotoprotección con productos naturales.....	7
2.3. Radiaciones provenientes del sol.....	9
2.4. La piel.....	10
2.5. Efectos cutáneos por la radiación solar.....	17
2.5.1. Efectos agudos.....	17
2.5.2. Efectos crónicos.....	20
2.6. Modelo SKH-1.....	21
2.7. <i>Dyssodia tagetiflora</i> Lag. (Asteraceae).....	23
3. Antecedentes.....	24
4. Justificación.....	26
5. Pregunta Científica.....	26
6. Hipótesis.....	26
7. Objetivos.....	26
7.1. Objetivo general.....	26
7.2. Objetivos particulares.....	26
8. Estrategia metodológica.....	27
8.1. Obtención del extracto metanólico.....	27
8.2. Experimento crónico de fotoprotección.....	27
8.3. Técnica histológica.....	29
8.4. Análisis histológico.....	29
8.5. Análisis estadístico.....	31
9. Resultados y Discusión.....	32
9.1. Incidencia y multiplicidad de lesiones provocadas por la radiación crónica a la UVB en ratones SKH-1.....	32
9.2. Análisis histológico del experimento de fotoprotección crónico en ratones SKH-1.....	34
9.3. Análisis histológico del conteo de mastocitos.....	45
10. Conclusiones.....	51
11. Bibliografía.....	52

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura general y ejemplos de estructuras químicas de flavonoides.....	8
Figura 2. Espectro electromagnético.....	9
Figura 3. Radiación ultravioleta que llega a la piel.....	10
Figura 4. Estructura de la piel.....	11
Figura 5. Distintos estratos y componentes celulares de la epidermis.....	12
Figura 6. Unión dermoepidérmica.....	15
Figura 7. Componentes celulares de la dermis.....	16
Figura 8. Hipodermis o tejido subcutáneo conformado por adipocitos.....	16
Figura 9. Procesos que se dan en la Inflamación aguda y crónica.....	18
Figura 10. Mastocitos.....	19
Figura 11. Desarrollo de la fotocarcinogénesis.....	21
Figura 12. Ratones sin pelo SKH-1.....	22
Figura 13. <i>Dyssodia tagetiflora</i>	24
Figura 14. Experimento crónico de fotoprotección.....	28
Figura 15. Lesiones macroscópicas en los tratamientos.....	34
Figura 16. Secciones histológicas representativas de la piel del control -, tinción Hematoxilina y Eosina.....	32
Figura 17. Secciones representativas del control + (UVB), tinción Hematoxilina y Eosina.....	39
Figura 18. Secciones representativas del control + (UVB) tinción Hematoxilina y Eosina.....	40
Figura 19. Secciones histológicas representativas del tratamiento el extracto metanólico de <i>D. tagetiflora</i> , tinción Hematoxilina y Eosina.....	41
Figura 20. Secciones histológicas del tratamiento DysUVB, tinción Hematoxilina y Eosina.....	42
Figura 21. Secciones representativas de los tratamientos del experimento crónico de fotoprotección, Tinción Azul de toluidina.....	46

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Dyssodia tagetiflora</i>	23
Tabla 2. Descripción de los grupos control y experimentales.....	27
Tabla 3. Descripciones histológicas de las lesiones crónicas provocadas por la UVB.....	30
Tabla 4. Categorías de lesiones histológicas relacionadas con el proceso de carcinogénesis cutánea.....	31
Tabla 5. Efectos histológicos en piel de ratones SKH-1 expuestos a la UVB y protegidos con el extracto metanólicos de <i>Dyssodia tagetiflora</i>	50

Indicie de Gráficas

Gráfica 1. Incidencia y multiplicidad de lesiones macroscópicas en ratones SKH-1 durante el experimento crónico de fotoprotección.....	33
Gráfica 2. Multiplicidad de lesiones macroscópicas en ratones SKH-1 durante el experimento crónico de fotoprotección.....	33
Gráfica 3. Incidencia de lesiones provocadas por la exposición crónica a la UVB en los tratamientos.....	36
Gráfica 4. Promedio del número de mastocitos por campo en los tratamientos del experimento de exposición crónica de la radiación UVB.....	45

1. Resumen

El cáncer de piel es una de las neoplasias más frecuentes en los seres humanos, uno de los factores de riesgo es la exposición acumulativa a la radiación ultravioleta (RUV). Como respuesta a esta problemática se ha utilizado la fotoquimioprotección como una herramienta para prevenir el daño causado en la piel por la exposición a la RUV, una alternativa dentro de esta actividad terapéutica es el uso de productos naturales como los compuestos fenólicos, ya que tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena.

La especie *Dyssodia tagetiflora* Lag. pertenece a la familia Asteraceae, se puede considerar fotoquimioprotector solar porque posee polifenoles de tipo flavonoide que pueden ayudar a prevenir el daño provocado por exposición a la radiación UVB. Por lo que el objetivo general de este trabajo fue evaluar histológicamente el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *D. tagetiflora* en ratones SKH-1 expuestos a radiación RUV de forma crónica.

Con el análisis histológico se determinó que el 82% de las muestras correspondientes al C+ presentaron lesiones diagnosticadas como carcinomas. El grupo que fue expuesto a la RUV y estuvo protegido por el extracto metanólico de *Dyssodia tagetiflora* disminuyó y retrasó los daños provocados por la RUV a nivel epidérmico y dérmico en un 20%, así mismo se disminuyó el número de mastocitos presentes en la piel de los ratones protegidos con el extracto lo que indica que puede funcionar como un modulador de la respuesta inflamatoria.

Los resultados obtenidos en este trabajo concluyen que el extracto metanólico de *D. tagetiflora* posee efecto fotoprotector y actividad moduladora de la inflamación provocada por la exposición crónica a la UVB considerándolo candidato para utilizarse en la fotoquimioprotección.

2. Introducción

El cáncer de piel es una de las neoplasias más frecuentes en los seres humanos. La Fundación Mexicana para la Dermatología (2006) reporta que ocupa el segundo lugar de frecuencia en México; en hombres se encuentra en el primer lugar y en mujeres ocupa el cuarto lugar. Existen dos tipos de cáncer cutáneo: melanoma y no melanoma.

El cáncer de piel no melanómico se divide en dos grupos debido al tipo celular que afecta, el carcinoma basocelular y el carcinoma de células escamosas. Ambas enfermedades comparten un factor de riesgo muy importante que es la exposición acumulativa a la radiación UV (RUV) proveniente del sol (Lang y Maize, 2006; Nguyen y Yoon, 2006).

En México no existe una cultura de la prevención de los daños provocados por la RUV y la mayor parte de la población mexicana desconoce los efectos que produce la exposición a las radiaciones solares (Jurado-Santa Cruz et al., 2011). La fotoprotección es una actividad terapéutica que se utiliza para prevenir y/o reducir los daños inducidos por la RUV mediante la administración oral o tópica de productos sintéticos o naturales (Saewan y Jimtaisong, 2015).

Los productos naturales son moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en las actividades bioquímicas primarias como el crecimiento, desarrollo y la reproducción. Sin embargo, tienen funciones específicas en los individuos que las producen. Pueden actuar como mecanismos de defensa, atracción de polinizadores, y/o protección a factores externos como la RUV (Bell, 1981).

Los productos naturales que se pueden utilizar como bloqueadores ante la RUV son los polifenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, debido a que su estructura química puede absorber la RUV y evitan los efectos dañinos al ADN, el estrés oxidativo y reducen la inflamación (Saewan y Jimtaisong, 2015).

Los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Dyssodia tagetiflora* se puede considerar como fotoprotectores solares, debido a que tienen capacidad

antioxidante (García-Bores et al., 2018), actividades anticancerosas (Li et al., 2014; Zang et al., 2014) y antiinflamatorias (Lesjak et al., 2018; Kim y Young, 2011; Formica y Regelson, 1995).

2.1. Fotoprotección

La fotoprotección se utiliza para prevenir los daños en la piel provocados por la RUV mediante la ropa, accesorios y fotoprotectores solares. Los fotoprotectores solares contienen moléculas que pueden absorber, reflejar o dispersar los fotones de la RUV, estos deben prevenir los daños cutáneos inducidos por la radiación solar por medio de la absorción directa de fotones, la inhibición de la inflamación aguda y crónica, la modulación de la inmunosupresión, la inducción de apoptosis y la actividad antioxidante (Gilaberte y González, 2010).

Los fotoprotectores tienen la propiedad de reflejar, absorber o dispersar los rayos solares, de modo que permiten una exposición solar más prolongada y con menor riesgo. Los fotoprotectores también debe de carecer de toxicidad aguda o crónica y no ser susceptibles de causar irritación ni ninguna otra reacción sensibilizante, ser compatibles con el resto de componentes del producto y ser estables frente al calor, la humedad, la luz intensa y el pH de la piel (Garrote y Bonet, 2008).

Los productos naturales pueden actuar por varios mecanismo celulares y moleculares para retrasar y prevenir los daños provocados por la RUV sobre todo el cáncer de piel, por eso se busca utilizar a los productos naturales como fotoprotectores (Afaq, 2011).

2.2. Fotoprotección con productos naturales

Los productos naturales o compuestos secundarios cumplen funciones que no son estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. No están, en general, directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo del organismo. Muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer polinizadores,

repeler predadores o seres dañinos, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima, etc. Es decir que cumplen funciones ecológicas (Ringuelet y Viña, 2013).

Los productos naturales que actúan como bloqueadores de la RUV son los compuestos fenólicos; como los polifenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, se encuentran distribuidos en alimentos de origen vegetal como frutos, semillas y flores (Nichols y Katiyar, 2010). Tienen actividades antioxidantes, anti-inflamatorias, inmunomodulatorias, anti-mutágenas y anti-carcinogénicas, por lo que son utilizados como agentes fotoprotectores en la prevención de los daños en la piel inducidos por la RUV (Afaq, 2011).

Las actividades biológicas de los compuestos fenólicos se debe a su estructura química que se caracterizan por poseer uno o más grupo hidroxilo (-OH) de reacción ácida, unidos a un anillo aromático (grupo fenol). Los flavonoides constan de dos anillos de seis átomos de carbono (que se les nombra con las letras A y B) que se encuentran unidos mediante un puente de tres átomos de carbono que generalmente forman un tercer anillo (Anillo C) (Viña, 2013) (Figura 1).

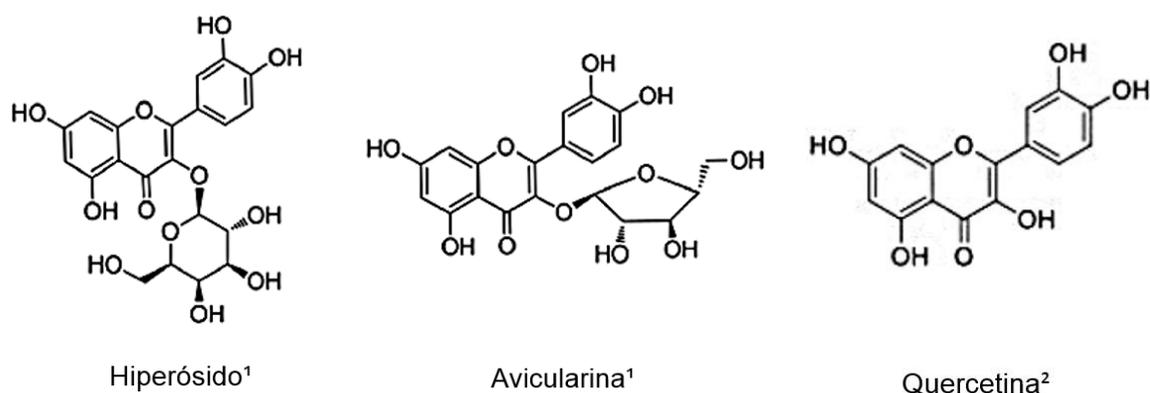


Figura 1. Ejemplos de estructuras químicas de flavonoides (Estrella-Parra et al., 2019¹; García-Bores et al., 2018²).

2.3. Radiaciones provenientes del sol

El sol es una fuente natural de radiaciones electromagnéticas que se caracterizan por la frecuencia y longitud de onda, suelen clasificarse de acuerdo a estas dos propiedades en diferentes grupos. Al conjunto de todas ellas se denomina espectro electromagnético. De todo el espectro solar solo la luz visible, los infrarrojos y una parte de la radiación ultravioleta alcanzan la superficie, el resto son detenidas por la capa de ozono (Maverakis et al., 2010) (Figura 2).

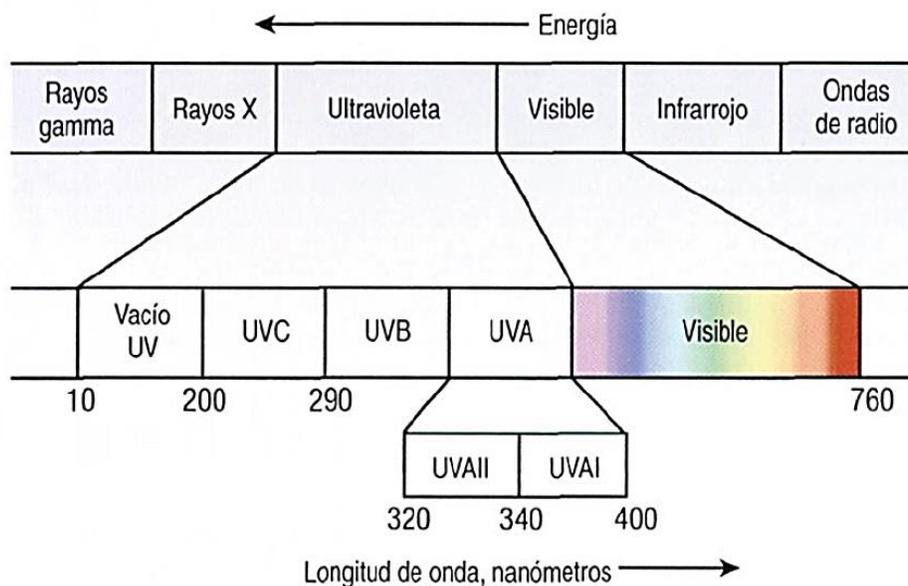


Figura 2. Espectro electromagnético (Kochevar et al., 2014).

La RUV es uno de los agentes físicos causantes de mutaciones en diversos organismos. Tiene un espectro electromagnético de 200-400 nm; presenta tres subdivisiones: UVC, UVB y UVA. Los rayos UVC (200-290 nm) son las radiaciones más dañinas para la piel, pero son captadas por la capa de ozono de la atmósfera y no llegan a la superficie terrestre. La radiación UVB o espectro de quemadura solar (290-320 nm) es causante del eritema, fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis. Las radiaciones UVA se divide en UVA I (340-400) y UVA II (320-340 nm), los efectos que produce en la piel son eritema, pigmentación, melanogénesis retardada y fotoenvejecimiento (D'Orazio, 2013; Maverakis et al., 2010) (Figura 3).

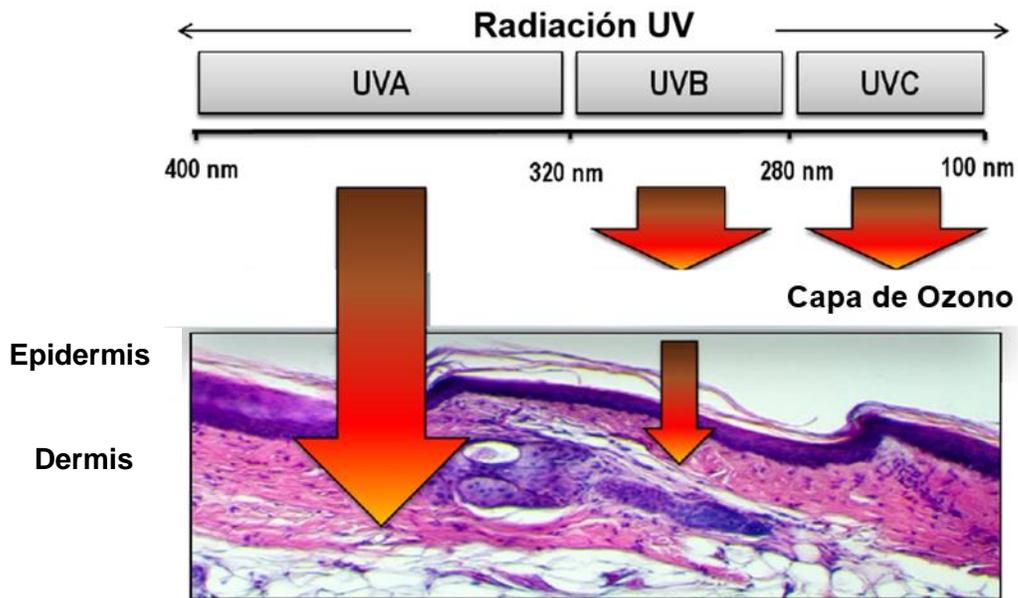


Figura 3. Radiación ultravioleta que llega a la piel. (Modificado de D'Orazio, 2013).

2.4. La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, mide aproximadamente 2 m², tiene un peso de 3 a 4 kg lo que equivale del 6 al 12% de peso corporal (Castell et al., 2017). Su principal función es actuar como barrera contra agresiones externas producidas por agentes físicos, químicos y biológicos. Cumple otras funciones como de termorregulación, sensoriales, inmunológicas y metabólicas, que permiten la interacción del organismo con su medio ambiente (Chu, 2014).

Desde el punto de vista histológico, la piel está constituida por tres capas conectadas entre sí: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 4). Y su origen embrionario se deriva de dos capas blastodérmicas diferentes, es decir, del ectodermo se derivan la epidermis, los anexos cutáneos, los melanocitos y el nervio y del mesodermo proceden la dermis e hipodermis con sus vasos y músculos (Castell et al., 2017).

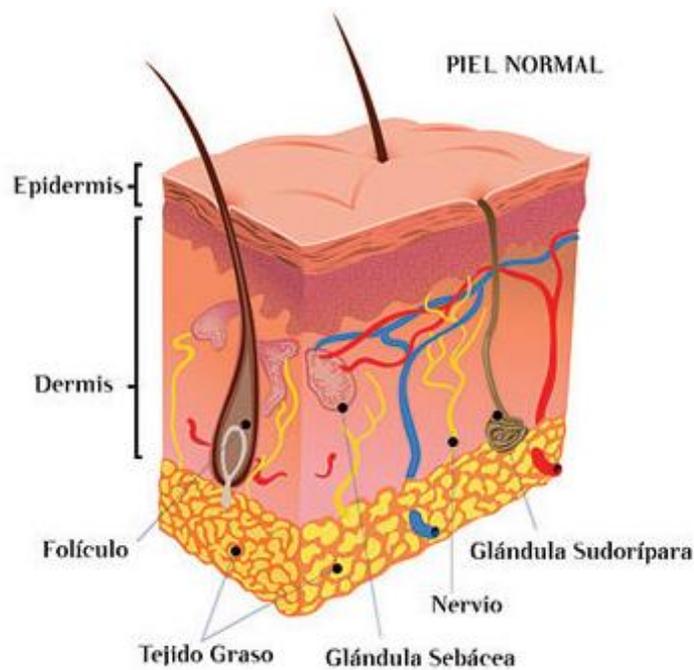


Figura 4. Estructura de la piel. Recuperado de <https://fmd.org.mx/2017/09/05/que-es-la-piel/>

↪ **Epidermis**

La epidermis es una capa de epitelio escamoso estratificado, queratinizado, constituye la parte más externa de la piel. En ella se localizan cuatro tipos celulares diferentes: células de Merkel, melanocitos, células de Langerhans y los queratinocitos (Chu, 2014) (Figura 5).

El 90% de la epidermis está constituida por los queratinocitos. Esta capa cutánea se clasifica como un epitelio plano estratificado, al cual se le reconocen cuatro estratos que van progresando desde el basal, pasando por el espinoso, granuloso, lúcido, hasta llegar al córneo (Chu, 2014) (Figura 5).

Estas células pasan por un proceso de diferenciación celular conocido como cornificación, en el cual se dan diferentes cambios en el tamaño, forma celular, la formación de nuevos organelos, la acumulación de filamentos intermedios de queratina y la muerte celular. Dichos cambios son los que caracterizan a cada uno de los estratos epidérmicos (Eckhart et al., 2013).

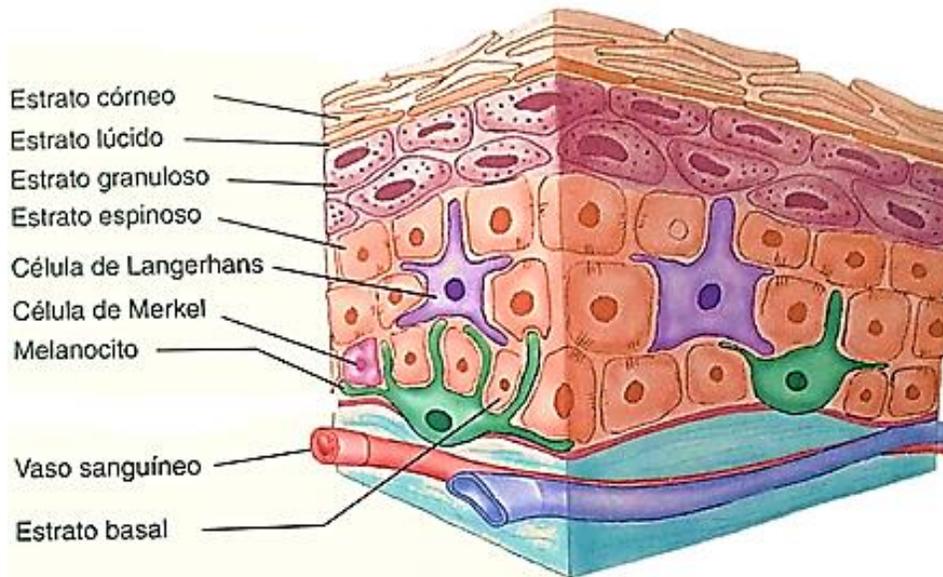


Figura 5. Distintos estratos y componentes celulares de la epidermis (Gartner, 2018).

El estrato basal o germinativo es el sitio donde se lleva a cabo la proliferación celular, está constituido por una sola capa de células cilíndricas unidas entre si por desmosomas y situada sobre una membrana basal por medio de uniones con hemidesmosomas (Magaña y Magaña, 2011). Estas células contienen organelos característicos de una célula eucarionte, lo que indica un metabolismo generalizado y un proceso de mitosis activo lo que conlleva a la diferenciación del queratinocito hasta el corneocito. Poseen filamentos intermedios de queratina 5 y 14, característicos del proceso de queratinización normal (Castell et al., 2017; Eckhart et al., 2013).

Al **estrato espinoso** se le llama así porque está compuesto de 5 a 10 capas de células espinosas poliédricas caracterizadas generalmente por la gran presencia de desmosomas que al microscopio electrónico se pueden observar como prolongaciones citoplasmáticas en forma de espigas (Gartner, 2018).

Estas células sintetizan queratina 1 y 10 que van reemplazando las queratinas producidas por el estrato basal en la cornificación; también producen gránulos de revestimiento de la membrana (cuerpos laminares o cuerpos de Odland) cuyo

contenido lipídico se compone de ceramidas, fosfolípidos y glucoesfingolípidos que evitan la deshidratación y mejoran la permeabilidad (Castell et al., 2017).

El **estrato granuloso** se encuentra constituido de una a tres capas de queratinocitos, que se caracterizan por presentar gránulos de queratohialina que contienen abundantes proteínas como la filagrina, loricrina, involucrina, entre otras que tienen como finalidad impedir que la membrana plasmática de los queratinocitos se desintegre una vez que los queratinocitos han muerto por apoptosis. Estos gránulos de queratohialina desaparecen en el momento de transición del estrato granuloso al estrato córneo, además de que en este estrato deja de sintetizarse la queratina 1 y 10 y comienza a sintetizar las queratinas 2 y 11 (Castell et al., 2017).

El **estrato lucido** es relativamente delgado y no siempre es evidente, se encuentra presente en palmas de la mano, y las plantas del pie. Suele observarse como una región translúcida entre los estratos granuloso y córneo. Las células de este estrato no tienen núcleo, ni organelos, pero sí contienen filamentos de queratina densamente empaquetados y eleidina, el cual es un producto de transformación de la queratohialina (Gartner, 2018).

Por último el **estrato córneo**, es el más superficial de piel y representa la fase final del proceso de diferenciación terminal epidérmica, está compuesto de numerosas capas de células queratinizadas, aplanadas, carentes de núcleo y organelos, se encuentran llenas de filamentos de queratina y se conocen como corneocitos (Castell et al., 2017).

Los **melanocitos** se encuentran entre los queratinocitos del estrato basal por medio de prolongaciones citoplasmáticas, en una proporción de 1 a 36 la cual se le conoce como unidad melanocítica epidérmica. Estas células sintetizan la enzima tirosina antes de la formación de melanina que se forma en los premelanosomas. Existen dos tipos de melanina: la eumelanina de color marrón que se encuentra en los melanosomas en la piel y anexos y la feomelanina de color anaranjado, rica en cisteína presente en los melanosomas en piel y cabello de personas pelirrojas (Castell et al., 2017).

Las **células de Langerhans** presentadoras de antígeno, importantes para la respuesta inmunitaria, se encuentran en todos los estratos de la epidermis, sin embargo, se hallan con mayor frecuencia en el estrato espinoso. Estas células derivan de la médula ósea, se unen a los queratinocitos por medio de prolongaciones, también se les conoce como células dendríticas. Las caracteriza la presencia de gránulos de Birbeck en el citoplasma (Gartner, 2018; Bruel et al., 2014).

Las **células de Merkel** cuyo origen se desconoce, se encuentran dispersas entre los queratinocitos del estrato basal. Las terminaciones nerviosas aferentes se aproximan a estas células formando complejos que se les nombra discos de Merkel, los cuales se considera que tienen funciones mecanorreceptoras y neuroreceptoras (Gartner, 2018).

↪ **Unión dermoepidérmica**

La unión entre la epidermis y la dermis se le conoce como **unión dermoepidérmica**, se pueden distinguir tres capas principales: 1) lamina clara en el lado epidérmico, 2) lámina densa en el centro y 3) lamina fibrorreticular poco definida que contiene abundante fibronectina, en el lado dérmico (Lowe y Anderson, 2015).

Los queratinocitos basales se encuentran anclados en la lámina densa por hemidesmosomas, de los cuales surgen proteínas de anclaje que cruzan la lámina clara. En la cara dérmica hay finas fibrillas de anclaje de colágeno tipo VII, que unen la superficie interna de la lámina densa a fibras de colágeno de la dermis papilar y unas microfibrillas de fibrilina que la unen a las fibras elásticas de la dermis superficial. Además de que la zona que se encuentra debajo de la lámina densa contiene abundante fibronectina (Lowe y Anderson, 2015) (Figura 6).

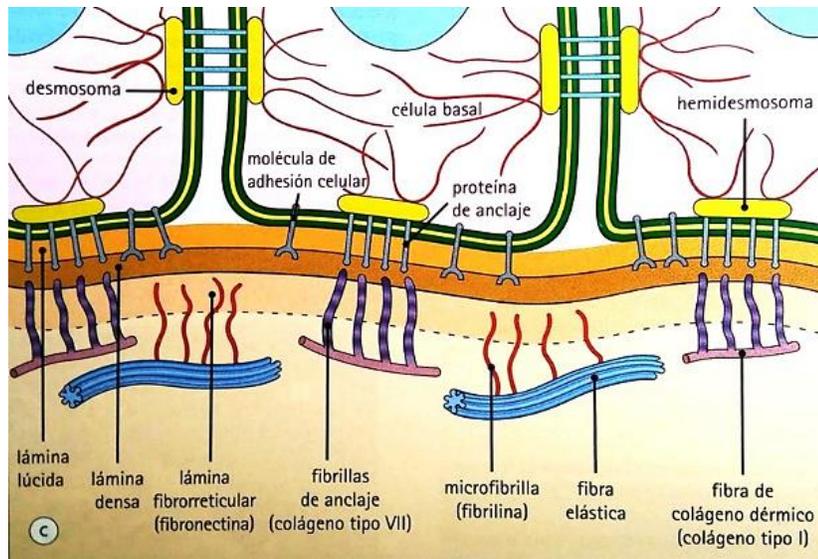


Figura 6. Unión dermoepidérmica (Lowe y Anderson, 2015).

↳ Dermis

La dermis está constituida por tejido conjuntivo denso, formado por una red de fibras elásticas y de colágeno que le dan resistencia y elasticidad a la piel; los componentes celulares que tiene son: fibroblastos, encargados de sintetizar las fibras y los componentes de la matriz extracelular (Lowe y Anderson, 2015), células del sistema inmune como linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y mastocitos. En esta capa se encuentran los vasos sanguíneos, terminales nerviosas, corpúsculos de Meisser (mecanorreceptoras) y anexos cutáneos como folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas (Tay et al., 2014) (Figura 7).

La dermis se compone de dos capas no muy definidas, una muy pegada a la epidermis que se conoce como dermis papilar y por debajo se encuentra la dermis reticular (Bruel et al., 2014) (Figura 7).

El estrato **papilar** se compone de tejido conectivo laxo de delgadas fibras de colágeno tipo III y fibras elásticas que se disponen en forma perpendicular al epitelio, en ella se encuentran vasos sanguíneos. La dermis **reticular** es mucho más densa por las gruesas fibras de colágena en su mayoría de tipo I dispuestas en grandes

haces junto con las fibras elásticas de forma irregular, dentro de este tejido se halla vasos sanguíneos, linfáticos y nervios de la piel (Bruel et al., 2014) (Figura 7).

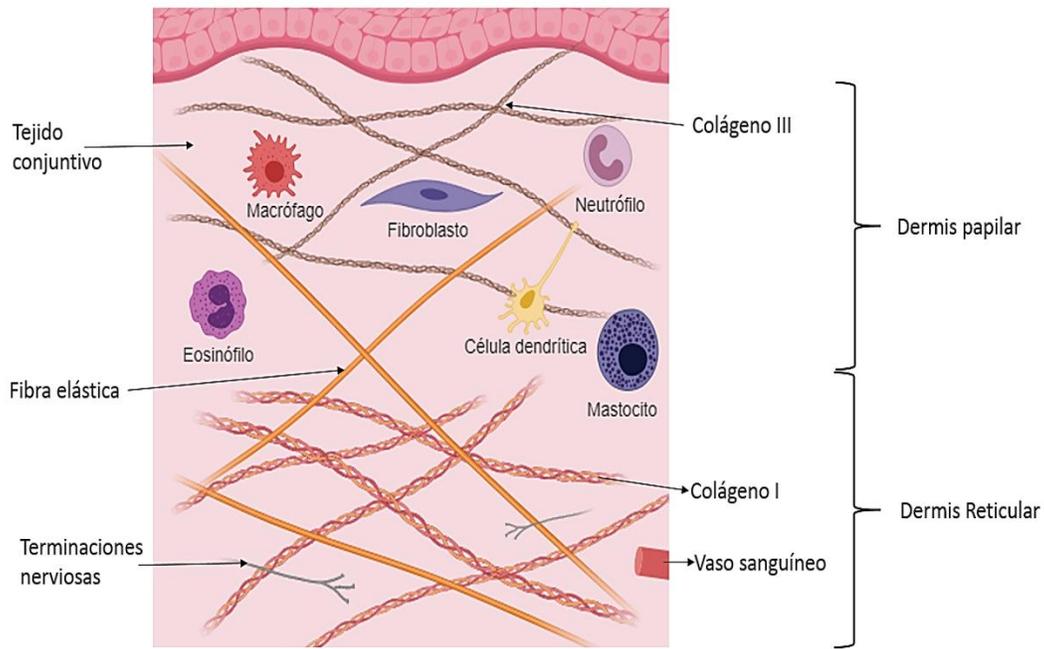


Figura 7. Componentes celulares de la dermis.

🔗 Hipodermis

La hipodermis o tejido subcutáneo que está formado por adipocitos derivados de células mesenquimatosas, son células especializadas en la producción y almacenamiento de lípidos. Están dispuestos en lóbulos redondeados entre tejido conjuntivo (Zappi y Zappi, 2007) (Figura 8).

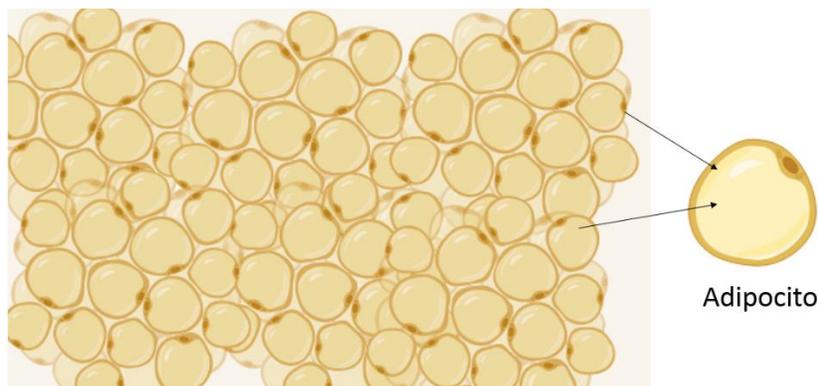


Figura 8. Hipodermis o tejido subcutáneo conformado por adipocitos.

2.5. Efectos cutáneos por la radiación solar

En la actualidad la RUV es uno de los mutágenos físicos más dañinos para la piel, ya que afecta a las biomoléculas como lípidos, proteínas y el material genético de las células que la conforman (Olarte et al., 2016; Kochevar et al., 2014). De manera general, los daños producidos por la radiación crónica de UVB en la piel se dividen en agudos y crónicos.

Los efectos agudos son aquellos que se producen de manera inmediata a la exposición solar como la quemadura o eritema solar y la pigmentación o bronceado. Los efectos crónicos son los daños que se presentan a largo plazo como el fotoenvejecimiento, la inmunosupresión y la fotocarcinogénesis (Maverakis et al., 2010).

2.5.1. Efectos agudos

El **eritema** o quemadura solar es un proceso inflamatorio en respuesta al daño producido por la RUV. El eritema producido por la UVB es una reacción tardía dependiente de la dosis y del fototipo de piel, esta radiación provoca daño directo en la epidermis, sobre todo el aumento de los dímeros de ciclobutil pirimidina (CPD) en el núcleo de los queratinocitos, después de 24 hrs se generan las células de quemadura que son queratinocitos apoptóticos (Roustan, 2014). A nivel dérmico suceden numerosos procesos bioquímicos y celulares, como el aumento en la irrigación sanguínea, la activación de las células endoteliales y el incremento de la concentración de mediadores inflamatorios (Kochevar et al., 2014).

Histológicamente la quemadura solar se caracteriza por la presencia de queratinocitos necróticos, espongiosis, edema dérmico, con vasodilatación e infiltrado de células linfomononucleares (Puig, 2014).

El **bronceado** es el aumento de la pigmentación cutánea y puede ser inmediato o diferido. El bronceado inmediato que se produce entre los 5 -10 min expuesto a la radiación UVB y UVA, en él se produce una fotooxidación de la melanina preexistente en los melanosomas y su transferencia a los queratinocitos ; el bronceado diferido o

tardío que se produce dentro de los 3-4 días de exposición a la UVB y UVA, a diferencia del bronceado inmediato, aquí si hay aumento de melanocitos epidérmicos y de la melanina, lo cual le otorga a la piel fotoprotección ante la RUV (Kochevar et al., 2014; Puig, 2014).

La **inflamación** es la primera respuesta del sistema inmune ante los daños que causa la RUV en la piel. La reacción inflamatoria se caracteriza por presentar enrojecimiento, aumento en la temperatura, acumulación del líquido intersticial y dolor. El proceso inflamatorio tiene tres fases: 1) iniciación: comienza con la acción de los neutrófilos, basófilos y mastocitos que liberan mediadores del proceso inflamatorio; 2) consolidación: en donde actúan los linfocitos, eosinófilos y macrófagos y 3) resolución: se debe a la interacción entre macrófagos, eosinófilos y fibroblastos (Rojas et al., 2010).

La inflamación crónica es la incapacidad del sistema inmune para deshacerse del agente agresor, se caracteriza por la presencia de un número muy grande de células mononucleares en el tejido como linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Además, se presenta la proliferación de pequeños vasos y de fibroblastos, con el consiguiente aumento de tejido conjuntivo (Rojas et al., 2010; Stanier et al., 1992) (Figura 9).

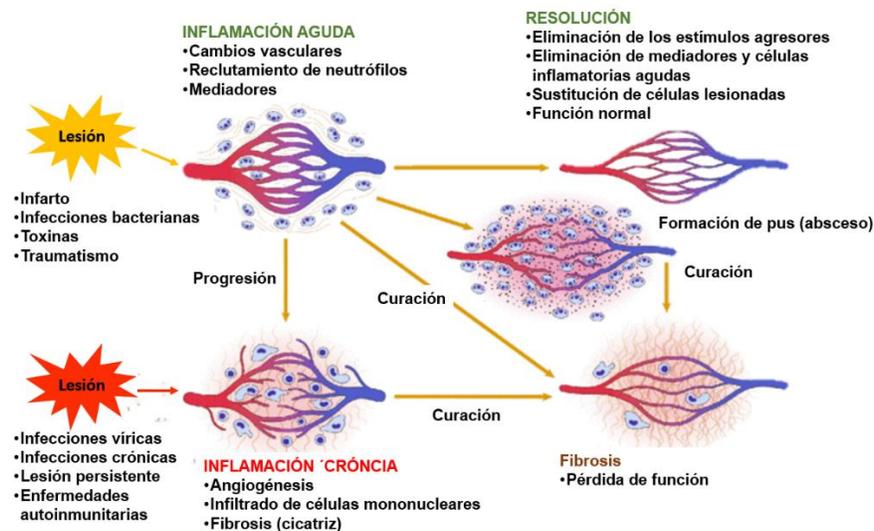


Figura 9. Procesos que se dan en la Inflamación aguda y crónica (Kumar et al.,2015).

En el desarrollo de células cancerosas la inflamación juega un papel tan importante como contradictorio, por un lado liberan citosinas y quimiocinas que iniciarían la respuesta inmune ante el cáncer, y por otro lado liberan también factores de crecimiento, angiogénicos, proteasas, y enzimas oxidativas que facilitan el desarrollo tumoral (Roustan, 2014).

Uno de los indicadores de que el proceso inflamatorio sigue en marcha es la presencia de mastocitos, ya que estas células, que actúan en la primera fase de la inflamación, siguen liberando mediadores inflamatorios como la histamina, serotonina y proteoglicanos, eotaxina y otras quimiocinas, que provocan el aumento del flujo sanguíneo, el cual permite que más células inmunitarias alcancen el sitio de lesión (Rojas et al., 2010).

Los mastocitos son células inflamatorias de origen hematopoyético, responden a señales de inmunidad innata y adaptativa liberando mediadores inflamatorios. Se encuentran asociados principalmente con los vasos sanguíneos y las superficies epiteliales (Stone et al., 2010) (Figura 10). Estas células tienen funciones fisiológicas e inmunomodulatorias, en el epitelio, endotelio y en el sistema nervioso de esta forma pueden participar en procesos biológicos y en el mantenimiento de la homeostasis (Zayas et al., 2014).

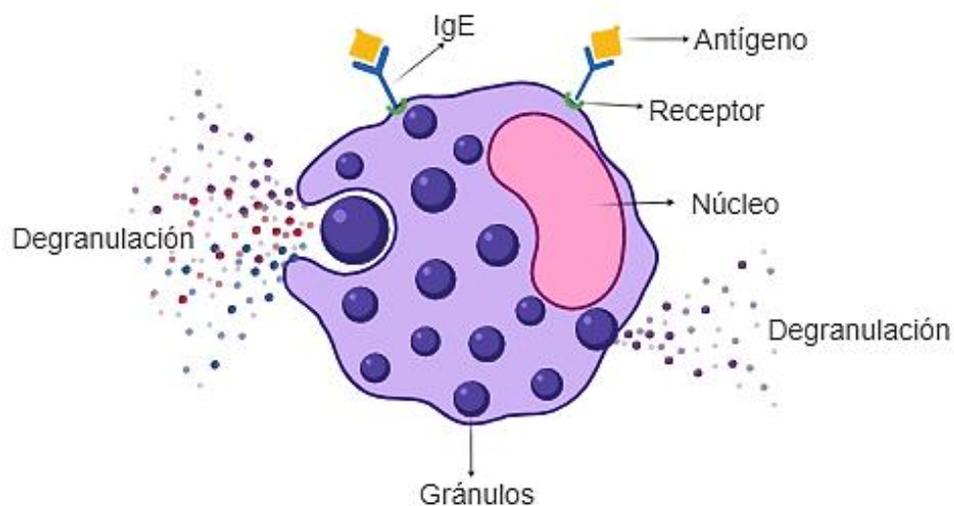


Figura 10. Mastocito

2.5.2. Efectos crónicos

El **fotoenvejecimiento** o envejecimiento cutáneo extrínseco, a diferencia del cronológico se caracteriza por una piel áspera, seca, sin elasticidad, con arrugas profundas y gruesas, además de alteraciones de la pigmentación. Se desarrolla como consecuencia de exposiciones repetidas y prolongadas al sol, sobre todo radiación UVA. Las zonas expuestas son las más afectadas como cara, cuello, nuca y dorso de manos. Su intensidad depende del fototipo de piel y la dosis total de radiación acumulada a lo largo de la vida (Villegas et al., 2005; Duro et al., 2003).

La **inmunosupresión cutánea** inducida por la UVB y en menor medida por la UVA es consecuencia de la alteración morfológica y funcional de las células de Langerhans epidérmicas. Es importante recordar que se trata de células presentadoras de antígenos a linfocitos T que desempeñan un papel importante en las respuestas de hipersensibilidad retardada, con lo que se dificulta ésta y el rechazo de antígenos tumorales. Se le atribuye un papel importante en el proceso de carcinogénesis cutánea (Maverakis et al., 2010; Duro et al., 2003).

La exposición a la RUV causa **fotocarcinogénesis cutánea**, la cual se clasifica en dos tipos de cáncer de acuerdo al tipo celular implicado: el melanómico y no melanómico. El cáncer de piel no melanómico se divide en dos variedades: el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, ambos tumores ocurren con más frecuencias en las zonas fotoexpuestas, como la cara, el cuello y las manos (Montes et al., 2017; Sarkany, 2011).

La carcinogénesis es un proceso que se divide en varias etapas: la iniciación, promoción y progresión maligna. (Roustan, 2014) (Figura 11).

- **Iniciación:** También se le conoce como inducción y comienza cuando un agente exógeno, en este caso la RUV, causa daño genético e induce mutaciones que alteran el control de la proliferación y diferenciación celular.
- **Promoción:** Se lleva a cabo una expansión de las células iniciadas para formar tumores benignos. Este es un proceso reversible.

- **Progresión:** Hay proliferación celular de las células con inestabilidad genética, anomalías cromosómicas expresión de sustancias en superficie y actividad oncológica. Este ya se convierte en un proceso irreversible.

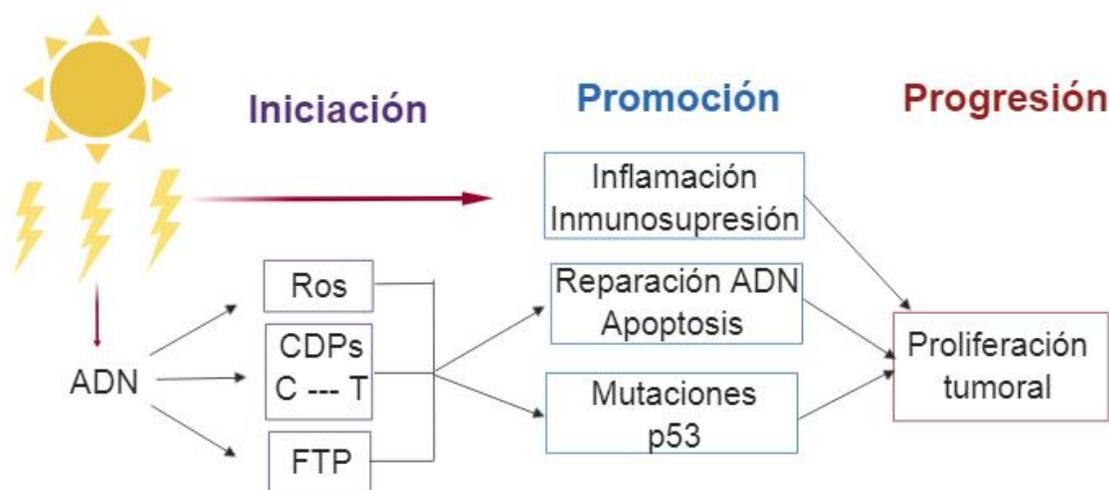


Figura 11. Desarrollo de la fotocarcinogénesis. ROS: especies reactivas de oxígeno; CDPs: dímeros de pirimidina; C---T: transición de citosina a timidina; FPT: fotoproductos; ADN: ácido desoxirribonucleico (modificado de Roustan, 2014).

2.6. Modelo SKH-1

Los ratones son un modelo muy utilizado en estudios de fotoprotección debido a la su facilidad de manejo, el tamaño y su costo. La cepa SKH-1 son ratones sin pelo (Figura 12) que se utilizan con frecuencia en estudios de fotoprotección, ya que no es necesario depilarlos, además de que la respuesta eritema-edema y la histología de los tumores que desarrollan estos ratones es muy similar a la que se desarrolla en los humanos (Kim et al., 2003).

A nivel histológico, poseen una estructura llamada utrículo en forma de ámpula con epitelio hiperqueratósico que se conecta a la superficie de la piel. Además tienen quistes en la dermis reticular revestidos de epitelio queratinizado y es posible que tengan sebocitos en la pared. Progresivamente va aumentando la cantidad de glándulas sebáceas y generan granulomas dérmicos y el espesor de la dermis y la hipodermis es más delgada en las hembras (Benavides et al., 2009).

La razón por la que estos ratones no tiene pelo es porque poseen una mutación en el gen Hr en el cromosoma 14, dicha alteración provoca pérdida completa del pelo a las tres semanas de edad, a pesar de que a la quinta semana hay un brote de pelo, los folículos ya se encuentran degradados por lo que disminuye drásticamente el número de pelo que surge (Benavides et al., 2009).



Figura 12. *Ratones sin pelo SKH-1*. Recuperado de <https://www.criver.com/products-services/find-model/skh1-hairless-mouse?region=3616>

2.3 *Dyssodia tagetiflora* Lag. (Asteraceae)

Dyssodia tagetiflora Lag. se conoce comúnmente como “Tzacarata” en la lengua purépecha, también se le llama “flor de muerto”; esta planta pertenece a la familia Asteraceae (Tabla 1), es una especie que crece en zonas abiertas y perturbadas. Forma parte de la vegetación del bosque tropical caducifolio, crece desde los 1600 a 2200 msnm y florece de mayo a diciembre (Villarreal, 2008; Villareal, 2003).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *D. tagetiflora* (Villarreal, 2008).

Reino	Plantae
División	Magnoliphyta
Clase	Magnolipsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Tageteae
Género	<i>Dyssodia</i>
Especie	<i>Dyssodia tagetiflora</i>

D. tagetiflora es una especie endémica de México, se distribuye en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Ciudad de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villarreal, 2008; Villareal, 2003).

D. tagetiflora es una especie herbácea perenne de 40 a 90 cm de altura, los tallos son erectos y ramificados, las hojas son opuestas a alternas, las cabezuelas se encuentran en pedúnculos de 5 a 10 cm de largo, sus flores son liguladas de 6 a 8 mm de longitud, de color amarillas-anaranjadas. Son de 40 a 60 flores del disco de

color amarillo, con corolas cilíndricas que miden de 4 a 6 cm de largo (Villarreal, 2008) (Figura 13).



Figura 13. *Dyssodia taquetiflora* Recuperado de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/dyssodiatagetiflora/fichas/pagina1.htm>

3. Antecedentes

Downum et al., (1985) encontraron que el género *Dyssodia* presentó al heterocíclico aromático 5-metil.2,2':5,2 ter-tiofeno acetilénico, compuesto que no se encontró en las otras especies de la familia Asteraceae incluidas en su estudio.

Gutiérrez-Lugo et al., (1996) realizaron un análisis microbiano de los extractos crudos de 28 plantas que se utilizan en la medicina tradicional mexicana, demostraron que el extracto de *D. papposa* presenta actividad antimicrobiana contra *Trichophyton*

mentagrophytes y actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer de colon (HT-29), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de pulmón (A-549).

Rojas et al., (1999) analizaron los extractos clorofomo-metanólicos de distintas plantas utilizadas en la medicina tradicional Otomí en Querétaro (México), encontraron que *D. pinnata* presentó actividad espasmódica debido a la presencia de flavonoides en los extractos.

Pérez-Amador et al., (2004) encontraron que *D. tagetoides*, *D. porophylla*, y *D. porophylla* de la familia *Asteraceae* presentan actividad fototóxica en *Bacillus subtilis*, esta actividad es causada por un éster poliacetilénico y un éster tiofeno.

García-Bores et al., (2018) realizaron el primer informe fitoquímico y de actividad biológica de *D. tagetiflora*, aislaron monoterpenos del aceite esencial, el limoneno fue el compuesto más abundante. Además identificaron al hiperósido, avicularina, acetato de avicularina, quercetina y los tiofenos α -tertienilo y BBT del extracto metanólico. El aceite esencial mostró actividad insecticida contra larvas de *Drosophila melanogaster*, mientras que el extracto metanólico de *D. tagetiflora* tuvo actividad antioxidante contra los radicales DPPH y ABTS, no mostró efectos genotóxicos o citotóxicos, al contrario, mostró efecto citoprotector en raíces de *Vicia faba*.

Estrella-Parra et al., (2019) caracterizaron del extracto metanólico de *D. tagetiflora* los glucósidos flavonoides quercetina-4'-metil éter 6-C glucósido, quercetina-4'-metil éter 8-C glucósido y [2-(3,4-hidroxifenil) -5,7-hidroxi-4-oxocromen-3-il] 3,4,5-trihidrooxano-2,6-dicarboxilato, además de que el hiperósido fue el compuesto mayoritario. Demostraron que el extracto metanólico de *D. tagetiflora* tuvo actividad contra *Micrococcus lateus* y *Bacillus subtilis*. El extracto metanólico fue aplicado tópicamente en ratones SKH-1 y redujo los daños epidérmicos inducidos por la exposición aguda y crónica a la UVB

Zamora (2019) demostró que el extracto metanólico de *D. tagetiflora* desarrolló inflamación controlada y disminuyó los daños histológicos provocados por la exposición aguda a la UVB en piel de ratones SKH-1.

4. Justificación

Debido a que la incidencia del cáncer de piel en México ha ido en aumento, resulta de gran importancia la búsqueda de nuevos fotoprotectores de origen natural, que eviten y/o disminuyan los daños provocados por la exposición excesiva a la RUV. Además, se deben tomar en cuenta los antecedentes sobre la actividad fotoprotectora, antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos que posee *D. tagetiflora* para considerar a esta especie como un fotoprotector ante la RUV.

5. Pregunta Científica

¿El extracto metanólico de *Dyssodia tagetiflora* tendrá la capacidad de reducir los daños causados por la exposición crónica a la UVB en piel de ratones SKH-1?

6. Hipótesis

Si el extracto metanólico de *Dyssodia tagetiflora* tiene compuestos que controlan la respuesta inflamatoria y disminuyen los daños histológicos en la piel provocados por la exposición aguda a la RUV entonces podrá evitar o disminuir los daños provocados por la exposición crónica a la RUV en la piel de ratones SKH-1.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Evaluar histológicamente el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *Dyssodia tagetiflora* (EMDT) en ratones SKH-1 expuestos a radiación UVB de forma crónica.

7.2. Objetivos particulares

- ☞ Inducir daño cutáneo mediante la exposición crónica a la UVB en ratones SKH-1 con y sin protección del EMDT.
- ☞ Analizar histológicamente los daños producidos por la UVB en la piel de ratones SKH-1 con y sin protección del EMDT.
- ☞ Determinar la respuesta inflamatoria producida por la UVB mediante el conteo de mastocitos en la piel de ratones SKH-1 con y sin protección del EMDT.

8. Estrategia metodológica

8.1. Obtención del extracto metanólico

El EMDT fue obtenido y proporcionado por el laboratorio de Fitoquímica, de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) perteneciente a la UNAM.

8.2. Experimento crónico de fotoprotección

En este trabajo se utilizaron 20 ratones hembras de la cepa SKH-1, que fueron adquiridos en Charles River Laboratories International, Inc (NY). Los animales se mantuvieron en el bioterio de la FESI en cajas de policarbonato de 20 x 30 cm. Se les proporcionó agua y alimento Harlan para roedores *ad libitum*, en una habitación en condiciones estériles, se sometieron a un fotoperiodo de 12 hrs luz/oscuridad a 24°C (Espinosa, 2016). Los 20 ratones se distribuyeron en cuatro grupos de cinco individuos (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los grupos control y experimentales

Grupos	Descripción
1. Control negativo (C-)	Etanol 70% (vehículo)
2. Control positivo (C+)	Etanol 70% + irradiación UVB
3. Dys	EMDT* disuelto en etanol al 70%
4. DysUVB	EMDT* disuelto en etanol al 70% + irradiación UVB

*EMDT = Extracto Metanólico de *D. tagetiflora*

El experimento tuvo una duración de 32 semanas y se dividió en dos fases (Figura 14).

☞ **Fase 1:** durante diez días consecutivos se les aplicó tópicamente a los ratones 200µL del vehículo (etanol 70%) o del EMDT disuelto en etanol al 70% a una concentración final de 2mg/mL, 15 min antes de las irradiaciones. El control + y el grupo experimental 4 (DysUVB) fueron irradiados con una lámpara de UVB de 302 nm, UVP. UVM-26, 6W (6mJ/cm²) un minuto durante diez días consecutivos para simular la fase de iniciación de la fotocarcinogénesis (Espinosa, 2016).

☞ **Fase 2:** tres veces por semana hasta completar las 32 semanas, se les aplicó tópicamente a los ratones la misma concentración del vehículo (etanol 70%) y el EMDT disuelto en etanol al 70% a cada grupo correspondiente. El grupo experimental 4 y el control + fueron irradiados un minuto y la aplicación de los extractos se realizó 15 min antes de las irradiaciones (Espinosa, 2016).

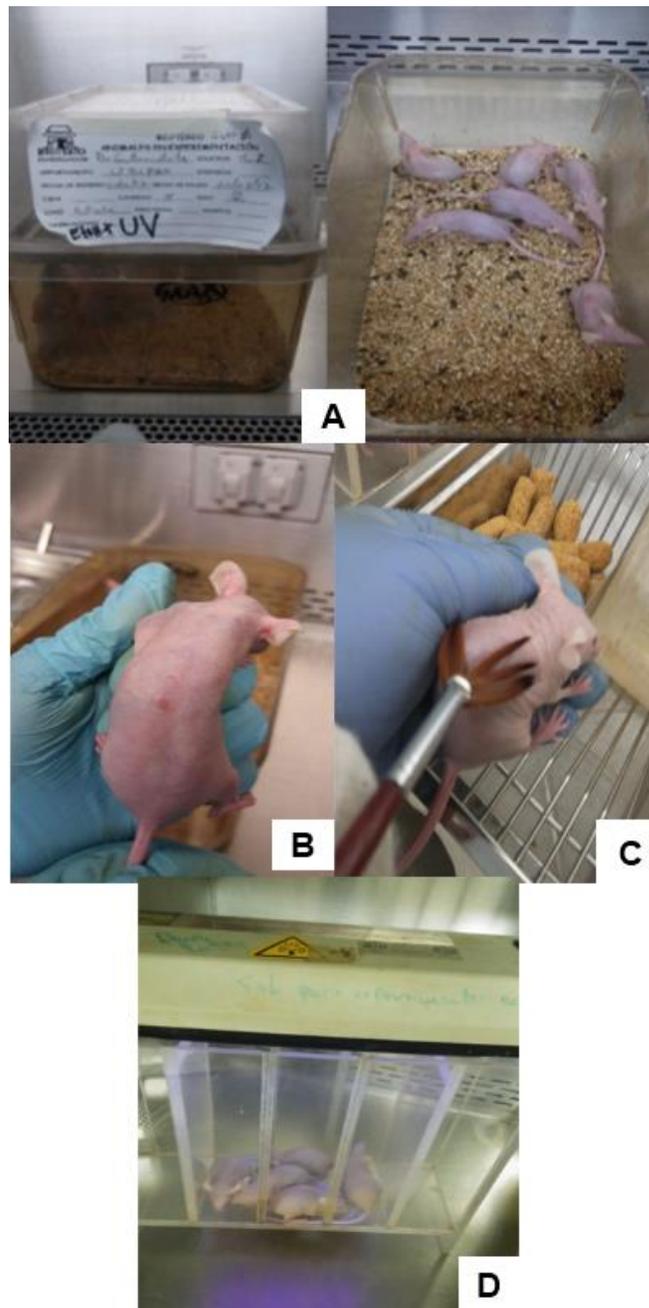


Figura 14. Experimento crónico de fotoprotección. A: Cajas de policarbonato en donde se mantenían los animales; B: Observación semanal de las lesiones; C: Aplicación tópica del vehículos o extracto metanólico de *D. tagetiflora*; D: Irradiación de UVB.

8.3. Técnica histológica

La parte histológica se realizó en el laboratorio de Histología de la Unidad de Morfofisiología y Función (UMF) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Una vez terminado el experimento crónico de fotoprotección, los ratones fueron sacrificados con 150µL de pentobarbital vía peritoneal y se tomaron biopsias sin lesión y con lesión aparente del dorso de los animales. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 24 hrs, posteriormente se realizaron cuatro lavados con agua corriente de 15 min cada uno, las muestras se deshidrataron con un tren de etanol de grado creciente [70, 80, 96 y 100 (I y II) %] con una duración de una hora cada uno; el aclaramiento se realizó durante cinco minutos con Xilol I y cinco minutos con Xilol II. Posteriormente las muestras fueron infiltradas en parafina I, II y III durante hora y media cada una; a continuación se hizo la inclusión en bloques de parafina para cada muestra y se realizaron los cortes histológicos de 5 µm de grosor. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina para observarse en un microscopio óptico e identificar las lesiones en células de la piel causadas por la radiación UVB. Adicionalmente, se realizó la tinción con azul de toluidina (tinción de Dominici) para realizar el conteo de los mastocitos como indicador del proceso inflamatorio (Montuenga et al., 2014; Verdín et al., 2013).

8.4. Análisis histológico

Los cortes histológicos se analizaron a través de un microscopio óptico marca Leica modelo DM500. Las lesiones que se tomaron como referencia se muestran en la tabla 3. Se observó cada campo de las muestras por triplicado y se tomó en cuenta el grado de cada lesión: leve (si fueron presentes de 0 a 20% del área total del corte histológico), moderada (20% a 50%) y grave (50% al 100%); la extensión: focal (0 a 20%), multifocal (20% a 50%) y difusa (50% al 100%) (Espinosa, 2016).

El número de muestras (laminillas) en cada ratón se determinó de acuerdo al tratamiento y a las características de las lesiones. Una vez observadas todas las muestras, los daños se agruparon en tres categorías (Tabla 4). El conteo de mastocitos también se realizó por campo de cada laminilla y por triplicado.

Posteriormente se tomaron fotomicrografías con ayuda del programa Leica Application Suite LAS EZ (Leica microsystems 2012).

Tabla 3. Descripciones histológicas de las lesiones crónicas provocadas por la UVB.

	Daño	Descripción
Epidermis	Paraqueratosis	Alteración de la queratinización con presencia de núcleos picnóticos en el estrato córneo (Edwar y Yung, 2012)
	Hiperqueratosis	Aumento en el grosor del estrato córneo (Edwar y Yung, 2012)
	Disqueratosis	Cornificación anormal y anticipada de los queratinocitos (Edwar y Yung, 2012).
	Espongiosis	Separación de los queratinocitos por el líquido intersticial (Edwar y Yung, 2012).
	Apoptosis y células de quemadura	Muerte celular individual en donde los núcleos de las células son picnóticos, contraídos y con citoplasma eosinofilo (Kumar et al., 2015).
	Necrosis	Muerte celular grupal con la pérdida de la integridad membranal (Kumar et al., 2015).
	Displasia	Crecimiento desordenado con atipia celular (Kumar et al., 2015).
	Hiperplasia	Aumento en el número de capas epidérmicas (Stevens et al., 2003).
	Hipertrofia	Aumento del tamaño de las células (Kumar et al., 2015).
	Atrofia	Reducción del tamaño y número de las células (Kumar et al., 2015).
	Acantosis	Incremento de la epidermis por el engrosamiento de las células espinosas (Stevens, 2003).
	Pleomorfismo	Los núcleos de los queratinocitos varían en cuanto forma y tamaño (Edwar y Yung, 2012).
	Neoplasia	Aumento de la proliferación celular (Stevens et al., 2003).
	Angiogénesis	Presencia de vasos sanguíneos en un tumor (Stevens et al., 2003).
Dermis	Edema	Acumulación de líquido entre los espacios intersticiales (Zappi y Zappi, 2007).
	Congestión	Acumulación de los eritrocitos en los vasos sanguíneos (Zappi y Zappi, 2007).
	Hemorragia	Extravasación de eritrocitos (Espinosa, 2016).
	Infiltrados, inflamatorios	Presencia de neutrófilos, linfocito, macrófagos y mastocitos (Espinosa, 2016).

Tabla 4. Categorías de lesiones histológicas relacionadas con el proceso de carcinogénesis cutánea (Callen et al., 2006).

Categoría	Tipos de lesiones
Hiperplasia	Se observa aumento en el número de capas epidérmicas, de grado moderado a grave y extensión multifocal a difusa, se observa además espongiosis leve a moderada y extensión focal a multifocal (Stevens et al., 2003).
Queratosis actínica	A nivel epidérmico se observa paraqueratosis e hiperqueratosis, atipia celular, hiper cromasia nuclear y pleomorfismo en la capa basal, acantosis. Las lesiones antes mencionada se observan de grado leve a grave y extensión focal a multifocal (Ferrándiz et al., 2017; Figueras y Puig, 2014).
Carcinoma	Se observa atipia celular en los queratinocitos de la epidermis, displasia, invasión de la epidermis hacia la dermis con pérdida de la integridad de la membrana basal, presencia de perlas de queratina, necrosis, se forman islotes de la dermis y angiogénesis (Stevens et al., 2003).

8.5. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con la prueba estadística ANOVA con una $p \geq 0.05$ para comprobar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Este análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad instat 7 (GraphPad Software).

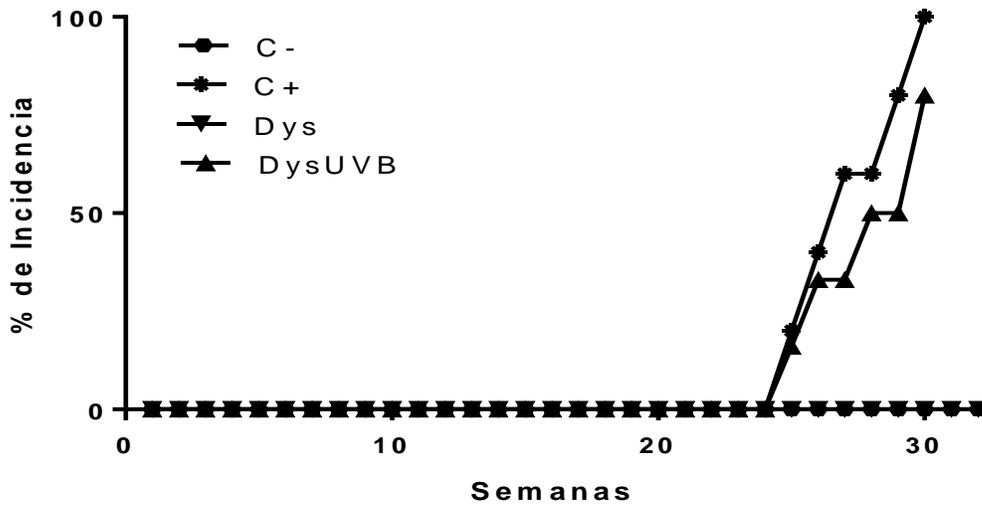
9. Resultados y Discusión

9.1. Incidencia y multiplicidad de lesiones provocadas por la radiación crónica a la UVB en ratones SKH-1.

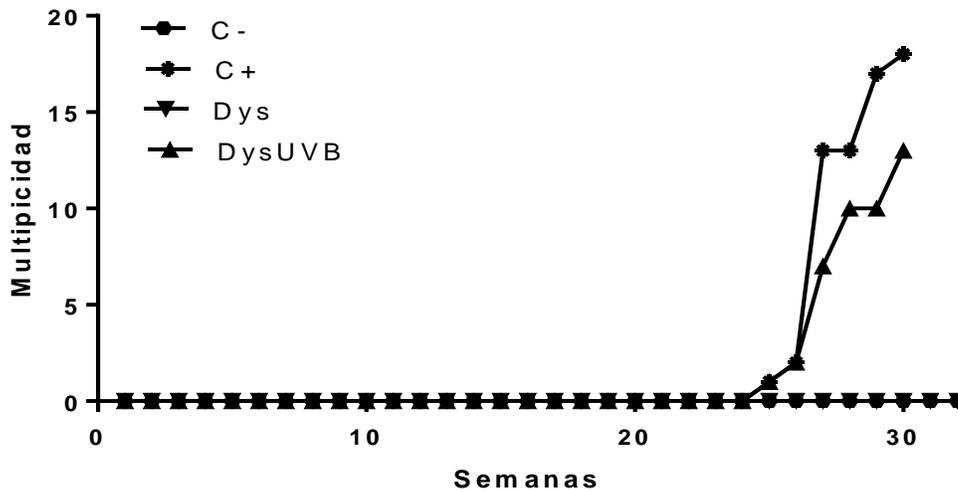
Con las lesiones macroscópicas observadas durante el experimento crónico se obtuvo la multiplicidad (número total de lesiones en los grupos) y la incidencia (porcentaje de ratones que presentaron lesiones en cada grupo). El control negativo (C-) tratado con etanol al 70% sin irradiar, no presentó lesiones macroscópicas. Los ratones del control positivo (C+) tratados con etanol al 70% e irradiados con UVB, comenzaron a tener lesiones a partir de la semana 25 del experimento; las cuales fueron de tipo pápula, vesícula y descamación (Lazar y Murphy, 2015) (Figura 15). La multiplicidad en este grupo fue de 18 lesiones en total y presenta el 100% de incidencia (Gráfica 1).

El grupo tratado con el EMDT sin irradiar no presentó lesiones macroscópicas durante toda la fase experimental, mientras que el grupo DysUVB comenzó a tener lesiones de tipo vesícula hasta la semana 25, al igual que el C+ (Figura 15). La multiplicidad fue de 13 lesiones, con una incidencia del 80% (Gráfica 1) por lo que el EMDT redujo la cantidad y retrasó el crecimiento de las lesiones macroscópicas con respecto al C+.

Los datos de incidencia y multiplicidad que se obtuvieron en este trabajo concuerda con lo reportado Kundoor et al., (2007), Zhaorigetu et al., (2003) y Katiyar et al., (1997) quienes en sus respectivos estudios de fotoprotección contra la RUV describieron que a partir de la décima semana de irradiación se comienzan a observar lesiones en piel de ratones SKH-1 y la incidencia en los controles irradiados son del 100%, lo que coincide con el C+ de este trabajo.



Gráfica 1. Incidencia de lesiones macroscópicas en ratones SKH-1 durante el experimento crónico de fotoprotección. C-: Control negativo; C+: Control positivo; Dys: Grupo tratado con solo con extracto metanólico de *D. tagetiflora*; DysUVB: Grupo protegido con extracto metanólico de *D. tagetiflora* e irradiado.



Gráfica 2. Multiplicidad de lesiones macroscópicas en ratones SKH-1 durante el experimento crónico de fotoprotección. C-: Control negativo; C+: Control positivo; Dys: Grupo tratado solo con extracto metanólico de *D. tagetiflora*; DysUVB: Grupo protegido con extracto metanólico de *D. tagetiflora* e irradiado.

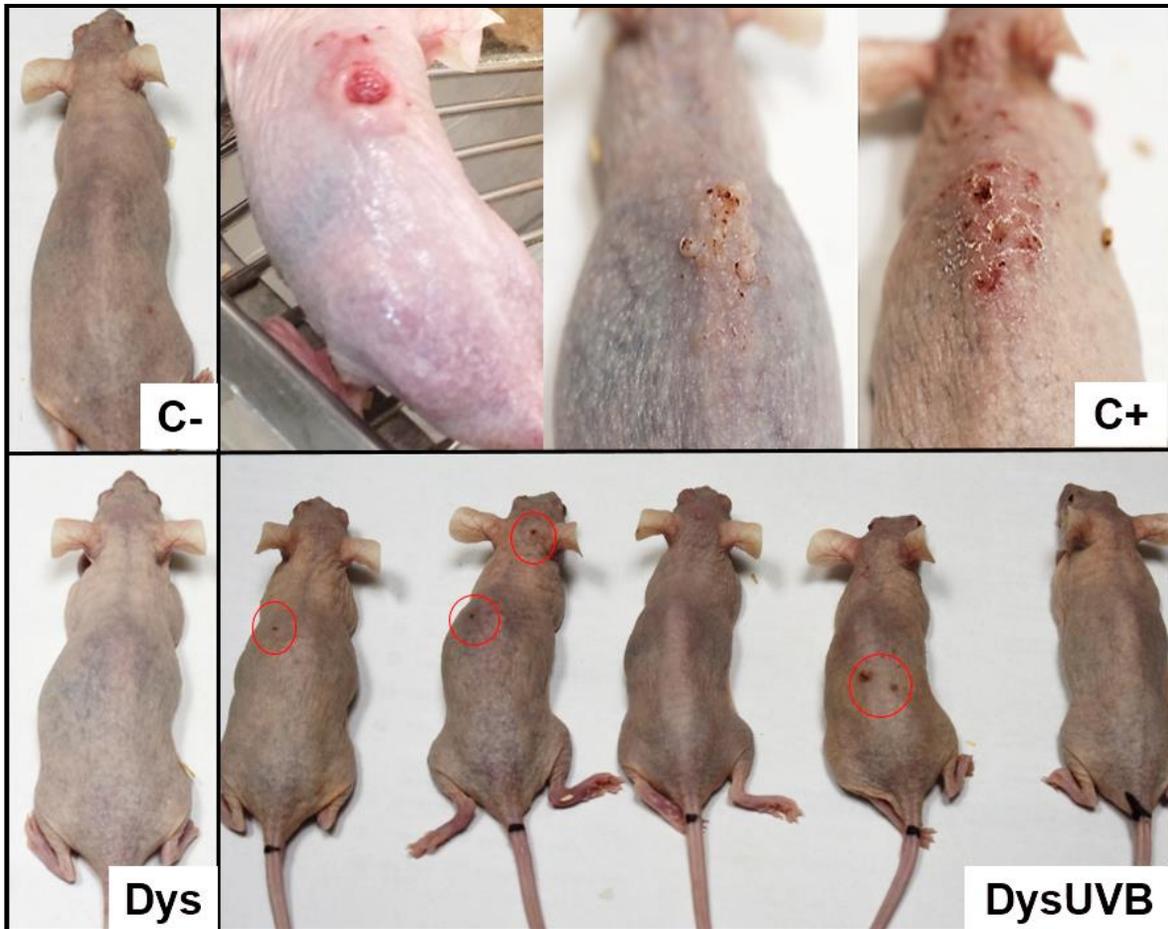


Figura 15. Lesiones macroscópicas en los tratamientos. C-: control negativo; C+: Control positivo; Dys: Grupo tratado solamente con el extracto metanólico de *D. taetiflora*; DysUVB: Grupo protegido con el extracto metanólico de *D. taetiflora* e irradiado.

9.2. Análisis histológico del experimento de fotoprotección crónico en ratones SKH-1

Control negativo (C-)

En las muestras histológicas del C- a nivel epidérmico solo se presentó apoptosis leve y focal, este fenómeno fue provocado posiblemente por la aplicación tópica del vehículo durante el experimento (Panel B de la Figura 16). Las fibras de colágena de la dermis se observan bien organizadas, a inicios de la hipodermis se encontraban los quistes pilosos reportados por Benavides, (2009) (Figura 16) y fue

posible observar las estriaciones musculares, por lo que la piel de los ratones de este grupo presentaron apariencia histológicamente normal.

La presencia de las células apoptóticas es un indicador histológico de que los queratinocitos mantienen la integridad, la homeostasis y la renovación epidérmica (Eckhart et al., 2013; Norris, 1995).

El etanol causa muerte celular en queratinocitos cultivados *in vitro*, por la liberación de citocinas proinflamatorias, TNF α y TNF β , lo que conduce a la apoptosis, mediante reacciones en cadena como la condensación de la cromatina, posteriormente se dan cambios en algunos orgánulos como el retículo endoplásmico y la membrana celular para que finalmente se formen los cuerpos apoptóticos (Neuman *et al.*, 2002). Sin embargo el etanol es muy utilizado en tratamientos tópicos para facilitar la absorción de los fármacos por la piel, por lo que la apoptosis se considera una reacción normal en la piel al ser expuesta a este solvente (Neuman, 2010).

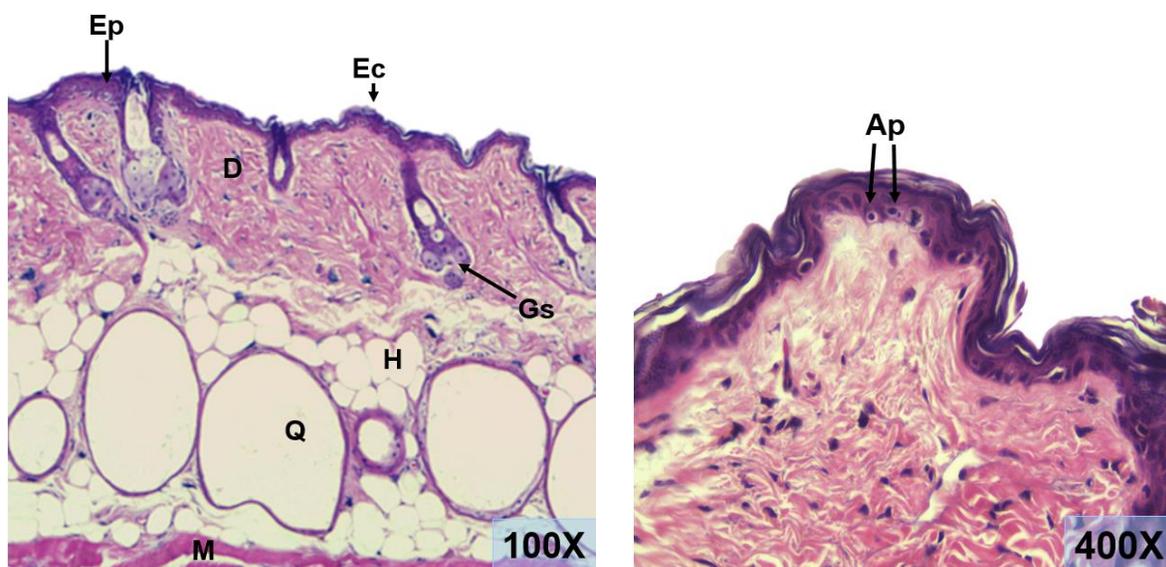
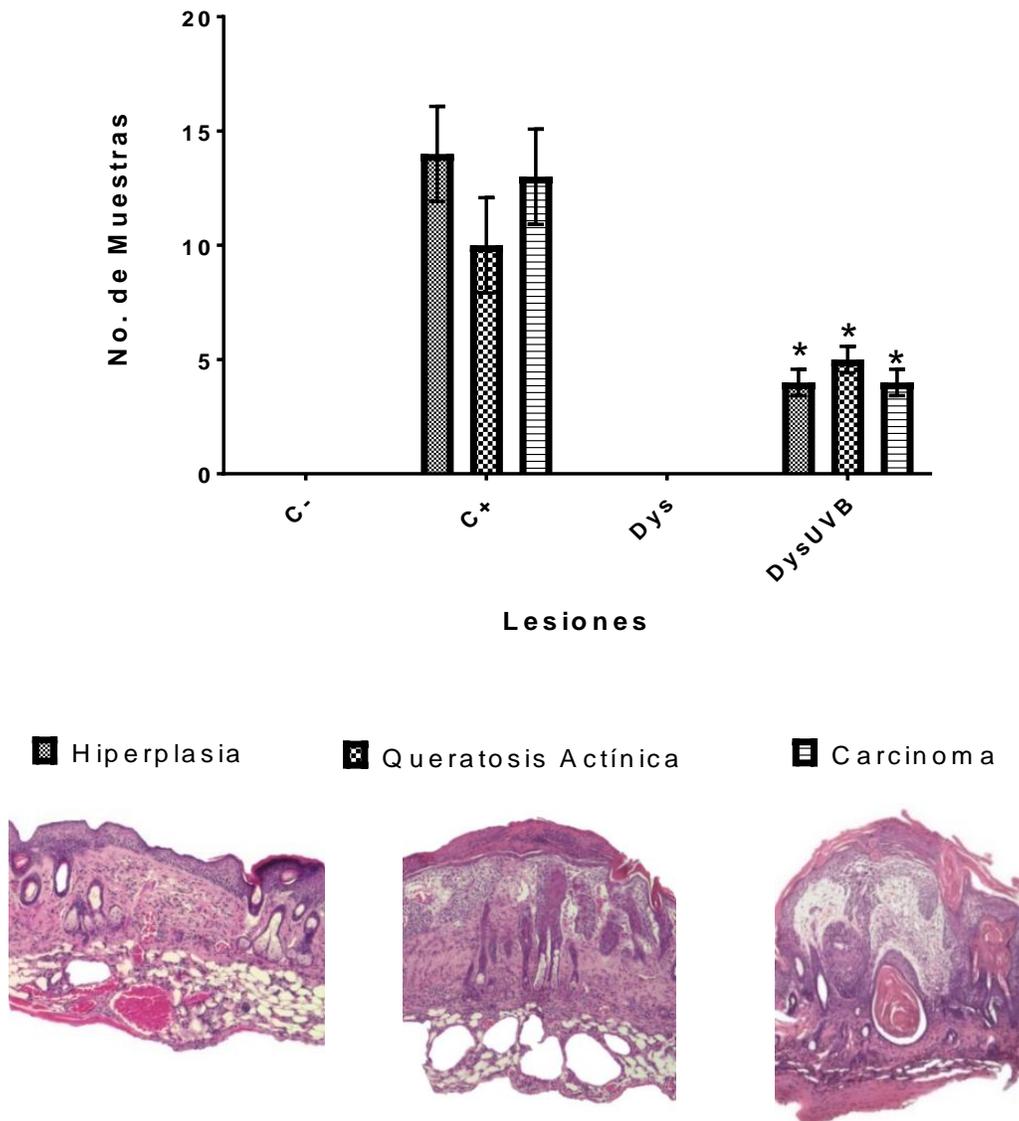


Figura 16. Secciones histológicas representativas de la piel del control negativo. Ep=Epidermis; Ec=Estrato córneo; D=Dermis; Gs=glándulas sebáceas; Q=Quistes; M=Músculo; H=Hipodermis; AP=Apoptosis. Tinción Hematoxilina y eosina.

Control positivo (C+)

Las lesiones observadas (tabla 2), se agruparon en tres categorías: Hiperplasia, queratosis actínica y carcinoma (Callen et al., 2006). (Tabla 4) En los ratones del grupo C+, de un total de 16 muestras el 87% presentaron hiperplasia, 62% queratosis actínica y 81% desarrollaron carcinoma (Gráfica 3).



Gráfica 3. Incidencia de lesiones provocadas por la exposición crónica a la UVB en los tratamientos. * $p = \leq 0.05$. C-: Control negativo; C+: Control positivo; Dys: Grupo tratado solamente con el extracto metanólico de *D. taetiflora*; DysUVB: Grupo protegido con el extracto metanólico de *D. taetiflora* e irradiado. En la parte inferior se muestra las alteraciones que se grafican.

En el análisis histológico se observó que en el C+, el estrato córneo estaba engrosado y con núcleos picnóticos (hiperqueratosis y paraqueratosis), así mismo se identificó hiperplasia epidérmica, espongirosis, células de quemadura y células necróticas, además de que en la parte basal del epitelio se formó acantosis, estas lesiones fueron difusas y graves (Figura 17).

A nivel epitelial también se desarrolló crecimiento desorganizado de los queratinocitos, pleomorfismo, presencia de perlas de queratina y la invasión epidérmica hacia la dermis sin diferenciación de la membrana basal, estas lesiones se presentaron difusas y graves y en conjunto se diagnostican como carcinoma (Stevens, 2003) (Figura 17 y 18).

La exposición a la UVB provocó a nivel de la dermis inflamación caracterizada por congestión que en algunos casos dio lugar a hemorragia, infiltrado inflamatorio, edema de forma grave y multifocal. También a nivel dérmico se observó la presencia de fibroblastos reactivos y cambios en apariencia de la colágena, como una masa poco definida. Por otro lado se observó necrosis del músculo que se encuentra por debajo de la hipodermis (Figura 17 y 18).

Con base a los datos obtenidos se comprueba que la radiación UVB en el C+ provocó todo el espectro de lesiones relacionadas con el desarrollo de carcinoma, Makinen y Stenback, (1998) en su estudio concluyen que la exposición excesiva a la UVB es carcinogénica, y que las lesiones epidérmicas y dérmicas son más fáciles de ser inducidas por la radiación UVB en los ratones SKH-1.

La radiación UVB incide en la piel y genera daños al DNA, que de no ser reparados persisten y se replican, lo que da lugar a mutaciones en el genoma que contribuyen a la formación de carcinogénesis cutánea por la proliferación descontrolada de los queratinocitos mutados. Existen diversos tipos de daño al DNA por la UVB, principalmente se forman dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD), 6-4 fotoproductos (Kim y He, 2014).

La UVB también puede inducir estrés oxidativo en la piel con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como oxígeno singulete (1O_2), anión superóxido

(O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (Chiang et al., 2013). El exceso de ERO intracelular activa proteínas quinasas activadas por mitógenos y al factor nuclear kappa β (NK-K β) que conlleva a la transcripción de metaloproteínas 1, 2, 3, 13 y 9 en fibroblastos de la dermis (Cavinato y Jansen-Durr, 2017; Pittayapruek et al., 2016).

Los queratinocitos y fibroblastos de la piel secretan las metaloproteínas 1 y 3 que se van a encargar de degradar las fibras de colágeno tipo I y III (Pittayapruek et al., 2016) lo anterior explica la causa por cual la dermis de los ratones del C+ muestren cambios en la organización de la colágena observándola como una masa amorfa.

Además, las metaloproteínas están involucradas en la el crecimiento tumoral y angiogénesis en carcinoma de células basales y de células escamosas provocados por la UVB (Pittayapruek et al., 2016), por lo que se asume que el desarrollo neoplásico de las muestras del C+ no solo se debe al daño provocado en el DNA, sino también a la secreción de metaloproteínas activadas por las ROS durante el estrés oxidativo inducido por la UVB.

Las ERO dañan al sistema inmunológico, provocan inflamación, la cual se pudo observar en el C+ por medio del infiltrado inflamatorio, la congestión y hemorragia. Recordemos que la inflamación es una respuesta biológica inmediata de la piel ante la radiación UVB, y a pesar de que es una respuesta inmune puede contribuir al desarrollo de la fotocarcinogénesis ya que, cuando se vuelve crónica, las células inflamatorias que participan en este proceso producen las ERO que aumentarán el daño al DNA (Halliday, 2005).

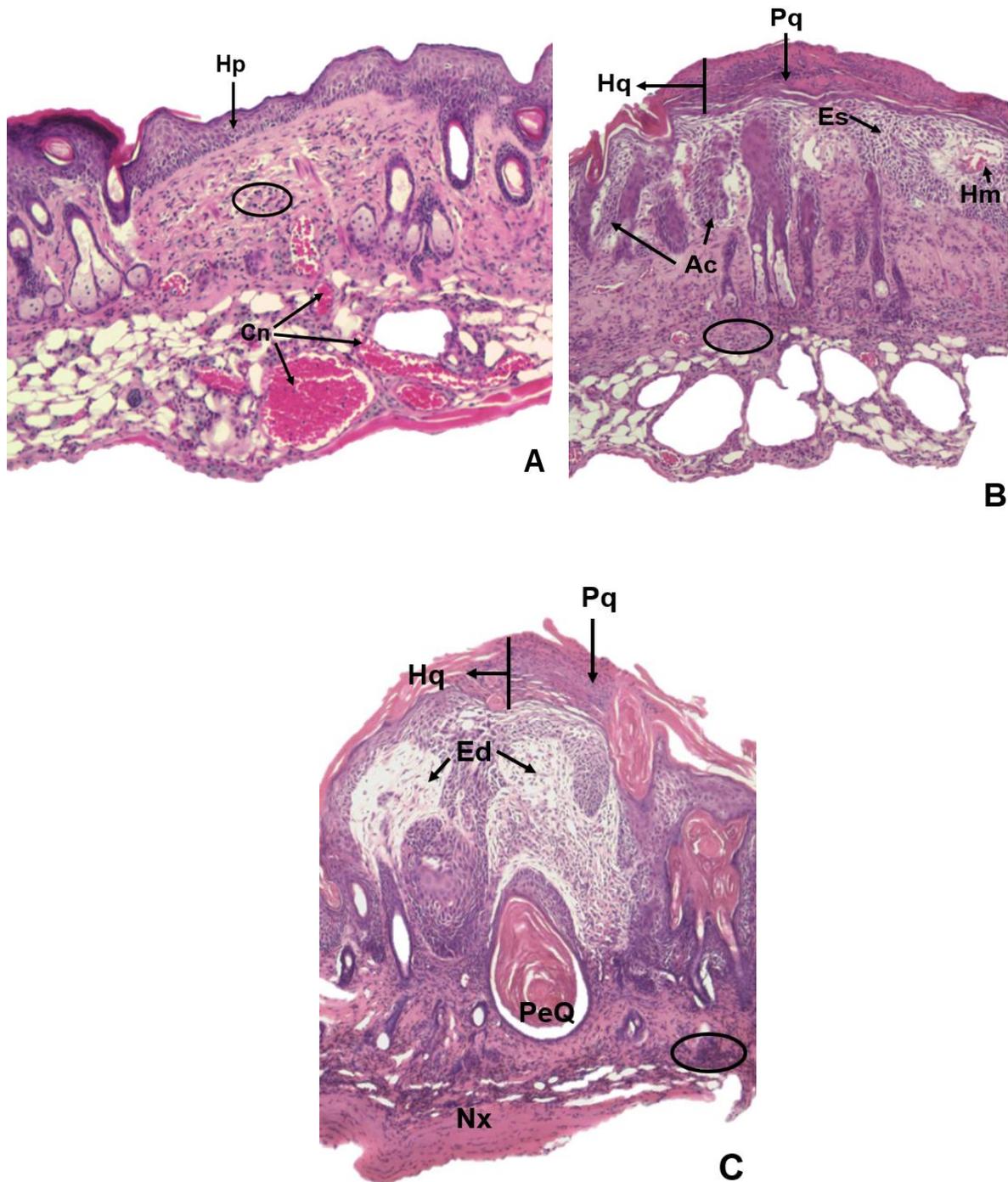


Figura 17. Secciones representativas del control + (UVB). Hq=Hiperqueratosis; Pq=Paraqueratosis; Peq=Perlas de queratina; Ac=Acanthosis; Hp=Hiperplasia Es=Espongiosis; Ed=Edema; Cn=Congestión; Hm=Hemorragia; en círculos se muestra al infiltrado inflamatorio; Nx=Necrosis. A: Hiperplasia; B: Queratosis actínica; C: Carcinoma. Microfotografía a 100X. Tinción Hematoxilina y Eosina.

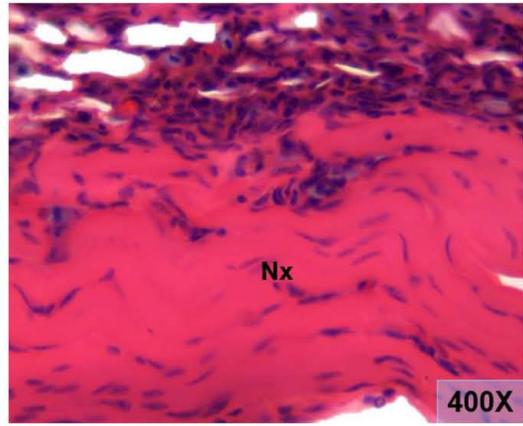
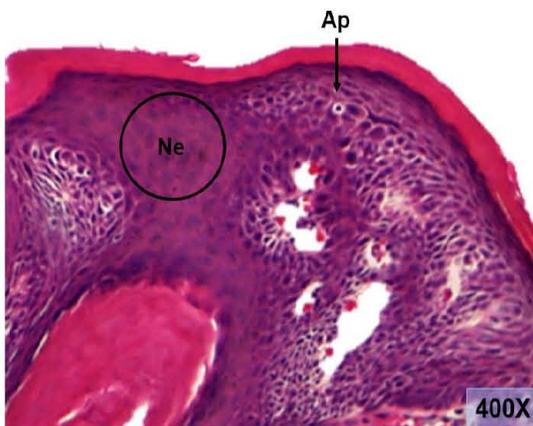
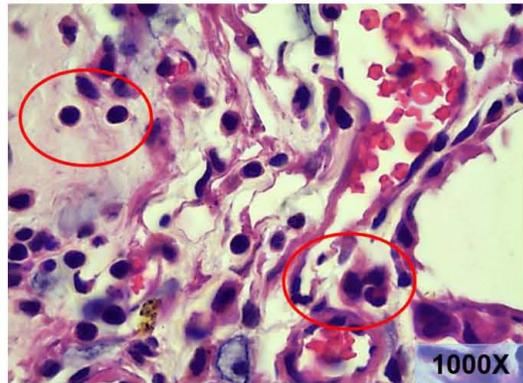
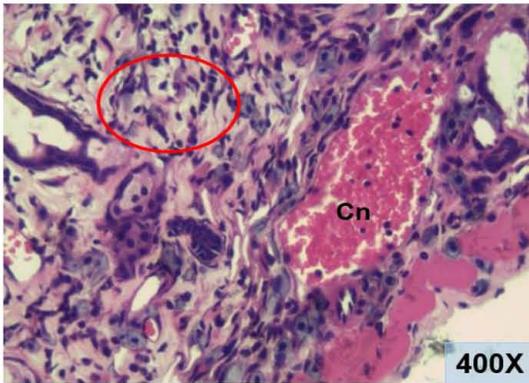
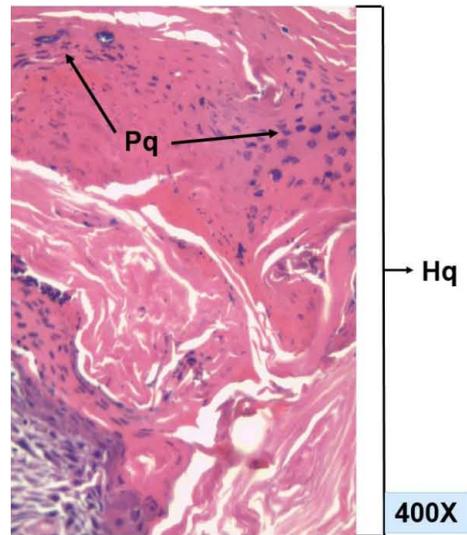
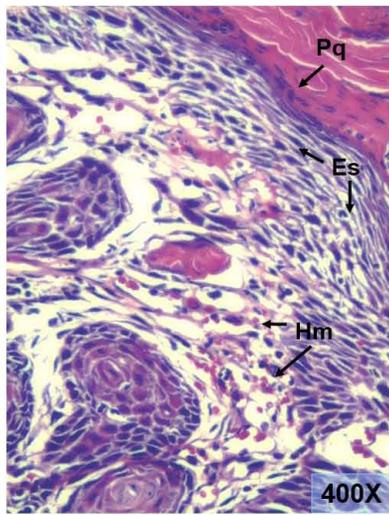


Figura 18. Secciones representativas del control + (UVB). Hq=Hiperqueratosis; Pq=Paraqueratosis; Es=Espongiosis; Ap=Apoptosis; Ne=Necrosis de queratinocitos; Hm=hemorragia; Cn=Congestión; Infiltrado inflamatorio encerrado en círculos; la flecha señala a los eritrocitos; Nx=Necrosis muscular. Tinción Hematoxilina y Eosina.

Grupo experimental Dys

En los ratones del grupo Dys (que solo fueron tratados con el EMDT no se presentó ninguna lesión en las capas de la piel, los estratos epidérmicos se observaron sin alteraciones. A nivel dérmico la fibras de colágena se encontraban bien organizadas y solo se observó inflamación, evidente por la congestión, hemorragia e infiltrado inflamatorio leve y focal (Figura 19).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zamora, (2019), quien diagnostica ligeras reacciones inflamatorias en piel de ratones SKH-1 en un experimento de exposición aguda a la RUV, causadas posiblemente por la aplicación tópica del extracto metanólico de EMDT diluido en etanol al 70%, como en este experimento. El etanol induce TNF- α , citosina que, entre otras funciones, desencadena la producción de otras citosinas que atraerán a células inflamatorias al órgano que fue expuesto al agente externo (etanol), sin embargo, esta reacción causada por este solvente se considera normal (Neuman, 2010).

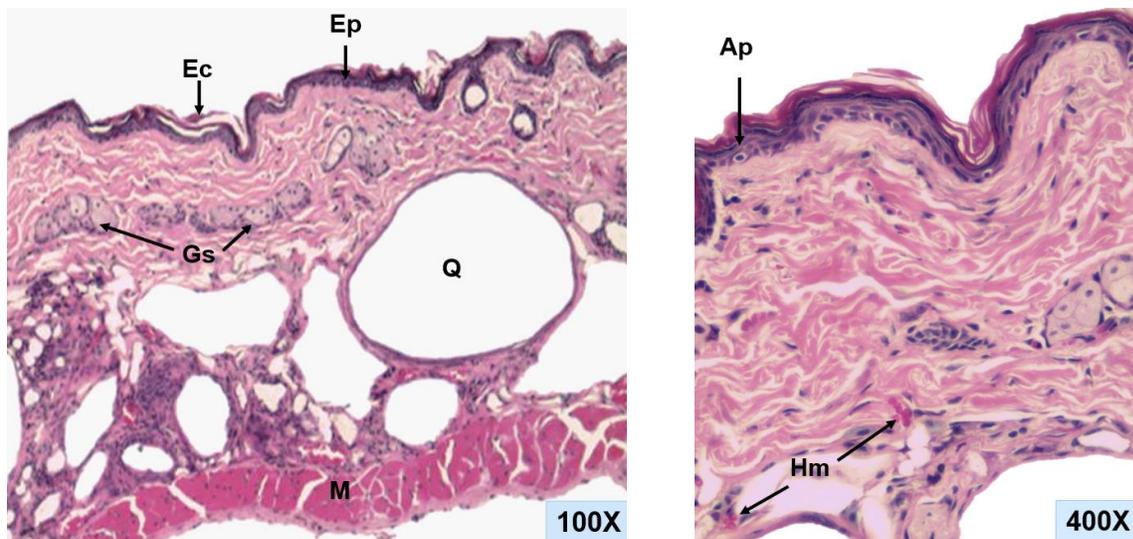


Figura 19. Secciones histológicas representativas del tratamiento Dys (grupo solamente tratado con el extracto metanólico de *D. taetiflora*). Ep= Epidermis; Ec=Estrato córneo; Ap=Apoptosis; Gs=Glándulas sebáceas; Hm=Hemorragia; Q=Quistes pilosos; M= Músculo. Tinción Hematoxilina y Eosina.

Grupo experimental DysUVB

En el análisis histológico se pudo observar que en el 72% de las muestras el tratamiento DysUVB a nivel epidérmico se disminuyó la incidencia de lesiones relacionadas con la formación de carcinogénesis cutánea con respecto a los ratones del C+. Los conteos por campo muestran que de un total de 14 muestras el 28% presentaron hiperplasia, 35% queratosis actínica y solo el 28% desarrollaron carcinoma (Gráfica 3 pág. 37) lo que corresponde a cuatro muestra de un total de 14.

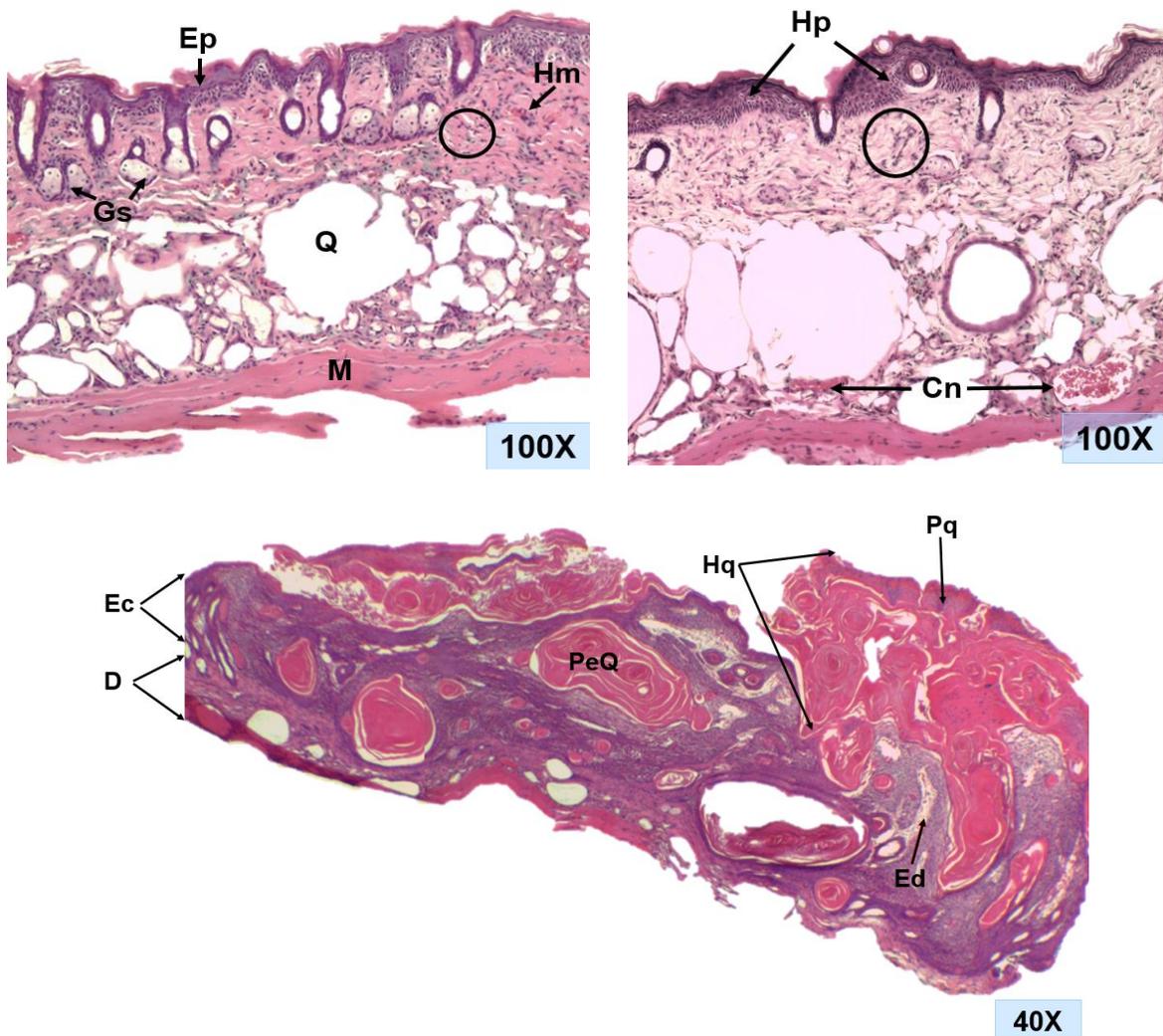


Figura 20. Secciones histológicas del tratamiento DysUVB. Ep=Epidermis; EC=Estrato córneo; D=Dermis; Gs=Glándulas sebáceas; Q=Quistes pilosos; M=Músculo; Hq=Hiperqueratosis; Pq=Paraqueratosis; Hp=Hiperplasia; PeQ=Perlas de queratina; Ed=Edema; Hm=Hemorragia; Cn=Congestión; el Infiltrado inflamatorio se observa en círculos. Tinción Hematoxilina y Eosina.

En la epidermis se observó hiperplasia moderada y multifocal. A nivel de la dermis hubo disminución del infiltrado inflamatorio, de los cambios en la colágena, hemorragia, y congestión respecto al C+. Además, el tejido subcutáneo se mantuvo de grosor regular. En general el aspecto de la piel presentó cambios patológicos moderados de grado leve y extensión focal (Figura 20).

La actividad fotoprotectora del EMDT se atribuye a los compuestos de tipo flavonol que se han identificado en el extracto. Reyna, (2018) aisló del extracto metanólico hiperósido, avicularina, acetato de avicularina y quercetina. Estrella-Parra et al., (2019) caracterizaron a los glicósidos de flavonoides: quercetina-4'-metil éter 6-C glucósido, quercetina-4'-metil éter 8-C glucósido y [2-(3,4-hidroxifenil) -5,7-hidroxi-4-oxocromen-3-il] 3,4,5-trihidroxoxano-2,6-dicarboxilato en el EMDT. Debido a la estructura química de estos compuestos fue posible reducir la incidencia de carcinogénesis cutánea inducida por la exposición a la UVB en este trabajo (Estrella-Parra et al., 2019).

La inhibición tumoral de compuestos fenólicos se le atribuye al doble enlace entre los carbonos 2 y 3 de estos compuestos que contribuye a la planaridad molecular y la conjugación entre los anillos C y A/B (Wang et al., 2018). También se ha demostrado que diversos polifenoles protegen al DNA del daño por las ERO inducido por irradiación UVB en queratinocitos HaCaT y en piel de ratones, mediante la eliminación de anillos de ciclobutano, la inhibición de las ERO y la baja regulación de NF-κB (Das et al., 2013).

Los compuestos fenólicos como los flavonoides pueden absorber las longitudes de onda de la RUV e inhiben diversas etapas de la progresión del cáncer (Vazhappilly et al., 2017) como se observó en las muestras del grupo experimental DysUVB. Los flavonoides inducen apoptosis, el arresto celular o bien tienen interacción con enzimas asociadas en el desarrollo del cáncer, además de provocar citotoxicidad de células cancerosas (Wang et al., 2018) lo que se vio reflejado en la disminución de incidencia de carcinoma en el grupo DysUVB.

Los compuestos fenólicos tienen la capacidad de quelar iones metálicos por lo grupos hidroxilo que presentan en sus estructuras, lo que confirma la actividad protectora ante el estrés oxidativo, es importante mencionar que las modificación estructurales en estos compuestos como las glicosilaciones favorecen la eficacia de sus actividades biológicas debido a que las moléculas son estables (Estrella-Parra et al., 2019; Halake, 2016).

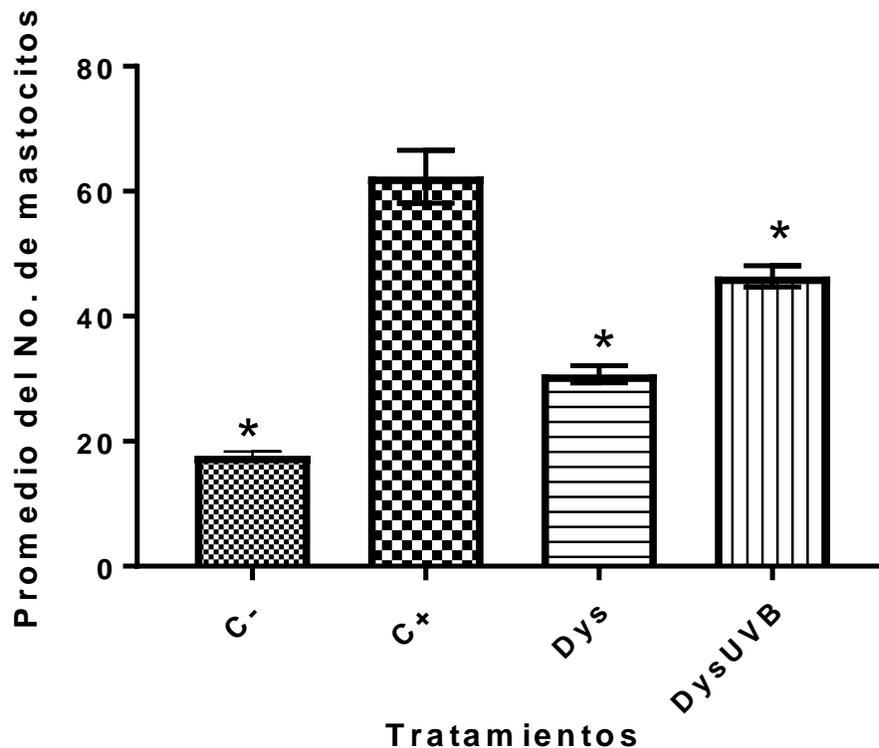
El EMDT reduce el número de tumores en ratones SKH-1 expuestos a la radiación UVB (Estrella-Parra et al., 2019) lo que coincide con lo reportado en este trabajo y esto se le atribuye a los componentes glicosilados que se derivan de la quercetina. Se reconoce que este compuesto es un buen antioxidante por los grupos hidroxifenilo presentes en su estructura (Estrella-Parra et al., 2019) que le permiten actuar ante el estrés oxidativo.

La quercetina se ha utilizado en modelos *in vitro* en combinación con otros productos naturales para evitar el cáncer de piel en el cultivo celular A375 (Srivastava, et al., 2019) o en combinación con nanoparticulas en donde inhibe la señalización de la vía NF- κ B /COX2 en queratinocitos HaCat. (Nan, et al., 2018). Además de que se ha demostrado que flavonoides glicosilados como la quercitrina evita el desarrollo de queratosis actínica inducida por UVB en ratones SKH-1 (Yin, et al., 2013) lo que explica nuestros resultados, en donde solo el 28% de las muestras desarrolló hiperplasia.

El hiperósido tiene actividad antidepresiva, neuroprotectora, cardioprotectora, antidiabética, antifúngica radioprotectora, gastroprotectora (Raza, et al., 2017; Piao, et al., 2008) y antioxidante (García-Bores et al., 2018), además de considerarlo un posible inhibidor de diferentes tipos de cáncer (Li et al., 2014; Zang et al., 2014). Este compuesto es el más abundante en el EMDT (Estrella-Parra et al., 2019). Lo que permite suponer que este compuesto en conjunto con los demás flavonoides disminuyeron la incidencia de carcinomas en las muestras analizadas.

9.3. Análisis histológico del conteo de mastocitos

El promedio de mastocitos en el C- fue de 17 células, en Dys de 30 y en DysUVB de 46 células por campo de observación; siendo estadísticamente significativo con respecto al C+, el cual presentó un promedio 62 células, cabe resaltar que también se observó degranulación de mastocitos en el este grupo (Gráfica 4; Figura 21).



Gráfica 4. Promedio del número de mastocitos por campo en los tratamientos del experimento de exposición crónica de la radiación UVB. * $p = \leq 0.05$. C-: Control negativo; C+: Control positivo; Dys: Grupo tratado solamente con el extracto metanólico de *D. taetiflora*; DysUVB: Grupo protegido con el extracto metanólico de *D. taetiflora* e irradiado.

Al realizar el conteo de mastocitos y la prueba estadística ANOVA se demostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos (Gráfica 4). Estas diferencias se pueden observar en la figura 21, donde se muestra secciones histológicas con la tinción de azul de toluidina (Dominicci).

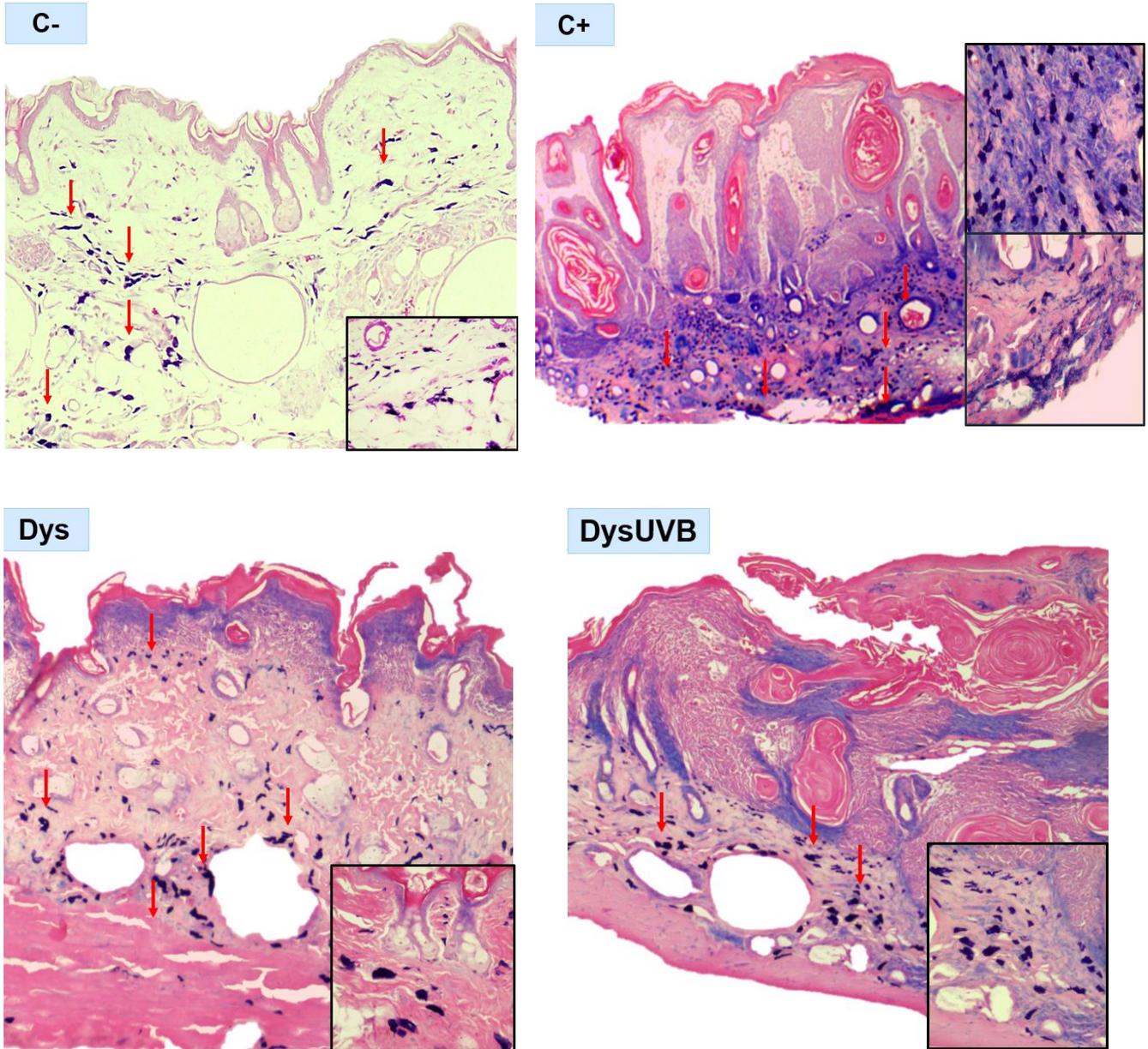


Figura 21. Secciones representativas de los tratamientos del experimento crónico de fotoprotección. Mastocitos señalados con flechas rojas. Tinción Azul de toluidina. Ampliaciones 100X, recuadros 400X.

En la inflamación causada por la radiación crónica a la UVB participan diversas células como los mastocitos, estos juegan un papel importante en la regulación homeostática de la piel y en la fototolerancia (Schweintzger, et al., 2015).

Los mastocitos son de las primeras células que actúan ante el daño provocado por la UVB, cuando son activadas secretan mediadores vasoactivos y proinflamatorios tales como la histamina, serotonina, citocinas, proteasas, entre otras, por lo que se consideran cruciales en la iniciación de defensa innata ante agentes como la UVB (Ribatti y Crivellato, 2012; Theoharides et al., 2012).

Los mastocitos junto con las moléculas que secretan pueden tomar funciones importantes dentro de la inflamación y el crecimiento de tumores, por un lado, siguen reclutando infiltrado inflamatorio para sanar el tejido dañado y por otro lado, cuando la inflamación se vuelve crónica, existe la posibilidad de que se generen y se liberen factores proinflamatorios como IL-6, TNF- α , VEGF, Cox-2, i-NOS y CCL-2 que promuevan el crecimiento tumoral (Ribatti y Crivellato, 2012; Theoharides y Conti, 2004)

Se ha reportado que la prevalencia de mastocitos dérmicos es un factor que influye en el desarrollo de carcinoma de células basales causada por la exposición a la radiación UVB en humanos, y que esta relación se puede considerar similar en diferentes cepas de ratones (Grimbaldeston et al., 2003; Grimbaldeston et al., 2000), algo semejante sucede con lo observado en las muestras del C+, alrededor de los carcinomas se observó degranulación excesiva de los mastocitos (ver figura 20, panel C+).

Es posible que la degranulación de los mastocitos que se presentó en las muestras del C+ se deba a la unión del ET-1 a receptores ETA en la piel, la cual produce la liberación de mediadores de estas células, lo que amplifica la respuesta inflamatoria en desarrollo, porque atrae a las células del sistema inmune que repararán el tejido dañado (Schweintzger, et al., 2015; Metz et al., 2006).

En grupo experimental DysUVB, el EMDT disminuyó drásticamente el número de mastocitos en la piel de ratones SKH-1. Esta disminución de mastocitos se le puede

atribuir a los compuesto fenólicos aislados en dicho extracto (Estrella-Parra et al., 2019; García-Bores et al., 2018) puesto que se reporta que tienen capacidad antioxidante y antiinflamatoria, inhibiendo potencialmente el factor de necrosis tumoral, interleucina-6 y óxido nítrico (Kim y Young, 2011), la vía COX-1 y 12-LOX (Lesjak et al., 2018), por mecanismos que implican la inhibición de la activación de NF- κ B (Risitano et al., 2014; Potapovich et al., 2011), por lo que se han utilizado en la prevención y tratamiento de distintas enfermedades crónicas como el cáncer de piel (Formica y Regelson, 1995).

Los flavonoides son una pieza importante en los tratamientos contra el cáncer y la inflamación, sobre todo porque tienen gran impacto sobre mecanismos y células del sistema inmune importantes en el proceso inflamatorio ya que pueden inhibir la actividad de enzimas reguladores o de factores de transcripción que regulan la inflamación debido a que eliminan y disminuyen la producción de radicales libres (Maleki et al., 2019).

La quercetina se ha identificado en el EMDT y a pesar de ser el compuesto minoritario, este tiene la capacidad de regular la respuesta inflamatoria por medio de la inhibición de histamina y NF- κ B (Weng et al., 2012) así como inhibir la expresión de citosinas proinflamatorias como el TNF- α , interleucinas (IL-1 β , IL-6 y IL-8) en la línea celular de mastocitos humanos (HMC-1) (Park et al., 2008), además de regular la disminución de ICAM-1, INOS y COX-2 en la línea celular NCTC2544 de queratinocitos humanos ya que inducen la inflamación por la activación de la histamina y del interferón gama (INF- γ) (Albouchi et al., 2019).

Los compuestos fenólicos presentes en el EMDT pueden influir directamente en la función de receptores, en la modulación de la señalización celular y/o en la transcripción de genes implicados en distintas vías proinflamatorias, lo cual se ve reflejado en la respuesta inflamatoria modulada por la disminución del número de mastocitos en la piel de los ratones irradiados con UVB (Estrella-Parra et al., 2019).

Considerando todos los datos obtenidos en este trabajo y los antecedentes fitoquímicos y biológicos del EMDT se puede considerar como un fotoprotector solar,

debido a que disminuye y evita el desarrollo de los daños provocados por la exposición crónica a la radiación UVB, además, actúa como modulador de la respuesta inflamatoria en la piel de los ratones expuestos a la radiación UVB de forma crónica.

A manera de resumen, en la tabla 5 (pág. 50) se muestra un cuadro comparativo con los daños provocados por la UVB y los efectos histológicos en la piel de los ratones que estuvieron protegidos con el EMDT. En la tabla 5 (pág. 50) se puede observar que la radiación UVB penetra todas las capas de piel.

Tabla 5. Efectos histológicos en piel de ratones SKH-1 expuestos a la UVB y protegidos con el extracto metanólicos de *Dyssodia tagetiflora*

Capa de la Piel	UVB	<i>Dyssodia tagetiflora</i>
Epidermis	Cambios pre malignos ~ Hiperplasia ~ Displasia ~ Hiperqueratosis ~ Paraqueratosis ~ Células de quemadura ~ Necrosis ~ Espongiosis ~ Acantosis ~ Atrofia Carcinoma ~ Perlas de queratina ~ Pleomorfismo ~ Aumento de mitosis del estrato germinativo que da lugar al crecimiento desorganizado de la epidermis ~ Acantosis	~ Retraso el crecimiento de las lesiones macroscópicas ~ La mayoría de las muestras presentaron hiperplasia, y queratosis actínica ~ Hiperqueratosis ~ Paraqueratosis ~ Células de quemadura ~ Las lesiones se dieron en menor incidencia en comparación a los ratones que no estuvieron protegidos.
	~ Edema ~ Infiltrado o inflamatorio ~ Fibroblastos reactivos. Cambios en la organización de las fibras de colágena. ~ Congestión ~ Hemorragias ~ Necrosis de glándulas sebáceas ~ Aumento de las células cebadas y degranulación excesiva (si se nota una prevalencia de los mastocitos y de la degranulación alrededor de los tumores.	~ Hubo inflamación moderada ~ Disminuyó el infiltrado inflamatorio ~ No hubo edema ~ Disminuyó la hemorragia, ~ Disminuyó la congestión ~ No hubo necrosis de las glándulas sebáceas ~ Disminuyó el número de mastocitos y por ende la degranulación de los mismos ~ No hubo cambios en la organización de la colágena
Hipodermis	~ Disminuyó el grosor de esta capa ~ Los quistes también se ven atrofiados	~ El espesor se mantuvo de tamaño regular y los quistes no se vieron atrofiados
Músculo	~ Necrosis muscular (se observan núcleos polimorfos y se pierde la estriación del músculo).	~ No se observó necrosis muscular

10. Conclusiones

- ↻ La exposición crónica a la radiación UVB generó el desarrollo de todo el espectro de lesiones histológicas relacionadas con la carcinogénesis cutánea en ratones SKH-1.
- ↻ El extracto metanólico de *D. tagetiflora* aplicado de forma tópica tuvo efecto fotoprotector al disminuir y retrasar la incidencia y multiplicidad de las lesiones macroscópicas provocadas por efecto de la UVB.
- ↻ El extracto metanólico de *D. tagetiflora* aplicado de forma tópica tuvo efecto fotoprotector al disminuir y retrasar los daños histológicos provocados por la exposición crónica a la UVB.
- ↻ En el grupo protegido con el extracto metanólico de *D. tagetiflora* se redujo el número de mastocitos involucrados en el proceso inflamatorio y por lo tanto se considera como un modulador de la respuesta inflamatoria.

11. Bibliografía

- ∞ Afaq, F. 2011. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 508(2):144-151.
- ∞ Albouchi, F., Avola, R., Lo Dico, G. M., Calabrese, V., Graziano, E. A. C., Abderraba, M. y Cardile, V. 2018. *Malaleuca styphelioides* Sm. Polyphenols modulate interferón gamma/histamine-induced inflammation in human NCTC 2544 keratinocytes. *Mol.* 23.
- ∞ Arenas, G. R. 2015. Dermatología atlas, diagnóstico y tratamiento. 6ª ed. Mc Graw Hill. China. 1-24.
- ∞ Bell, A. E. 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products en Stumpf, K. P y Conn, E. E. 1981. The biochemistry of plants a comprehensive treatise. Vol. 7 Secondary plants products. Academic press. Primera edición. London. 1.
- ∞ Benavides, F., Oberyszyn, M. T., VanBuskirk, M. A., Vivienne, E. R., y Kusewitt, D. F. 2009. The hairless mouse in skin research. *Jour. Of Derma. Scie.* 53:10-18.
- ∞ Bruel, A., Christensen, L. E., Trandum-Jensen, J., Qvortrup, K. y Geneser, F. 2014. Geneser Histología. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. México. 435-453.
- ∞ Callen P. J. 2006. Posibles precursores de las neoplasias epidérmicas queratinocíticas. En Rigel, S. D., Friedmad, J. R., Dzubow, M.L., Reintgen, S. D., Bystry, J. C. y Marks, R. 2006. Cáncer de Piel. España. 93-100.
- ∞ Castell, R. A. E. y Herrera, E. M. 2017. Cap. 14 Piel y anexos, en Fortourl V. der G. Histología y biología celular. 3ª ed. Mc Graw Hill Editores. Ciudad de México. 215-229.
- ∞ Cavinato, M. y Jansen, Durr, P. 2017. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Geront.* 94:78-82.
- ∞ Chiang, H. M., Chen, H. C., Chiu, H. H., Chen, W. C., Wang, M. S. y Wen, C. K. 2013. *Neocauclea reticulata* (Havil). Merr stimutales skin regeneration after UVB exposure via ROS scavenging and modulation of the

MAPK/MMPs/Collagen pathway. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/324864>

- ∞ Chu, D. 2014. Desarrollo y estructura de la piel. En Goldsmith, A. L., Katz, I. S., Gilchrest, A. B., Paller, S. A., Leffel, D., y Wolff. K. *Fitzpatrick*. Dermatología en medicina. 8ª ed. Tomo I. Editorial, Médica Panamericana. 58-74.
- ∞ Das, S., Das, J., Paul, A., Samadder, A. y Khunda-Bukhsh, A. R. 2013. Apigenin, a bioactive flavonoid from *Lycopodium clavatum*, stimulates nucleotide excision repair genes to protect skin keratinocytes from ultraviolet B-induced reactive oxygen species and DNA damage. *J. Acupunct Meridian Stud.* 6(5):252-262.
- ∞ Downum, R. K., Keil, D. J. y Rodríguez, E. 1985. Distribution of acetylenic thiophenes in pectidinae. *Biochem Syst Ecol.* 13(2):109-113.
- ∞ D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T. 2013. UV Radiation and the skin. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 12222-12248.
- ∞ Duro, M. E., Campillos, P. M. T. y Causin, S. S. 2003. El sol y los filtros solares. *MEDIFAM.* 13(3):159-165.
- ∞ Eckhart, L., Lippens, S., Tschacler, E. y Declercq, W. 2013. Cell death by cornification. *Biochem. et Biophys. Acta.* 1833. 3471-3480.
- ∞ Edward, S. y Yung, A. 2012. Essential dermatopathology. Primera edición. Wolters Kluwer Health. China. 58-77, 118-112.
- ∞ Espinosa, G. A. M. 2016. Evaluación del efecto fotoquimiprotector del verbascósido en ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta. Tesis Doctoral en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.
- ∞ Estrella-Parra, E. A., Espinosa-González, A. M., García-Bores, A. M., Zamora-Salas, S. X., Benítez-Flores, J. C., González-Valle, M. R., Hernández-Delgado, C. T. y Peñalosa-Castro, I. 2019. Flavonol glycosides in *Dyssodia tagnetiflora* and its temporal variation, chemoprotective and ameliorating activities. *Food and chemical toxicology.* 124:411-422.
- ∞ Fernández-Figueras, M. T. y Puig, L. 2014. Queratosis actínica: de la histopatología a la clínica. *Piel.* 20(20):1-5
- ∞ Ferrándiz, C. Malveyh, J., Guillén, C., Ferrándiz-Pulido, C. y Fernández-Figueras, M. T. 2017. Precancerous skin lesions. *Actas dermosidiliogy.* 108(1):31-41.

- ∞ Formica, J. V. y Regeleson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.* 33(12):1061-1080.
- ∞ Fundación Mexicana para la dermatología (2006). Boletín: Daño acumulado en la piel. Recuperado el día 27 de Febrero del 2019 de: <https://fmd.org.mx/2006/03/16/boletin-dano-acumulado-en-la-piel/>
- ∞ García-Bores, A. M., Arciniegas, A. A., Reyna, C. A., Céspedes, A. C., Avila, S. B., Alarcón, E. J., Flores, M. S., Espinosa, G. A. M., R. R. A., Plasencia, P. C. y Avila, A. G. 2018. Phytochemical composition and biological activities of *Dyssodia tagetiflora* Lag. *Chem. Biodivers.* 15(2).
- ∞ Gartner, P. L. 2018. Cap. 11. Tegumento en Histología Atlas en color y texto. 7ª ed. Wolters Kluwer. España. 296-314..
- ∞ Gilaberte, Y. y González, S. 2010. Novedades en fotoprotección. *Actas Dermosifiliog.* 101(8):690-672.
- ∞ Grimbaldeston, M. A., Skov, L., Baadsgaard, O., Skov, B. G., Marshman, G., Finlay-Jones, J. J. y Hart, P. H. 2000. High dermal mast cell prevalence is a predisposing factor for basal cell carcinoma in humans. *J. Invest. Dermatol.* 115(2):317-320.
- ∞ Grimbaldeston, M. A., Simpson, A., Finlay-Jones, J. J. y Hart, P. H. 2003. Photobiology. The effect of ultraviolet radiation exposure in the prevalence of mast cells in human skin. *J. Dermatol.* 148:300-306.
- ∞ Gutierrez-Lugo, M. T., Barrientos-Benítez, T., Luna. B., Ramirez-Gama, R. M., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican Medicinal Plants. *Phytomed.* 2(4):341-347.
- ∞ Halake, K., Birajdar, M., Lee, J. 2016. Structural implications of polyphenolic antioxidants. *J. Ind. Eng. Chem.;* 35: 1-7.
- ∞ Halliday, M. G. 2005. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat. Res.*571:107-120.
- ∞ Jurado-Santa Cruz, F., Medina-Bojórquez, A., Gutiérrez-Vidrio, R. M. y Ruiz-Rosillo, J. M. 2011. Prevalencia del cáncer de piel en tres ciudades de México. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 49(3):253-258.

- ⌘ Katiyar, K. S., Korman, J. N., Mukhtar, H. y Agarwal, R. 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J. Natl. Cancer Inst.* 89(2):556-565.
- ⌘ Kim, T. H., Ananthaswamy, N. H., Kripke, L. M. y Ullrich, E. S. 2003. Advantages of using hairless mice versus hairless mice to test sunscreen efficacy against photoimmune suppression. *Photochem. Photobio.* 78(1):37-42.
- ⌘ Kim, J. S. y Young, U. J. 2011. Antiinflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor-Kb activation in mouse peritoneal macrophages. *J. Chin. Med.* 39(1):171-181.
- ⌘ Kim, I. Y. y He Y. Y. 2014. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cáncer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis.* 1: 188-198.
- ⌘ Kochevar, R. I., Taylor, R. C. y Krutmann, J. 2014. Fundamentos de fotobiología y de fotoimmunología cutáneas. En *Fitzpatrick. Dermatología en medicina.* 8ª ed. Tomo I. Editorial, Médica Panamericana.1031.1048.
- ⌘ Kumar, V., Abbas, A. y Aster, C. J. 2015. Robbins y Cortan Patología estructural y funcional. 9ª ed. Elsevier. España. 265.
- ⌘ Kundoor, V., Zhang, X., Bommareddy, A., Khaliffa, S., Fahmy, H. y Dwivedi, C. 2007. Chemopreventive effects of sarcotriol on ultraviolet B-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Mar. Drugs.* 5:197-207.
- ⌘ Lang G. P. y Maize C. J. 2006. Carcinoma basocelular en Rigel, S. D., Friedman, J. R., Dzubow, M. L., Reintgen, S. D., Bystry, J. C. Marks, R. 2006. Cáncer de piel. Elsevier. España. 101-132.
- ⌘ Lazar, G. A. J. y Murphy G. F. 2015. Piel en Kumar, V., Abbas, A. K. y Aster, J. C. 2015. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Elsevier. 9ª Ed. España. 1141-1178.
- ⌘ Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pitác, D., Majkic, T., Bekvalac, K., Orcic, D. y Mimica-Dukic, N. 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J. Funct. Foods.* 40:68-75.
- ⌘ Li, W., Liu, M., Xu, Y. F., Feng, Y., Che, J. P. y Wang, G. C. y Zheng, J. H. 2104. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncol Rep.* 31(1): 117-124.

- ∞ Lowe, S. J y Anderson, G. P. 2015. Cap. 18. Piel y mamas, en *Histología Humana*. 4ª ed. Elsevier. España. 363-377.
- ∞ Magaña, G. M. y Magaña, L. M. 2011. Cap. 1 Anatomía, embriología, histología y fisiología de la piel. En *Dermatología*, 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Ciudad de México. 3-18.
- ∞ Makinen, M. y Stenback, F. 1998. Skin tumor development and keratin expression in different experimental models. Relation to inducing agent and target tissue structure. *Exp. Toxic. Pathol.* 50:199-208.
- ∞ Maleki, J. S., Crespo, F. J. y Cabanillas, B. 2019. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* 299: 1-11.
- ∞ Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, P. M., Correa, G., Ono, Y., Goodarzi, H. 2010. Light, including ultraviolet. *J. Autoimmun.* 30:1-11.
- ∞ Metz, M., Lammel, V., Gibbs, B.F, y Maurer, M. 2006. Inflammatory murine skin responses to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells. *Am. J. Pathol.* 169(3):815-822.
- ∞ Montes O. M. K., Pearlman, L. R., McClees, F. S., Strickland, R., Afaq, F. 2017. Phytochemicals for the prevention of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 93(4):956-974.
- ∞ Montuenga, B. L., Esteban, R. F. J. y Calvo, G. A. 2014. *Técnicas en histología y biología celular*. Essevier Masson. 2ªed. 72.
- ∞ Nan, W., Ding, L., Chen, H., Khan, F. H., Yu, L., Sui, X., y Shi, X. 2018. Topical Use of quercetin-loaded chitosan nanoparticles against ultraviolet B radiation.
- ∞ Neuman, M. G., Haber, J. A., Malkiewicz, I. M., Cameron, R. G., Katz, G. G. y Shear, N. H. 2002. Ethanol signals for apoptosis in cultured skin cells. *Alcohol.* 26(3):179-190.
- ∞ Neuman, G. M., Oruña, L., Coto, G., Lago, G., Nanau, R. y Vincent, M. 2010. Hyaluronic, acid signals for repair in etanol-induced apoptosis in skin cells in vitro. *Clin. Biochem.* 43:822-826.
- ∞ Nguyen, H. T. y Yoon, J. 2006. Carcinoma epidermoide. Rigel, S. D., Friedman, J. R., Dzubow, M. L., Reintgen, S. D., Bystry, J. C. Marks, R. 2006. *Cáncer de piel*. Elsevier.España.133-150.

- ⌘ Nichols, A. J. y Katiyar, K. S. 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* 302(2):71.
- ⌘ Norris D. 1995. Differential Control of Cell Death in the Skin. *Arch Dermatol.* 131:945-948.
- ⌘ Olarte, S. M, Sánchez, R. S. H., Aréchiga, F. C. F., Bañuelos, V. R., Ramírez A. E. D. y López, L. A. 2016. Cell response and skin damage by prolonged exposure to UV radiation. *Rev. ANCEM.* 9(1): 44-51.
- ⌘ Park, H. H., Lee, S., Son, H. Y., Park, S. B., Kim, M. S., Choi, E. J., Singh, S. K. T., Ha, J. H., Lee, M. G., Kim, J. E., Hyun, C. M., Kwon, K. T., Kim, H. Y. y Kim, S. H. 2008. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Rev.* 31(10):1303-1311.
- ⌘ Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. y Bravo, J. A. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Rev. Bol. Quím.* 31(2):68-81.
- ⌘ Pérez-Amador, M. C., Herrera, J., Muñoz, V., Vives, J., García-Jiménez, F. 2004. Phototoxic compounds in 3 *Dyssodia* species (*Asteraceae*). *International Journal of experimental botany.* 115-117.
- ⌘ Piao, M. J., Kang, K. A., Zhang, R., Ko, D. K., Wang, Z. H., You, H. J., Kim, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S. y Hyun, J. W. 2008. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780(1448-1457).
- ⌘ Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M. y Ohtsuki, M. 2017. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17. 1-20
- ⌘ Potapovich, L. A., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, A. V., Luca, C., Pastore, S., Korkina, L. 2011. Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NF κ B and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255:138-149.

- ∞ Puig, S. L. 2014. Reacciones cutáneas frente a agentes físicos. Fotobiología, y fotodermatosis en Ferrandiz, C. 2014. Dermatología clínica. 4ª ed. Elsevier, España. 109-118.
- ∞ Raza, A., Xu, X., Sun, H., Tang, J. y Ouyang, Z. 2017. Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review. *Tropical J. Pharm. Res.* 16(2):483-489.
- ∞ Reyna, C. A. O. 2018. *Dyssodia tagetiflora* Lag.: Caracterización química del extracto metanólico y sus propiedades biológicas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ∞ Ribatti, D. y Crivellato, E. 2012. Mast cells, angiogenesis and tumor growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1822:2-8.
- ∞ Ringuélet J. y Viña, S. 2013. Introducción a los productos naturales vegetales. En Ringuélet, J. y Viña, S. 2013. Productos Naturales vegetales. Primera edición. La plata. Universidad Nacional de la plata. Argentina. 4-7.
- ∞ Risitano, R., Curro, M., Cirimi, S., Ferlazzo, N., Campiglia, P., Caccamo, D., Lentille, R. y Navarra, M. 2014. Flavonoid fraction of bergamot juice reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF-κB inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS ONE.* 9(9): e107431. doi:10.1371/journal.pone.0107431.
- ∞ Rojas, W., Anaya, J. M., Aristzábal, B., Cano, L. E, Gómez, L. M., Lopera, D. 2010. Inmunología de Rojas. Corporación para las investigaciones Biológicas. 14ª ed. Medellín. 54-73
- ∞ Rojas, A., Bah, M., Rojas, J. I., Serrano, V. y Pacheco, S. 1999. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomí Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomed.* 5(6):367-371.
- ∞ Roustan, G. G. 2014. Nociones fundamentales de fotoquímica en Escalas, T. J. 2014. Fotodermatología. 1er edición. Editorial médica panamericana. España. 15-25.
- ∞ Saewan, N. y Jimtaisong, A. 2015. Natural products as photoprotection. *J. Cosmet. Dermatol.* 0:1-17.
- ∞ Sarkany, R. P. E. 2011. Ultraviolet radiation and the skin. Elsevier. 469-482.

- ⌘ Scheintzger, N. A., Bambach, I., Reginato, E., Mayer, G., Limón-Flores, A. Y., Ullrich, S. E., Byrne, S. N. y Wolf, P. 2015. Mast cells are required for phototolerance induction and scratching abatement. *Exp. Derm.* 24(7):491-496.
- ⌘ Srivastava, N. S. y Srivastava, R. A. K.. 2019. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt β -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomed.* 52:117-128.
- ⌘ Stanier, Y. R., Ingraham, L. J., Wheelis, L. M. y Painter, R. P. 1992. Microbiología. Editorial reverté. 2ª ed. España. 65.
- ⌘ Stevens, A., Lowe, J. S. y Young, B. 2003. Wheater Histopatología básica. Elsevier, 4º ed. Madrid, España. 250.
- ⌘ Stone, D. K., Prussin, C., Metcalfe, D. D. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin.Immunol.* 25(2):73-80.
- ⌘ Tay, S. S., Roediger, B. Tong, L. P. 2013. The skin-resident immune network. *Curr. Derm. Rep.* 3:13-22.
- ⌘ Theoharides, C. T. y Conti, P. 2004. Mast cells: the JEKYLL and HYDE of tumor growth. *Trends Immunol.* 25(5):235-241.
- ⌘ Theoharides, C. T., Alysandratos, K. D., Angelidou, A., Delivanis, D. A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A. y Kalogeromitros, D. 2012. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1822:21-33.
- ⌘ Vazhappilly, C. J., Graham, D., y Rupasinghe, V. V. P. 2017. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: Role in genome stability. *J. Nutr. Biochem.* 45:1-14
- ⌘ Verdín, T. S. L., Morenos, F. L., Rojo, B. N. R., García, H. A. L., Omaña, M., Meneses, A. A. y Nieto, Y. O. J. 2013. Histología e Inmunohistoquímica manual de métodos. Universidad Nacional Autónoma de México. Primera edición, México. 3-39.
- ⌘ Villarreal, Q. J. A. 2003. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Familia Compositae (Asteraceae). Recuperado el 13 de Agosto del 2017 de >><http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/floba/compositae-tageteae113.pdf><<

- ∞ Villareal, A., Villaseñor, J. y Medina, L. 2008. Flora de Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 57.
- ∞ Villegas, D. A., Castillo, M. M. D., Sabatés, M. M., Curbelo, A. I. y Ramos, V. N. 2005. Radiación ultravioleta. Fotoenvejecimiento cutáneo. *MediSur*. 3(1):14-33.
- ∞ Viña, S. 2013. Compuestos fenólicos. En Ringuelet, J. y Viña, S. 2013. Productos Naturales vegetales. Primera edición. La plata. Universidad Nacional de la plata. Argentina. 91-150.
- ∞ Wang, T., Li, Q. y Bi, K. 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* 13:12-23.
- ∞ Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J. y Gao, Y. 2016. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 56:21-38.
- ∞ Wen, Z., Zhang, B., Asadi, S., Sismanopoulos, N., Butcher, A., Fu, X., Katsarou-Katsari, Antoniou, C. y Theoharides, T. 2012. Quercetin is more effective than Cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PLoS ONE*. 7:1-10.
- ∞ Yin, Y., Li, W., Son, Y., Sun, L., Lu, J., Kim, D., Wang, X., Yao, H., Wang, L., Pratheeshkmar, P., Hilton, J. A., Luo, J., Gao, N., Shi, X., Zhang, Z. 2013. Quercitri protects skin from UVB-induced oxidative damage. *Toxicol. App. Pharma.* 269:89-99.
- ∞ Zamora, S. S. X. 2019. Fotoprotección de los extractos metanólicos de *Dyssodia tagetiflora* (Asteraceae) e *Hyptis mocinicana* (Labiatae) a nivel celular y tisular. Tesis de Lic. en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ∞ Zhang, N., Ying, M. D., Wu, Y.P., Zhou, Z. H., Ye, Z. M., Li, H. y Lin, D. S. 2014. Hyperoside, a flavonoid compound, inhibits proliferation and stimulates osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells. *PloS one*. 9(7).
- ∞ Zappi E. y Zappi A. E. 2007. Dermatopatología clasificación y estudio razonado de las lesiones cutáneas. Primera edición. Editorial Ascune Hnos. Argentina. 19.
- ∞ Zayas, M. S. E., Jamur, M. C. y Oliver, C. 2014. Mast cell function: A new visión of an Old cell. *J. Histochem.* 62(10):698-738.

- ∞ Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H. y Kato, N. 2003. Inhibitory effects of silk protein, serin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J. of photochem. And Photobiol.* 71:11-17.

Bibliografía de páginas en Línea

- ∞ *Dyssodia tagetiflora* Lag. Recuperado el 4 de abril del 2019 de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/dyssodia-tagetiflora/fichas/pagina1.htm>
- ∞ Fundación Mexicana para la dermatología. 2017. ¿Qué es la piel? Recuperado el 27 de Febrero del 2019 de: <https://fmd.org.mx/2017/09/05/que-es-la-piel/>
- ∞ Ratón sin pelo SKH1-Hrhr. Recuperado el 4 de abril del 2019 de: <https://www.criver.com/products-services/find-model/skh1-hairless-mouse?region=3616>