



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**EFFECTO FOTOPROTECTOR DE *Hyptis  
mociniana* (Benth) EN PIEL DE RATONES SKH-  
1 EXPUESTOS A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA  
DE FORMA CRÓNICA**

**TESIS**

Que para obtener el título de:  
Bióloga

**PRESENTA:**

Rebeca García Hernández

**DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Adriana Montserrat Espinosa  
González



**F E S I**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla,  
Estado de México, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme estudiar y obtener una formación profesional.

Esta investigación fue posible gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con los proyectos IN218616, IN221120. Así como al proyecto CONACYT A1-S-14605 “Estudio de la actividad fotoquimioprotectora de algunas plantas mexicanas”.

La directora de este proyecto la Dra. Adriana Montserrat Espinosa González, este trabajo fue realizado el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) y en el laboratorio de Histología en la Unidad de Morfosiología y Función (UMF).

Al comité tutor, integrado por el Biólogo José del Carmen Benítez Flores, la Dra. Ana María García Bores, la Mtra. María del Rosario González Valle y la Dra. Rocío Serrano Parrales.

## Agradecimientos personales

Primero gracias a mi familia que siempre me apoyado, siempre han estado cerca y me han dado un gran ejemplo, a mis papas por siempre ver por mí, a mis primos Luis, Elisa por hablar, divertirse, compartir sus momentos importantes conmigo y hacerme reír. A mis dos abuelas por siempre estar y recordarnos que debíamos estudiar y siempre compartir sobre sus plantas y experiencias.

Gracias a todas las personas importantes que pude conocer en el laboratorio, a mi tutora la dra. Mon por adoptarme en el laboratorio, la dra. Ana y la dra. Rocío a los amigos que hice aquí Miguel, Mizty, Say, Ari, Naye, Aquetzali, Ivonne por los buenos momentos y consejos. A la maestra Rosario y el Profesor Carmelo de Histología por su paciencia y todo lo que me enseñaron.

A Isaac, por conocerme desde primer semestre y ser mi amigo, no hubiera terminado sin ti, a Fany por siempre escuchar, Nacho, Octi, Frida por todo el chisme y el apoyo, Lau, Sari, por siempre invitarme y permitirme estar con ustedes.

Gracias Osiris, Mari, Ashley, por haber trabajado conmigo en la carrera y haber sido el equipo perfecto. Aranza por trabajar conmigo, me gustó mucho conocerte y que me tuvieras confianza.

## Índice

<b>1</b>	<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Introducción</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Justificación</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Pregunta científica</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Objetivo</b>	<b>19</b>
<b>7</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>20</b>
<b>8</b>	<b>Resultados</b>	<b>25</b>
<b>9</b>	<b>Discusión</b>	<b>39</b>
<b>10</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>11</b>	<b>Literatura citada</b>	<b>45</b>
<b>12</b>	<b>Apéndices</b>	<b>51</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama y fotomicrografía donde se observan las distintas capas y estructuras que conforman la piel humana.	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> Comparación entre piel normal (A) y piel con fotoenvejecimiento (B).	<b>13</b>
<b>Figura 3.</b> <i>Hyptis mociniana</i> (Benth).	<b>18</b>
<b>Figura 4.</b> Ratón SKH-1 hembra adulto (Charles River Laboratories) y fotomicrografía de piel de ratón SKH-1.	<b>19</b>
<b>Figura 5.</b> Multiplicidad y porcentaje de incidencia de las lesiones presentes en los grupos irradiados con y sin protección.	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografías de piel del grupo control negativo al que se le aplicó etanol sin irradiar (C-).	<b>27</b>
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografía del grupo control positivo irradiado con etanol (C+).	<b>26</b>
<b>Figura 8.</b> Comparación del grupo C- y EMHM UV, junto con fotomicrografías del grupo EMHM UV.	<b>28</b>
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografías del grupo al que se le aplicó el EMHM (EMHM) y comparación con el grupo control negativo, irradiado con etanol (C-).	<b>29</b>
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografías del grupo irradiado con EMHM (EMHM UV) y comparación del grupo C-.	<b>31</b>
<b>Figura 11.</b> Gráficas de extensión de daños histológicos representativos en los distintos grupos experimentales.	<b>32</b>
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografías de las lesiones por exposición crónica a la RUV (100x) hiperplasia, queratosis actínica y carcinoma.	<b>33</b>
<b>Figura 13.</b> Incidencia de lesiones resultado de la exposición crónica a la RUV presentes en los grupos evaluados.	<b>34</b>
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de extensión de los daños asociados a la inflamación, presentes en la dermis.	<b>35</b>
<b>Figura 15.</b> Promedio de mastocitos por campo de observación de los distintos tratamientos.	<b>36</b>

<b>Figura 16.</b> Fotomicrografías de secciones histológicas de los grupos C+ (irradiado con etanol) y C- (sin irradiar) teñidas con azul de toluidina.	<b>37</b>
<b>Figura 17.</b> Fotomicrografías de los grupos EMHM (sin irradiar con EMHM) y EMHM UV (irradiado con EMHM).	<b>38</b>
<b>Figura 18.</b> Esquema de la técnica histológica.	<b>52</b>

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Antecedentes del género <i>Hyptis</i> .	<b>16</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Hyptis mociniana</i> .	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Daños histológicos presentes en la piel de los ratones SKH-1 ocasionados por la exposición crónica a la RUV.	<b>23</b>
<b>Tabla 4.</b> Lesiones precancerosas y neoplasia, resultado de la exposición prolongada a la radiación ultravioleta sin protección.	<b>24</b>

## 1 Resumen

La radiación ultravioleta, proveniente del sol, provoca a largo plazo fotoenvejecimiento y cáncer de piel; la fotoprotección busca prevenir dicho daño. Las prácticas que las personas realizan para evitar el daño solar implican el evitar exponerse al sol en las horas de mayor incidencia de radiación UV y el uso de fotoprotectores tópicos. Una nueva alternativa al uso tradicional de los protectores solares es utilizar extractos provenientes de plantas cuyos compuestos activos sean los metabolitos secundarios.

El extracto metanólico *Hyptis mociniana* (EMHM), planta de la familia Labitae, contiene polifenoles entre los que se han aislado la rutina, la isoquercetina y el ácido rosmarínico. También se ha reportado su actividad antioxidante, citoprotectora en queratinocitos HaCaT y fotoprotectora en un modelo agudo en ratones SKH-1 y bacterias.

En este trabajo se evaluó el efecto fotoprotector EMHM en un modelo crónico de fotoprotección, aplicado a ratones SKH-1. El experimento tuvo una duración de 33 semanas durante las cuales se determinó la incidencia y multiplicidad de lesiones. Al término del experimento, los organismos fueron sacrificados para luego tomar muestras de piel y procesarlas para someterlas a un análisis histológico con el fin de evaluar el estado de la piel, identificar lesiones y confirmar la presencia de carcinoma o lesiones precancerosas.

El grupo control negativo, sin irradiar, con un aspecto normal, no mostró lesiones. Sin embargo, el grupo control positivo, irradiado, exhibió todo el espectro de daños ocasionados por la radiación ultravioleta (RUV) y presentó lesiones precancerosas y carcinoma.

A dos grupos se les aplicó el extracto metanólico de *H. mociniana*, uno sin irradiar (EMHM) y uno irradiado (EMHM UV), ambos tuvieron apariencia similar al control C-: no se observaron lesiones precancerosas o carcinoma; en el grupo EMHM UV solo se presentó hiperplasia como consecuencia de la exposición a radiación UV.

Para evaluar el posible efecto antiinflamatorio del extracto, se realizó un conteo de mastocitos en las muestras de piel. El control positivo mostró el mayor número de estas células, mientras que el control negativo (sin irradiar) se consideró como el número normal de mastocitos en la piel. El grupo al que se le aplicó extracto y se irradió mostró un conteo menor al del C+, con diferencias significativas respecto a este.

Se concluyó que la aplicación del extracto metanólico de *H. mociniana* en piel de ratones SKH-1 redujo la aparición de lesiones macroscópicas, disminuyó la presencia y extensión de daños histológicos, evitó el desarrollo de neoplasias y disminuyó la presencia de mastocitos.



## 2 Introducción

### 2.1 La piel

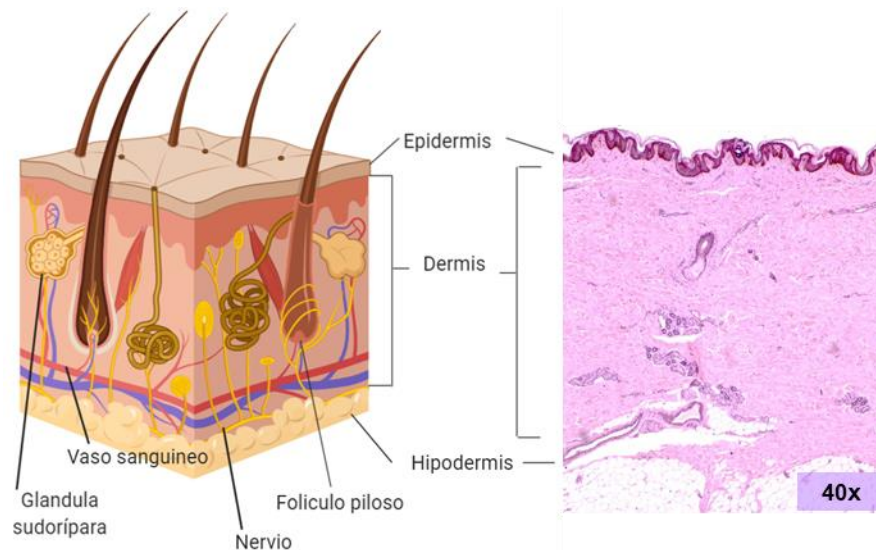
La piel es un órgano que cubre todo el cuerpo cuya función es proteger y permitir la interacción del organismo con el medio. Funciona como barrera frente a los agentes físicos, químicos y biológicos dañinos, se encarga de la termorregulación, la sensibilidad, la protección contra patógenos y la protección contra la radiación ultravioleta (RUV). Tiene capacidad de absorción, secreción y es parte importante de la defensa inmunitaria (Brüel *et al.*, 2014). Se divide en tres capas: *epidermis*, *dermis* e *hipodermis* (Fitzpatrick *et al.*, 2014), (Figura 1).

La epidermis se caracteriza por estar queratinizada y estratificada. Se divide en cuatro estratos: *córneo*, *granuloso*, *espinoso* y *basal*. Se conforma, principalmente, de queratinocitos los cuales se diferencian, a partir de células cilíndricas en el estrato basal, a células aplanadas en el estrato córneo (Brüel *et al.*, 2014).

En la epidermis también se pueden encontrar melanocitos. Estas células sintetizan pigmentos que le confieren color a la piel y brindan cierta protección frente a la RUV. Además de estas células, se encuentran las células de Merkel y células de Langerhans (Fitzpatrick *et al.*, 2014; Brüel *et al.*, 2014).

La dermis está compuesta principalmente por tejido conectivo denso el cual da soporte mecánico, resistencia y espesor a la piel. Contiene distintos tipos celulares: fibroblastos, macrófagos y mastocitos, además de fibras de colágeno y fibras de elastina. Se divide en dos regiones: a) la dermis papilar, que se compone de tejido conjuntivo laxo, cuyas fibras de colágena son principalmente del tipo I y III, siendo este último su principal componente; b) la dermis reticular, la cual está formada por fibras de colágena gruesas de tipo I y fibras elásticas (Wojciech y Ross, 2015; Fitzpatrick *et al.*, 2014), (Figura 1).

Por último, la hipodermis está formada, principalmente, por adipocitos. Conforman una capa de espesor variable de tejido graso la cual funciona como aislante térmico. Esta capa contiene nervios, vasos sanguíneos y linfáticos (Fitzpatrick *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Diagrama y fotomicrografía donde se observan las distintas capas y estructuras que conforman la piel humana (modificado de Brüel *et al.*, 2014).

## 2.2 Efectos de la radiación ultravioleta en la piel

La radiación ultravioleta (RUV) proveniente del sol abarca la longitud de onda de los 200 a los 400 nm. Para facilitar su estudio, se ha dividido en RUV-A (320-400 nm), RUV-B (290-320 nm) y RUV-C (200-290 nm) (Maverakis *et al.*, 2009). El que pueda penetrar en las distintas capas del epitelio depende de la longitud de onda de la RUV (Hillman, 1995).

Dado que RUV-C no llega a la superficie terrestre ya que es absorbida por la capa de ozono y no interactúa con la piel, los efectos de la RUV en la piel, se centran en las reacciones de la RUV-A y RUV-B (Fitzpatrick *et al.*, 2014).

Cuando la RUV llega a la piel, una parte de la energía que contiene es reflejada por el estrato córneo y se dispersa como luz o calor. Otra parte de esta energía es absorbida por las moléculas que componen a la piel, cuyo espectro de absorción está dentro de la longitud de la RUV. Estos compuestos se desestabilizan y pueden cambiar su estructura, formando fotoproductos (Fitzpatrick *et al.*, 2014).

La RUV-A constituye el 95% de la RUV que incide en la tierra (Fitzpatrick *et al.*, 2014) la cual puede penetrar hasta la dermis y generar especies reactivas de oxígeno (ERO) que son moléculas derivadas del oxígeno, más reactivas que él, capaces de interactuar con facilidad con otras (Hillman, 1995). La RUV-A también produce radicales libres, moléculas con un electrón desapareado (Halliwell y Gutteridge, 2015). Tanto las ERO como los radicales libres son responsables del daño oxidativo en las células (Sarkany, 2011) y promueven la inflamación (Avril *et al.*, 2004).

La RUV-B (290-320 nm) constituye el 5% de la radiación UV que llega a la superficie terrestre (Fitzpatrick *et al.*, 2014) la cual incide principalmente en la epidermis. Dicha radiación reacciona con el DNA y forma dímeros de pirimidina ciclobutano (Hillman, 1995) los cuales promueven la aparición de mutaciones (Sarkany *et al.*, 2011).

A pesar de los efectos dañinos de la RUV en la piel, ésta brinda beneficios como la síntesis de vitamina D y sensación de bienestar (Fitzpatrick *et al.*, 2014).

Las consecuencias de la exposición a la RUV, se pueden clasificar en daños agudos o “inmediatos” en la piel o en daños crónicos o “a largo plazo” (Sarkany *et al.*, 2011). Los *daños agudos* causados por la RUV consisten en la quemadura solar, la inmunosupresión, la fotodermatitis, la hiperpigmentación y el eritema. Los *daños crónicos*, por otro lado, consisten en el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel (Jadoon *et al.*, 2015). También se ha observado que el envejecimiento de la piel se puede acelerar y agravar por acción de la RUV, lo cual provoca resequedad, pigmentación, arrugas y un aumento en la angiogénesis (Jadoon *et al.*, 2015).

El cáncer de piel es resultado de varios factores: el daño acumulativo causado por la exposición a la RUV, los fotoproductos, el estrés oxidativo, las mutaciones y la predisposición genética (Arellano-Mendoza *et al.*, 2014); estas neoplasias se pueden presentar en los distintos tipos celulares. En las células de la epidermis se produce el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células basales. El cáncer de melanocitos (melanoma) es el menos común de este tipo, pero más agresivo.

En las últimas décadas, ha aumentado el número de casos de cáncer de piel asociado principalmente a la exposición crónica a la RUV. Esta neoplasia puede afectar a cerca de 2 a 3 millones de personas al año, a nivel mundial (Alfaro-Sánchez *et al.*, 2016). El cáncer de piel no melanómico es de las neoplasias más comunes en México y su incidencia ha aumentado en los últimos años (Hernández-Zarate *et al.*, 2012).

### **2.3 Inflamación inducida por exposición a la radiación ultravioleta**

La inflamación es una respuesta defensiva del organismo en la que intervienen distintas células y mediadores. Se produce con el fin de eliminar y reparar el daño generado por un agente nocivo como patógenos, tejido necrótico, agentes químicos o físicos. Dependiendo de cuánto dure la inflamación, ésta puede clasificarse como *aguda*, que va de unos pocos minutos a días, o *crónica*, cuando continúa de semanas a meses. La evolución de la inflamación de un estadio agudo a uno crónico depende de la eliminación del estímulo nocivo y de la

reparación del tejido lesionado. Pese a que la inflamación es un mecanismo defensivo, también genera lesiones tisulares (Kumar *et al.*, 2013).

La RUV ocasiona inflamación en la piel y se manifiesta, de forma visible, con el eritema. La exposición a la RUV-B induce la aparición de queratinocitos apoptóticos, conocidos como células de quemadura y genera fotoproductos de DNA. Esto promueve la formación de mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Fitzpatrick *et al.*, 2014) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) los cuales inician la respuesta inflamatoria (Saewan y Jiamtaisong, 2015).

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, formadas por la RUV, oxidan las membranas celulares además de dañar al DNA y las proteínas (Katiyar *et al.*, 2001). En respuesta al daño celular, se forman citocinas proinflamatorias que generan inflamación local y llegan a desregular al sistema inmune (Saewan y Jiamtaisong, 2015).

La respuesta inflamatoria provocada por la RUV es inicialmente aguda. Sin embargo, si permanece de forma constante sin eliminar el estímulo nocivo, la respuesta pasa a ser del tipo crónica (Kumar *et al.*, 2013).

En la inflamación crónica ocurren cambios en el tejido afectado y puede llegar a suceder el infiltrado de células del sistema inmune como es el caso de linfocitos, monocitos, macrófagos, células plasmáticas, mastocitos y, en algunos casos, eosinófilos. También se observa destrucción tisular, inducida por los productos de células inflamatorias y señales de reparación, como es la aparición de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y fibrosis (Kumar *et al.*, 2013).

La inflamación crónica participa de forma importante en la progresión de los estadios premalignos y malignos de las neoplasias (Hanahan y Weinberg, 2011). La presencia y activación de células del sistema inmune (macrófagos, mastocitos, linfocitos, neutrófilos, células NK) en el tejido puede promover un microambiente favorable para el desarrollo de la neoplasia (Varricchi *et al.*, 2017). Estas células liberan factores de crecimiento, proliferación, promotores angiogénicos y proteínas que degradan la matriz extracelular, lo que facilita el desarrollo tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011).

### **Mastocitos**

Algunas de las células del sistema inmune que se encuentran en la piel son los mastocitos, también conocidos como *células cebadas*. Se encuentran en zonas con abundante tejido conjuntivo, como la dermis. Ellas liberan, mediante su desgranulación, distintos mediadores proinflamatorios o inmunomoduladores, lo cual permite el reclutamiento de diversas células que intervienen en procesos de inflamación y reparación (Rojas *et al.*, 2014). Algunos de los mediadores que

liberan estas células son: histamina, heparina, proteasas, proteoglicanos, TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, leucotrienos, citocinas y factores de crecimiento (Aponte-López *et al.*, 2018).

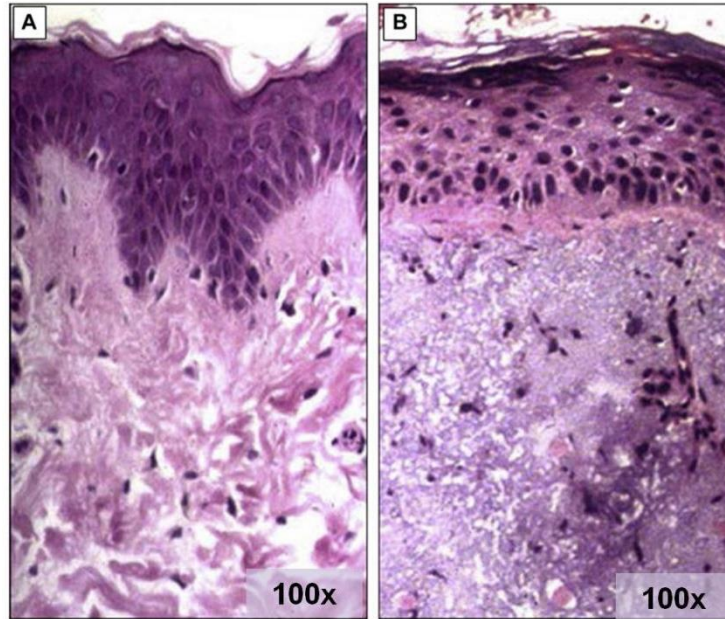
Debido a su actividad como reguladores de la inflamación y reclutadores de otras células, se ha estudiado el papel de los mastocitos en la progresión o remisión de distintas neoplasias (Varrichi *et al.*, 2017). La presencia de estas células se ha asociado con la progresión de algunos carcinomas. Por ejemplo, en el caso de lesiones de queratosis actínica, donde se observó el incremento de células cebadas, estas lesiones progresaron rápidamente a carcinoma de células escamosas. También se ha correlacionado la presencia de mastocitos con una mayor progresión del carcinoma de células basales y con el aumento en la angiogénesis en melanomas (Siiskonen *et al.*, 2018).

## **2.4 Fotoenvejecimiento**

El envejecimiento acelerado, por acción de la RUV, hace que la piel presente un aspecto seco, con pigmentación, más áspero, desgastado; también muestra un mayor número de arrugas y un incremento en la angiogénesis (Jadoon *et al.*, 2015). Estos cambios se deben a la acción de la RUV en la dermis. Se induce la producción de metaloproteinasas que degradan al colágeno de tipo I, el colágeno más abundante en la piel, y el tipo III, responsable de la elasticidad y la tensión de la piel. Además, los productos de la degradación del colágeno inhiben la síntesis de nuevas fibras de colágena (Baron *et al.*, 2014).

Otro factor implicado en el fotoenvejecimiento es el daño causado por el estrés oxidativo. La RUV, como se ha mencionado anteriormente, participa en la formación de ERO, las cuales dañan el tejido y participan en procesos de envejecimiento y muerte celular (Jadoon *et al.*, 2015).

En piel que ha sido expuesta de forma crónica a la RUV y que desarrolla fotoenvejecimiento se puede observar, a nivel histológico se han reportado atrifia de los queratinocitos o engrosamiento de la epidermis, mientras que en la dermis, las fibras de colágena se presentan anormales y hay pérdida de las fibras elásticas, esto último causa la elastosis solar. En la figura 2 se compara piel normal y piel que presenta fotoenvejecimiento, donde se observan queratinocitos y fibras de colágena anormales (Han *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Comparación entre piel normal (A) y piel con fotoenvejecimiento (B).  
(Fotomicrografía de Han *et al.*, 2014).

## 2.5 Cáncer de piel

Distintas neoplasias se pueden desarrollar en la piel y depende de su tipo celular si desarrollará un tumor distinto. Las neoplasias se dividen, principalmente, en cáncer de piel *no melanoma*, que incluye al carcinoma de células basales, el *carcinoma espinocelular* y el *adenocarcinoma* de glándulas sebáceas y el *melanoma*. Este último se origina en los melanocitos y es la forma más agresiva del cáncer de piel (Castañeda y Eljure, 2016).

El cáncer de piel es resultado de varios factores: la predisposición genética, la sensibilidad a la exposición solar, el tipo de piel y la exposición a la RUV sin protección y de forma prolongada (Castañeda y Eljure, 2016; Kumar *et al.*, 2013).

La exposición crónica a la RUV genera diversos cambios que permiten el desarrollo del cáncer de piel, genera daños al DNA, inestabilidad genética (Liu-Smith *et al.*, 2017), daño oxidativo, induce el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Baron y Suggs, 2014) aguda y crónica, así como la inmunosupresión (Varrichi *et al.*, 2017).

En los últimos años, se ha registrado un aumento en la incidencia de cáncer de piel a nivel mundial. Se ha triplicado, en la última década, con 160,000 registros de melanoma y entre dos a tres millones de casos registrados anualmente de cáncer de piel no melanoma (Hernández-Zarate *et al.*, 2012). En México, el carcinoma basocelular es el más común, seguido del carcinoma epidermoide y, por último, se

ubica el melanoma, y se reporta que ha aumentado la incidencia de esta última neoplasia (Alfaro-Sánchez *et al.*, 2016).

## 2.6 Fotoprotección

Ya que existe una preocupación por los efectos dañinos provocados por la RUV (como serían el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel), muchas estrategias se centran en buscar nuevas formas para prevenir dichos efectos. La fotoprotección es una estrategia preventiva y terapéutica, frente a los efectos perjudiciales de la luz solar. Estas estrategias incluyen el evitar exponerse durante las horas de mayor incidencia de luz solar, el uso de ropa y accesorios que bloqueen la RUV y el uso de fotoprotectores tópicos (Gilaberte y González, 2010).

Un fotoprotector, idealmente, debe de ser capaz de absorber la RUV-A y RUV-B, debe evitar la producción de ERO por daño solar (Arellano-Mendoza *et al.*, 2014), debe absorber directamente los fotones, inhibir la inflamación crónica, no permitir la actividad antioxidante, además de ser seguro para la salud del ser humano y seguro para el medio (Gilaberte y González, 2010).

Las sustancias que componen a los fotoprotectores presentan complejos moleculares que pueden absorber, reflejar o dispersar los fotones de la RUV (Gilaberte y González, 2010). Existen, por lo menos, dos grandes grupos de sustancias empleadas en los fotoprotectores. En primer lugar tenemos a las *sustancias inorgánicas*, sales minerales, que brindan protección de amplio espectro frente a la RUV. Sin embargo, estas sustancias presentan reacciones adversas como la producción de irritación e imperfecciones en la piel (Arellano-Mendoza *et al.*, 2014).

El otro grupo de protectores son los *compuestos orgánicos*, que en su mayoría presentan grupos aromáticos, conjugados con grupos carbonilo lo que les permite absorber (Saewan *et al.*, 2015), dispersar y reflejar la energía proveniente de la RUV (Arellano-Mendoza *et al.*, 2014).

Como una alternativa o en conjunto a los fotoprotectores tradicionales, se ha investigado el uso compuestos de origen natural con potencial acción antioxidante y fotoprotectora los cuales pueden prevenir el daño inducido por la RUV (Afaq, 2011).

## 2.7 Fotoprotección con productos naturales

Los extractos provenientes de plantas se han usado dentro de la medicina tradicional y para el cuidado de la piel. Dichos extractos son una mezcla compleja de compuestos químicos cuyas propiedades biológicas se deben a la acción de

una sustancia o el efecto sinérgico de varios de sus constituyentes. Estos compuestos activos pertenecen al grupo de metabolitos secundarios, también conocidos como *productos naturales* (Oumeshi, 2001; Surber y Smith, 2005).

Los metabolitos secundarios son biomoléculas que no participan directamente en el crecimiento, desarrollo o reproducción de los organismos que los producen (Buchanan *et al.*, 2000). Sin embargo, participan en su adaptación y defensa frente al estrés biótico o abiótico además de la transducción y coordinación de señales (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). A este grupo de biomoléculas se le ha dividido en tres grandes grupos: compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides (Korkinka, 2008).

Varios de los metabolitos secundarios presentes en las plantas participan en la adaptación a la RUV, como los polifenoles, polifenoles glicosilados y los triterpenos (Kostyuk *et al.*, 2018). Estos compuestos pueden actuar como antioxidantes y pantalla contra la RUV (Afaq, 2011).

### **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener, al menos, un grupo fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Buchanan *et al.*, 2000). Una de sus principales vías de síntesis es la ruta del ácido shikímico. Son un grupo muy diverso de metabolitos que pueden ser desde compuestos simples y pequeños como el ácido gálico hasta complejos polímeros como la lignina (Burlando *et al.*, 2010). Algunos de los compuestos más comunes dentro de este grupo son los ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos (Serafini *et al.*, 2015).

Los compuestos fenólicos participan en la adaptación de las plantas. Estos compuestos presentan actividad antimicrobiana, antifúngica, refuerzan la pared celular de las plantas (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). También evitan el daño por estrés abiótico como son la alta concentración de sales y la RUV. Frente al aumento de la RUV, se incrementa la producción de compuestos fenólicos en las plantas, lo cual previene el daño ocasionado (Korkinka *et al.*, 2008).

### **Antecedentes**

#### **2.8 *Hyptis mociniana* (Benth)**

La *Hyptis mociniana*, del género *Hyptis*, cuenta con 380 especies de las cuales 35 se encuentran en México. Perteneció a la familia Labitae, la cual posee importancia económica debido a su uso ornamental, alimenticio y medicinal (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).



## Género *Hyptis*

Diversas plantas del género *Hyptis* han presentado actividades biológicas de interés debido a los metabolitos secundarios que presentan. A continuación, se muestran algunos antecedentes relacionados con la actividad fotoprotectora o antiinflamatoria.

**Tabla 1.** Antecedentes del género *Hyptis*.

Año	Autor	Especie	Actividad	Compuestos
1972	Seth <i>et al.</i>	<i>H. emory</i>	Antitumoral en carcinoma de Walker 256.	Triterpenos, ácido betulínico.
2006	Edeoga <i>et al.</i>	<i>H. suaveolens</i>		Alto contenido de fenoles y alcaloides.
2013	de Lima	<i>H. fruticulosa</i>	Antioxidante (TBARS) y antinociceptiva, modelos de formalina, capsaicina y glutamato en ratón.	El extracto hidroxietanólico contiene fenoles, flavonoides, taninos y terpenos.
2013	Caldas <i>et al.</i>	<i>H. martusi</i>	Antioxidante (DPPH), gastroprotectora y antiinflamatoria, reduce niveles de histamina en ratones.	Los compuestos mayoritarios del aceite esencial son 1,8-cineol y 3-careno.
2014	Ghaffari <i>et al.</i>	<i>H. suaveleons</i>	Antioxidante (DPPH y ABTS), aumenta la viabilidad celular en células N2A.	El extracto metanólico presenta fenoles y flavonoides.
2017	Anjos <i>et al.</i>	<i>H. umbrosa</i>	Antinocicepción en los modelos de formalina glutamato-capsaicina en pata de ratón, antiinflamatorio en el modelo de peritonitis inducida por carragenina.	Reportan epicatequina, rutina, isoquercetina, quercetina, apigenina en el extracto metanólico.

*Hyptis mociniana* (Figura 3) es un arbusto delgado que puede alcanzar hasta los 3 m de altura, con un tallo erecto y ramas recurvadas, cubiertas por tricomas. Sus hojas son opuestas, pecioladas, ovadas con márgenes dentados irregulares, cubiertas por tricomas. Su inflorescencia es pequeña, dispuesta en grupos densos en la parte terminal de las ramas, con hojas reducidas acompañando a la inflorescencia. La flor tiene un cáliz tubular, cubierto por tricomas; el ápice se divide en 5, la corola es de color blanco y el tubo hacia el ápice se divide en cinco lóbulos redondeados y cortos, presenta cuatro estambres (Standley y Williams, 1973).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Hyptis mociniana* (Benth).

<b>Reino</b>	Plantæ
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Labiatae
<b>Género</b>	<i>Hyptis</i>
<b>Especie</b>	<i>Hyptis mociniana</i> (Benth)

Es una planta que se puede encontrar en zonas perturbadas de los trópicos, cercano a bosques de pino-encino y selva baja caducifolia. En el continente americano se distribuye desde México hasta Costa Rica. En México, se ha reportado su presencia en los estados de Chihuahua, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Veracruz y Zacatecas (Standley y Williams, 1973).

En 2002, Domínguez-Vázquez y Castro-Ramírez reportaron el uso etnobotánico de *H. mociniana* para tratar hinchazones y edema. Mientras que, en 2018, Nolasco realizó el estudio fitoquímico donde reporta que el extracto metanólico de *H. mociniana* se compone principalmente de compuestos fenólicos. A pesar de que no llegó a reconocer los metabolitos que lo componen, identificó compuestos similares a la rutina y apigenina. Además, menciona que la actividad antioxidante del extracto es buena y probó su actividad fotoprotectora en un modelo bacteriano donde el extracto protegió a las bacterias de la RUV.

Zamora-Salas, en 2018, evaluó la actividad fotoprotectora del extracto metanólico de *H. mociniana* en dos modelos agudos de irradiación en la línea de queratinocitos HaCaT. Allí observó un aumento de la viabilidad celular y, en los ratones SKH-1, disminuyó el eritema, las lesiones microscópicas y la inflamación, reportada en número de mastocitos.

En el laboratorio de fitoquímica se ha continuado con la investigación sobre los compuestos presentes en el extracto metanólico de *H. mociniana* y sus actividades. Por ello, se sabe que el extracto contiene isoquercetina, rutina y ácido rosmarínico además de que posee una buena actividad antioxidante (Espinosa-González *et al.*, 2020; documento en revisión).



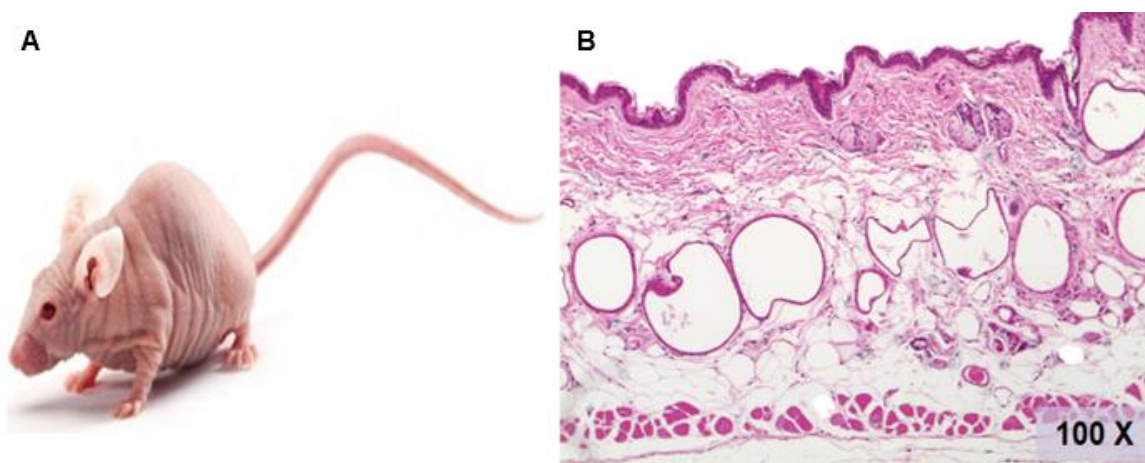
**Figura 3.** *Hyptis mociniana* (Benth) (Hanan *et al.*, 2009).

## 2.9 Modelo biológico

Como modelo experimental para este trabajo se eligieron a los ratones SKH-1. Esta cepa se caracteriza por perder el pelo a las tres semanas de nacidos (Figura 4), resultado de una mutación en el gen *Hr* lo cual evita la necesidad de depilarlos o rasurarlos. Así se elimina la inflamación asociada al retirar el pelo. No presentan eumelanina, por lo que son sensibles a la RUV, su piel es más permeable a distintos compuestos y son inmunocompetentes (Benavides *et al.*, 2009).

Esta cepa de ratones se ha usado como modelo para observar los efectos de los RUV de forma aguda, crónica y para estudios de fotoprotección, gracias a la pérdida de pelo, tamaño, manejo y el parecido de su piel a la humana (Figura 4) (Sharma *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2003; Divya *et al.*, 2015).

Los ratones SKH-1, después de ser expuestos de forma aguda o crónica a la RUV, presentan reacciones similares a la de la piel humana, como el engrosamiento de la epidermis, el eritema, inflamación, degradación de fibras de colágena, fotoenvejecimiento y el desarrollo de tumores similares a las neoplasias humanas (Benavides *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011).



**Figura 4.** (A) Ratón hembra SKH-1 adulto (Charles River Laboratories); (B) fotomicrografía de piel de ratón SKH-1.

### 3 Justificación

Frente al aumento en la incidencia de cáncer de piel a nivel mundial, se han buscado nuevas alternativas a los fotoprotectores tradicionales que, además de brindar un efecto de pantalla, protejan a la piel de otras consecuencias de la exposición a la RUV. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *Hyptis mociniana* (EMHM) frente a la exposición crónica a la RUV en piel de ratones SKH-1.

### 4 Pregunta científica

*¿El extracto metanólico de *H. mociniana* protege la piel de ratones SKH-1 de la RUV a largo plazo?*

### 5 Hipótesis

Si el extracto metanólico de *H. mociniana* presenta compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y estos también pueden tener actividad fotoprotectora, entonces el extracto metanólico de *H. mociniana* protegerá a la piel de los daños causados por la RUV en un modelo crónico.

### 6 Objetivos

#### 6.1 Objetivo

Evaluar el efecto fotoprotector del extracto metanólico de *Hyptis mociniana* (EMHM) en la piel de ratones SKH-1 expuestos a la RUV de forma crónica.

## 6.2 Objetivos particulares

- Inducir daño por RUV en piel de ratones SKH-1.
- Evaluar los daños macroscópicos ocasionados por la RUV en la piel de los ratones SKH-1 con y sin protección del extracto metanólico de *H. mociniana*.
- Evaluar los cambios histológicos ocasionados por la RUV en la piel de los ratones SKH-1 con y sin protección del extracto metanólico de *H. mociniana*.
- Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *H. mociniana* en piel de ratones SKH-1 por medio del conteo de mastocitos.

## 7 Materiales y métodos

El extracto metanólico de *H. mociniana* (EMHM) fue obtenido en el laboratorio de Fitoquímica en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (Nolasco, 2018).

### 7.1 Experimento de fotoprotección

El experimento de fotoprotección, se realizó en el laboratorio de Fitoquímica en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO). Se utilizaron 20 ratones hembra SKH-1, los cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad, en condiciones de esterilidad, con alimento y agua *ad libitum*, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los ratones SKH-1 se dividieron en 4 grupos de cinco ratones cada uno a los cuales se les aplicó, de forma tópica en la zona dorsal, distintos tratamientos según su grupo:

- *Grupo control negativo (C-)*: 200  $\mu$ L de etanol al 70% sin exposición a la RUV.
- *Grupo control positivo (C+)*: 200  $\mu$ L de etanol al 70% antes de su exposición a la RUV.
- *Grupo experimental con extracto metanólico de H. mociniana (EMHM)*: 200  $\mu$ L de solución de EMHM disuelta en etanol con una concentración de 2 mg/cm<sup>2</sup> sin exposición a la RUV.
- *Grupo experimental con extracto metanólico de H. mociniana expuesto a la RUV (EMHM UV)*: 200  $\mu$ L de solución de EMHM disuelta en etanol con una concentración de 2 mg/cm<sup>2</sup> previa a la exposición a la RUV.

El experimento de fotoprotección empezó simulando la fase de iniciación durante los primeros 10 días. Se les aplicaron los tratamientos según las indicaciones de cada grupo para, después, ser irradiados con una dosis de RUV-B 6 mJ/cm<sup>2</sup> por

un minuto, de forma diaria. Luego del periodo de iniciación, se continuó con los tratamientos y la irradiación de los ratones cada tercer día durante un minuto, hasta completar las 33 semanas del experimento (Espinosa-González, 2016).

Durante el periodo de irradiación, se registró semanalmente el número de lesiones que se presentaron en los ratones para obtener la *incidencia*, es decir, el porcentaje de individuos que mostraron lesiones. También se registró la *multiplicidad*, la cual se define como el número total de lesiones presentes por grupo (Espinosa-González, 2016; Cruz Toscano, 2015).

Al finalizar las 33 semanas, los animales se sacrificaron con pentobarbital y se tomaron muestras de piel de la zona dorsal, en regiones con lesiones macroscópicas y sin lesiones visibles.

Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 24 h. Después, pasaron por un proceso de deshidratación en un tren de alcohol etílico (70, 80, 90, 96 y dos cambios de 100%), para luego ser aclaradas en xilol. Posteriormente, fueron infiltradas e incluidas en parafina. Finalmente se realizaron cortes de 5  $\mu$ m (Anexo 1) por medio de un micrótopo Leica de rotación y se tiñeron.

Se realizaron dos tinciones: a) *hematoxilina y eosina* (HE), que es una tinción general que permite identificar las estructuras presentes en una muestra biológica (Anexo 2); b) *tinción de azul de toluidina* que tiñe de forma específica los gránulos de histamina presentes en los mastocitos (Anexo 3).

## 7.2 Análisis histológico

Se reportaron los cambios y daños histológicos observados en las muestras de piel teñidas con HE. Para ello, se siguió la clasificación de las lesiones histológicas que se han reportado y que se pueden cotejar en la Tabla 3. Dicha clasificación se realiza en términos de: a) *gravedad*, que es la severidad de los daños celulares y tisulares, b) *extensión*, definidos como el porcentaje de campos por muestra en los que se observó el daño (Cruz-Toscano, 2015; Montuenga et al., 2009; Espinosa-González, 2016).

La gravedad o grado se clasificó en: leve, cuando se observan cambios incipientes, consistentes en degeneración celular, así como signos tempranos y escasos de los daños histológicos, se ve en menos del 20% del campo de observación; moderado, se observan cambios bien definidos y abundantes, que se observan del 20-50% del campo de observación y grave/ severo las células muestran daños evidentes y marcados, principalmente necrosis y en el caso de infiltrado inflamatorio es abundante y presenta linfocitos células plasmáticas, esto en más del 50% de campo de observación (Espinosa-González, 2016; Benítez-Flores, 2020 comunicación personal).

La extensión, igualmente se midió en tres niveles: *focal* (menos del 20% de campos observados por muestra), *multifocal* (20-50% de campos de la muestra) y *difuso* (más de 50% de la muestra) (Cruz-Toscano, 2015; Montuenga *et al.*, 2009; Espinosa-González, 2016).

Después de realizar el análisis histológico, los resultados se clasificaron como: *hiperplasia*, *queratosis actínica* y *carcinoma*, según las características de las lesiones que se mencionan en la Tabla 4. El identificar estas lesiones permite observar el efecto crónico de la RUV sobre la piel sin protección (Espinosa-González, 2016).

Los daños reportados en la Tabla 3 son lesiones histológicas que, de forma individual, indican daño celular en la piel el cual es producto de la RUV, mientras que la clasificación en las lesiones presentes en la Tabla 4 permite observar el daño crónico ocasionado por la RUV y la progresión de lesiones a carcinomas.

Los resultados obtenidos de clasificar las observaciones de las muestras según las Tablas 3 y 4 se registraron en porcentaje de extensión y luego analizaron mediante la prueba de ANOVA y la prueba de Dunnet con el programa Graph Pad Prism.

**Tabla 3.** Daños histológicos presentes en la piel de los ratones SKH-1 ocasionados por la exposición crónica a la RUV (Stevens *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2013; Espinosa-González, 2016)

<b>Estrato</b>	<b>Daño</b>	<b>Descripción</b>
Estrato córneo	Paraqueratosis (Pq)	Presencia de núcleos fusiformes en el estrato córneo, queratina del estrato córneo anormal (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Hiperqueratosis (Hq)	Aumento o engrosamiento del estrato córneo (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
Epidermis	Espongiosis (Es)	Edema intraepidérmico (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Apoptosis/células de quemadura (Cq)	Células con cromatina condensada y citoplasma eosinófilo, presencia de cuerpos apoptóticos y en algunos casos la célula puede retraerse (Kumar <i>et al.</i> , 2013).
	Disqueratosis (Dis)	Queratinización anticipada de las células epidérmicas (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Necrosis (Ne)	Muerte celular con pérdida de la integridad de la membrana (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Hipertrofia (Ht)	Aumento del tamaño celular (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Atrofia (At)	Disminución del tamaño de las células por la pérdida de la sustancia celular (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Hiperplasia (Hp)	Aumento en el número de capas en la epidermis, por proliferación celular (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Pleomorfismo (Pl)	Células que presentan variación en la forma y tamaño. Presentan núcleos hiper cromáticos con variación en el tamaño (Kumar <i>et al.</i> , 2013).
	Displasia (Ds)	Proliferación desorganizada con pérdida de la uniformidad celular, mitosis abundante y frecuentemente anómalas (Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	Neoplasia (Neo)	Aumento de la proliferación celular (Stevens <i>et al.</i> , 2003). Presenta atipia celular (Kumar <i>et al.</i> , 2013).
	Angiogénesis (Ag)	Formación de vasos sanguíneos cerca de un tumor (Stevens <i>et al.</i> , 2003)
Acantosis (Ac)	Engrosamiento irregular de la epidermis con la presencia de prolongaciones hacia la dermis (Kumar <i>et al.</i> , 2013).	
Dermis	Edema (Ed)	Acumulación de líquido en el intersticio (Kumar <i>et al.</i> , 2013).
	Hemorragia (HM)	Extravasación de eritrocitos a la dermis (Espinosa-González, 2016).
	Infiltrados inflamatorios (If)	Presencia de células del sistema inmune, neutrófilos, macrófagos y mastocitos (Espinosa-González, 2016)
	Congestión de vasos sanguíneos (Cg)	Acumulación de eritrocitos en vasos sanguíneos (Espinosa-González, 2016).



**Tabla 4.** Lesiones precancerosas y neoplasia, resultado de la exposición prolongada a la RUV sin protección.

<b>Lesión</b>	<b>Descripción</b>
Hiperplasia	Se presenta el aumento en el grosor de la epidermis con una extensión multifocal (20-50%) a difusa (>50%), acompañado por espongiosis de forma focal (<20%) (Rigel <i>et al.</i> , 2006; Espinosa-González, 2016). Si bien se trata de una respuesta compensatoria frente al estrés, la hiperplasia patológica predispone al desarrollo de carcinomas (Kumar <i>et al.</i> , 2013).
Queratosis actínica	Presenta hiperqueratosis y paraqueratosis con una extensión focal a difusa, atipia celular de las células basales y elongaciones de la epidermis a la dermis (acantosis) (Kumar <i>et al.</i> , 2013).
Carcinoma	Presencia de células atípicas, necrosis, pleomorfismo, displasia de forma difusa, pérdida de la integridad de la membrana basal, invasión a la dermis, perlas de queratina, angiogénesis y acantosis (Kumar <i>et al.</i> , 2013; Espinosa-González, 2016).

### 7.3 Evaluación del efecto antiinflamatorio

La tinción de azul de toluidina se usó para identificar mastocitos, las cuales son células pertenecientes al sistema inmune que contienen gránulos de heparina y/o histamina (Bancroft, *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2014).

El conteo de mastocitos se realizó en toda la extensión de los cortes histológicos, para reportar el promedio de células cebadas por campo. Por último, los datos obtenidos del conteo se sometieron a la prueba de ANOVA y la prueba de Dunnet con el programa Graph Pad Prism.

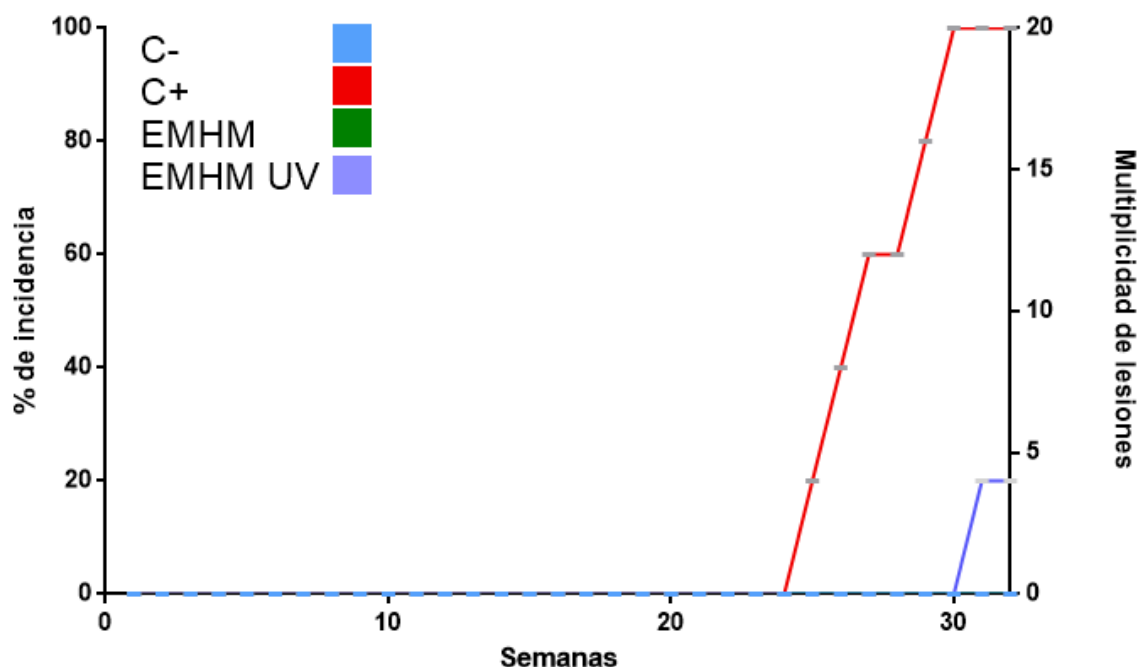
## 8 Resultados

### 8.1 Incidencia y multiplicidad

Durante el experimento de fotoprotección, se registró de forma semanal el número de lesiones visibles a simple vista en los grupos experimentales. En los grupos sin irradiar, C- y EMHM, no se observó lesión alguna. Mientras que en los grupos irradiados, C+ y EMHM UV, se presentaron lesiones resultado de la exposición crónica a la RUV.

El grupo C+, expuesto a la RUV sin ninguna protección, presentó 18 lesiones que se observaron a partir de la semana 25 las cuales están presentes en los 5 ratones del grupo, con un promedio de 3.6 lesiones por individuo y con una incidencia del 100% (Figura 5).

El grupo EMHM UV presentó una lesión macroscópica que se reportó en la semana 31. La incidencia de lesiones en los ratones de este grupo fué del 20% (figura 5).



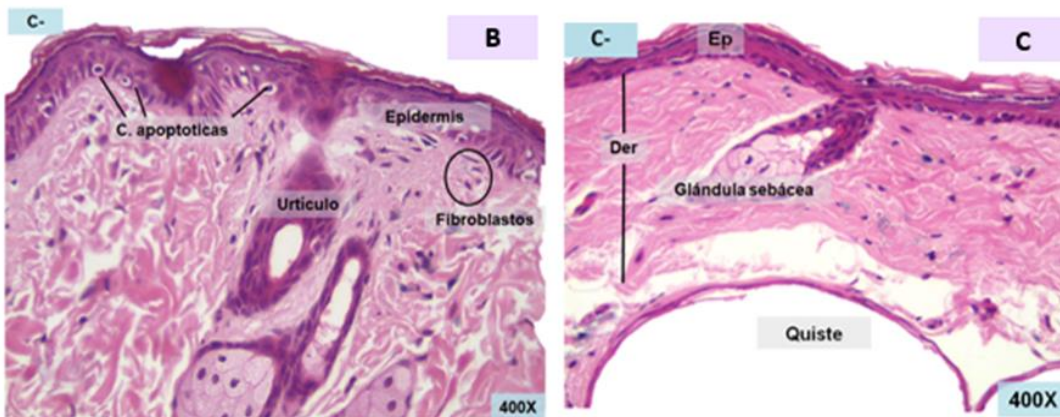
**Figura 5.** Multiplicidad y porcentaje de incidencia de las lesiones presentes en los grupos irradiados con y sin protección.

## 8.2 Análisis histológico

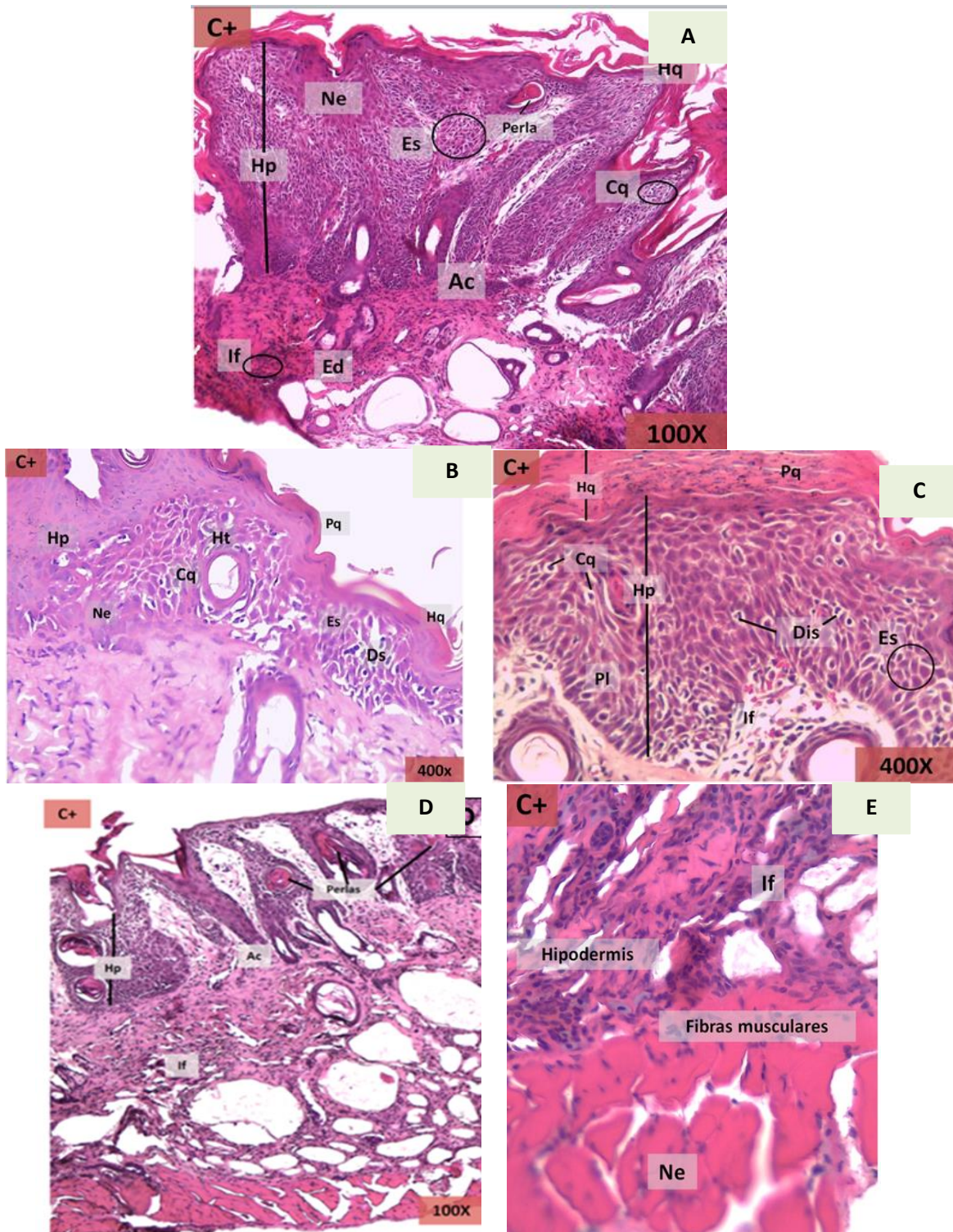
Los cambios histológicos presentes en la piel de los ratones SKH-1 se determinaron a partir de las muestras teñidas con HE. El grupo C- (sin irradiar) se caracterizó por presentar un aspecto normal y no se observaron daños significativos (Figura 11, A). En la epidermis se observaron células apoptóticas y espongiosis. En la dermis, se encontró congestión y edema, los cuales fueron de forma leve y focal, como se muestra en la Figura 6.

El grupo C+ (irradiado) presentó todo el espectro de daños relacionados con la exposición prolongada a la RUV mencionados en las Tablas 2 y 3. En la epidermis se describieron distintos daños como: hiperqueratosis, espongiosis, hiperplasia, displasia, necrosis, neoplasia y acantosis de forma difusa los cuales iban de una gravedad moderada a severa. Otros daños observados fueron: paraqueratosis, células de quemadura, disqueratosis, hipertrofia, atrofia y pleomorfismo de forma focal a multifocal. La dermis mostró edema, hemorragia, congestión e infiltrado inflamatorio de forma multifocal con un daño moderado a grave (Figura 7).

Las estructuras queratinizadas presentes en la epidermis, que se observaron en varias muestras del grupo C+, corresponden a perlas de queratina (Figura 7, parte inferior). En este grupo se observó un cambio en la forma y tamaño de los fibroblastos en comparación al control negativo. Las fibras de colágena presentaron alteración en su forma y grosor (Figura 8).

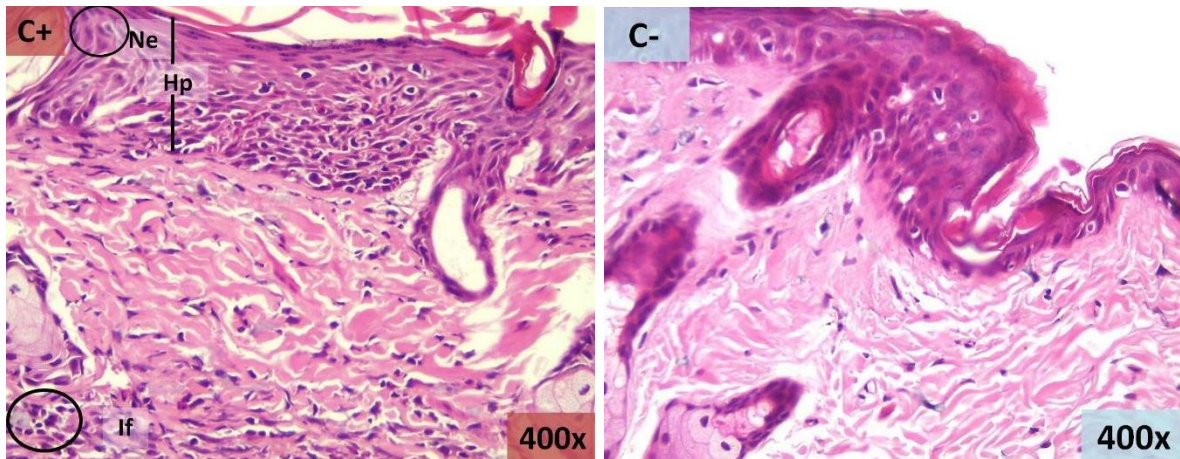


**Figura 6.** Fotomicrografías de piel del grupo control negativo (C-). (A) Epidermis (Ep) delgada, dermis (Der) bien diferenciada, con quistes desarrollados, urticulo, glándulas sebáceas, hipodermis y fibras musculares 100X. (B) Se observa la epidermis con la presencia de células apoptóticas y fibroblastos en la dermis 400X. (C) Se observa la epidermis y dermis y se distingue un quiste y una glándula sebácea.



**Figura 7.** Fotomicrografías de piel del grupo control positivo irradiado (C+). Se observan diferentes lesiones en A, B y C: hiperqueratosis (Hq), paraqueratosis (Pq), hiperplasia (Hp), necrosis (Ne), células de queratina (Cq), displasia (Ds), espongiosis (Es), pleomorfismo (Pl), edema (Ed), infiltrado inflamatorio (If) y edema (Ed).

En D se observan perlas de queratina, acantosis (Ac), infiltrado inflamatorio y en E hay necrosis de las fibras musculares.

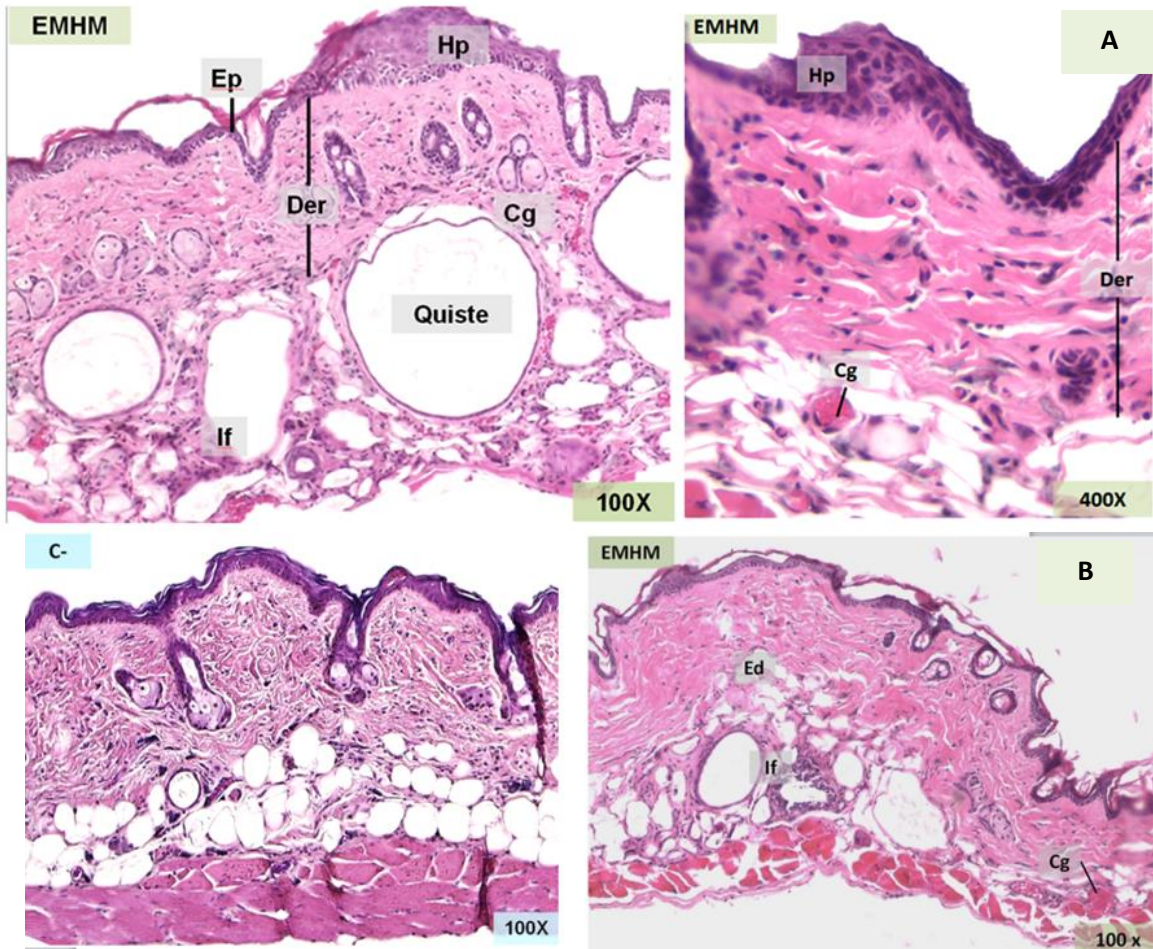


**Figura 8.** Comparación del grupo C- y EMHM UV, junto con fotomicrografías del grupo EMHM UV. Se observan fibras de colágena de los grupos C- (etanol sin irradiar) y C+ (irradiado con etanol). Se observa que en el grupo C+ las fibras son más gruesas y no se logra distinguir una integridad entre ellas. También se observa una mayor cantidad de fibroblastos y aumento de tamaño en estas células.

El grupo al que solo se le aplicó EMHM sin irradiar presentó espongiosis, hiperplasia, células apoptóticas, edema, congestión e infiltrado inflamatorio con extensión focal a multifocal, cuya gravedad iba de leve a moderado. Su aspecto fue similar al del grupo C-, también sin irradiar (Figura 9). Ambos grupos presentaron la menor incidencia y extensión de daños histológicos (Figura 11 A y C).

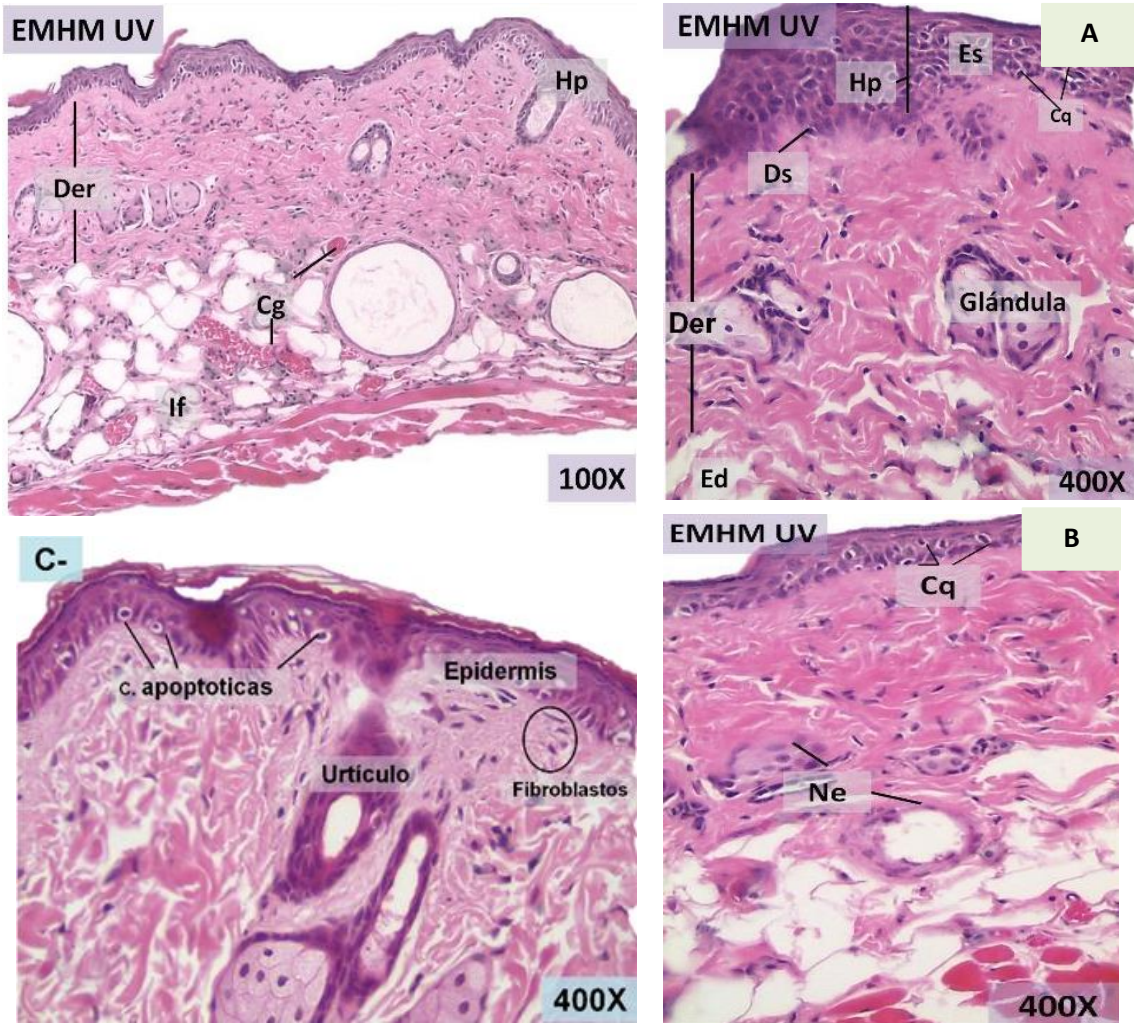
El grupo irradiado y protegido con el EMHM (EMHM UV) presentó daños relacionados con la exposición a la RUV. En él se observó hiperqueratosis, células de quemadura, necrosis, hipertrofia y edema de forma focal, espongiosis, hiperplasia, hemorragia, congestión e infiltrado inflamatorio con una extensión multifocal (figura 10). Al ser comparado con el control C+, el grupo EHMH UV tuvo menos daños histológicos y se observaron en una extensión menor, un 40% menos en relación con el control C+ (Figura 11 B y D).

El grupo EMHM UV en general mostró aspecto similar a los grupos sin irradiar EMHM y C-. Esto nos puede indicar que el EMHM presenta actividad fotoprotectora, reduciendo el tipo de daños, la gravedad y la extensión de estos dado que conservaron una piel similar a la no irradiada (Figura 10).



**Figura 9.** Fotomicrografías de piel en las que se compara el grupo al que se le aplicó el EMHM sin irradiación (A) con el grupo control negativo (B).

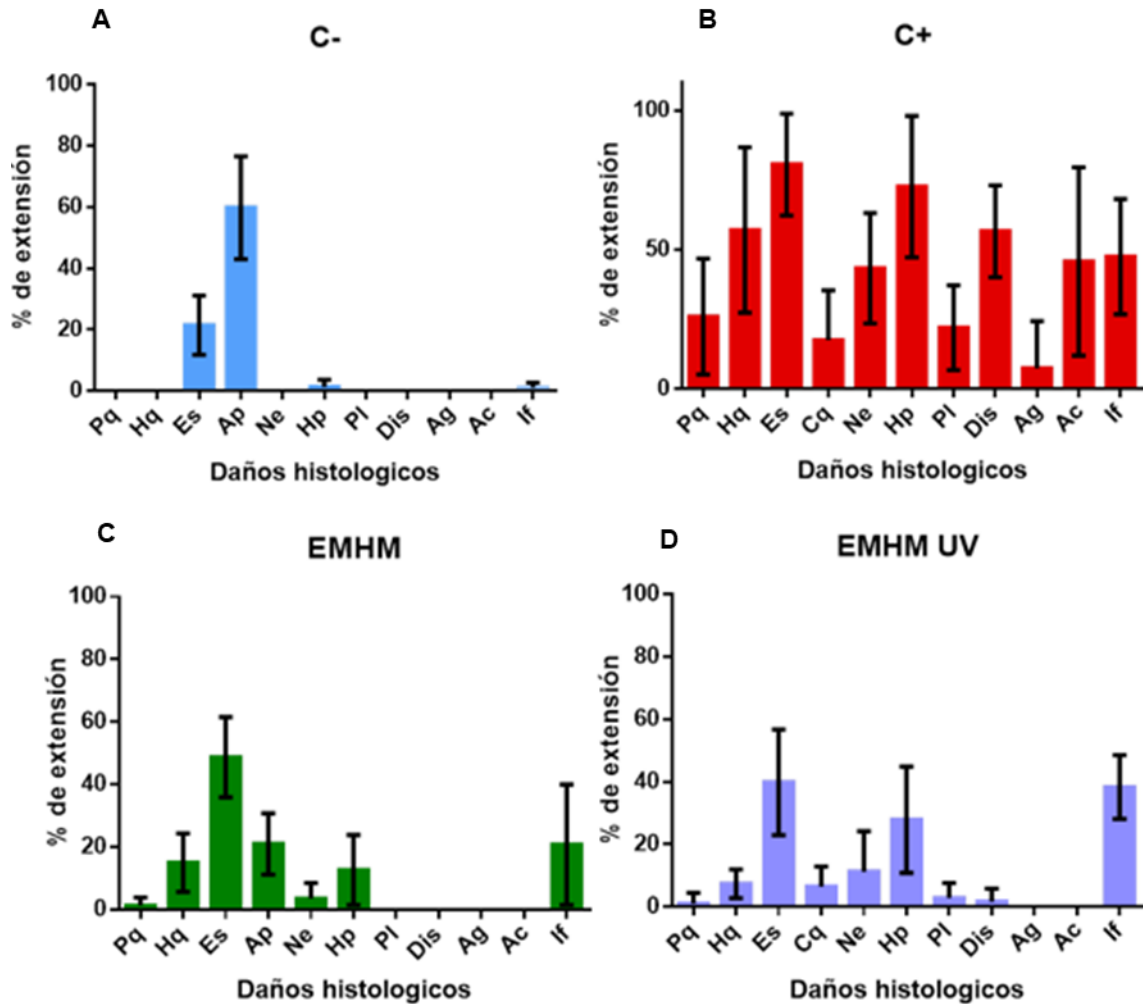
Se puede observar que el grupo EMHM tiene un aspecto similar al del C-: presenta daños asociados a inflamación, pero de forma leve y focal (arriba). Se puede observar hiperplasia (Hp), congestión (Cg) e infiltrado inflamatorio (If) de forma focal y leve (abajo).



**Figura 10.** Fotomicrografías del grupo irradiado con EMHM (EMHM UV) en (A) y comparación con grupo C- en (B).

Se observa hiperplasia (Hp) de forma focal, espongiosis (Es), células displásicas (Ds) y de quemadura (Cq), edema (Ed), congestión (Cg) e infiltrado inflamatorio (If). El grupo EMHM UV difiere levemente del grupo C-.



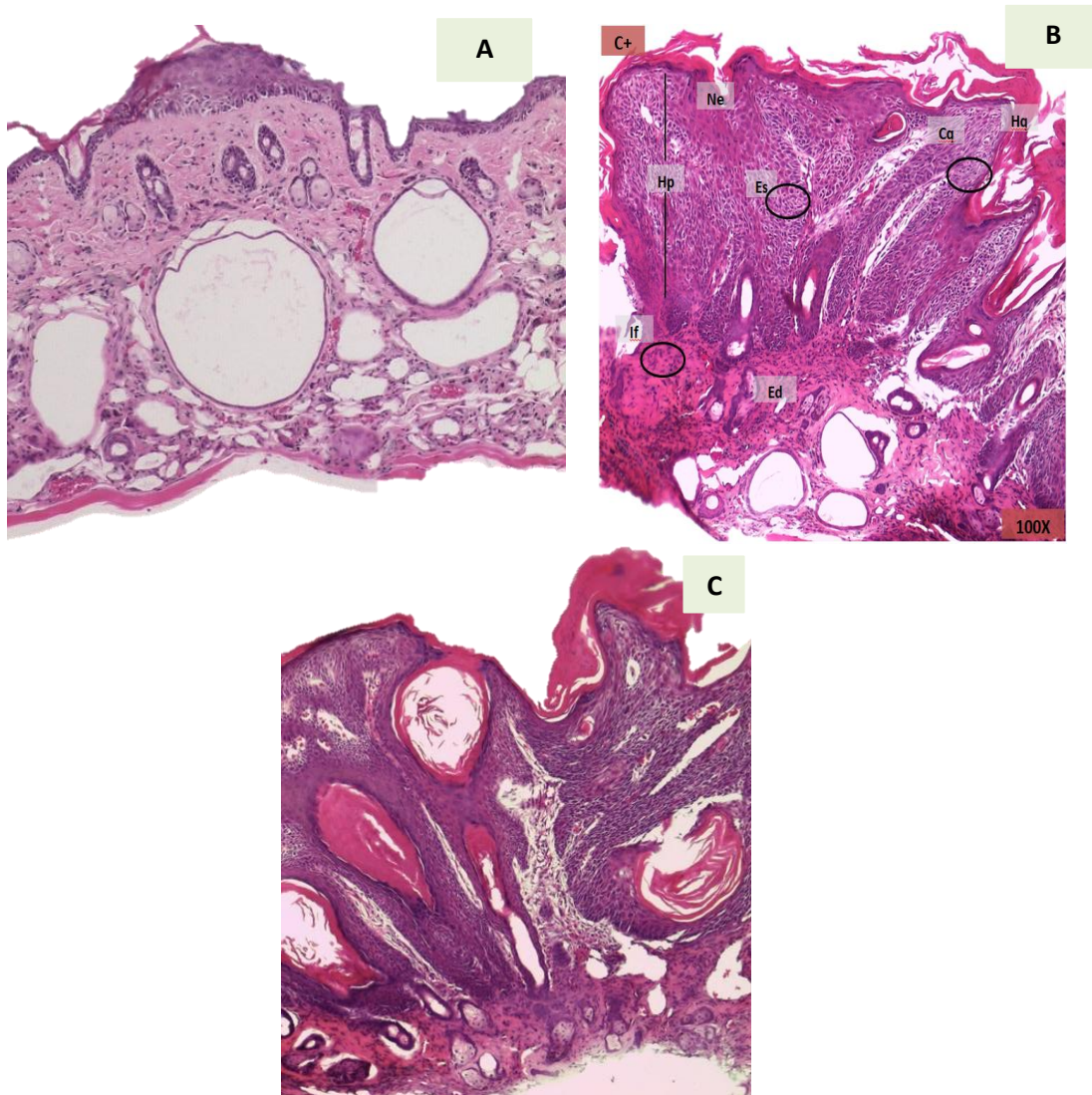


**Figura 11.** Gráficas de extensión de daños histológicos representativos en los distintos grupos experimentales. (A) Control negativo, (C-); (B) Control positivo, irradiado con etanol (C+); (C) EMHM, grupo al que se le aplicó el extracto sin irradiar; (D) EMHM UV, grupo irradiado y protegido con EMHM. Paraqueratosis (Pq), hiperqueratosis (Hq), espongiosis (Es), células apoptóticas (Ap)/ células de quemadura (Cq), necrosis (Ne), hiperplasia (Hp), pleomorfismo (Pl), displasia (Dis), angiogénesis (Ag), acantosis (Ac) e infiltrado inflamatorio (If).

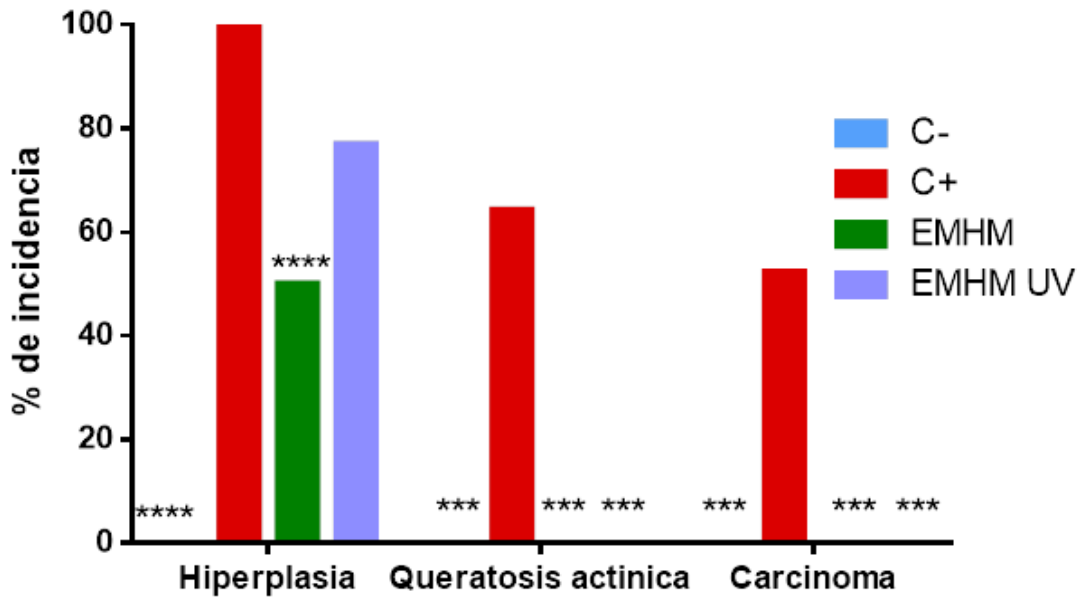
Según la extensión y gravedad de los daños observados en las muestras, se determinó el tipo de lesión presente en cada una, al seguir las características de la Tabla 3 (Figura 12). En la Figura 13 se puede observar las distintas lesiones que se presentaron en los grupos experimentales y la progresión de lesiones producidas por la RUV de forma crónica.

El grupo C-, no irradiado, no presentó ninguna lesión en las muestras analizadas. Mientras que el grupo C+ tuvo una incidencia del 100% de hiperplasia, el 64.22% de las muestras se observó la lesión precancerosa queratosis actínica y el 52.38% mostró un tipo de carcinoma (Figura 13).

El grupo al que se le aplicó el EMHM sin irradiar, presentó una incidencia de hiperplasia del 50%. El grupo EMHM UV, irradiado y protegido con el EMHM, mostró en el 76.62% de las muestras hiperplasia. Con ello se determinó que la lesión macroscópica que se observó en este grupo pertenece a esta clasificación (Figura 13).

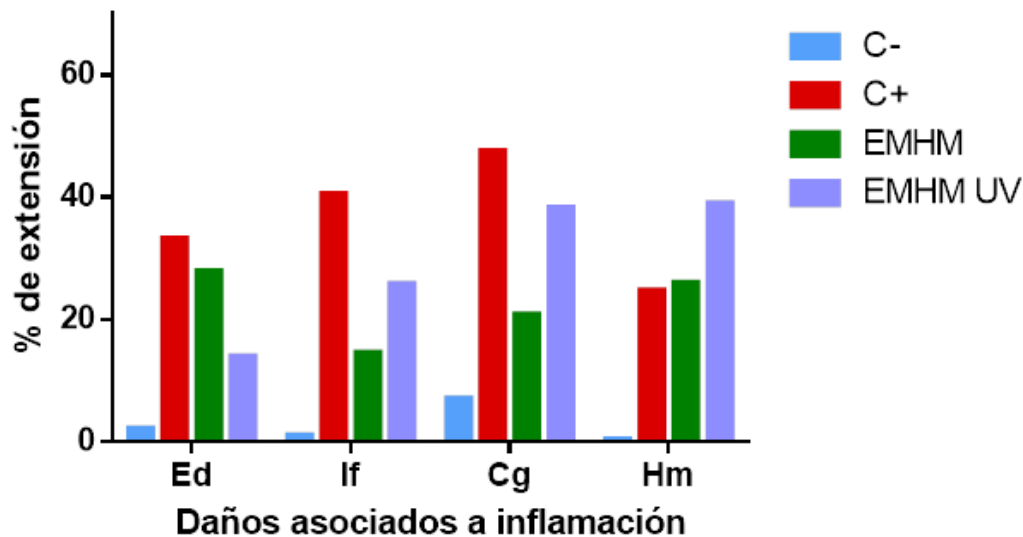


**Figura 12.** Fotomicrografías de las lesiones por exposición crónica a la RUV (100x) (A) hiperplasia (espacio), (B) queratosis actínica y (C) carcinoma.



**Figura 13.** Incidencia de lesiones resultado de la exposición crónica a la RUV presentes en los grupos evaluados. En cada lesión se observaron diferencias significativas respecto al C+ contra los demás grupos (\*)  $p < 0.0001$ .

Se comparó la extensión de los daños asociados a inflamación, edema, congestión, hemorragia e infiltrado inflamatorio entre los grupos evaluados. Como referencia, se usó al grupo C+ para comparar la extensión de estos daños y se observó que el grupo protegido con el EMHM presentó una menor extensión de muestras con edema, infiltrado inflamatorio y congestión. Por su parte el grupo C- se usó como referencia para conocer la presencia de estos daños en piel normal sin irradiar, por esto presenta la menor extensión de estos daños (Figura 14).



**Figura 14.** Porcentaje de extensión de los daños asociados a la inflamación, presentes en la dermis: edema (Ed), infiltrado inflamatorio (If), congestión de vasos sanguíneos (Cg) y hemorragia (He) en los distintos grupos experimentales. Se realizaron las pruebas de ANOVA y Dunnet para observar las diferencias significativas respecto al C+ (\*) ( $p < 0.0001$ ).

### 8.3 Evaluación del efecto antiinflamatorio

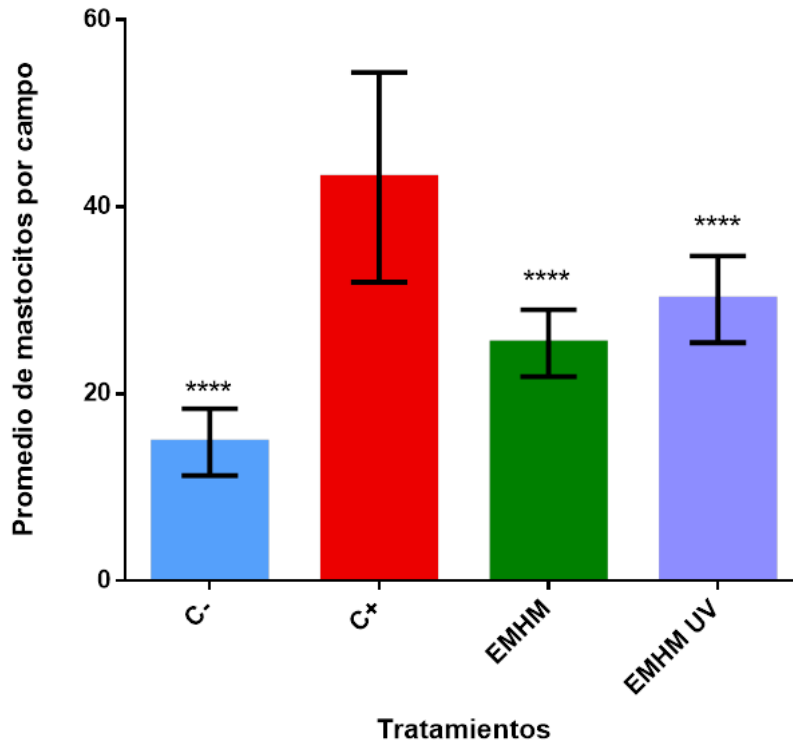
El control negativo (C-) presentó en promedio 14.8 mastocitos por campo, los cuales se encontraron en la dermis y principalmente cerca de los vasos sanguíneos (Figura 17, inferior). Este grupo fue el que tuvo menor promedio de células (Figura 15)

El grupo irradiado con etanol (C+), con un promedio de 43.18 mastocitos, fue el que mostró una mayor densidad de células cebadas (Figura 15). En este grupo, las células cebadas se encontraron en la dermis (Figura 16, superior) y en algunos casos también en la epidermis. En las muestras que presentaron carcinoma se observó una mayor concentración de estas células y fue posible observar mastocitos degranulados en la mayor parte de las muestras.

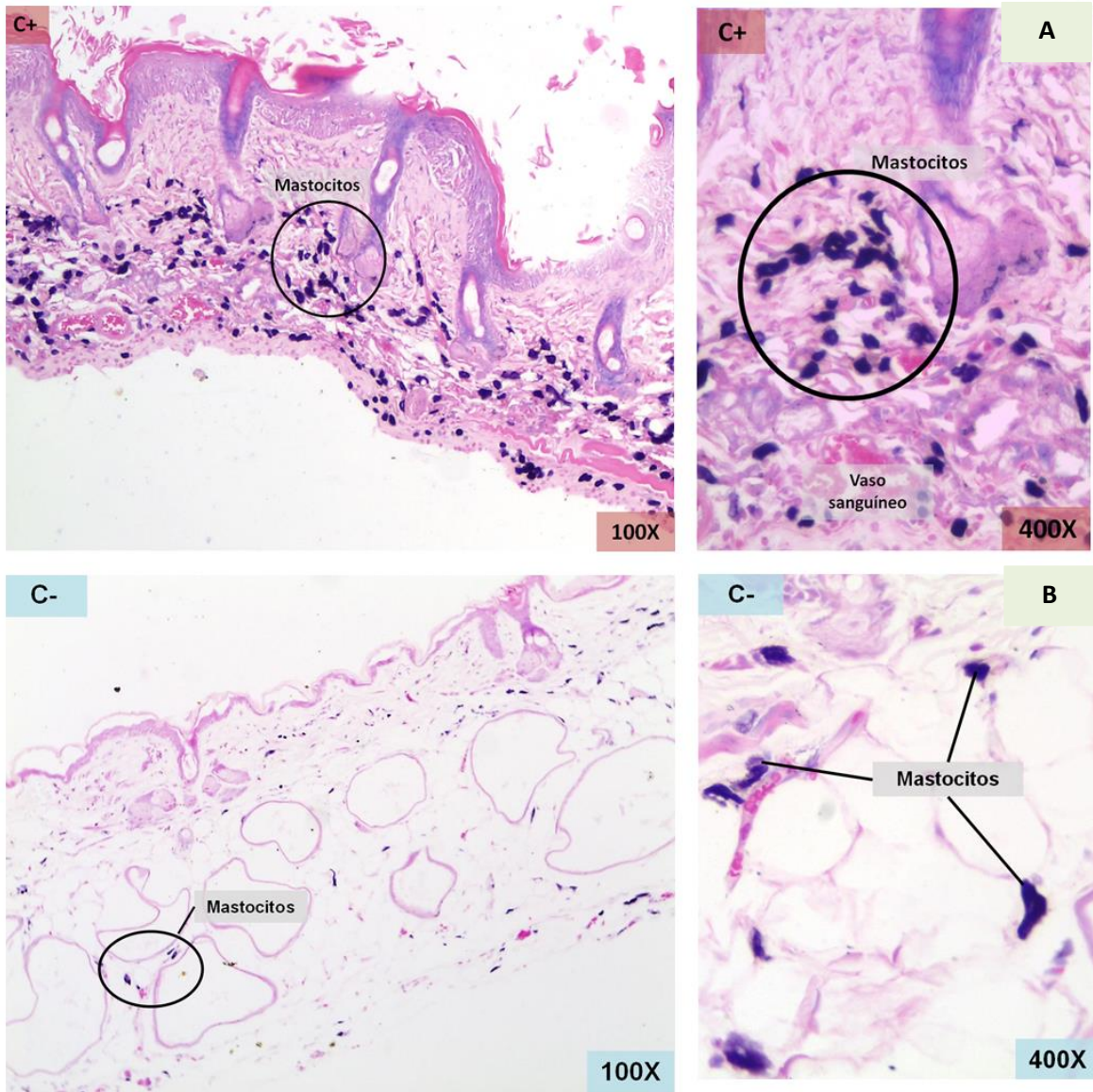
El grupo al que se le aplicó el EMHM sin irradiar (Figura 17, superior) presentó un promedio de 25.44 células por campo (Figura 15). En este grupo no se observaron células cebadas degranuladas y se presentaron diferencias significativas respecto al C+.

El grupo EMHM UV (Figura 17, inferior) tuvo en promedio 30.13 mastocitos por campo (Figura 15). Este grupo presentó un menor número de células

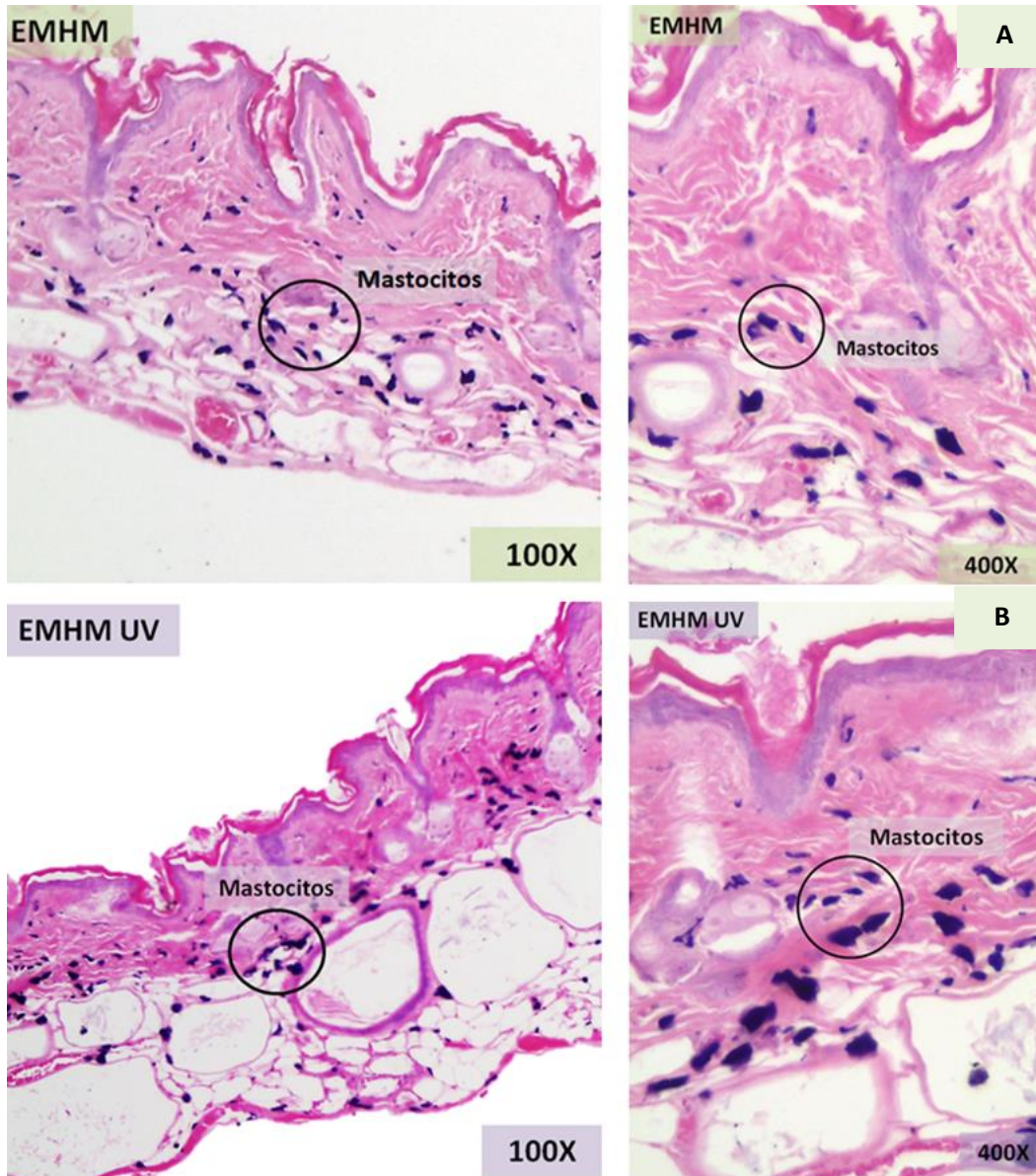
degranuladas. Este grupo mostró diferencias significativas y una disminución en el número de células por campo respecto al C+.



**Figura 15.** Promedio de mastocitos por campo de observación de los distintos tratamientos, se puede observar que los grupos C-, EMHM y EMHM UV presentaron diferencias significativas respecto al grupo C+ ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 16.** Fotomicrografías de secciones histológicas de piel teñidas con azul de toluidina (se observan a las células cebadas de color azul-violeta) de: (A) grupo C+ y (B) grupo C-. Se observa una mayor densidad celular en el grupo C+.



**Figura 17.** En (A), fotomicrografías de la piel. (A) grupo EMHM sin irradiar y (B), EMHM UV. Se pueden observar a las células cebadas en la dermis, hipodermis y cerca de los vasos sanguíneos.

## 9 Discusión

### 9.1 Incidencia y multiplicidad

El grupo C+ presentó lesiones de forma similar a lo que reporta Cruz-Toscano (2015) quien menciona que los ratones SKH-1 del grupo expuesto a la RUV sin protección presentaron lesiones macroscópicas desde la semana 18 y que, al concluir el experimento, este grupo tenía un 100% de incidencia de lesiones.

El EMHM UV disminuyó el número y la incidencia de lesiones macroscópicas, además de retrasar su aparición. Esto sucedió, probablemente, gracias a los compuestos fenólicos que son los componentes mayoritarios del EMHM, en su mayoría compuestos de tipo flavonoide (Nolasco, 2018).

Se han identificado tres compuestos presentes en el EMHM: la isoquercetina, rutina y el ácido rosmarínico. Los dos primeros, son flavonoles, derivados de la quercetina (Estrella-Parra *et al.*, 2020; comunicación personal); mientras que el último es un éster de ácido cafeico (Colica *et al.*, 2018).

Los compuestos fenólicos absorben entre los 340-380 nm, lo que está dentro del espectro de la RUV (Bowsher *et al.*, 2008). Esto permite que actúen como una pantalla solar, protegiendo a la piel de los efectos dañinos de la RUV, lo cual previene la aparición de lesiones.

### 9.2 Análisis histológico

#### Grupos no irradiados

El grupo C- presentó el aspecto normal de la piel de los ratones SKH-1 y mostró dos estructuras características de esta cepa de ratones: el utrículo y los quistes dérmicos (figura 5), cuyas paredes están recubiertas por epitelio plano y en ocasiones se encuentran adipositos en su periferia. El *utrículo* es una estructura en forma de ampolla, rodeada de epitelio hiperqueratinizado, que se encuentra cerca de la superficie de la piel (Benavides *et al.*, 2009).

La presencia de daños histológicos en los grupos no irradiados, (C- y EMHM), puede explicarse por el solvente usado, etanol, el cual puede causar reacciones de inflamación al promover la liberación de citocinas e incrementar la permeabilidad vascular (Neuman *et al.*, 2011).

#### Grupos irradiados

La presencia de edema, hemorragia, congestión e infiltrado inflamatorio en el grupo C+ se asocia con la respuesta inflamatoria (Murphy *et al.*, 2009). La RUV induce inflamación en la piel, produce radicales libres y daña al DNA (Afaq, 2011). Esto se ha observado tanto en ratones como en humanos (Athar *et al.*, 2004).



En las muestras analizadas del grupo C+ se observó que las fibras de colágena que componen a la dermis se encuentran alteradas en comparación con las fibras del grupo C- y presentan poca organización, pérdida de la integridad entre las fibras e infiltración de líquido en la dermis (edema) (Figura 7).

Lo anterior coincide con los resultados de Zhao *et al.* (2018) quienes observaron que el grupo irradiado de forma crónica presentó fibras de colágena distribuidas de forma distinta al control sin irradiar. Estos cambios son resultado de la exposición crónica a la RUV la cual degrada las fibras de colágena y afecta su síntesis. Esto causa la pérdida de la elasticidad de la piel lo cual está motivado principalmente por metaloproteinasas.

Los cambios en el tamaño y forma de los fibroblastos, así como la alteración de las fibras de colágena, coincide con lo que se ha reportado de la elastosis solar (Kumar *et al.*, 2013). La presencia de perlas de queratina en algunas de las muestras del grupo C+ es un indicador del desarrollo de carcinoma espinocelular (Rigel *et al.*, 2006).

El grupo EMHM UV presentó una menor incidencia de daños histológicos (Figuras 11 y 12) y de lesiones, asociadas a la RUV (Figura 13) con lo que se mostró una disminución del 35.78% de muestras con hiperplasia. Dichas muestras presentaron una gravedad leve-moderada, en comparación de las lesiones graves del control positivo. Los resultados indican que el EMHM disminuye la incidencia y gravedad de dichas lesiones, gracias a los compuestos presentes en el extracto (Espinosa-González *et al.*, 2020; comunicación personal).

Los glicósidos de flavonoides como la isoquercetina pueden presentar actividad antiinflamatoria al interferir con la neutrófilo elastasa, la sintasa de óxido nítrico y la prostaglandina sintetasa. Esto previene la respuesta inflamatoria al disminuir la presencia y extensión de infiltrado inflamatorio y reduce, en parte, el daño causado por las especies reactivas de nitrógeno y la inflamación (Korkinka *et al.*, 2008).

El grupo protegido con el EMHM presentó un aspecto similar al de los grupos no irradiados. Esto se puede deber a que, no sólo los componentes del extracto actúen como pantalla solar al absorber dentro del espectro UV, sino que también puede deberse al efecto antioxidante del extracto. El EMHM posee una buena actividad antioxidante, la cual se atribuye a su alto contenido en compuestos de tipo flavonoide (Nolasco, 2018).

La rutina uno de los compuestos identificados en el EMHM es un flavonoide del que se tiene reporte que reduce la hiperplasia y la inflamación producida por la RUV en piel de ratones, además de que disminuye la expresión de cicloxigenasa 2 y la sintasa de óxido nítrico inducible (Ganeshpurkar *et al.*, 2018). Esto indica que

la rutina actúa como un antioxidante en la piel, además de absorber parte de la RUV.

El ácido rosmarínico presenta actividad citoprotectora en la línea de queratinocitos HaCaT expuestos a la RUV-B. Al absorber parte de la radiación y a su actividad antioxidante disminuyen los niveles de ERO y previenen el daño celular (Pattage *et al.*, 2016).

En la Figura 11 se puede observar que el grupo EMHM UV, a comparación del C+, presenta menos daños relacionados con el daño celular en una menor extensión como es el caso de las células de quemadura, necrosis, displasia y pleomorfismo.

La isoquercetina presenta actividad antioxidante frente a ERO del oxígeno y del nitrógeno. También se tiene registro de que previene el desarrollo de angiogénesis en modelos *in vitro* y *ex vivo* (Valentová *et al.*, 2014). En el caso del grupo irradiado y protegido con el EMHM es posible que la isoquercetina reduzca parte del daño oxidativo inducido por la RUV y evite la presencia de angiogénesis en este grupo.

La presencia de daños asociados con la inflamación en ambos grupos irradiados se debe a la acción de la RUV sobre la piel, dado que induce la activación de Nf- $\kappa$ B, un factor de transcripción que promueve la transcripción de varios genes que regulan a la inflamación como TNF- $\alpha$  e IL-1. Esto favorece la migración de células del sistema inmune a la zona irradiada. Además, la RUV induce la formación de ERO que dañan a las células de la piel y favorecen también la inflamación (Montes de Oca *et al.*, 2017).

Algunos de los metabolitos presentes en los extractos llegan a producir efectos adversos en la piel, como es el caso de los flavonoides (Korkinca *et al.*, 2008), los cuales son los compuestos mayoritarios en el extracto metanólico de *H. mociniana*. Si bien se observan daños asociados a inflamación en los grupos tratados con este extracto, esto puede deberse, en parte, a la acción de los flavonoides y otros compuestos presentes en el EMHM. Estos daños se reportaron con una extensión focal y con una gravedad leve.

### **9.3 Efecto antiinflamatorio**

El control negativo presentó el menor promedio de células cebadas por campo de observación (14.8). La mayor parte de los mastocitos observados se encontraron en la capa de la dermis y en zonas cercanas a los vasos sanguíneos. Esto coincide con lo que se conoce de estas células las cuales se encuentran principalmente en el tejido conjuntivo (Murphy *et al.*, 2009).

El grupo con mayor número de mastocitos por campo fue el C+ (43.18) y también fue en el que se observó con más frecuencia células degranuladas. La RUV promueve la migración y desgranulación de mastocitos a la piel lo que libera distintos mediadores, promoviendo la reacción inflamatoria (Siiskonen *et al.*, 2018). En este grupo se observó una mayor concentración de mastocitos en las muestras que exhibieron carcinoma. La presencia de estas células en los tumores se ha relacionado con el desarrollo de un microambiente favorable para el carcinoma ya que promueven la inflamación del tejido y la liberación de metaloproteinasas que dañan el tejido conjuntivo y a la membrana basal, lo cual origina así la angiogénesis (Aponte-López *et al.*, 2018).

El EMHM está constituido principalmente por compuestos fenólicos (Estrella-Parra 2020; comunicación personal), los cuales absorben la RUV (Bowsheer *et al.*, 2008), pero tienen poca penetración en la piel ya que solo el 0.58% del extracto penetra en la epidermis (23  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (Zamora-Salas, 2018). Por lo tanto, es de suponer que el extracto estaría actuando como una pantalla solar lo que previene el daño ocasionado por la RUV, como es la inflamación y la activación de las células cebadas.

El extracto (EMHM) presenta compuestos fenólicos como la rutina e isoqueretina, de los cuales se ha estudiado la actividad antiinflamatoria en otros modelos. Es importante mencionarlos como componentes que, posiblemente, intervienen en la modulación de la respuesta inflamatoria en la piel. La reducción del número de células cebadas en el grupo EMHM UV se podría, entonces, relacionar a la presencia de estos compuestos que forman parte del EMHM, ya que ambos pueden tener actividad antiinflamatoria al interferir con los mediadores proinflamatorios (Zárate y Marrugo, 2017).

Se ha reportado que la quercetina reduce la respuesta inflamatoria al interferir con mediadores inflamatorios como  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (Swanson, 2016). Dado que su estructura posee efecto antiinflamatorio, puede inhibir la actividad de las células cebadas con lo cual se evita la liberación de la histamina e interfiere con IL-6 y  $\text{TNF-}\alpha$  (Kimata *et al.*, 2000). También se ha reportado que la quercetina reduce la liberación de histamina en mastocitos humanos lo que disminuye la inflamación y la fotosensibilidad (Weng *et al.*, 2012).

La isoqueretina tiene reportes de actividad antiinflamatoria. Esto se ha relacionado con el efecto antineoplásico en algunas líneas celulares, por lo que se cree que puede interferir con el funcionamiento de  $\text{TNF}\alpha$  y  $\text{TGF-}\beta$  (Di Camillo-Orfali *et al.*, 2016).

El EMHM contiene compuestos derivados de la quercetina los cuales presentan actividad antiinflamatoria. Debido a lo anterior, se puede considerar que el EMHM contiene compuestos capaces de regular la actividad de las células cebadas y

mediar la liberación de histamina, reduciendo la inflamación en el tejido, evitando un microambiente que favorezca la aparición de lesiones.

## 10 Conclusiones

- El EMHM retrasa y disminuye la aparición de lesiones en la piel de ratones SKH-1.
- La aplicación del EMHM disminuyó la presencia y extensión de los daños histológicos en la piel de ratones SKH-1, producto de la exposición a la RUV.
- El grupo protegido con el EMHM no presentó lesiones precancerosas o carcinomas. Esto indica que el extracto de *H. mociniana* puede tener actividad fotoprotectora frente a la exposición crónica a la RUV.
- El EMHM disminuyó el número de mastocitos por campo respecto al C+ y evitó la desgranulación de estas células lo cual indica un posible efecto inmunomodulador.

## Literatura citada

- Afaq, F. (2011). Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(2), 144-151.
- Alfaro-Sánchez, A., García-Hidalgo, L., Casados-Vergara, R., Rodríguez-Cabral, R., Piña-Osuna, A. K., y Sánchez-Ramos, A. (2016). Cáncer de piel. Epidemiología y variedades histológicas, estudio de cinco años en el noreste de México. *Dermatología Revista Mexicana*, 2(60), 106-113.
- Anjos, K. S., Araújo-Filho, H. G., Duarte, M. C., Costa, V. C., Tavares, J. F., Silva, M. S., ... Quintans-Júnior, L. J. (2017). HPLC-DAD analysis, antinociceptive and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract of *Hyptis umbrossa* in mice. *EXCLI Journal*, 16, 14-24.
- Aponte-López, A., Fuentes-Pananá, E. M., Cortes-Muñoz, D., y Muñoz-Cruz, S. (2018). Mast cell, the neglected member of the tumor microenvironment: The role in breast cancer. *Journal of Immunology Research*, 1-11.
- Arellano-Mendoza, I., Alcalá-Pérez, D., Barba-Gómez, J. F., Carlos-Ortega, B., Castanedo-Cázares, J. P., de la Barrera-Becerril, F., ...Valencia-Herrera, A. M. (2014). Recomendaciones clínicas para la fotoprotección en México. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 12(4), 243-256.
- Athar, M. A. (2004). Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet N-Induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195, 370-378.
- Bancroft, J. D. (2002). *Theory and practice of histological techniques* (5a. ed.). Dublin, Escocia: Churchill Livingstone.
- Baron, E., y Suggs, A. K. (2014). Introduction to photobiology. *Dermatologic Clinics*, 32(3), 255-266.
- Benavides, F., Oberysyn, T. M., Van Burskirk, A. M., Reeve, V. E., y Kusewitt, D. F. (2009). The hairless mouse in skin research. *Journal of Dermatological Science*, 53, 10-18.
- Bowsher, C., Steer, M., y Tobin, A. (2008). *Plant biochemistry*. Philadelphia, Estados Unidos: Garland Science.
- Brüel, A., Christensen, E. I., Trandum-Jensen, J., Qvortrup, K., y Geneser, F. (2014). *Histología* (Cuarta ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Buchanan, B., Gruissem, W., y Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists. Courier Companies.

- Burlando, B., Verotta, L., Cornara, L., y Bottini-Massa, E. (2010). *Herbal principles in cosmetics. Properties and mechanisms of action*. Boca Raton: CRC Press.
- Caldas, G. F., da Silva, A. R., Valenca, A. A., Quixabeira, D. C., Ferreira, F., Lima, A. C., . . . Goncalves, A. W. (2014). Gastroprotective and Ulcer Healing Effects of Essential Oil of *Hyptis martiusii*Benth. (Lamiaceae). *PLoS ONE*, 1-10.
- Castañeda, P., y Eljure, J. (2016). El cáncer de piel, un problema actual. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 59(2), 7-14.
- Colica, C., Di Renzo, L., Aiello, V., De Lorenzo, A., y Abenavoli, L. (2018). Rosmarinic acid as potential anti-inflammatory agent. Reviews on recent clinical trials, 13(4), 240-242.
- Cruz-Toscano, S. (2015). *Efecto del extracto de Lippia graveolens en el desarrollo de carcinomas cutáneos en ratones SKH-1. Tesis para obtener el título de Biólogo*. Tlalnepantla, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- De Lima, A. P. (2013). Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis friculosa* salmz ex Benth. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 192-197.
- Di Camillo-Orfali, G., Duarte, A. C., Bonadio, V., Pres-Matinez, N., de Araújo, M. E., Marinho-Priviero, F. B., ... Goncalve, P. D. (2016). Review of anticancer mechanism of isoquercetin. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(2), 189-199.
- Divya, S. P., Wang, X., Pratheeshkumar, P., Son, Y. O., Roy, R. V., Kim, D., ... y Shi, X. (2015). Blackberry extract inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation through MAP kinases and NF-κB signaling pathways in SKH-1 mice skin. *Toxicology and applied pharmacology*, 284(1), 92-99.
- Domínguez-Vázquez, G., y Castro-Ramírez, A. E. (2002). Usos medicinales de la familia Labitae en Chiapas, México. *Etnobiología*, 2(1), 19-31.
- Edeoga, H. O., Omosun, G., y Uche, L. C. (2006). Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5(10).
- Espinosa-González, A. M. (2016). *Evaluación del efecto fotoprotector del verbascosido en ratones SKH-1 irradiados con luz ultravioleta. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias*. Tlanepantla. Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

- Fitzpatrick, Wolf, K., Lowell, A., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A., y Leffell, D. (2014). *Fitzpatrick. Dermatología en Medicina General*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Ganeshpurkar, A., y Saluja, A. K. (2017). The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 149-164.
- Ghaffari, H., Ghassam, B. J., y Prakash, H. S. (2012). Hepatoprotective and cytoprotective properties of Hyptis suaveolens against oxidative stress-induced damage by CCl<sub>4</sub>. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(11), 868-874.
- Gialberte, Y., y González, S. (2010). Novedades en fotoprotección. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 8(101), 659-62.
- Halliwel, B. G. (2015). *Free radicals in biology and Medicine*. Oxford: Oxford Scholarship.
- Han, A., Chien, A. L., y Sewon, K. (2014). Photoaging. *Dermatologic Clinicas*, 32(3), 291-299.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hanan, A. M., Mondragon-Pichardo, J., Vibrans, H., y Tenorio-Ledezma, P. (2009). CONABIO. Retrieved from Malezas de México: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiacea/hyptismociniana/fichas/ficha.htm#1>
- Hernández-Zárate, S. I., Medina-Bojórquez, A., Santillán, A. L. T., y Alcalá-Pérez, D. (2012). Epidemiología del cáncer de piel en pacientes de la Clínica de Dermato-oncología del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua. Estudio retrospectivo de los últimos ocho años. *Dermatología Revista Mexicana*, 56(1), 30-37.
- Jadoon, S., Karim, S., Asad, M. H., Akram, M. R., Khan, A. K., Malik, A., ... Murtaza, G. (2015). Anti-Aging Potential of Phytoextract Loaded-Pharmaceutical Creams for Human Skin Cell Longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-7.
- Katiyar, S. K., Bergamo, B. M., Vyalil, P. K., y Elmet, C. A. (2001). Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 65(2-3), 109-114.
- Kim, T. H., Ananthaswamy, H. N., Kripke, M. L., y Ullrich, S. E. (2003). Advantages of Using Hairless Mice Versus Haired Mice to Test Sunscreen Efficacy Against Photoimmune Suppression. *Photochemistry and photobiology*, 78(1), 37-42.



- Kimata, M., Shichijo, M., Miura, T., Serizawa, I., Inagaki, N., y Nagai, H. (2000). Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 30(4), 501-508.
- Korkina, L. G., Pastore, S., De Luca, C., y Kostyuk, V. A. (2008). Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*, 9(8), 710-729.
- Kostyuk, V. P. (2018). Plant polyphenols against UV-C induced cellular death. *Planta Medica*, 75(5), 509-514.
- Kumar, V., Abbas, A. K., y Aster, J. C. (2013). *Patología Humana* (Novena ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Liu-Smith, F., Jia, J., y Zheng, Y. (2017). UV-Induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 996, 27-40.
- Martínez-Gordillo, M., Fragozo-Martínez, I., García-Peña, M. R., y Montiel, O. (84). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 30-86.
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M. P., Correa, G., Ono, Y., y Goodarzi, H. (2010). Light, including ultraviolet. *Journal of Autoimmunity*, 3(34), 1-11.
- Montes de Oca, M. K., Pearlman, R. L., McClees, S. F., Strickland, R., y Afaq, F. (2017). Phytochemicals for the prevention of photocarcinogenesis. *Photochemistry and photobiology*, 93(4), 956-974.
- Montuenga, B. E. (2009). *Técnicas en histología y biología celular*. Barcelona, España: Elsevier.
- Murphy, K., Travers, P., y Walport, M. (2009). *Inmunología de Janeway* (Septima ed.). McGrawHill.
- Neuman, M. G., Nanau, R. M., Oruña, L., y Coto, G. (2010). In vitro anti-inflammatory effects of hyaluronic acid in ethanol-induced damage in skin cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 425-437.
- Nolasco, O. E. (2018). *Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y fotoprotectora de Hyptis mociniana (Benth)*. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Tlalnepantla, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

- Oumeish, O. Y. (2001). The cultural and philosophical concepts of cosmetics in beauty and art through the medical history of mankind. *Clinics in dermatology*, 19(4), 375-386.
- Pattage, M. D. (2016). Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells. *Biomolecules and Therapeutics*, 24(1), 75-84.
- Ramakrishna, A., y Ravishankar, G. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling and behaviour*, 11(6), 1720-1731.
- Rigel, D.S. Dzubow, L.M. Reintgen, D.S. y Bystry, J. (2006). *Cáncer de Piel*. Elsevier. España. 728 p.
- Rojas, W., Amaya, J. M., Aristizabal, B., y Gómez, L. (2014). *Inmunología de Rojas* (14 ed.). Bogotá: Centro de Investigaciones Biológicas.
- Saewan, N., y Jiamtaisong, A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14(1), 47-63.
- Sarkany, R. P. (2011). Ultraviolet Radiation and the Skin. In J. O. Nriagu (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health* (pp. 469-482). Londres: Elsevier.
- Sepulveda-Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., y Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Serafini, M. R., Guimaraes, A. G., Quintans, J., Araújo, A., Nunes, P., y Quintans-Júnior, L. (2015). Natural compounds for solar photoprotection: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(4), 467-478.
- Sheth, K., Jolad, S., Wiedhopf, R., y Cole, J. R. (1972). Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *Journal of pharmaceutical sciences*, 61(11), 1819.
- Sharma, M. R., Werth, B., y Weerth, V. P. (2011). Animal models of acute photodamage: Comparison of anatomic, cellular and molecular responses in C57BL/6J, SKH-1 and Balb/c mice. *Photochemistry and Photobiology*, 87(3), 690-698.
- Siiskonen, H., Smorodchenko, A., Krause, K., y Maurer, M. (2018). Ultraviolet radiation and skin mast cells: Effects, mechanisms and relevance for skin diseases. *Experimental Dermatology*, 27(1), 3-5. doi:10.1111/exd.13402
- Standley, P. C., y Williams, L. O. (1973). *Flora of Guatemala*. *Fieldiana botany*, 24.
- Stevens, A., Lowe, J. S., y Young, B. (2003). *Histopatología básica [de] Wheater: atlas y texto en color: cuarta edición*. Elsevier.

- Surber, C., y Smith, E. W. (2005). The mystical effects of dermatological vehicles. *Dermatology*, 210, 157-168.
- Swanson, H. (2016). *Flavonoides, inflammation and cancer*. Danvers, Estados Unidos: World Scientific.
- Valentová, K., Vrba, J., Bancirová, M., Ulrichová, J., y Krén, V. (2014). Isoquercetin: Pharmacology, toxicology and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267-282.
- Varrichi, G., Galdiero, M. R., Loffredo, S., Marone, G., Iannone, R., Marone, G., y Granata, F. (2017). Are mast cells MASTers in cancer? *Frontiers in Immunology*, 8(APR), 1-13.
- Weng, Z. Z.-K. (2012). Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release ADN inhibits contact dermatitis and potosensibility in humans. *PLoS ONE*, 7(3), 1-10.
- Wojciech, P., y Ross, M. H. (2016). *Histología. Texto y Atlas (7a. ed.)*. Philadelphia, Estados Unidos : Wolters Kluwer.
- Zamora-Salas, S. X. (2018). *Fotoprotección de los extractos metanólicos de Dyssodia tagetiflora (ASTERACEAE) e Hyptis mociniana (LABITAE) a nivel celular y tisular. Tesis para obtener el título de Bióloga*. Tlalnepantla, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Zárate, P. E., y Marrugo, C. J. (2017). Inhibidores de NF-kB en la dieta y su papel en enfermedades alérgicas. *Salud Uninorte*, 33(3), 467-479.
- Zhao, X., Qi, Y., Yi, R., y Park, K. (2018). Anti-aging skin effects of Korean bamboo salt on SKH-1 hairless mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.

## Anexo 1

### Técnica histológica

La histología permite el estudio científico de las estructuras microscópicas de los tejidos y órganos de organismos pluricelulares, junto con su función. Se apoya principalmente en la observación por medio de la microscopía óptica (Wojciech *et al.*, 2015).

Para observar estas estructuras, el tejido que va a ser estudiado debe ser preparado antes con el fin de evitar su descomposición y facilitar el corte. La preparación del tejido requiere de varios pasos donde la fijación de la muestra elegida es el primero de ellos. La fijación permite que el tejido conserve su estructura al detener el metabolismo celular lo cual impide la degradación enzimática, evita la degradación por intervención de microorganismos y realiza enlaces entrecruzados en las proteínas del tejido (Wojciech *et al.*, 2015).

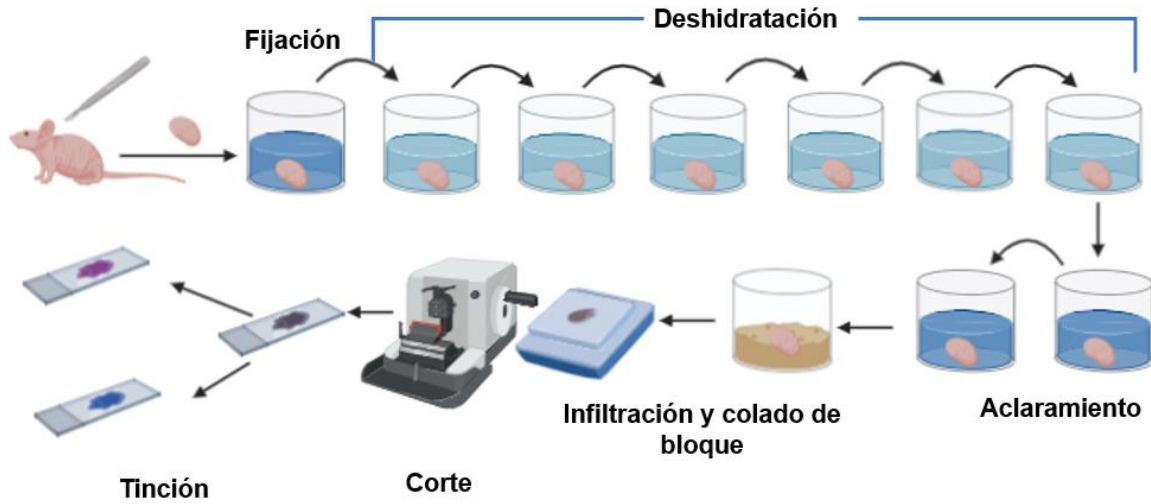
Una vez que el tejido se ha fijado, se lava, se deshidrata y se procede a pasar la muestra de tejido en una serie de alcoholes etílicos en grado creciente (de alcohol al 70% hasta llegar a alcohol 100%). Una vez deshidratado, el tejido se aclara con algún solvente orgánico (generalmente xilol) el cual posee una polaridad intermedia, lo que permite el paso del tejido a parafina (Wojciech *et al.*, 2015).

Una vez aclarado, se infiltra en parafina y se incluye formando bloque o casete, para posteriormente cortarlo con un micrótopo (aunque generalmente se corta a 5  $\mu\text{m}$  se puede cortar a 3  $\mu\text{m}$  para facilitar la observación del tejido). Los cortes obtenidos se extienden y colocan en portaobjetos, en donde se teñirán posteriormente.

#### Procedimiento

A continuación, se describe el procedimiento realizado para preparar las muestras empleadas en la presente tesis. Esta técnica se estandarizó en el laboratorio de Histología de la UMF, FES- Iztacala:

- Fijación
- Inclusión
  - Deshidratación
  - Aclaramiento
  - Infiltrado en parafina
  - Colado del bloque
- Corte
- Tinción



**Figura 18.** Esquema de la técnica histológica. El proceso va de: 1) la toma de muestra; 2) la fijación, 3) la deshidratación, 4) la inclusión, 5) el corte; 6) la tinción.

## Anexo 2

### Tinción hematoxilina-eosina (HE)

#### Fundamento

La tinción de hematoxilina-eosina es de las más usadas para teñir cortes histológicos. Esta tinción permite hacer descripciones generales del tejido dado que tiñe todas sus estructuras presentes al utilizar dos colorantes: a) la *eosina* que tiene una carga neta negativa, por lo que reacciona con compuestos con carga neta positiva, coloreando el citoplasma de color rojo-rosa; b) la *hematoxilina*, que tiene propiedades de un colorante básico, por lo que puede interactuar con compuestos de carácter ácido o de carga neta negativa, como es el caso del núcleo que tiñe de color morado (Wojciech y Ross, 2015)

#### Procedimiento

##### Desparafinar

1. Xilol I - 5 minutos
2. Xilol II - 5 minutos
3. Alcohol 100% - 3 minutos
4. Alcohol 96% - 3 minutos
5. Alcohol 90% - 3 minutos
6. Alcohol 80% - 3 minutos
7. Alcohol 70% - 3 minutos
8. Agua - 3 minutos
5. Agua amoniacal - dejar hasta que cambie a color azul
6. Agua - lavar
7. Eosina - 5 minutos
8. Alcohol 96% - 30 segundos
9. Alcohol 100% I - 3 minutos
10. Alcohol 100% II - 5 minutos
11. Xilol I - 5 minutos
12. Xilol II - 5 minutos
13. Montar con solución entellan

##### Tinción

1. Hematoxilina de Harris - 7 minutos
2. Agua - lavar hasta retirar la mayor parte del color
3. Alcohol ácido 1% - paso rápido
4. Agua - lavar

##### Interpretación

Núcleos - color azul  
Citoplasma - color rosa  
Musculo - color rojo  
Eritrocitos - color naranja-rojo  
Fibrina - color rosa fuerte

### Anexo 3

#### Tinción de azul de toluidina

##### Fundamento

La tinción de azul de toluidina, también conocida como “de Dominicci” permite distinguir a las células cebadas al emplear como colorante metacromático al azul de toluidina, que tiñe de color morado-azul los gránulos presentes en estas células (Bancroft *et al.*, 2002). Además de teñir de forma específica los gránulos de estas células, esta técnica disminuye la tinción de fondo, lo que permite identificar fácilmente a los mastocitos en el tejido de interés (Churikian y Schenk, 1981).

##### Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar (xilol I, xilol II, alcohol 100%, alcohol 96%, alcohol 90%, alcohol 80%, alcohol 70% y agua destilada).
2. Azul de toluidina -3 minutos
3. Agua destilada - dos lavados
4. Alcohol ácido 0.5% - paso rápido
5. Agua destilada - tres lavados
6. Eosina - 1 minuto
7. Alcohol 96% - 30 segundos
8. Alcohol 100% I - 3 minutos
9. Alcohol 100% II - 5 minutos
10. Xilol I - 5 minutos
11. Xilol II - 5 minutos
12. Montar con entellan

##### Interpretación

Gránulos de los mastocitos - color azul-morado

Núcleos - color azul

