



# Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Alejandro Jerez M.  
**INSTITUTO:** Farmacia  
**FACULTAD:** Ciencias

**PROFESOR CO-PATROCINANTE:** Annemarie Nielsen S.  
**INSTITUTO:** Farmacia  
**FACULTAD:** Ciencias

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL INFUSO DE *Haplopappus remyanus* CONTRA LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS ATRIBUIDOS A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA-B EN UN MODELO DE PIEL DE RATA”.**

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico.

**VERÓNICA PAOLA GARCÍA VANDER STELT**

VALDIVIA – CHILE

2008

*Quiero dedicar todos estos años de estudio a Dios, a mis queridos padres  
y a mis hermanos, Nelson y Francisco.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre y a mi padre por todo el cariño y amor que me han dado, por la oportunidad y sacrificio que ha significado darme una educación. A mis hermanos por estar presente en todo momento conmigo.

Quisiera dar las gracias de manera muy especial a mi profesor Alejandro Jerez, por la oportunidad de realizar mi tesis con él, por enseñarme y ayudarme en todo lo que fuera posible, además, de la confianza que siempre depositó en mí.

Agradecer a las profesoras Annemarie Nielsen, Karin Jürgens y Carolina Manosalva, por la ayuda y dedicación en el desarrollo de esta tesis y por demostrarme lo hermosa que es esta carrera. Agradecer el tiempo y paciencia de la Patóloga Dra. Tatiana Benavides y Tecnóloga médico Jenny Valencia. A don Genaro Alvial por su excelente trabajo con las muestras de las ratas.

Quisiera agradecer a Joel Pardo, pues su colaboración fue vital para llevar a cabo algunos trabajos que forman parte de mi tesis. De manera especial quisiera dar las gracias a don Eduardo Aguayo por toda su ayuda y tiempo que dedicó en la parte práctica de mi tesis y por ser siempre tan buena persona.

Finalmente a mis amigos Karen, Juan Pablo, Natalia, Carola, Germán, Evelyn y Yesenia, gracias por brindarme su amistad y estar conmigo incluso en los momentos más difíciles, ya que no habría sido lo mismo recorrer este camino sin ustedes.

## ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<hr/>	
<b>2. RESUMEN</b>	<b>6</b>
<hr/>	
<b>SUMMARY</b>	<b>7</b>
<hr/>	
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<hr/>	
3.1 Radiación Solar	8
3.2 Radiación Ultravioleta	8
3.3 Piel	12
3.4 Proteína p53	13
3.5 Flavonoides	14
3.6 Radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH)	17
3.7 <i>Haplopappus remyanus</i>	18
<b>4. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>22</b>
<hr/>	
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<hr/>	
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos específicos	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<hr/>	
6.1 Materiales	25
6.2 Métodos	28
6.2.1 Recolección del material vegetal	28
6.2.2 Clasificación taxonómica del bailahuén	28
6.2.3 Secado y almacenamiento del material vegetal	28
6.2.4 Preparación de la infusión	29
6.2.5 Estudio fitoquímico	29

6.2.6 Evaluación del efecto antioxidante in-vitro	30
6.2.7 Diseño experimental	31
6.2.7.1 Vía de administración buco gástrica	33
6.2.7.2 Procedimiento de irradiación	33
6.2.7.3 Análisis histopatológico	34
6.2.7.4 Consideraciones éticas para el trabajo con animales	35
6.2.7.5 Disposición de residuos animales	36
6.2.8 Estudio inmunohistoquímico de la proteína p53	36
6.2.9 Expresión de los resultados	37
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<hr/>	
7.1 Estudio fitoquímico	40
7.2 Evaluación del efecto antioxidante in-vitro	41
7.3 Observación microscópica del tejido	41
7.3.1 Tejido de piel de ratas grupo Control	42
7.3.2 Tejido de piel de ratas grupo Experimental 1	43
7.3.3 Tejido de piel de ratas grupo Experimental 2	44
7.3.4 Tejido de piel de ratas grupo Experimental 3	45
7.4 Estudio inmunohistoquímico de la proteína p53	46
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<hr/>	
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<hr/>	
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>
<hr/>	
<b>11. ANEXOS</b>	<b>59</b>
<hr/>	
<b>11.1 ANEXO Nº 1: FIGURAS</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA Nº 1.</b> Hojas desecadas de <i>Haplopappus remyanus</i>	59

<b>FIGURA Nº 2.</b>	Planta de <i>Haplopappus remyanus</i>	59
<b>FIGURA Nº 3.</b>	Preparación del infuso con hojas desecadas y fragmentadas de <i>Haplopappus remyanus</i>	59
<b>FIGURA Nº 4.</b>	Filtración del infuso por papel filtro	59
<b>FIGURA Nº 5.</b>	Preparación de las soluciones de <i>Haplopappus remyanus</i>	60
<b>FIGURA Nº 6.</b>	Espectrofotómetro UV-Visible Unicam modelo Helios	60
<b>FIGURA Nº 7.</b>	Ratas macho de la cepa Sprague Dawley	60
<b>FIGURA Nº 8.</b>	Sonda para administración buco gástrica	60
<b>FIGURA Nº 9.</b>	Administración del infuso de <i>Haplopappus remyanus</i>	60
<b>FIGURA Nº 10.</b>	Sistema de radiación	60
<b>FIGURA Nº 11.</b>	Proceso de corte de tejido	61
<b>FIGURA Nº 12.</b>	Corte de tejido tratado	61
<b>11.2 ANEXO Nº 2: GRÁFICOS</b>		<b>62</b>
<b>GRÁFICO Nº 1.</b>	Absorbancia (Abs) de hierbas y estándar sometidos a DPPH	62
<b>GRÁFICO Nº 2.</b>	% Inhibición de radicales libres de hierbas y estándar	62
<b>11.3 ANEXO Nº 3: TABLAS</b>		<b>63</b>
<b>TABLA Nº 1.</b>	Absorbancia (Abs) y % de inhibición de radicales libres de hierbas y estándar	63

## 1. ABREVIATURAS

ADN : Ácido Desoxirribonucleico

°C : Grado Celsius

cm : Centímetro

DPPH : 2,2-difenil-1-picril hidracilo

FPS : Factor de Protección Solar

g : Gramo

GNC : General Nutrition Center

IR : Radiación Infrarroja

J/m<sup>2</sup> : Julios por metro cuadrado

kDa : Kilodalton

Km : Kilómetro

Km<sup>2</sup> : Kilómetro cuadrado

m.s.n.m : Metros sobre el nivel del mar

mg/L : Miligramo por litro

mg : Miligramo

mL : Mililitro

mm : Milímetro

m<sup>2</sup> : Metro cuadrado

Nº : Número

Nm	: Nanómetro
OMS	: Organización Mundial de la Salud
PAAC	: Proyecto de Administración Ambiental Corporativo
UV	: Ultravioleta
UV-A	: Ultravioleta A
UV-B	: Ultravioleta B
UV-C	: Ultravioleta C
W/m <sup>2</sup>	: Watio por metro cuadrado
μL	: Microlitro
Mm	: Micrómetro
% p/v	: Porcentaje peso/volumen

## 2. RESUMEN

La exposición a la radiación ultravioleta puede provocar un efecto beneficioso como uno dañino en quien la experimenta. Dentro de los efectos dañinos encontramos, inflamación, edema, queratosis actínica, inmunosupresión y envejecimiento cutáneo. En los últimos tiempos ha aumentado el interés por saber que efectos produce la radiación sobre la piel y como la población puede prevenir estos daños. Es por esto que se estudió el efecto que una infusión de *Haplopappus remyanus* presenta sobre los cambios histológicos atribuidos a la radiación ultravioleta-B en un modelo de piel de ratas, gracias a las propiedades antioxidantes que ésta posee. *H. remyanus* es un arbusto endémico de la cordillera andina de la zona central de Chile.

Se realizó un estudio fitoquímico y se evaluó la capacidad antioxidante que tiene una infusión al 20% p/v de *H. remyanus*. Para el estudio experimental se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley mediante 4 grupos experimentales; grupo control, grupo al cual se sometió a radiación UV-B, grupo que se le administró *H. remyanus* antes de la irradiación, grupo que se le administró *H. remyanus* antes y durante la radiación y el último al cual se le administró *H. remyanus* después de la radiación. Para evaluar el efecto del *Haplopappus remyanus* se hizo un análisis histopatológico de la piel de las ratas y se les practicó la técnica inmunohistoquímica de la proteína p53.

Se observó que la radiación ultravioleta-B si produce cambios histológicos como paraqueratosis, espongiosis y úlcera; y que no hubo diferencias significativas en la administración de *H. remyanus* a la concentración utilizada antes, durante o después de la exposición a la radiación ultravioleta-B.

## SUMMARY

Exposition to UV radiation can cause either damage or beneficial effects. Common damages are inflammation, edema, actinic chertosis, immunosuppression and skin aging. In the past years the effort has been placed on understanding which kind of damage is exerted by UV light exposition on skin and how they can be avoided. This study was designed to assess the protective antioxidant effect of *Haplopappus remyanus* infusion against histological changes attributed to UV-B light exposition in a rat skin model. *H. remyanus* is an endemic bush found in the pre-Andean slopes of central Chile

A phytochemical study was carried out to evaluate the antioxidant properties of a 20% *H. remyanus* infusion. Experiments were carried out in Sprague Dawley male rats divided in 4 experimental groups; named control, which was subjected to UV-B exposition only, group 2 administered with *H. remyanus* infusion before exposition, group 3 administered with *H. remyanus* infusion before and after exposition and group number 4 administered with *H. remyanus* infusion after irradiation. To assess *H. remyanus* protective effect rat skin samples were subjected to histopathological analysis and p53 protein was detected by immunohistochemical techniques.

It was observed that UV-B induces histopathological changes like paracheratosis, spongiosis and ulcers and no significant differences were observed in the groups administered with *H. remyanus* infusion before, after or during UV-B irradiation.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Radiación Solar**

Se conoce por radiación solar al conjunto de radiaciones electromagnéticas emitidas por el Sol. Es la principal fuente de energía para la vida e incluye a la radiación ultravioleta (UV), comprendida entre 200 y 400 nm, radiación visible (luz), comprendida entre los 400 y 770 nm y la radiación infrarroja (IR) que está sobre los 770 nm de longitud de onda (Whitten y col, 1999).

#### **3.2 Radiación Ultravioleta**

La parte UV del espectro solar juega un papel importante en muchos procesos de la biósfera. La radiación ultravioleta incluye a la radiación de tipo UV-C (200-280 nm), UV-B (280-320 nm) y la UV-A (320-400 nm). La proporción de radiación UV-A y radiación UV-B varía según la localización geográfica, tiempo de exposición y temporada, pero en promedio, la radiación UV-A es 20 veces más dañina que la radiación UV-B. La radiación UV-B es necesaria para la síntesis cutánea de la vitamina D, que resulta indispensable en la homeostasis del calcio. Sin embargo, los efectos perjudiciales de las radiaciones UV han llegado a convertirse en un problema de salud pública a nivel mundial (Swindells y Rhodes, 2004).

Más del 90% de la radiación que nos llega es UV-A. Esta radiación penetra en lo profundo de la epidermis y la dermis de la piel (Svobodova y col, 2003). Aproximadamente el 50 % de esta radiación penetra en la epidermis y lo hace con mayor profundidad que la radiación UV-B. La radiación UV-A es responsable de la pigmentación primaria a través de la fotooxidación de la melanina en la epidermis, produciendo un bronceado rápido, pero poco duradero. La radiación UV-B se absorbe en un 90% por la epidermis. Es la principal responsable del eritema solar y

del bronceado más duradero, pero que aparece más tardíamente que el originado por la radiación UV-A. La radiación UV-C es la más energética, posee propiedades germicidas y es por ende la más peligrosa. Es absorbida en su totalidad en la alta atmósfera por parte de las moléculas de oxígeno y ozono. Está presente en fuentes artificiales como lámparas UV y arcos de soldadura industrial (Morales y col, 2006).

La mayor parte de la radiación UV-B se absorbe en la estratósfera por las moléculas de ozono y sólo un pequeño porcentaje alcanza la superficie de la tierra, es decir, la intensidad de la UV-B en la superficie de la tierra depende de la cantidad de ozono presente en la atmósfera. La radiación UV-B es menos letal que la UV-C, pero puede producir daños a la salud humana (Morales y col, 2006).

La radiación UV se cuantifica en su interacción con la materia como una irradiancia, que es la potencia incidente sobre una superficie. Su unidad de medida es Watio por metro cuadrado ( $W/m^2$ ), o como dosis de exposición, que corresponde a la energía incidente sobre la superficie de área unitaria durante un período de tiempo especificado, siendo su unidad de medida Julios por metro cuadrado ( $J/m^2$ ) (Masteikova, 2007).

La exposición a la radiación UV puede provocar tanto un efecto beneficioso como uno dañino en quién la experimenta. Los principales efectos nocivos de la radiación UV se producen en la piel y los ojos. De acuerdo a los datos entregados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno de cada tres casos de cáncer en el mundo está relacionado con la piel, principalmente con la sobreexposición a las radiaciones naturales del sol. Cada año se registran en todo el mundo 2 a 3 millones de tumores benignos y 132.000 casos de melanoma maligno, siendo uno

de los cánceres más peligrosos el de piel, debido a que puede extenderse a otras partes del cuerpo (OMS, 2007).

En las últimas décadas del siglo 20, la piel de la población ha sido expuesta a elevados niveles de radiación UV como consecuencia de una mayor exposición a la luz solar en periodos vacacionales y una depleción en la capa de ozono (Swindells y Rhodes, 2004).

Los efectos agudos de la radiación UV incluyen quemaduras de sol (como una respuesta inflamatoria) e inmunosupresión, mientras que en los efectos crónicos se encuentran envejecimiento de la piel y carcinogénesis. La fotocarcinogénesis es el efecto adverso más serio de la radiación UV, donde la incidencia de tumores malignos del tipo melanoma y no melanoma han experimentado un alza importante. El incremento de la incidencia de cáncer de piel se ha atribuido parcialmente a la gran cantidad de radiación UV recibida en la superficie de la tierra, como resultado del adelgazamiento de la capa de ozono en la atmósfera. La capa de ozono ha decrecido aproximadamente un 2% en los últimos 20 años. Por cada 1% que disminuye el ozono se incrementa de 2-7% el cáncer de piel tipo no melanoma. Se estima que debido a la disminución del 2% de la concentración de ozono a lo largo de la vida, la radiación UV adicional causaría un 6-12% de incremento en el cáncer de piel tipo no melanoma en la población expuesta. Sin embargo, el espesor de la capa de ozono en el hemisferio norte declina de un 10-40% durante los meses de invierno y primavera. Como regla general, la reducción del 10% del espesor de la capa de ozono causa un 20% de incremento en la radiación UV y un 40% de incremento en el cáncer de piel (Diepgen y Mahler, 2002).

En la piel expuesta a la radiación UV, se induce la generación de especies reactivas de oxígeno. Éstas son capaces de reaccionar con el ADN, proteínas y ácidos grasos causando así daño de tipo oxidativo. Tales daños repercuten en una serie de efectos nocivos como alteración del metabolismo celular, alteraciones morfológicas y ultraestructurales y alteración en la diferenciación, proliferación y apoptosis de las células de la piel. Todos estos procesos pueden llevar al desarrollo de envejecimiento prematuro de la piel y al desarrollo de cáncer en ésta (Svobodova y col, 2003).

Entre las medidas de protección dérmica contra la radiación UV se encuentran el uso de ropa protectora, búsqueda de sombra y la buena utilización de bloqueadores solares. Estos últimos son capaces de reducir tanto los efectos agudos como los crónicos producidos sobre la piel por dispersión o absorción de la radiación UV. Sin embargo, un problema asociado a la utilización de los bloqueadores solares es su mala utilización por parte de la población. Ello se ve reflejado en una incompleta aplicación sobre la piel o tiempos de exposición solar mayores para los cuales fueron diseñados. El factor de protección solar de los bloqueadores solares (FPS) asegura el grado de protección contra la generación de eritema, sin embargo, no actúa como un “factor de protección inmunitario” o “factor de protección mutacional”. Adicionalmente a los métodos que forman una barrera en la protección de la piel, existen métodos fotoprotectores, específicamente direccionados a contrarrestar los efectos adversos de la radiación UV. Los agentes administrados oralmente resultan de particular interés, porque no dependen de una adecuada aplicación tópica. Lo ideal es que estos agentes resulten efectivos, seguros, bien tolerados, económicamente accesibles y que permitan realizar profilaxis en pacientes susceptibles. Incluso podría llegarse a un grado de

fotoprotección que disminuyera la incidencia de cáncer a la piel (Swindells y Rhodes, 2004).

Si se considera el costo de los protectores solares, podemos suponer que parte de la población podría no llegar a contar con los recursos necesarios para satisfacer esta necesidad. Una manera de suplir este déficit es la utilización de productos naturales.

### **3.3 Piel**

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano y ocupa aproximadamente 2 m<sup>2</sup>. Su espesor varía entre los 0,5 mm en los párpados a los 4 mm en el talón. Está formada por tres capas: de la superficie hacia la profundidad, se encuentran la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es un epitelio pavimentoso estratificado y queratinizado. Las capas o estratos de la epidermis desde la superficie hacia la profundidad están: estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. La epidermis está formada por cuatro tipos celulares: queratinocitos, representan el 80% de la población celular de la epidermis; melanocitos, células que sintetizan un pigmento castaño oscuro y son responsables del color de la piel; células de Langerhans, desempeñan un papel en las reacciones inmunes; y células de Merkel, pertenecen al sistema endocrino difuso. La dermis es un tejido conjuntivo muy vascularizado sobre el que se apoya la epidermis. Está formada por fibras de colágeno, células (fibroblastos, macrófagos, mastocitos y plasmocitos) y otras células sanguíneas (linfocitos y polimorfonucleares) en bajas proporciones. Recorren la dermis numerosos vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas. La hipodermis es la capa más profunda de la piel y está formada por lóbulos adiposos rodeados por nervios y vasos (Robbins y col, 2004).

La piel desempeña varias funciones: barrera cutánea, que impide la penetración de las moléculas exógenas gracias a la aglomeración y la cohesión de los corneocitos de la capa córnea; protección inmune, mediante la función de la capa córnea y por la presentación de antígenos por las células de Langerhans a los linfocitos T; protección mecánica, debido a las propiedades físicas de los componentes de la dermis; protección frente a los rayos del sol, asegurada, fundamentalmente, por la actividad de los melanocitos y, de manera accesoria, por el cabello para el cuero cabelludo; protección térmica, para el exceso de frío y calor. (Perlemuter, 1999).

### **3.4 Proteína p53**

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear de 53 kDa y 393 aminoácidos. Fue descubierta en 1979 al comprobar que ella se unía a un producto proteínico oncogénico, resultante de la infección en células eucarióticas de murinos por el virus simio: SV40. Se cree que regula el inicio y la progresión a través del ciclo celular normal, aunque la función bioquímica exacta es desconocida (Triviño y López, 1994).

Mutaciones de la proteína p53 son determinadas por inmunohistoquímica y son frecuentes en distintos tumores humanos lo que indica que la proteína p53 actúa como guardián esencial frente a la formación de cáncer, impidiendo la propagación de células genéticamente dañadas (Robbins y col, 2004).

Neoplasias humanas de mama, colon, pulmón y esófago, a menudo contienen un gen p53 mutado (que muestra elevadas concentraciones de proteína p53 mutada). Esta alteración se ha observado también en distintos porcentajes en otros tumores entre los que se encuentran los de origen neural, tracto respiratorio, partes

blandas, cutáneas: mecánicas o no, y hematológicas. Dependiendo del tipo de neoplasia, la alteración del gen de supresión tumoral puede tener un papel en los estadios temprano, intermedio o tardío de la progresión tumoral (Triviño y López, 1994).

La radiación UV-B produce también mutaciones en oncogenes y en genes supresores del cáncer, habiéndose detectado formas mutadas de los genes ras y p53 tanto en cánceres humanos como en los inducidos en ratones. Estas mutaciones afectan sobre todo a las secuencias de dipirimidina en el interior del ADN, lo que implica a la lesión genética provocada por la radiación UV-B, una causa del desarrollo de cánceres cutáneos. En modelos animales, las mutaciones del p53 se producen poco después de la exposición a los rayos UV-B, antes de que aparezcan los tumores y, por lo tanto, se ha propuesto que las mutaciones de p53 podrían ser un marcador molecular de la exposición de la piel a la luz solar (Robbins y col, 2004).

### **3.5 Flavonoides**

Los flavonoides son una clase de pigmentos hidrosolubles naturales presentes en los vegetales, los cuales protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta y la polución ambiental (Martínez y col, 2002). Se encuentran tanto en estado libre como glicosidado, constituyendo el grupo más amplio de los fenoles naturales. Son los responsables del color de las flores (rojo, azul, amarillo) y de la coloración otoñal de las hojas. Estos se encuentran localizados en tejidos superficiales sobre todo en los órganos aéreos de color amarillo (hojas y botones florales) (Vogel y col, 2005).

Los flavonoides se clasifican en categorías, aunque existe controversia sobre cómo dividirlos. En un sistema, los flavonoides se clasifican en isoflavonas, antocianidinas, flavanos, flavonoles, flavonas y flavanonas. Aunque todos están relacionados estructuralmente, sus funciones son distintas. Entre los flavonoides se incluyen hesperidina, la rutina, los flavonoides cítricos y varios suplementos más. La resistencia que presentan las plantas a la radiación UV-B es atribuida a la presencia de flavonoides en las hojas. Ellos absorben en la zona que va desde los 280 a 320 nm actuando así como filtros de la radiación y protegiendo a los tejidos vegetales del daño que ésta le pueda producir. Varios experimentos sobre la fisiología vegetal entregaron evidencia de que los flavonoides están involucrados en el proceso de protección UV, por medio de un mecanismo que involucra la síntesis de flavonoides frente al estímulo de la radiación UV. Un experimento que sostiene que los flavonoides son importantes para la planta contra la radiación UV-B fue realizada en la *Arabidopsis thaliana*, donde se creó un mutante con escasez de flavonoides epidermales. Los mutantes resultaron ser mucho más sensibles a la radiación UV-B que la planta original (Harbone y Williams, 2000).

Entre los flavonoides que han sido estudiados como profilácticos de daños a la piel inducida por radiación UV se encuentran la quercetina, la apigenina, genisteína y silibinina, por lo que la investigación de este tipo de sustancias permitirá nuevas estrategias de prevención contra el daño asociado a la radiación UV (Svobodeva y col, 2003).

Otra clase de funciones que se le atribuyen a los flavonoides son el poseer actividad antioxidante, capacidad de realizar inhibición enzimática, prevención de enfermedad coronaria, actividad protectora vascular y actividad citotóxica

antitumoral. Esas sustancias han demostrado ser capaces de actuar atrapando especies oxidantes como el anión superóxido y radicales hidroxilo y peroxi (Zhao y col, 2000). Los flavonoides no reaccionan como una sola sustancia para actuar como antioxidantes, por lo que la evaluación de esta capacidad ha provocado el desarrollo de varios métodos para su evaluación (Tournaire y col, 1993). Respecto a la actividad citotóxica antitumoral de estas sustancias, han sido evaluadas varias plantas de uso común en la medicina popular. Entre ellas se encuentran especies tales como *Fissistigma languinosum* (Annonaceae) (Alias y col, 1995), *Muntingia calabura* (Elaeocarpaceae) (Kaneda y col, 1991), *Monotes engleri* (Dipterocarpaceae) (Seo y col, 1997), *Baeckea frutescens* (Myrtaceae) (Makino y Fujimoto, 1999), entre otras.

Una de las plantas más estudiadas respecto a su actividad antitumoral es el cardo mariano (*Silybum marianum*), la cual permite una gran protección frente a la iniciación, promoción y concreción de tumores de piel mediados por radiación UV y carcinogénesis mediada por agentes químicos en piel de ratón (Dhanalakshmi y col, 2004).

El cardo mariano es una planta milenaria que ha sido usada por años en Europa para el tratamiento de problemas digestivos y hepáticos. Está compuesta por tres isómeros: silibinina, silidianina y silicristina. Inhibe los eventos bioquímicos relacionados con la generación de tumores luego de la exposición a radiación UV en piel de rata (Dhanalakshmi y col, 2004). La silibinina es la flavanona de mayor bioactividad y se encuentra presente en las semillas del cardo mariano. Estas semillas han sido utilizadas por más de dos mil años en la medicina tradicional para tratar problemas hepáticos. Aparece de manera silvestre en los climas

mediterráneos y actualmente es ampliamente comercializada (Singh y Awargal, 2005).

La silimarina, como extracto estandarizado en cápsulas, ha sido utilizada como protector hepático desde hace mucho tiempo en Alemania. El hígado tiene una gran capacidad regenerativa, que se ve estimulada por la administración de silimarina, siendo utilizado con éxito en la regeneración de los hepatocitos dañados ya sea por alcohol o medicamentos tóxicos. En un estudio alemán, se demostró que la silimarina suministrada 3 veces al día en una dosis de 140 mg, disminuyó la tasa de muerte en pacientes con cirrosis comparado con placebo. Además, ayudó a pacientes con inflamación crónica del hígado, causada por medicamentos o alcohol y a reducir daños versus grupo control (GNC, 2008).

Varios estudios han demostrado sus propiedades altamente antioxidantes que le permiten atrapar radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Además, ha demostrado tener capacidad de reparar el daño provocado a nivel del ADN por la radiación UV-B (Singh y Awargal, 2005).

### **3.6 Radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH)**

Se han propuesto diversos métodos para determinar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres, tanto en fase orgánica como en fase acuosa. Entre ellos está el uso del radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo. Este radical es de color violeta intenso y tiene su máxima absorción a 517 nm. Al ser capturado por sustancias antirradicalarias, pierde su coloración característica, manifestándose en una disminución de la absorbancia (Viturro y col, 1999).

El aumento de radicales libres es asociado a enfermedades coronarias, diversos tipos de cáncer y procesos de envejecimiento (Cai, 2005). Es razonable pensar entonces que los antioxidantes exógenos pueden jugar un rol importante en prevenir el daño oxidativo en células y tejidos (Masteikova y col, 2005).

### **3.7 *Haplopappus remyanus***

La familia de las Asteráceas comprende alrededor de 20.000 especies, principalmente herbáceas y arbustivas de distribución cosmopolita y predominante en regiones montañosas de zonas subtropicales templadas. En Chile han sido descritos 156 géneros, los que representan un número superior al millar de especies. Dentro de los géneros más representados en el país destacan *Senecio*, *Haplopappus*, *Chaethanthera* y *Baccharis* (Muñoz, 1992).

El género *Haplopappus* tiene 160 representantes en América. En Chile existen 61 especies del género *Haplopappus*, y bajo el nombre común de bailahuén se usan al menos siete especies. Las más utilizadas en Chile son *H. multifolius*, *H. taeda*, *H. baylahuen* y *H. remyanus* (Hoffmann y col, 2003).

*Haplopappus multifolius* es endémica de la cordillera de Santiago, Chile. Además, se encuentra en la V Región, Los Andes-Portillo y Región Metropolitana, Farellones. Se estima su presencia entre los 32° a 33° de latitud sur, en una extensión de 111 Km, en un modelo de distribución agregado y discontinuo. *Haplopappus taeda*, es endémica de la cordillera andina de la zona central, entre la VI y el norte de la VII Región de Chile, habita en las cordilleras de Curicó. Se estima una extensión de menos de 5000 Km<sup>2</sup>, ya que no se conoce exactamente los límites de distribución (Vogel y col, 2006). *Haplopappus baylahuen* tiene su hábitat entre los 26° a 28° de latitud sur en las montañas y sobre los 2000 m.s.n.m. Sin embargo,

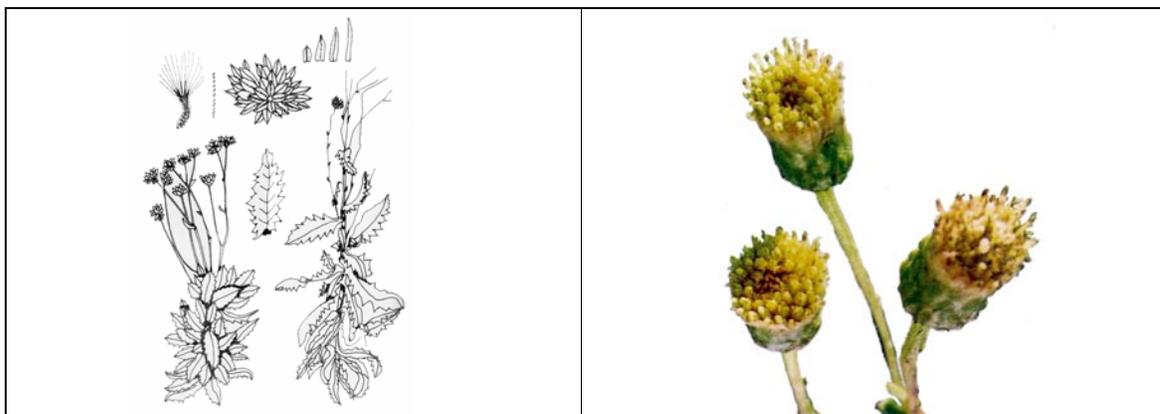
existen otras especies endémicas de *Haplopappus*, las cuales se extienden hasta los 35° de latitud sur. *Haplopappus remyanus* es endémica de la cordillera andina de la zona central, específicamente entre la IV y el norte de la VI regiones de Chile, en altitudes inferiores a los 2000 m.s.n.m. (Vogel y col, 2005).

En la actualidad, el bailahuén, es usado en prácticamente todo el territorio nacional. Es una planta de uso ampliamente difundido en nuestro país, la cual ha sido usada desde tiempos muy remotos (Hoffmann y col, 2003). Por esto se piensa que esta planta, gracias a los flavonoides con actividad antioxidante que se sabe que poseen sus hojas (Vogel y col, 2005), podría presentar algún efecto anticarcinogénico a nivel de piel.

La infusión de bailahuén ha sido usada por los mapuches para tratar las enfermedades del hígado, para curar dolencias estomacales y para la cicatrización de las heridas de los caballos. Se considera que la infusión es emenagoga, estimulante intestinal, antiséptica, mejora las vías urinarias, la gripe y el resfrío. (Hoffmann y col, 2003). Las distintas especies del género *Haplopappus* que crecen de manera endémica en Chile tienen reconocidas propiedades colagogas y coleréticas. Una pequeña fracción está siendo exportada como digestivo en bolsitas de té para ser consumido como infusión. Toda la producción de bailahuén es obtenida de la planta silvestre, de la cual sólo se utilizan las partes aéreas (Vogel y col, 2005).

Estudios realizados en la Universidad Austral de Chile demostraron tanto bioquímica como histológicamente que el *Haplopappus baylahuen* tiene propiedades protectoras sobre células hepáticas que han sido sometidas a un daño lipoperoxidativo (Nielsen, 1990).

Dentro de todas las especies de *Haplopappus* que hay en el territorio nacional, el objeto de estudio fue el *Haplopappus remyanus*, el cual según la literatura, es el que presenta mayor actividad antioxidante como infusión (Vogel y col, 2005).



**Figura Nº 1.** Planta de *Haplopappus remyanus*.\* **Figura Nº 2.** Flor de *Haplopappus remyanus*.\*

\* Fuente: H. Vogel. 2005. Plantas medicinales chilenas. Talca, Ed. Universidad de Talca.

*Haplopappus remyanus* se caracteriza por ser un arbusto resinoso y aromático de hasta un metro de altura. Las plantas (Figura Nº 1) son de color verde con alta densidad foliar y con hojas en diferente disposición en el tallo. En la mitad inferior de los tallos, las hojas son de color claro, secas y en disposición descendente, es decir, dirigidas hacia la base. Por el contrario, las hojas de la mitad superior están dispuestas en posición ascendente (Vogel y col, 2005).

Las hojas son ovaladas y de aproximadamente 10 cm de largo en filotaxis alterna, sésiles y semiabrazadoras. Presentan un margen dentado y espinoso. Las espinas son cortas y agudopunzantes (Vogel y col, 2005).

Las flores (Figura Nº 2) son homomorfas del tipo tubulado dispuestas en capítulos cuya antesis ocurre en el mes de enero. Los ejes de las inflorescencias pueden igualar la altura de la planta. Se presentan desnudos y ramificados. En su

extremo inferior presentan hojas anchas, sésiles y semiabrasadoras para hacerse lineales y de menor tamaño hacia el extremo superior (Vogel y col, 2005).

Los aquenios son pilosos y el vilano amarillento, con dispersión en el mes de marzo (Vogel y col, 2005).

La composición química es distinta y muy característica para cada especie de *Haplopappus* (Vogel y col, 2005), lo que hace necesario estudiar sus actividades antioxidantes y realizar una caracterización química que permita diferenciarlas, para establecer que metabolitos posee cada especie y qué beneficio médico trae para la comunidad (Vogel y col, 2006).

Estudios químicos en especies de *Haplopappus* han demostrado la presencia de flavonoides, heterósidos antraquinónicos y cumarinas. Estos últimos se han identificado en forma detallada. Además, contiene una resina muy evidente externamente en las hojas de la planta; sin embargo, la bibliografía consultada no aporta mayores detalles sobre la composición química de ella (Hoffmann y col, 2003).

En la parte aérea de *Haplopappus remyanus* se han encontrado labdanos, ésteres monoterpénicos y flavononas (eriodictiol, pinostrobina, 3-acetilalpinona) (Vogel y col, 2005).

Es por esto que este trabajo propone estudiar si el *Haplopappus remyanus* administrado oralmente en forma de infusión, puede contrarrestar el daño producido por la radiación ultravioleta-B sobre la piel de rata.

#### **4. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Se plantea que dadas las propiedades antioxidantes que posee la infusión de *Haplopappus remyanus*, ésta protege y/o regenera los cambios histológicos atribuidos a la radiación ultravioleta-B, cuando se administra en ratas previo, durante y/o posterior a la exposición de la radiación ultravioleta-B.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto que la infusión de *Haplopappus remyanus* presenta sobre los cambios histológicos atribuidos a la radiación ultravioleta-B, utilizando para ello un modelo animal.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Recolectar, secar, almacenar e identificar taxonómicamente el material vegetal correspondiente a *Haplopappus remyanus*.
2. Determinar la presencia de sustancias antioxidantes, mediante el análisis fitoquímico de una infusión de *Haplopappus remyanus*.
3. Evaluar la capacidad antioxidante de la infusión de *Haplopappus remyanus* mediante una técnica in-vitro.
4. Determinar microscópicamente las alteraciones histológicas de los tejidos de piel de las ratas luego de ser sometidas a radiación ultravioleta-B y recibir tratamiento con una infusión de *Haplopappus remyanus* al 20% p/v.
5. Analizar la expresión de la proteína p53 mediante inmunohistoquímica en los tejidos de las ratas luego de ser sometidas a radiación ultravioleta-B y recibir tratamiento con una infusión de *Haplopappus remyanus* al 20% p/v.
6. Evaluar el grado de protección ejercido por el infuso de *Haplopappus remyanus* en los animales tratados con el infuso previo a la irradiación.

7. Evaluar el grado de regeneración ejercido por el infuso de *Haplopappus remyanus* en los animales tratados con el infuso posterior a la irradiación.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIALES

#### Material vegetal

- Hojas desecadas de *Haplopappus remyanus* obtenidas en su hábitat.

#### Animales de Experimentación

- Ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 6 semanas de edad.

#### Reactivos

- Radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (Sigma).
- Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ).
- Éter ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) (Merck<sup>®</sup>).
- Formalina tamponada 10%.
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ).
- Ácido clorhídrico (HCl) (Merck<sup>®</sup>).
- Antrona en medio sulfúrico.
- Reactivo de Molisch.
- Licor de Fehling.

- S.R.  $\text{FeCl}_3$ .
- Reactivo de Dragendorff.

### **Instrumentos**

- Lámpara Ultravioleta (Utilizada a 302 nm). Lámpara Modelo UVLMS-38 EL Series 3 UV. (365, 264, 302 nm).
- Cámaras de irradiación.
- Procesador (Moulinex A-320).
- Espectrofotómetro UV-Visible Unicam modelo Helios.
- Microscopio óptico. Modelo BX31 de Olimpos (aumento de 40-400X).

### **Material de laboratorio**

- Material de vidrio.
- Papel filtro, Advantec MFS, Inc. Diámetro 11 cm, N° 2.
- Jeringas de 1mL y 3 mL.
- Sondas buco-gástricas.

### **Enzimas**

- Kit enzimático que corresponde a un sistema de detección de Ultra Visión Anti-Polivalente HRP/DAB, marca Thermo Scientific.

**Anticuerpos**

- Anticuerpo monoclonal de ratón, p53 Ab-5 (Clon D0-7), marca Thermo Scientific.

**Otros materiales**

- Ampollas de diazepam (Biosano<sup>®</sup>).
- Jaulas para ratas.
- Agua destilada.
- Tablas de disección.
- Guantes quirúrgicos.
- Magnesio metálico.
- Balanza.
- Tijeras.
- Pinzas.
- Crema depilatoria.
- Papel absorbente.

## **6.2 MÉTODOS**

### **6.2.1 Recolección del material vegetal**

El material vegetal fue recolectado en su hábitat natural, específicamente en el sector de las Peñas, en la precordillera andina de la provincia de Colchagua en la región del Libertador General Bernardo O'Higgins. La recolección fue entre los últimos días de enero y los primeros de febrero del año 2007. La recolección se realizó en dicha zona basada en las publicaciones recientes donde se señala que el bailahuén con mayor actividad antioxidante crece en ese lugar (Vogel y col, 2005).

### **6.2.2 Clasificación taxonómica del bailahuén**

El material vegetal recolectado fue clasificado como *Haplopappus remyanus*. Para su identificación se utilizó la clave propuesta en la literatura por Reiche en 1902 y la nomenclatura científica es la propuesta por Marticorena y Quezada en Gayana botánica. Además, con la finalidad de asegurar una correcta clasificación se consultó el herbario CONC, donde quedaron incorporados los ejemplares.

### **6.2.3 Secado y almacenamiento del material vegetal**

La actividad fue llevada a cabo luego del arribo del material vegetal a Valdivia. Las hojas fueron desecadas (Anexo N° 1, Figuras N° 1 y 2) a temperatura ambiente, en un ambiente seco y ventilado por un mes, con las que luego se preparó la infusión.

#### 6.2.4 Preparación de la infusión

La infusión de *Haplopappus remyanus* se preparó con 200 gramos de hojas desecadas y fragmentadas y se completó a 1000 mL con agua hirviendo (Anexo N° 1, Figura N° 3). Se dejó reposar por 10 minutos y luego se procedió a filtrar por papel filtro (Anexo N° 1, Figura N° 4), para posteriormente ser administrada a los animales de experimentación vía sonda buco-gástrica a una dosis de 7,5 mL/Kg.

#### 6.2.5 Estudio fitoquímico

El estudio fitoquímico tiene como objeto analizar una droga vegetal usando técnicas simples y rápidas que permitan detectar la presencia de determinados grupos de compuestos o constituyentes específicos, aportando información al conocimiento de las drogas vegetales (Jürgens, 2007). Los ensayos realizados se detallan en la siguiente tabla (Heinrich y col, 2004):

**Tabla N° 1.** Ensayos fitoquímicos y metabolitos a identificar.

Ensayos	Metabolitos
Antrona en medio sulfúrico	Todo tipo de azúcares
Reactivo de Molisch	Azúcares reductores y no reductores
Licor de Fehling	Azúcares reductores
Prueba de etanol	Gomas y mucílagos
Prueba de Espuma	Saponinas
S.R. FeCl <sub>3</sub>	Taninos
Reacción de la cianidina	Flavonoides

Reacción de Liebermann	Núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno
Reacción Keller-Kiliani	Heterósidos cardiotónicos (heterósidos con 2-desoxiazúcares)
Reacción de Kedde	Heterósidos cardiotónicos (genina de 23 átomos de carbono)
Reacción de Bornträger	Heterósidos antraquinónicos
Reacción de Shouteten	Heterósidos antraquinónicos
Reacción de Dragendorff	Alcaloides

### 6.2.6 Evaluación del efecto antioxidante in-vitro

Para evaluar la capacidad de la infusión de *Haplopappus remyanus* de actuar como atrapador de radicales libres se utilizó una solución metanólica del radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH). De acuerdo a lo descrito por Kukic, el grado de decoloración de la solución de DPPH (20 mg/L) indicaría la eficiencia atrapadora de los productos agregados (Kukic y col, 2006). Este radical de color violeta intenso (máxima absorción a 517 nm); al ser capturado por sustancias antirradicalarias, pierde su coloración característica, manifestándose en una disminución de la absorbancia (Viturro y col, 1999; Joyeux, 1995).

Para evaluar la capacidad atrapadora de radicales libres se preparó una solución al 0,5% p/v. Para esto se pesó 1 gramo de las hojas desecadas de la especie en estudio y se le agregó 200 mL de agua hirviendo, se dejó reposar durante 10 minutos y luego la infusión preparada se filtró en un tubo de ensayo (Anexo N° 1, Figura N° 5).

Paralelamente se preparó la solución metanólica de DPPH (20 mg/L), un control de ácido ascórbico (1 mg/mL) y un blanco preparado en las mismas

condiciones, con 0,75  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  y 1,5  $\mu\text{L}$  DPPH, y se midió su absorbancia. Se realizó la mezcla de 0,75  $\mu\text{L}$  de las infusiones y 1,5  $\mu\text{L}$  de DPPH. Después de 5 minutos de reacción a  $T^\circ$  ambiente se midió su absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro (Anexo N° 1, Figura N° 6).

Se analizaron también algunas infusiones de plantas comúnmente usadas por la población a modo de evaluar el efecto antioxidante que poseen en comparación con el *Haplopappus remyanus* en estudio. Las hierbas utilizadas fueron, *Haplopappus remyanus* (bailahuén), *Rosa rubiginosa* (rosa mosqueta), *Camellia simensis* (té negro), *Melissa officinalis* (toronjil), *Mentha piperita* (menta) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla).

El porcentaje de inhibición se calcula como sigue (Miliauskas y col, 2004):

$$\% \text{ de Inhibición} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \right) \right] \times 100$$

### 6.2.7 Diseño Experimental

Para el estudio del efecto protector y/o regenerador del infuso de *Haplopappus remyanus* se utilizaron 24 ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 6 semanas de edad y en promedio 323 g de peso corporal (Anexo N° 1, Figura N° 7). Estas ratas fueron obtenidas del Vivero Central de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales fueron aclimatados por 15 días antes del trabajo experimental. Durante el desarrollo del estudio tuvieron libre acceso a alimento y agua. Se mantuvieron bajo condiciones de 12 horas luz/oscuridad y temperatura aproximada de 18°C.

Se debe mencionar que el trabajo con animales se ve respaldado en estudios previos relacionados a la protección UV de los flavonoides, en los cuales se han utilizado estos animales como modelo.

Este diseño experimental se basó en trabajos realizados, en el cual, se plantearon estudios similares, utilizando el mismo diseño experimental (Mathur y col, 2004).

El estudio tuvo una duración de 20 semanas, en los cuales para su desarrollo se formaron 4 grupos al azar de 6 ratas cada uno.

Los grupos de las ratas se denominaron así:

- **Grupo Control**: grupo de ratas no tratadas.
- **Grupo Experimental 1**: grupo de ratas expuestas a radiación UV-B de 302 nm en una cámara de radiación por una hora durante 20 días. Observadas durante 12 semanas post radiación.
- **Grupo Experimental 2**: grupo de ratas que se les administró vía buco-gástrica el infuso de *Haplopappus remyanus* por 5 días, previo a la exposición a la radiación UV-B, para luego administrarle el infuso una hora antes de la exposición a la radiación por un periodo de 20 días. Observadas durante 12 semanas.
- **Grupo Experimental 3**: grupo de ratas expuestas a radiación UV-B por una hora durante 20 días, las cuales fueron posteriormente tratadas con el infuso de *Haplopappus remyanus* por vía buco-gástrica diariamente por 12 semanas.

Una vez concluido el trabajo experimental, los animales fueron sacrificados utilizando éter (método indoloro).

#### **6.2.7.1 Vía de administración buco gástrica**

Al inicio del estudio se realizó un adiestramiento para el uso correcto de la sonda buco gástrica.

La administración del infuso de *Haplopappus remyanus* se realizó utilizando una sonda buco gástrica de acero inoxidable con forma de aguja curva y punta en forma de esfera (Anexo N° 1, Figura N° 8). Este tipo de sonda gástrica evita el daño en las mucosas de las ratas cuando es introducida por la boca hasta el estómago, y se asegura la correcta administración, evitándose pérdida del producto administrado (Anexo N° 1, Figura N° 9).

#### **6.2.7.2 Procedimiento de irradiación**

Para este procedimiento se cortó el pelo de las ratas, seguido de la aplicación de crema depilatoria en frío en un área en el dorso de las ratas de 2 x 3 cm, un día antes de la exposición a la radiación. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de diazepam (dosis 1 mg/mL), que en un tiempo aproximado de 5 minutos logró su efecto de sedación (Merriam y col, 2000). Cuatro ratas por experiencia se introdujeron a una cámara de irradiación, para ser expuestas a radiación del tipo UV-B (302 nm), sobre el área depilada dentro de la cámara (Anexo N° 1, Figura N° 10) (Mathur y col, 2004). La puerta de la cámara fue asegurada de manera que las ratas sean exitosamente irradiadas una hora al día por 20 días.

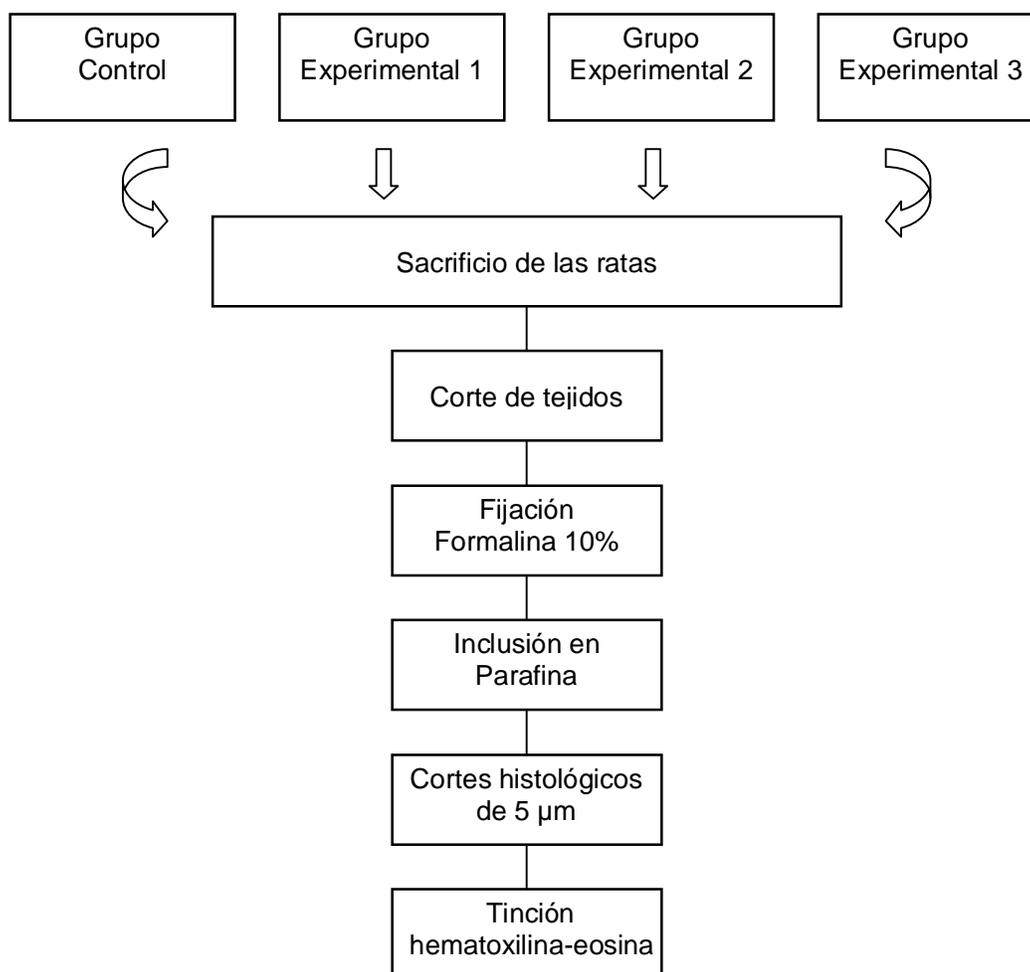
Debe mencionarse que la cabeza de las ratas se protegió de la radiación de manera de no generar daños a ojos y oídos (Mathur y col, 2004) y que la radiación se realizó a 15 cm de distancia, entre la lámpara y el área depilada (Merriam y col, 2000).

### **6.2.7.3 Análisis histopatológico**

Una vez transcurrido el período de 12 semanas de observación, las ratas se sacrificaron para luego ser escindida la piel del dorso. Ésta fué fijada en formalina tamponada al 10 % y embebida en parafina. Se realizaron cortes verticales de 5µm de grosor, los cuales se montaron sobre láminas de vidrio, donde fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Finalmente, se realizó la observación de cortes de piel mediante microscopía óptica, con el fin de observar la existencia de cambios a nivel celular y confirmar la existencia de daño.

La tinción de hematoxilina-eosina es una técnica de coloración basófila y acidófila, provocando que los colores que se advierten en los cortes teñidos reflejen distribuciones generales de carga por las proteínas (Cormack, 1988).

El proceso de corte, fijación y teñido se realizó en el Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile (Anexo N° 1, Figura N° 11 y 12).



**Figura Nº 3:** Esquema del procedimiento histológico.

#### **6.2.7.4 Consideraciones éticas para el trabajo con animales**

De acuerdo a las consideraciones bioéticas para el trabajo con animales de la Universidad Austral de Chile se dispondrá que los animales sean tratados adecuadamente para evitarles el dolor y sufrimiento innecesarios. En caso de detectar que un tratamiento o acción pudiera provocar dolor a los animales, este procedimiento se deberá realizar bajo anestesia.

#### **6.2.7.5 Disposición de residuos animales**

Los cadáveres de los animales sacrificados fueron dispuestos en bolsas plásticas reforzadas y bien cerradas para luego someterse al programa de Manejo de Residuos de la Universidad Austral de Chile para así minimizar la contaminación al interior de los campus y los riesgos asociados que pudiese provocar para la salud de la comunidad universitaria, el manejo indebido de los residuos (PAAC, UACH).

#### **6.2.8 Estudio inmunohistoquímico de la proteína p53**

Se analizó la expresión de la proteína p53 mediante inmunohistoquímica (técnica de Streptavidina-biotina), en muestras de cortes verticales de 5µm de grosor, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales en estudio. Luego los cortes se montaron sobre láminas de vidrio para poder ser examinadas posteriormente mediante microscopía óptica. Previo a la incubación del anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal antiproteína p53 Ab-5, Thermo Scientific), los cortes histológicos fueron calentados hasta ebullición y lavados con buffer fosfato. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario (Thermo Scientific, Biotinylated Goat Anti-Polyvalent), durante una hora y finalmente revelados con diaminobenzidina, que corresponde a un sustrato cromógeno. En cada prueba se emplearon controles negativos y positivos. En los controles negativos se sustituyó el anticuerpo primario por suero normal, y como control positivo se utilizaron casos de carcinoma de colon, previamente se había demostrado positividad para esta proteína (Thermo Scientific, Instructivo de uso).

### 6.2.9 Expresión de los resultados

Al ensayo fitoquímico realizado al infuso de *Haplopappus remyanus*, este fue evaluado de manera arbitraria en; presencia y ausencia de los compuestos analizados.

Para la observación de los cambios histológicos de los tejidos de piel de los distintos grupos de ratas, se evaluó de manera arbitraria en; presente o ausente. Además, la evaluación histológica se hizo de acuerdo a la localización y tipo de cambios.

Según la localización de cambios histológico se clasificó en:

- Epidermis: epitelio pavimentoso estratificado y queratinizado. Capa más superficial de la piel.
- Dermis: tejido conjuntivo muy vascularizado sobre el que se apoya la epidermis.
- Hipodermis: capa más profunda de la piel. Formada por lóbulos adiposos rodeados por nervios y vasos.

Según el tipo de cambios histológicos se clasificó en:

- Espongiosis: edema entre células escamosas de la epidermis.
- Paraqueratosis: inclusión patológica de núcleos en el estrato córneo de la epidermis. Es una forma de queratinización anormal. Los nucleolos se hacen más grandes y prominentes.

- Úlcera: erosión, pérdida parcial o total de la superficie de la piel, profunda que penetra al menos hasta la dermis.
- Daño epidérmico agudo: se refiere a la presencia de espongiosis, paraqueratosis y úlcera. Son signos de daño agudo producidos por exposición prolongada a radiaciones ultravioleta.
- Queratosis actínica: lesión displásica de los queratinocitos. Esta displasia suele aparecer tras una exposición crónica a la luz solar. Se puede clasificar en leve, moderada o severa. En el caso de que las atipias (células con variabilidad de formas y tamaños, además de presencia de nucleolo) se encuentren en el tercio superior de la epidermis (capa basal) se denomina leve. En el tercio medio, atipias moderadas. Y en el tercio inferior, comprometiendo todo el espesor de la epidermis, enfermedad de bowen o atipias severas.
- Neoplasia maligna invasora: afección cancerosa que traspasa la membrana basal de cualquier epitelio.
- Degeneración basófila del tejido conectivo: alteración asociada a las neoplasias cutáneas de cualquier tipo y que se traduce el daño cutáneo por exposición solar prolongada.
- Costra: acumulo de láminas de queratina y polimorfonucleares, compacta.

Para el análisis de las muestras de tejido de las ratas mediante técnica inmunohistoquímica de la proteína p53, se evaluó de manera arbitraria en; positivo y negativo. La tinción positiva para la proteína del gen p53 fue de tipo intranuclear. La

estimación de la positividad se realizó de acuerdo al porcentaje de células positivas en la muestra examinada. Para los fines de este estudio se consideraron como positivos aquellos casos en que al menos 5% de las células mostraron positividad (Thermo Scientific, Instructivo de uso).

## 7. RESULTADOS

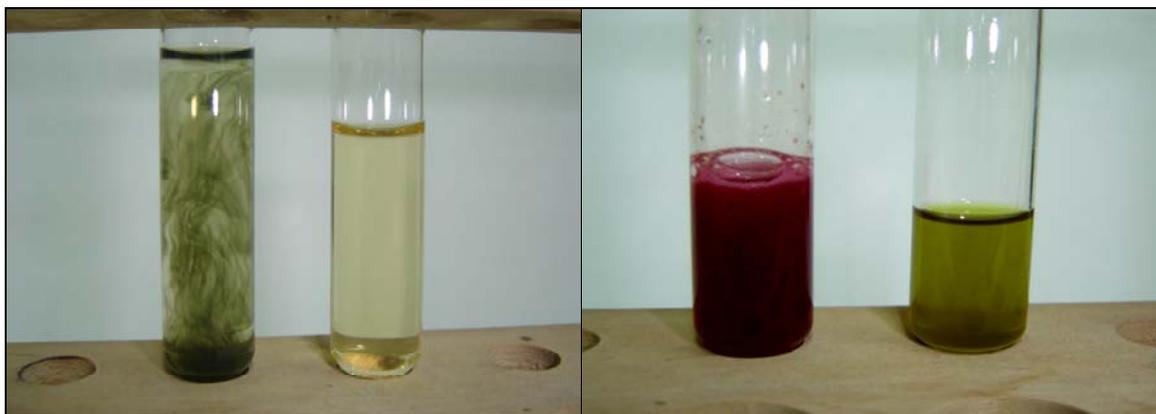
### 7.1 Estudio fitoquímico

Se realizó una batería de ensayos fitoquímicos a las hojas desecadas y fragmentadas de la planta de *Haplopappus remyanus*, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla Nº 2.** Resultados de los ensayos fitoquímicos.

Ensayos	Metabolitos	Resultado
Antrona en medio sulfúrico	Todo tipo de azúcares	+++
Reactivo de Molisch	Azúcares reductores y no reductores	+
Licor de Fehling	Azúcares reductores	-
Prueba de etanol	Gomas y mucílagos	+
Prueba de Espuma	Saponinas	-
S.R. FeCl <sub>3</sub>	Taninos	+++
Reacción de la cianidina	Flavonoides	+++
Reacción de Liebermann	Núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno	-
Reacción Keller-Kiliani	Heterósidos cardiotónicos (heterósidos con 2-desoxiazúcares)	-
Reacción de Kedde	Heterósidos cardiotónicos (genina de 23 atomós de carbono)	-
Reacción de Bornträger	Heterósidos antraquinónicos	-
Reacción de Shouteten	Heterósidos antraquinónicos	-
Reacción de Dragendorff	Alcaloides	-

El estudio fitoquímico de las hojas desecadas de *Haplopappus remyanus* dio reacción positiva para los siguientes metabolitos: todo tipo de azúcares (Figura N° 4), azúcares reductores y no reductores, taninos, gomas y mucílagos y flavonoides (Figura N° 5).



**Figura N° 4.** Izq. Reacción positiva a azúcares. Der. Control. **Figura N° 5.** Izq. Reacción positiva a flavonoides. Der. Control.

## 7.2 Evaluación del efecto antioxidante in-vitro

El infuso de *Haplopappus remyanus* mostró tener un efecto antioxidante, con un porcentaje de inhibición del radical libre DPPH de 77,6%. La mayor capacidad antioxidante se observó en el compuesto de referencia (Ácido ascórbico) y su porcentaje de inhibición del radical libre DPPH fue de 80%. (Anexo N° 2, Gráficos N° 1 y 2).

## 7.3 Observación microscópica del tejido

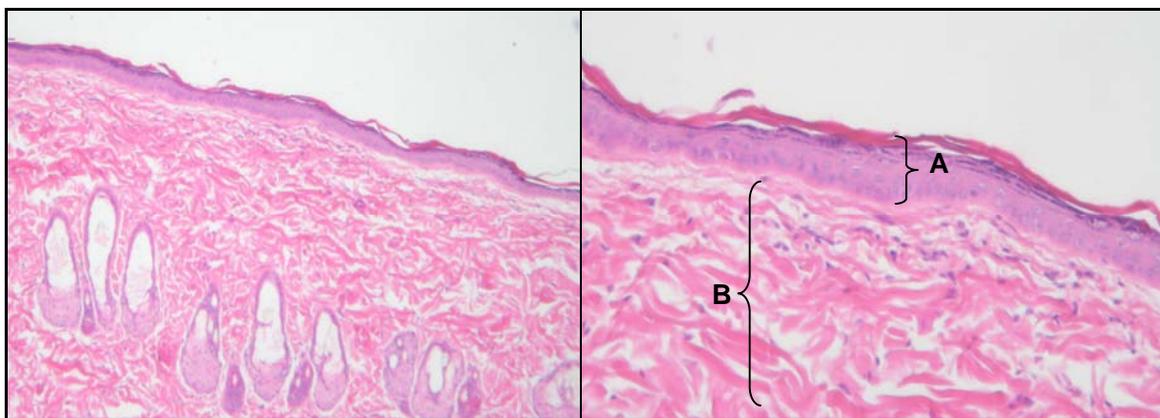
La evaluación de las muestras se realizó a través del estudio histológico con la tinción de Hematoxilina-eosina, observando a los distintos grupos experimentales cambios a nivel celular y presencia de daño.

### 7.3.1 Tejido de piel de ratas grupo Control

Con tinción de Hematoxilina-eosina, al grupo de ratas no tratadas y observadas durante 12 semanas.

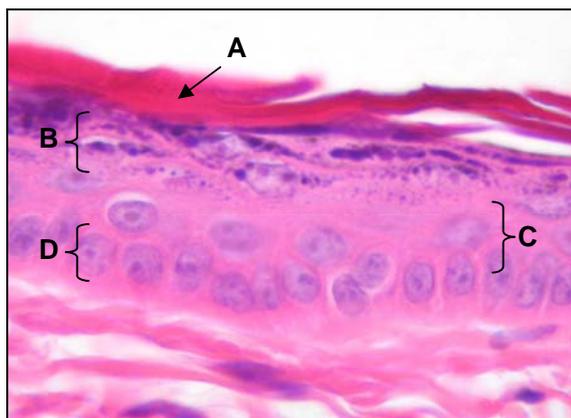
Observación:

En los tejidos de piel de todas las ratas del grupo control, presentaron piel histológicamente conservada. Tanto en la epidermis, dermis e hipodermis.



**Figura Nº 6.** HE (4X) Microfotografía de tejido de piel de rata grupo control.

**Figura Nº 7.** HE (10X) Microfotografía de tejido de piel de rata grupo control. (A) Epidermis y (B) dermis.



**Figura Nº 8.** HE (40X) Microfotografía de tejido de piel de rata grupo control. (A) Estrato córneo, (B) estrato granuloso, (C) estrato espinoso y (D) estrato basal.

### 7.3.2 Tejido de piel de ratas grupo Experimental 1

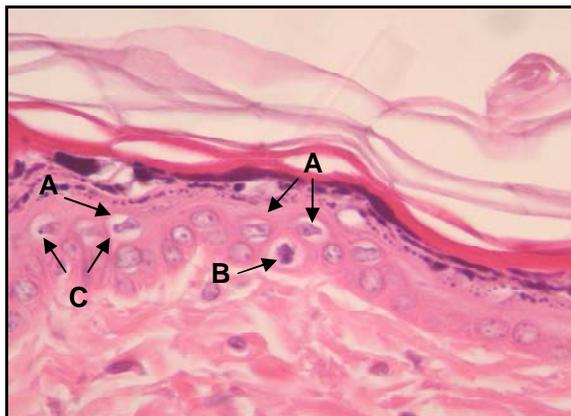
Con tinción de Hematoxilina-eosina, al grupo de ratas expuestas a radiación UV-B de 302 nm en una cámara de radiación por una hora durante 20 días. Observadas durante 12 semanas.

Observación:

El grupo no se le reconoce neoplasia maligna invasora de ninguna estirpe (epitelial ni mesenquimática). Tampoco degeneración basófila del tejido conectivo dérmico.

Lo observado en cinco de las muestras de piel de este grupo, fueron signos de daño epidérmico agudo por radiación ultravioleta-B, los cuales son: espongiosis, paraqueratosis y úlceras.

Sólo en una rata de las seis de este grupo, expuesta a radiación ultravioleta-B, se observó atipías escamosas localizadas en la epidermis, además de mitosis, alteración compatible con queratosis actínica con atipías leves.



**Figura Nº 9.** HE (40X) Microfotografía de tejido de piel de rata grupo experimental 1. Queratosis actínica con atipías leves. (A) Atipías nucleares, (B) mitosis y (C) espongiosis.

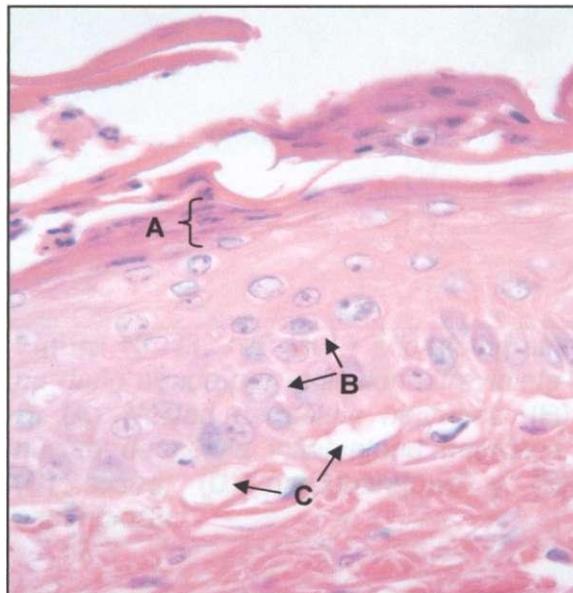
### 7.3.3 Tejido de piel de ratas grupo Experimental 2

Con tinción de Hematoxilina-eosina, al grupo de ratas que se les administró vía buco gástrica el infuso de *Haplopappus remyanus* por 5 días, previo a la exposición a la radiación UV-B, para luego administrarle el infuso una hora antes de la exposición a la radiación por un periodo de 20 días. Observadas durante 12 semanas.

#### Observación:

Al grupo no se le reconoce neoplasia maligna invasora epitelial ni mesenquimática. Tampoco se observó degeneración basófila de tejido conectivo dérmico.

Lo observado en seis de los tejidos de piel de este grupo, fueron signos de daño epidérmico agudo por radiación UV-B, los cuales son: espongiosis, paraqueratosis y úlceras.



**Figura N° 10.** HE (40X) Microfotografía del daño agudo por radiación ultravioleta-B. (A) Paraqueratosis, (B) espongiosis y (C) dilatación de los vasos de la dermis.

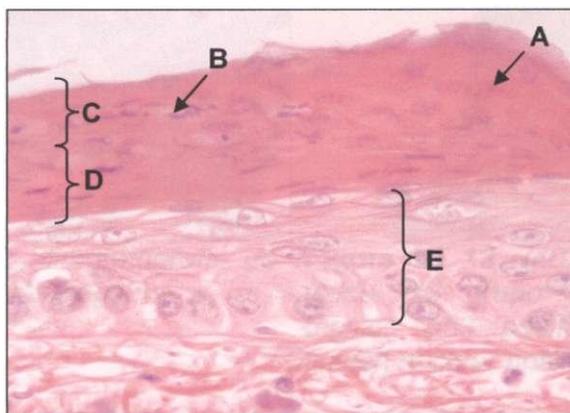
### 7.3.4 Tejido de piel de ratas grupo Experimental 2

Con tinción Hematoxilina-eosina, al grupo de ratas expuestas a radiación UV-B por una hora durante 20 días, las cuales fueron posteriormente tratadas con el infuso de *Haplopappus remyanus* por vía buco-gástrica diariamente por 12 semanas.

Observación:

Al grupo no se le reconoce neoplasia maligna invasora epitelial ni mesenquimática. Tampoco se observó degeneración basófila de tejido conectivo dérmico.

Lo observado en seis de los tejidos de piel de éste grupo, fueron signos de daño epidérmico agudo por radiación UV-B, los cuales son: espongiosis, paraqueratosis y úlceras.



**Figura N° 11.** HE (40X) Microfotografía de daño agudo por radiación ultravioleta-B. (A) Núcleo de célula necrótica, (B) núcleo de célula inflamatoria necrótica, (C) costra, (D) paraqueratosis y (E) espongiosis.

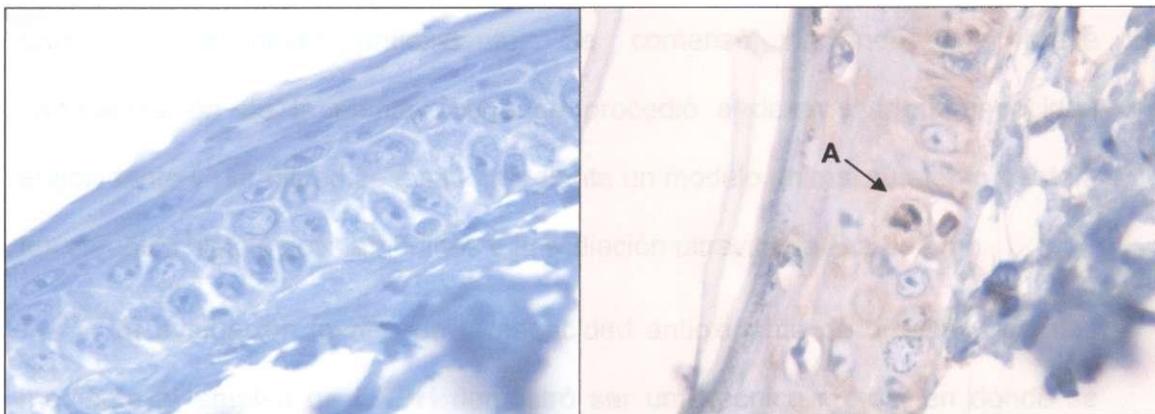
#### 7.4 Estudio inmunohistoquímico de la proteína p53

El grupo control presentó p53 negativa.

El grupo Experimental 1 mediante la técnica de p53 mostró positividad nuclear de moderada intensidad focal, en células epidérmicas correspondientes a este grupo (Figura N° 13).

La técnica p53 para el grupo Experimental 2, no mostró positividad nuclear, por lo tanto, la técnica fue negativa.

La técnica p53 no mostró positividad nuclear para el grupo Experimental 3, por lo tanto, la técnica fue negativa.



**Figura N° 12.** (40X) Microfotografía de tejido con inmunotinción negativa.

**Figura N° 13.** (40X) Microfotografía de tejido del grupo experimental 1, con técnica p53 positiva. (A) Célula con tinción nuclear positiva.

## 8. DISCUSIÓN

La vida de los seres humanos se ha desarrollado sobre la tierra en estrecha relación con el mundo vegetal. Desde las plantas el hombre primitivo obtuvo alimentación, abrigo, salud y bienestar general. Es así como gran parte de los fármacos utilizados en la actualidad tuvieron su origen en las plantas (Montes y col, 1999). Esto nos indica la importancia que tiene conocer las plantas medicinales, cuáles son sus principios activos y evaluar su actividad biológica.

Este trabajo de investigación se basó en evaluar el efecto del infuso de bailahuén, específicamente de la especie *Haplopappus remyanus*, la cual posee una alta capacidad antioxidante. Se comenzó haciendo una breve caracterización de la planta, luego se procedió a determinar su capacidad antioxidante y por último se evaluó mediante un modelo animal su efecto frente a los cambios histológicos atribuidos a la radiación ultravioleta-B a 302 nm.

La evaluación in-vitro de la capacidad antioxidante de drogas vegetales mediante el empleo de DPPH demostró ser una técnica rápida, en donde se requieren pequeñas cantidades de muestra y que, además, es fácilmente reproducible. En nuestro caso, se decidió evaluar la actividad atrapadora de radicales libres de la infusión del *Haplopappus remyanus*. La cual demostró tener un importante efecto como capturador del radical libre DPPH y mucho más alto que las otras hierbas analizadas, las cuales, son ampliamente utilizadas por la población en forma de infusión.

Este efecto es beneficioso en enfermedades donde el daño provocado por especies reactivas del oxígeno como el envejecimiento celular, cáncer, oxidación

lipídica, etc. puede ser evitada por agentes antioxidantes (Masteikova y col, 2007; Kukic y col, 2006). Es por esto que la adición de antioxidantes exógenos puede ser una herramienta útil para evitar estos trastornos y transformar el *Haplopappus remyanus* en una alternativa válida como suplemento natural y de bajo costo para la población.

Con el presente trabajo se pretendió evaluar el efecto de la infusión de *Haplopappus remyanus* contra los cambios histológicos atribuidos a la radiación ultravioleta-B en un modelo de piel de rata.

Basado en los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales y de acuerdo a las observaciones que se obtuvieron, se determina que tanto el tejido de piel del grupo experimental 2, como del experimental 3, en ambos se manifiesta la presencia de daño epidérmico agudo, lo que se le puede atribuir a la radiación ultravioleta-B que se les administró. En ambos grupos experimentales, la técnica p53 no presentó positividad, por lo que quizás se puede atribuir que el tiempo de radiación no fue el necesario como para provocar una neoplasia invasora.

Las técnicas inmunohistoquímicas nos ofrecen, a menudo, información del estado en la vía del control de la p53 celular. Estas técnicas detectan acumulación de la p53, que indican indirectamente presencia de mutaciones en el gen, aunque al ser medidos con otras técnicas esto puede variar. Algunos autores han señalado que la presencia de un fondo inflamatorio facilitaría la progresión a cáncer y, por lo tanto, las alteraciones de genes involucrados en el control del ciclo celular como p53. Sin embargo, el mayor problema de los estudios inmunohistoquímicos con la p53 parte en la interpretación, al valorar la inmunorreactividad de la proteína acumulada en el núcleo celular (Triviño y López, 1994).

La queratosis actínica es una lesión displásica de la epidermis (capa más externa de la piel) resultante de una exposición crónica a la luz solar y se asocia con una formación excesiva de queratina por parte de los queratinocitos, aparece en la piel con un diámetro inferior a un centímetro; tienen un color de tostado a pardo o de color de la piel, y presentan una consistencia rugosa. Es característica la presencia de atipias nucleares y mitosis. Los sitios de la piel comúnmente expuestos al sol (cara, brazos, dorso de las manos) son los afectados con mayor frecuencia (Robbins y col, 2004).

Durante la observación microscópica de los tejidos de piel de las ratas tratadas con *Haplopappus remyanus*, sólo se observó en una rata de quince atipias escamosas intraepidérmicas y mitosis, la cual corresponde a una forma de neoplasia escamosa in situ o queratosis actínica y no a una neoplasia invasora. Por lo que al infuso de *Haplopappus remyanus* no se le podría atribuir un efecto beneficioso considerable sobre el daño producido por la radiación ultravioleta-B, en este trabajo.

Existen trabajos sobre la protección de la fotocarcinogénesis en que utilizaron como modelo animal ratones de la cepa SKH-1 (ratones lampiños), lo cual podría ser una buena alternativa para este tipo de trabajos (Katiyar y col, 1997; Dhanalakshmi y col, 2004).

Además, se podría haber sometido a las ratas a más tiempo de radiación. Sin embargo, para tener la certeza de esto, hacen falta estudios posteriores.

## 9. CONCLUSIONES

- Se establece la presencia de flavonoides como sustancias antioxidantes en la infusión de *Haplopappus remyanus*, mediante el análisis fitoquímico.
- Se confirmó la alta capacidad antioxidante que posee la infusión del *Haplopappus remyanus*, mediante el porcentaje de inhibición de radicales libres con respecto al estándar utilizado como referencia.
- Se observó en las ratas del grupo control piel histológicamente conservada. Tanto en la epidermis, dermis e hipodermis.
- Se observó en cinco ratas del grupo Experimental 1, las cuales recibieron sólo radiación ultravioleta-B, daño epidérmico agudo y en una rata la presencia de queratosis actínica con atiplas leves.
- Se observó en todas las ratas del grupo Experimental 2, las cuales recibieron infuso de *Haplopappus remyanus* antes y durante la radiación ultravioleta-B, daño epidérmico agudo atribuido a la radiación ultravioleta-B.
- Se observó en todas las ratas del grupo Experimental 3, las cuales recibieron infuso de *Haplopappus remyanus* después de la radiación ultravioleta-B, daño epidérmico agudo atribuido a la radiación ultravioleta-B.

- Se confirmó con la técnica inmunohistoquímica de la proteína p53 lo observado microscópicamente en las muestras de tejido de las ratas tratadas anteriormente con tinción hematoxilina-eosina.
- La administración del infuso de *Haplopappus remyanus* antes, durante y después de la radiación ultravioleta-B, no tuvo efectos beneficiosos significativos frente a Los cambios histológicos de las ratas, rechazándose la hipótesis planteada para este estudio.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alias, Y., Awang, K., Hadi, H.A., Thoison, O., Sévenet, T., Pais, M. (1995) An antimitotic and cytotoxic chalcone from *Fissistigma lanuginosum*. *Journal of natural products* 58: 1160-1166

Cai, YZ. (2005) Structure-radical scavenging activity relationship of phenolic compounds from traditional Chinese medical plants. *Life Sci.*, 30,15-20

Cormack, D. 1988. *Histología de HAM*. 9ª Edición. México, Ed. Haría. Pág. 20-22

Dhanalakshmi, S., Mallikarjuna, G.U., Singh, R., Agarwal, R. (2004) Silibin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice via a decrease in thymine dimmer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip in epidermis. *Carcinogenesis* 25(8): 1459-1465

Diepgen, T.L., Mahler, V. (2002) The epidemiology of skin cancer. *British Journal of Dermatology* 146:1-6

General Nutrition Center, (GNC) (Visitada el día 18 de febrero 2008).

[http://vwww.gnc.cl/web/Aspx/vwww\\_Consejos/Cronicas.aspx?Id\\_News=116](http://vwww.gnc.cl/web/Aspx/vwww_Consejos/Cronicas.aspx?Id_News=116)

Harborne, J., Williams, C. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. (2004) Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone, España. Pág. 304

Hoffmann, A; C. Farga; J. Lastra; E. Veghazi. 2003. Plantas medicinales de uso común en Chile. 3ª Edición. Santiago, Ed. Fundación Claudio Gay. Pág. 49-52

Joyeux, M., Lobstein, A., Antón, R., Mortier, F. (1995). Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med.* 61 (2): 126-129

Jürgens, K. (2007) Farmacognosia, guía de laboratorio. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Kaneda, N., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., Reutrakul, V. (1991) Plant anticancer agents, Part 48. New cytotoxic flavonoids from *Muntingia calabura*. *Journal of natural products* 61: 145-148

Katiyar, S., Korman, N., Mukhtar, H., Agarwal, R. (1997) Protective effects of Silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *Journal of the National Cancer Institute* 89(8): 556-565

Kukic, J., Petrovic, S., Niketic, M. (2006) Antioxidant activity of four endemic *Stachys taxa*. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(4), 725-729

Makino, M., Fujimoto, Y. (1999) Flavonones from *Baeckea frutescens*, *Phytochemistry* 50: 273-277

Martínez, F.J., González, J.M., Tuñón, M.J. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 17: 271-278

Masteikova, R., Muselik, J., Bernatoniene, J., Bernatoniene, R. (2007) Antioxidative activity of Ginkgo, Echinacea, and Ginseng tinctures. *Medicina (Kaunas)*, 43(4), 306-309

Mathur, S., Kaur, P., Sharma, M., Katyal, A., Singh, B., Tiwari, M., Chandra R. (2004) The treatment of skin carcinoma, induced by UVB radiation, using 1-oxo-5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxi-witha-2-enolido, isolated from the roots of *Withania somnifera*, in a rat model. *Phytomedicine* 11: 452-460

Merriam, J., Löfgren, S., Michael, R., Söderberg, P., Dillon, J., Zheng, A., Ayala, M. (2000) An Action Spectrum for UV-B Radiation and the Rat Lens. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41 : N° 9

Miliauskas, G., Venskutonis, P., Van Beek, T. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85: 231-237  
*Monotes engleri*. *Phytochemistry* 45: 509-515

Montes, M., Wilkomirski, T., Valenzuela, L. 1991. *Plantas medicinales*. Ed. Concepción, Ed. Universidad de Concepción. Pág. 76

Morales, J., Grau, S., Jiménez, J., Mateu, J., Espona, M., Berges, M., Zarzuelo, A. (2006) Sun burn: photoprotection and treatment. *Ars Pharm* 47 (2): 119-135

Muñoz, O. 1992. *Química de la Flora de Chile*. Santiago, Editorial Universidad de Chile. Pág. 29-53

Nielsen, A. (1990) Efecto de silimarina del extracto de *Schizandra chinensis* y del *Haplopappus baylahuen* sobre los cambios bioquímicos e histológicos inducidos por tetracloruro de carbono en ratas. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Organización Mundial de la Salud, (Visitada el día 09 de septiembre 2007).

<http://www.20minutos.es/noticia/11695/0/SALUD/CANCER/OMS/>

Perlemuter, L. 1999. Anatomía-fisiología. España, Ed. Masson. Pág 208

Robbins, S; R. Cotran y V. Kumar. 2004. Patología humana. 7ª Edición. Barcelona, Ed. Gea consultoria, S.L.L. Pág. 873

Seo, E.-K., Silva, G.L., Chai, H.-B., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Hinghorn, A.D. (1997) Cytotoxic prenylated flavonones from

Singh, R., Agarwal, R. (2005) Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. European Journal of Cancer 41 (13): 1969-1979

Svobodova, A., Psotová, J., Walterová, D. (2003) Natural Phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. Biomedical papers 147(2): 137-145

Swindells, K., Rhodes, L. E. (2004) Influence of oral antioxidants on ultraviolet radiation-induced skin damage in humans. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 20: 297-304

Thermo Scientific. (2008) Instructions for use TP-015-HD, Ultra Vision detection system anti-polyvalent, HRP/DAB (Ready-To-Use)

Thermo Scientific. (2008) Research use only data sheet, p53 Ab-5 (Clone DO-7) mouse monoclonal antibody

Tournaire, C, Croux, S., Maurette, M. (1993) Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ( $^1\Delta$ ) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 19: 205-215

Triviño, A., López, A. (1994) La oncoproteína p53. *Med Clin* 103: 56-58

UACH, Programa Administrativo Ambiental Corporativo (PAAC). (2008) Lineamientos básicos para el manejo de residuos en la UACH. (Visitada el día 20 de Enero 2008). <http://www.paac.uach.cl/sec.php?sec=5.html>

Vituro, C, Molina, A., Schmeda-Hirschmann, G. (1999) Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). *Phytother Res.* 13(5):422-424

Vogel, H., González, M., Faini, F., Razmilic, I., Rodríguez, J., San Martín, J., Urbina, F. (2005) Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus-speaes* known as bailahuén. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 97-100

Vogel, H., San Martín, J., Razmilic, I., Doll, U. 2006. Antecedentes para la clasificación de tres especies de *Haplopappus* usadas como "Bailahuén": *H.baylahuen*, *H. multifolius* y *H. taeda*. Manuscrito U. Talca

Vogel, H; I. Razmilic; J. San Martín; U. Doll; B. González. (2005). Plantas Medicinales Chilenas; Experiencias de domesticación y cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui. Talca, Ed. Universidad de Talca. Pág. 121

Whitten, K.W., Davis, R.E., Larry Peck M.A. 1999. Química General. 5ª Edición. Madrid, Ed. Me Graw Hill. Pág 170-171

Zhao, J., Lahiri-Chatterjee, M., Sharma, Y., Agarwal, R. (2000) Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis* 21 (4): 811-816

## 11 ANEXOS

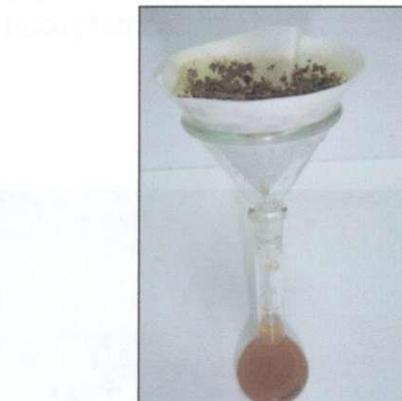
### 11.1 ANEXO N° 1: FIGURAS



**Figura N° 1.** Hojas desecadas de **Figura N° 2.** *Haplopappus remyanus*.



**Figura N° 3.** Preparación del infuso con hojas desecadas y fragmentadas de *Haplopappus remyanus*.



**Figura N° 4.** Filtración del infuso por papel filtro.



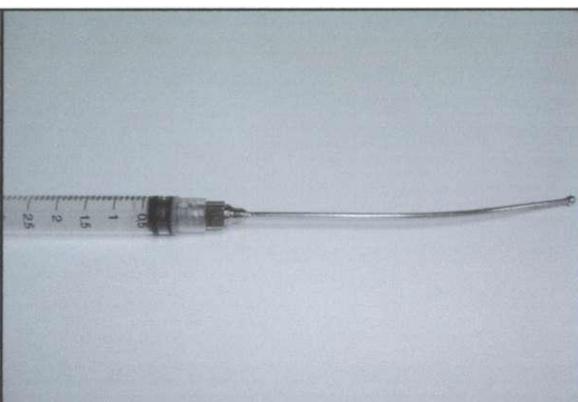
**Figura N° 5.** Preparación de las soluciones de *Haplopappus remyanus*.



**Figura N° 6.** Espectrofotómetro UV-Visible Unicam modelo Helios.



**Figura N° 7.** Ratas macho de la cepa Sprague Dawley.



**Figura N° 8.** Sonda para administración buco-gástrica.



**Figura N° 9.** Administración del infuso de *Haplopappus remyanus*.



**Figura N° 10.** Sistema de radiación.



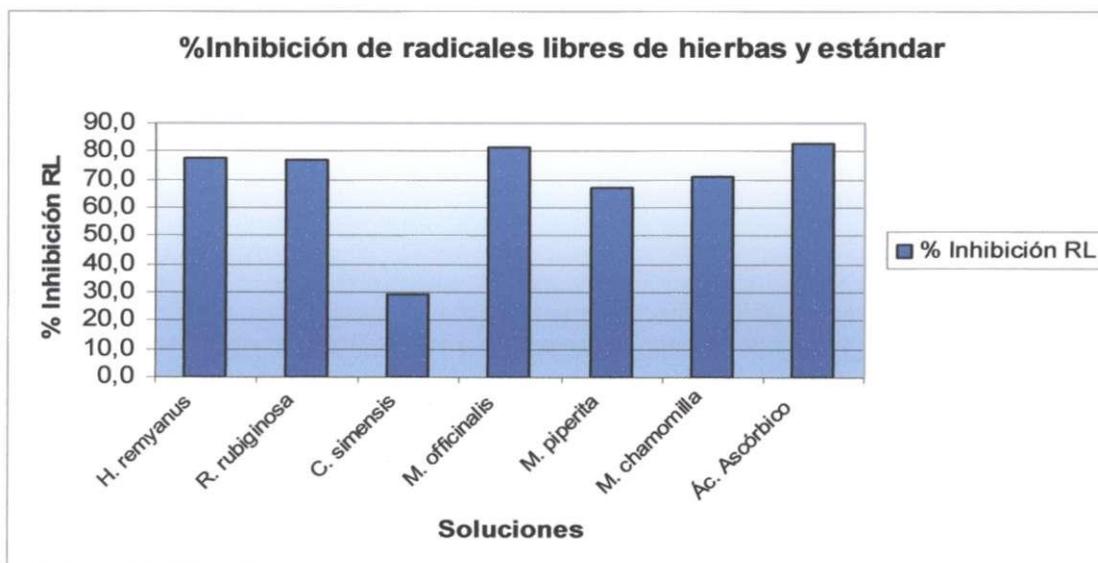
**Figura N° 11.** Proceso de corte de tejido. **Figura N° 12.** Corte de tejido tratado.

## 11.2 ANEXO N° 2: GRÁFICOS

**GRÁFICO N° 1.** Absorbancia (Abs) de hierbas y estándar sometidos a DPPH.



**GRÁFICO N° 2.** % Inhibición de radicales libres de hierbas y estándar.



### 11.3 ANEXO N° 3: TABLAS

**TABLA N° 1:** Absorbancia (Abs) y % de inhibición de radicales libres de hierbas y estándar.

Plantas	Absorbancia (Abs)				% Inhibición
	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	
<i>H. remyanus</i>	0,091	0,098	0,096	0,095	<b>77,6</b>
<i>R. rubiginosa</i>	0,100	0,098	0,095	0,098	<b>77,0</b>
<i>C. simensis</i>	0,304	0,295	0,302	0,300	<b>29,3</b>
<i>M. officinalis</i>	0,078	0,080	0,078	0,079	<b>81,5</b>
<i>M. piperita</i>	0,139	0,140	0,138	0,139	<b>67,3</b>
<i>M. chamomilla</i>	0,126	0,120	0,125	0,124	<b>70,9</b>
Ác. Ascórbico	0,073	-	-	0,073	<b>82,8</b>
Blanco	0,425	-	-	0,425	-