



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

“DETERMINACIÓN HISTOPATOLÓGICA EN PIEL DE RATAS DEL DAÑO OCASIONADO POR LA RADIACIÓN UVB Y EL PERÓXIDO DE BENZOÍLO CUANDO SE LES ADMINISTRA UNA INFUSIÓN DE *Haplopappus remyanus*”.

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

EVELYN ANDREA GRAFF ÁLVAREZ

VALDIVIA-CHILE

2008

*Quiero agradecer por todo el apoyo
brindado por mi familia en este trabajo,
en especial a mi madre y hermanas.*

*De igual forma agradezco a José por
su compañía en este largo camino.*

Agradecimientos

En primer lugar agradecer al proyecto que me permitió financiar este trabajo:

DID UACH, S-2006-41 “Efecto protector del infuso de *Haplopappus remyanus* (bailahuén) contra la fotocarcinogénesis en un modelo de piel de rata”.

Agradecer a todos los profesores que ayudaron en el desarrollo de esta tesis en especial a mi profesor patrocinante Alejandro Jerez, también a mis profesoras Annemarie Nielsen, Carolina Manosalva y Karin Jürgens. A la vez agradecer a profesionales del Hospital Base de Valdivia, por su paciencia a la Patóloga Dra. Tatiana Benavides y a la Tecnóloga médica Jenny Valencia. También, dar las gracias a la profesora Maria Cristina San Martín, del Instituto de Botánica, por su ayuda en la identificación de la especie estudiada en este trabajo.

Además, a todo el personal de Farmacia, en especial a Joel Pardo y Eduardo Aguayo, por su ayuda incondicional. A Don Genaro Alvial de Histología por su impecable trabajo con las muestras.

No quiero dejar de mencionar y dar gracias a todos los docentes de la Universidad Austral de Chile, que participaron en mi formación profesional y personal. En especial a mis queridos profesores del Instituto de Farmacia.

A mis amigos que me apoyaron y acompañaron en todo momento a Natalia R., Germán O., Karen S., Juan Pablo R., Paulina N., Gabriela A., Loreto M. y Yi Rang L. También a mi amiga y compañera de proyecto Verónica G.

A Mauricio González y Mahani Teave, amigos que aportaron sus conocimientos en este trabajo.

Finalmente, dar las gracias a cada persona que aportó para que este proyecto de tesis llegara a buen término.

Índice

1.1	Resumen	10
1.2	Summary	11
2.	Introducción	12
2.1	Biología de la piel	15
2.2	Oncoproteína p53	16
2.3	Radicales libres y peróxido de benzoílo	17
2.4	Plantas medicinales	18
2.5	Flavonoides	20
2.6	Ensayo de DPPH como forma de medir efecto antioxidante	21
2.7	<i>Haplopappus remyanus</i>	22
2.8	Hipótesis	25
2.9	Objetivos	26
2.9.1	Objetivo General	26
2.9.2	Objetivos Específicos	26
3.	Materiales y Métodos	27
3.1	Materiales	27
3.2	Métodos	30
3.2.1	Material vegetal	30
3.2.2	Preparación de la infusión	30
3.2.3	Estudio fitoquímico	30
3.2.4	Evaluación del efecto antioxidante	32
3.2.5	Grupos de trabajo con animales	33

3.2.6	Método de irradiación	34
3.2.7	Consideraciones éticas para el trabajo con animales	35
3.2.8	Disposición de residuos animales	35
3.2.9	Estudios histopatológicos	35
3.2.10	Técnica de inmunohistoquímica para p53	37
4.	Resultados	39
4.1	Estudio fitoquímico	39
4.2	Evaluación del efecto antioxidante	40
4.3	Estudio histopatológico de piel	43
4.4	Piel de ratas control	43
4.5	Piel de ratas grupo I	45
4.6	Piel de ratas grupo II	47
4.7	Piel de ratas grupo III	49
4.8	Determinación de inmunohistoquímica para p53	51
5.	Discusión	54
6.	Conclusiones	59
7.	Referencias	60
8.	Anexos	65

Índice de Figuras

Figura 1.	Estructura química de peróxido de benzoílo.	18
Figura 2.	Ratas machos cepa Sprague Dawley.	24
Figura 3.	Hojas <i>Haplopappus remyanus</i> .	24
Figura 4.	Grupo Control (Tinción H & E).	44
Figura 5.	Grupo I (Tinción H & E).	46
Figura 6.	Grupo II (Tinción H & E).	48
Figura 7.	Grupo III (Tinción H & E).	50
Figura 8.	Grupo II. Determinación de inmunohistoquímica para p53 mutada.	52
Figura 9.	Grupo III. Determinación de inmunohistoquímica para p53 mutada.	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1.	Absorbancia de solución estándar de ácido ascórbico e infusiones sometidas a ensayo de DPPH.	41
Gráfico 2.	Porcentaje de inhibición de radicales libres de solución estándar de ácido ascórbico e infusiones sometidas a ensayo de DPPH.	42

Índice de Tablas

Tabla 1.	Ensayos fitoquímicos y metabolitos a identificar.	31
Tabla 2.	Resultados de los ensayos fitoquímicos.	39

Abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- bcl-2: Protooncogen, por sus siglas en inglés para gen del linfoma de células B.
- CONAMA: Corporación Nacional del Medio Ambiente.
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
- FPS: Factor de protección solar.
- H & E: Tinción Hematoxilina - Eosina.
- m.s.n.m: Metros sobre nivel del mar.
- PAAC: Programa administrativo ambiental corporativo.
- PB: Peróxido de benzoílo.
- PO: Administración oral en inglés.
- p53: Fosfoproteína nuclear de 53 kDa.
- ras: Oncogen aislado en principio del sarcoma de rata, de allí su nombre.
- RUV: Radiación ultravioleta.
- S.R: Solución reactivo.
- UVA: Ultravioleta de espectro A.
- UVB: Ultravioleta de espectro B.

1. Resumen

La infusión al 20% p/v de hojas y tallos de *Haplopappus remyanus*, arbusto resinoso y aromático endémico de la zona centro norte de Chile y recolectado en la precordillera de la provincia de Colchagua, región del Libertador General Bernardo O'Higgins, se evaluó si su administración a ratas cepa Sprague Dawley atenúa el desarrollo de daño celular en la piel atribuidos a la radiación ultravioleta y a la acción oxidante del peróxido de benzoílo aplicado tópicamente.

Se utilizaron 4 grupos de trabajo, uno control. Otros tres corresponden a los sometidos a irradiación con luz UVB, a una longitud de onda de 302 nm, durante una hora por veinte días. Al grupo I se le administró infuso de *H. remyanus* antes y durante la exposición a UVB. A los grupos II y III, posterior a la irradiación se les aplicó peróxido de benzoílo dos veces a la semana por 4 semanas, además el grupo III recibió infuso de *H. remyanus* luego de terminada la irradiación con UVB. Los animales se mantuvieron en observación por 12 semanas al concluir el ciclo de exposición a radiación. Las muestras de piel fueron sometidas a estudios histopatológicos e inmunohistoquímica para determinar p53 mutada. Los resultados mostraron daño agudo por UVB y queratosis actínica, esto ratificado también por la positividad para p53 mutada al interior del núcleo de células epidérmicas, tanto en ratas tratadas y no tratadas con infuso de *H. remyanus*.

A la infusión de hojas y tallos de *Haplopappus remyanus*, se le realizaron estudios fitoquímicos determinando su contenido de flavonoides. Además, a esta infusión se le demostró a través del ensayo de DPPH su actividad antioxidante.

En este trabajo, la infusión de *H. remyanus* no demostró un marcado efecto de atenuación del desarrollo de cambios histológicos atribuidos a radiaciones UVB y a la acción oxidante del peróxido de benzoílo sobre piel de ratas.

1.1 Summary

Infusions and stems from *Haplopappus reymanus* by a 20% p/v, a resinous and aromatic bush endemic from central and northern Chile, collected in the Colchagua province, Libertador General Bernardo O'Higgins region, it was evaluated whether oral administration attenuates skin damage induced by UV radiation and topically applied benzoil peroxide oxidant action in Sprague Dawley rats.

Four assays groups, control and three others subjected to UVB radiation, with a 302 nm wavelength for one hour during 20 days. Group I was administered with *H. reymanus* infusion before and after UV irradiation Groups II and III were applied with benzoil peroxide after irradiation, twice a week for 4 weeks, besides group III received *H. reymanus* infusion after UVB irradiation was completed. The animals were kept under observation for 12 weeks after the radiation cycles finished. Skin samples were subjected to histopathological and immunohistochemical studies to detect mutated p53. The results showed acute damage caused by UVB light actinic keratosis which was consistent with the mutated p53 located inside the nucleus of epidermis cells, either in treated and untreated rats with *H. reymanus* infusion.

Infusions and stems from *Haplopappus reymanus*, were subjected phytochemical studies to assess its flavonoid content. This infusion was also subjected to DPPH assay to assess their antioxidant properties.

In this study *H. reymanus* infusion did not show any attenuation effect to development histological changes attributed to a UVB light and benzoil peroxide oxidative over rat skin.

2. Introducción

La exposición a la radiación ultravioleta (RUV) puede provocar tanto un efecto beneficioso como uno dañino en quién la experimenta. La radiación ultravioleta que llega a la tierra puede agruparse en las radiaciones UVA y UVB. Ellas presentan longitudes de onda que van de 315 a 400 nm y 280 a 315 nm, respectivamente, siendo estas últimas las de mayor energía. La radiación UVB 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 RUV han llegado a convertirse en un problema de salud pública a nivel mundial. En las últimas décadas del siglo XX, la piel de la población ha estado expuesta a elevados niveles de RUV 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 RUV 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 RUV, donde la incidencia de tumores malignos del tipo melanoma y no melanoma han experimentado un alza importante (Diepgen y Mahler, 2002).

El adelgazamiento de la capa de ozono puede tener consecuencias muy graves para nuestro planeta. Los científicos han detectado variaciones en la cantidad de ozono que van más allá de los cambios naturales y que tienen su origen en la actividad del ser humano. La capa de ozono filtra la mayor parte de la radiación proveniente del sol, en especial la UVB. A la vez, determina la estructura térmica de una gran porción de la estratosfera. Hace más de 50 años se comenzaron a utilizar algunas sustancias químicas compuestas de cloro y bromo como es el caso

de los aerosoles, en los refrigeradores y en los sistemas de aire acondicionado, entre otros, que destruyen el ozono y están haciendo que el escudo protector se esté debilitando. Los rayos ultravioletas pueden generar serios problemas a la vista, debilitar el sistema inmunológico, y provocar enfermedades en la piel tales como cáncer. Los dos tipos de radiación UVA y UVB contribuyen a la formación del cáncer de la piel por una alteración del ADN de las células (CONAMA, 2008). Es por ello que se hace indispensable proteger eficazmente a la piel de este daño físico ocasionado por las radiaciones ultravioletas, lo que hace necesario desarrollar nuevas estrategias de protección contra estas radiaciones.

En la piel expuesta a la radiación UV se induce la generación de especies reactivas de oxígeno. La radiación ultravioleta es capaz de reaccionar con el DNA, 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 esta (Svobodeva y col., 2003).

También existen una serie de compuestos químicos capaces de inducir carcinoma de piel, como es el caso del peróxido de benzoílo, un agente generador de radicales libres utilizado en preparados farmacéuticos y cosméticos de aplicación común sobre la piel, para el tratamiento del acné (Mathur y col., 2004).

Entre las medidas de protección dérmica contra la RUV se encuentran el uso de ropa protectora y bloqueadores solares. Estos últimos son capaces de reducir tanto los efectos agudos como los crónicos a consecuencia de la absorción de la RUV. 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” (Swindells y Rhodes, 2004).

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 RUV. En ellos, los agentes administrados oralmente resultan de particular interés, debido a que 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).

Los estudios epidemiológicos han aportado pruebas suficientes de que los rayos UV procedentes del sol incrementan la incidencia de carcinomas epidermoides, carcinomas basocelulares y, posiblemente, melanomas cutáneos. La magnitud del riesgo depende del tipo de rayos UV, de la intensidad de la exposición y de la cantidad de “manto protector” absorbente de la radiación creado por la melanina en la piel. Los rayos UV ejercen distintos efectos como inhibición de la división celular, inactivación de enzimas, inducción de mutaciones, y en dosis suficientes, muerte celular. La capacidad carcinógena de la luz UVB se atribuye a la formación de dímeros de pirimidina en el DNA. Este tipo de lesión del DNA se recupera a través de la vía de la reparación de la excisión de nucleótidos (Robbins y col., 2000).

2.1 Biología de la piel.

La piel es el órgano de mayor tamaño de la especie humana. Su grosor varía según su localización. Tiene máxima delgadez en los párpados y el mayor grosor en la planta de los pies y palmas de las manos. Es un sistema que regula la temperatura corporal, percibe los estímulos de dolor y placer, no permite que determinadas sustancias entren en el organismo y representa una barrera protectora frente a los efectos perjudiciales del sol (Manual Merck, 2005).

Cada estrato de la piel cumple con una tarea específica. La capa exterior, la epidermis, es más fina, en la mayor parte del cuerpo, que una película de plástico. La parte superior de la epidermis, el estrato córneo, contiene queratina, está formada por restos de células muertas y protege la piel de las sustancias nocivas. Luego, viene el estrato granuloso que está formado por una o dos capas de células, con forma rómbica, a este nivel comienzan a morir las células, rompiéndose la membrana y liberando su contenido al exterior. A continuación, se encuentra, el estrato espinoso, caracterizado por una serie de células cuboidales, que según van ascendiendo, se van aplanando. En la parte inferior de la epidermis, el estrato basal, se hallan los melanocitos, células que producen melanina, el pigmento oscuro de la piel (Manual Merck, 2005).

Debajo de la epidermis se localiza la dermis, que contiene receptores táctiles y del dolor, cuyas ramificaciones llegan hasta la superficie de la piel y a diversas glándulas funcionales de la misma: las glándulas sudoríparas, que producen el sudor, las glándulas sebáceas, que producen sebo, y los folículos pilosos, que dan origen al pelo. También, en el interior de la dermis, se encuentran vasos sanguíneos que proporcionan nutrientes y calor a la piel, así como nervios que se ramifican entre las diferentes capas de la misma. Por debajo de la dermis se encuentra la hipodermis, que es un estrato de grasa que ayuda a aislar al cuerpo del calor y del frío (Manual Merck, 2005).

2.2 Oncoproteína p53.

La oncoproteína p53 es una fosfoproteína nuclear de 53 kDa y 393 aminoácidos. Fue descubierta en 1979 al comprobar que aquella se unía a un producto proteínico oncogénico. Esta proteína está altamente conservada en vertebrados y presenta propiedades de un factor de transcripción. La p53 actúa manteniendo el control de la proliferación celular, en la síntesis y reparación del ADN, diferenciación celular, plasticidad genómica, muerte celular programada, y su mutación resulta en una proteína con funciones biológicas alteradas (Triviño y López, 1994). Mutaciones de 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., 2000).

Los rayos UVB producen también mutaciones en oncogenes y en genes supresores del cáncer, habiéndose detectado formas mutantes de los genes ras y p53, tanto en los cánceres humanos como en los inducidos en ratones. Estas mutaciones afectan sobre todo a las secuencias de dipiridimina en el interior del DNA, lo que implica a la lesión genética provocada por los UVB una causa del desarrollo de cánceres cutáneos. En modelos animales, las mutaciones del p53 se producen poco después de la exposición de los UVB, antes de que aparezcan los tumores y, por 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., 2000).

2.3 Radicales libres y peróxido de benzoílo.

Los radicales libres son grupos químicos, por lo general, con presencia de oxígeno, altamente reactivos e inestables, que se liberan en nuestras células en innumerables funciones biológicas y también se producen por influencias externas cuando nuestro organismo recibe el impacto de diversos contaminantes o radiaciones. La inestabilidad de los radicales libres se debe a que han perdido uno de sus electrones e intenta reponerlo tomándolo de otros átomos. Esto crea una reacción en cadena que ocasiona grandes daños a nuestras células, daños que se manifiestan en envejecimiento y en un gran número de enfermedades. Los radicales libres cumplen numerosas funciones útiles en el organismo, pero también tienen el potencial de dañar células y el material genético allí contenido (Salas, 2007).

Además del metabolismo celular, existen otras fuentes generadoras de radicales libres tales como: los rayos ultravioletas del sol, los gases de los automóviles, la contaminación ambiental y el humo del cigarrillo. Por otro lado, nuestro propio cuerpo produce radicales libres con propósitos específicos. Uno de estos es el de protegernos contra agentes externos. Un ejemplo es el de las células blancas del sistema inmunológico conocidas como neutrófilos y macrófagos. Estas células utilizan grandes cantidades de oxígeno con el cual producen radicales libres que se unen con las bacterias o virus invasores, para eliminarlos (Salas, 2007).

Existen sustancias con elevado poder oxidante que dañan las células, una de ellas es el peróxido de benzoílo (Soguero, 2000). El peróxido de benzoílo es un poderoso agente oxidante obtenido a partir del ácido benzoíco que forma parte del arsenal terapéutico tópico utilizado para el tratamiento del acné. Entre sus ventajas destacan su eficacia tanto en lesiones inflamatorias, como no inflamatorias, la rapidez de acción y la no producción de resistencias bacterianas propias

de los antibióticos. Respecto al efecto terapéutico, el peróxido de benzoílo presenta una triple actividad: antibacteriana, sebolítica y queratolítica (Martindale, 2004).

Como inconveniente de este principio activo con las formulaciones tradicionales se encuentra la irritación. Por otro lado se han descrito dermatitis de contacto en un 1-3% de los casos de tratamiento. Se debe tener precaución con este medicamento evitando exponer la piel a los rayos del sol, ya que la vuelve mucho más sensible a los daños provocados por luz solar (Martindale, 2004).

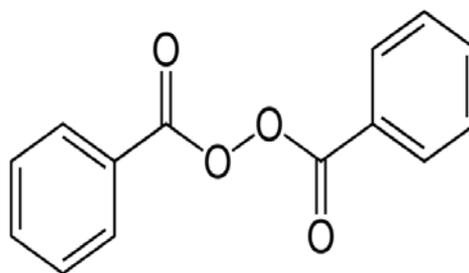


Figura 1. Estructura química del peróxido de benzoílo.
Fuente: Martindale, 2004.

El peróxido de benzoílo actúa como un agente oxidante al romper su estructura química y liberar radicales libres al medio, para esto debe haber un activador, que puede ser un agente externo como el calor, radiación u otra sustancia química (Soguero, 2000).

2.4 Plantas medicinales.

Una de las plantas más estudiadas respecto a su actividad antitumoral y que crece en la zona central de Chile es el cardo mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn), cuya administración ha demostrado entregar una gran protección frente a iniciación, promoción y concreción de

tumores de piel mediados por RUV y carcinogénesis mediada por agentes químicos en piel de ratón (Dhanalakshmi y col., 2004).

La Silimarina es un flavonoide que se extrae de las semillas del cardo mariano, la cual está compuesta por tres isómeros silibinina, silidianina y silicristina. Estudios han demostrado que la Silimarina inhibe los eventos bioquímicos relacionados con la generación de tumores luego de la exposición a RUV en piel de rata (Dhanalakshmi y cols., 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 2000 años en la medicina tradicional para tratar problemas hepáticos. Aparece de manera silvestre en los climas mediterráneos y actualmente existen medicamentos preparados a partir de su sustancia activa. Estudios han demostrado sus propiedades altamente antioxidantes que le permiten atrapar radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Además, ha demostrado tener la capacidad de reparar el daño provocado a nivel de DNA por la radiación UVB (Singh y Awargal, 2005).

Las especies del género *Haplopappus* son utilizadas en diferentes regiones con el nombre de “bailahuén” como planta medicinal. Se ha descrito un grupo de 6 especies que son confundidas y utilizadas como plantas medicinales en Chile con el nombre de bailahuén: *Haplopappus baylahuen*, *H. taeda Reiche*, *H. multifolius Phil.*, *H. remyanus Wedd.*, *H. angustifolius (DC.) Reiche*, *H. rigidus Phil.* (Muñoz y col., 1981).

Estas especies medicinales nativas de Chile con reconocidas propiedades colagogas y coleréticas, han sido utilizadas tradicionalmente por la población y una pequeña fracción está siendo exportada como digestivo en bolsitas de té para ser consumido como infusión. Existen varias especies del género *Haplopappus* que tiene su hábitat entre los 26° a 35° de latitud sur en las montañas sobre los 2000 m.s.n.m. Un representante, *Haplopappus remyanus*, en sus hojas presenta flavonoides con actividad antioxidante (Vogel y col., 2005). Estudios realizados en la

Universidad Austral de Chile demostraron tanto bioquímica como histológicamente que el *Haplopappus taeda* tiene propiedades protectoras de las células hepáticas (Nielsen, 1990). Además, fue realizada una investigación en la misma universidad para determinar que adicionalmente posee un efecto hepatorregenerador (Nielsen, proyecto DID S-2004-46).

2.5 Flavonoides.

Los flavonoides son una clase de pigmentos vegetales hidrosolubles. Estos 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. Algunos de los flavonoides más conocidos, como la genisteína de soya y la quercetina de las cebollas, se consideran subcategorías de las categorías. Aunque todos están relacionados estructuralmente, sus funciones son distintas. Los flavonoides incluyen también la hesperidina, la rutina, los flavonoides cítricos y otros suplementos. La resistencia que presentan las plantas a la radiación UVB (banda de menor longitud de onda, pero de mayor energía) es atribuida a la presencia de flavonoides en las hojas. Ellos absorben en la zona que va de 280 a 315 nm actuando así como filtros de la radiación y protegiendo a los tejidos vegetales del daño que esta le pueda producir. 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 UVB 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 UVB que la planta original (Harbone y Williams, 2000).

Entre los flavonoides que han sido estudiados como profilácticos de daños a la piel inducida por RUV 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 RUV (Svobodeva y col., 2003).

Otra clase de funciones que se les atribuye a los flavonoides son el poseer actividad antioxidante, capacidad de realizar inhibición enzimática, prevención de enfermedad coronaria, actividad protectora vascular y actividad citotóxica antitumoral. Este tipo de sustancias ha demostrado ser capaz de actuar atrapando especies oxidantes como el anión superóxido y radicales hidroxilo y peroxilo (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.

2.6 Ensayo de DPPH como forma de medir efecto antioxidante.

Existen diversas formas de medir el efecto antioxidante, existen métodos in vivo e in vitro. Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del

compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo (Viturro y col., 1999).

Un método in vitro para determinar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos es el uso del radical 2,2-difenil-1picril hidracilo (DPPH), el cuál es de color violeta intenso y al ser capturado por sustancias antirradicalarias, pierde su coloración característica (Viturro y col.,1999)

2.7 *Haplopappus remyanus.*

El bailahuén (*Haplopappus remyanus*) es un arbusto muy resinoso y aromático, de hasta un metro de altura. Especie nativa de Chile, su hábitat se encuentra principalmente en las laderas cordilleranas preandinas de la cuarta región a la metropolitana, en altitudes inferiores a los 2000 m.s.n.m. La literatura informa también de su presencia en la región del Libertador General Bernardo O'Higgins (Vogel y col., 2005).

En observaciones, se ha encontrado que las poblaciones de *Haplopappus remyanus* están bien representadas formando parte de matorrales bajos y abiertos lo que facilita percibir a distancia su aromaticidad y una fácil y directa visualización como ocurre en el Alto del cruces o límite comunal entre Vicuña y Río Hurtado en la cuarta región (Gajardo, 1994).

Las hojas son ovaladas de aproximadamente 10 centímetros de largo en filotaxis alterna, sésiles y semiabrasadoras. Presentan un margen dentado y espinoso. Las espinas son cortas y agudopunzantes. Las plantas 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. Las flores 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. Los aquenios son pilosos y el vilano amarillento, con dispersión en el mes de marzo. (Vogel y col., 2005).

Los compuestos químicos de *Haplopappus remyanus* distribuidos en la parte aérea de la planta son:

Labdanos: Ácido 18-hidroxiabda-7, 13E-dien-15-oico y ácido 18-dihidroxicinnamoiloxi-labda-7, 13E-dien-15-oico.

Ésteres monoterpénicos: 9-cinnamoiloxi-alfa-terpineol, 9-dihidrocinnamoiloxi-alfa-terpinol, 8-hidroxi-9-acetoxi-beta-fellandrene, 8-hidroxi-9-acetoxi-p-cymeno, 8-hidroxi-9-dihidrocinnamoiloxi-p-cymeno y 9-(p-cumamoiloxi)-mirceno.

Flavononas: Eriodictiol, pinostrobin, 3-acetilalpinona (Vogel y col., 2005).

El bailahuén (*Haplopappus remyanus*) contiene en sus hojas flavonoides a los cuales se les atribuye actividad antioxidante, entre otras funciones (Vogel y col., 2005).

En un estudio con DPPH que se llevaron a análisis cuatro especies de *Haplopappus*: *Haplopappus baylahuen*, *Haplopappus taeda*, *Haplopappus multifolius* y *Haplopappus remyanus*, la infusión que mostró tener mayor capacidad antioxidante, fue la infusión de *H. remyanus* (Vogel y col., 2005). Es por ello, que en este trabajo se propuso estudiar si la infusión de *Haplopappus remyanus* administrado oralmente puede contrarrestar el efecto nocivo de la RUV y de peróxido de benzoflora sobre piel de rata.



Figura 2. Ratas machos cepa Sprague Dawley. Fuente: Álbum personal.



Figura 3. Hojas *Haplopappus remyanus*. Fuente: Álbum personal.

2.8 Hipótesis

El presente trabajo plantea como hipótesis que la administración oral de una infusión de *Haplopappus remyanus* atenúa el desarrollo de cambios histológicos atribuidos a la radiación ultravioleta y a la acción del peróxido de benzoílo aplicado tópicamente a piel de ratas.

2.9 Objetivos

2.9.1 Objetivo General

Determinar si la administración oral de una infusión de bailahuén atenúa el daño celular de la piel asociado a la radiación ultravioleta y a la acción oxidante del peróxido de benzoílo aplicado tópicamente a piel de ratas.

2.9.2 Objetivos Específicos

- Detectar a través de estudios fitoquímicos la presencia de flavonoides en una infusión de hojas de *H. remyanus* al 20% p/v.
- Evaluar el efecto antioxidante in vitro de la infusión de hojas de *Haplopappus remyanus*.
- Realizar estudios histológicos para determinar alteraciones carcinogénicas en la piel de las ratas, luego de ser sometidas a radiación ultravioleta y a la aplicación tópica de una solución de peróxido de benzoílo.
- Realizar estudios histológicos para determinar alteraciones carcinogénicas en la piel de las ratas, luego de ser sometidas a radiación ultravioleta + peróxido de benzoílo y tratadas con una infusión de bailahuén al 20% p/v.
- Determinar por medio de inmunohistoquímica la mutación de p53 en células epidermales de ratas luego de ser sometidas a radiación ultravioleta y a la aplicación tópica de peróxido de benzoílo.
- Determinar por medio de inmunohistoquímica la mutación de p53 en células epidermales de ratas luego de ser sometidas a radiación ultravioleta + peróxido de benzoílo y tratadas con una infusión de bailahuén al 20% p/v.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales.

Material vegetal

- Hojas y tallos de *Haplopappus remyanus*.
- Hojas y tallos de *H. baylahuen*.
- Hojas de *R. graveolens*, *P. boldus*, *I. paraguariensis*, *P. lanceolata*, *M. piperita*, *B. globosa*, *C. sinensis*, *C. ambrosioides* *S. marianum* y *M. officinalis*.
- Hojas y flores de *M. recutita*.
- Frutos y hojas de *R. eglanteria*.
- Frutos secos de *V. macrorpon* y de berries (frutilla, arándanos, mora y frambuesa).
- Flores de *L. angustifolia* Millar.

Instrumentos

- Microscopio de luz modelo BX31, marca Olympus.
- Espectrofotómetro, marca UNICAM, modelo Helios Alfa.
- Máquina trituradora, marca Moulinex.
- Lámparas de radiación UV, modelo UVLMS-38 EL Series 3UV (365, 264, 302), utilizada a 302 nm.
- Micrótopo, marca R. Juning AG Heidelberg.
- Baño regulable, marca Lab-Line Instruments Inc.

Material de laboratorio

- Agua destilada.
- Cámaras de irradiación.

- Sondas bucucogástricas.
- Jeringas de 1 y 3 ml.
- Jaulas para ratas.
- Papel filtro.
- Matraz aforado de 50 ml.
- Embudo de decantación.
- Vidrio reloj.
- Vasos precipitados de 100 y 250 ml.
- Tijeras, pinzas y tabla de disección.
- Porta y cubra objetos.
- Moldes para muestras incluidas en histosec.

Reactivos

- Reactivo de Dragendorff.
- Antrona en medio sulfúrico.
- Reactivo de Molisch.
- Licor de Fehling.
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$).
- S.R. FeCl_3 .
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), Sigma.
- Ampollas de Diazepam, Laboratorio Biosano.
- Peróxido de benzoílo gel al 10%, Laboratorio Galderma.

- Formalina al 10%.
- Histosec (parafina sólida).
- Colorante Hematoxilina - Eosina.
- Éter.

Enzimas

- Kit enzimático que corresponde a un sistema de detección de UltraVision Anti-, Polivalente HRP/DAB, marca Thermo Scientific.
- Anticuerpo monoclonal de ratón, p53 Ab-5 (Clon DO-7), marca Thermo Scientific.

Animales de experimentación

- Ratas machos de 6 semanas de edad con un peso entre 250 - 400g, cepa Sprague Dawley.

3.2 Métodos

3.2.1 Material vegetal.

El material vegetal fue recolectado en su hábitat natural, sector de las Peñas, provincia de Colchagua, región del Libertador General Bernardo O'Higgins. Esta recolección se realizó en el momento de la floración y luego, la planta se identificó taxonómicamente. Las hojas fueron desecadas a temperatura ambiente en un ambiente ventilado durante un mes, para luego preparar la infusión.

3.2.2 Preparación de la infusión (Martin y col., 1988).

La infusión de *Haplopappus remyanus* se preparó con 200 gramos de hojas desecadas y se completó con agua hirviendo hasta un volumen de 1000 mL (Anexos, Figuras 1 y 2). La infusión de bailahuén se preparó al momento de la administración a las ratas.

3.2.3 Estudio fitoquímico (Jürgens, 2007).

El análisis fitoquímico tiene como objeto analizar cualitativamente 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. Los ensayos realizados a una porción de hojas secas y trituradas de *Haplopappus remyanus* se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 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 ₃	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

3.2.4 Evaluación del efecto antioxidante

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-picrilhidrazil (DPPH), la capacidad antioxidante de *H. remyanus* se comparó con otras sustancias naturales.

De acuerdo a lo descrito por Kukic y colaboradores el grado de decoloración de la solución de DPPH (20mg/L) indicaría la eficiencia atrapadora de los productos agregados (Kukic y col., 2006).

Para cada infusión se realizó una determinación a una concentración de 0,5% p/v, siguiendo la técnica descrita a continuación: a 1,5 µL de solución de DPPH (20mg/mL) se agregan 0,75 µL de cada infusión de concentración 0,5 mg/mL. Después de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente se midió su absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro. Se realizó un blanco en las mismas condiciones, con 0,75 µL de agua y un control con 0,75 µL de ácido ascórbico (1mg/mL). El porcentaje de inhibición se calcula como sigue (Somparn y col., 2007).

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

3.2.5 Grupos de trabajo con animales (Mathur y col., 2004).

Para este estudio se utilizaron ratas de 6 semanas de edad. Las cuales fueron aclimatadas por 15 días previos y durante el estudio con comida y agua ad libitum, condición que fue mantenida durante todo el transcurso del trabajo. Se debe mencionar que el trabajo con animales se ve respaldado en estudios previos relacionados a la protección UV otorgada por los flavonoides, en los cuales fueron utilizados estos animales ratas cepa Sprague Dawley como modelos. Se formaron 3 grupos experimentales de 6 ratas cada uno, más un grupo control. Las experiencias realizadas en cada grupo fueron las siguientes:

GRUPO I: A los animales primero se les administró oralmente el infuso de bailahuén vía sonda buco-gástrica a una dosis de 7,5 mL/Kg (Anexos, Figura 3), por 5 días previos a la exposición a la radiación UVB de 302 nm, y luego se administró el mismo infuso una hora antes de la exposición a la radiación por un periodo de 20 días, la exposición a radiación fue de una hora diaria. Terminado los 20 días de irradiación, los animales se mantuvieron en observación por 12 semanas.

GRUPO II: Los animales fueron expuestos a radiación UVB de 302 nm durante una hora por 20 días en una cámara de irradiación. Terminado el ciclo de irradiación, a los animales, se les aplicó tópicamente peróxido de benzoílo (20 mg/animal) dos veces por semana durante un mes. Luego, de terminado el ciclo de irradiación, los animales, permanecieron en observación durante 12 semanas.

GRUPO III: Los animales fueron expuestos a radiación UVB de 302 nm durante una hora por 20 días en una cámara de irradiación. Terminado el ciclo de irradiación, a los animales, se les aplicó tópicamente peróxido de benzoílo (20 mg/animal) dos veces por semana durante un mes. A los animales, luego de concluido el ciclo de irradiación, se les administró infuso de bailahuén vía sonda buco gástrica a una dosis de 7,5 mL/Kg durante 12 semanas.

GRUPO CONTROL: Los animales fueron mantenidos en condiciones de comida y agua ad libitum, sin ser expuestos a radiación UVB, ni tampoco se les administró infusión de bailahuén o aplicación de peróxido de benzoílo sobre sus pieles. Son ratas no tratadas durante el total de semanas que duró el estudio.

Nota: El peróxido de benzoílo se les aplicó tópicamente a las ratas de los grupos dos y tres los días lunes y jueves, durante cuatro semanas.

3.2.6 Método de irradiación (Merriam y col., 2000).

A las ratas de experimentación, cepa Sprague Dawley, se les sedó con una inyección de diazepam intraperitoneal (dosis 1mg/Kg), en un tiempo de cinco minutos logró su efecto de sedación, luego de esto las ratas se colocaron en una cámara de irradiación, la que logró contener hasta cuatro animales de experimentación por cada ciclo de irradiación (una hora de radiación UVB diaria por rata). La lámpara de rayos UV se ubicó sobre la cámara de irradiación a quince centímetros de esta. La radiación UVB tuvo una longitud de onda de 302 nm (Anexos, Figuras 4 y 5).

3.2.7 Consideraciones éticas para el trabajo con animales (PAAC, UACH).

De acuerdo a las consideraciones bioéticas para el trabajo con animales de la Universidad Austral de Chile se dispuso que los animales fueran tratados adecuadamente para evitarles el dolor y sufrimiento innecesarios. Cuando se detectó que un tratamiento o acción pudiera provocar dolor a los animales, este procedimiento se realizó bajo anestesia.

3.2.8 Disposición de residuos animales (PAAC, UACH).

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.

3.2.9 Estudios histopatológicos (Katiyar y col., 1997).

Una vez transcurrido el periodo de 12 semanas de observación, las ratas fueron sacrificadas para luego ser escindida la piel del dorso, se sacó una muestra de piel de 3x2 cm (Anexo, Figura 6). Está fue fijada en formalina tamponada al 10% y embebida en parafina sólida (Histosec). Se realizaron cortes verticales de 5 μ m, los cuales fueron montados sobre láminas de vidrio y posteriormente teñidos con Hematoxilina – Eosina (H & E). Finalmente, fueron examinadas por un profesional patólogo con microscopio de luz modelo BX31, marca Olimpos (aumento de 40x y 400x) para determinar la existencia de células anormales en la piel. Los criterios utilizados fueron el tipo de lesión y su localización.

Localización de las lesiones en la piel:

La piel esta compuesta por tres capas: Epidermis, dermis e hipodermis.

Epidermis: Capa más externa, esta compuesta por: Estrato córneo (capa superior), Estrato granuloso, Estrato espinoso y Estrato basal (capa inferior).

Dermis: Capa ubicada entre la epidermis y la hipodermis, constituida principalmente por fibras de colágeno, receptores sensitivos, células de tejido conectivo, glándulas sebáceas y sudoríparas, vasos sanguíneos y linfáticos, entre otros.

Hipodermis: Capa más profunda de la piel, formada principalmente por una capa variable de tejido adiposo (Manual Merck, 2005).

Tipos de lesiones de la piel:

Espongiosis: Edema entre células escamosas de la epidermis.

Paraqueratosis: Inclusión patológica de núcleos en el estrato córneo de la epidermis.

Úlcera: Erosión, pérdida parcial o total de la superficie de la piel, profunda y penetrar al menos hasta la dermis.

Costra: Sangre, pus, o suero desecados en la superficie de la piel. Una costra puede formarse donde se haya producido una lesión cutánea.

Espongiosis, paraqueratosis, costras y úlceras son signos de daño agudo producidos por exposición prolongada a radiaciones ultravioletas.

Queratosis actínica: Lesión displásica de los queratinocitos o células escamosas. Se puede clasificar en leve, moderada o severa. Queratosis actínica leve es aquella lesión que tiene atipias (células con variabilidad de formas y tamaños, además tienen presencia de nucleolo) sólo en el estrato basal. Queratosis actínica moderada es aquella que tiene células atípicas en los estratos basal y espinoso. Queratosis actínica severa o enfermedad de Bowen, lesión que

compromete a todo el espesor de la epidermis, es decir, existen atipías en todo el espesor de la epidermis.

La queratosis actínica en cualquiera de sus grados: leve, moderada o severa puede presentar células en mitosis y células necróticas intraepidérmicas.

Neoplasia maligna invasora: Son tres tipos de tumores que afectan al epitelio de la piel, ellos son Carcinoma basocelular, Carcinoma escamoso y Melanoma. El Carcinoma basocelular es el tumor cutáneo más frecuente en la raza blanca y esta formado por células semejantes a las de la capa basal de la epidermis, no produce metástasis. El Carcinoma escamoso es una tumoración maligna de la piel derivada de los queratinocitos de la epidermis y tiene capacidad de metástasis. El Melanoma es un tumor maligno derivado de los melanocitos y tiene elevada agresividad, y tendencia a la producción de metástasis.

Estos tipos de tumores tienen como factor etiológico común la exposición solar.

Degeneración basófila del tejido conectivo: Cambios en el tejido conectivo, caracterizado por una menor resistencia y elasticidad de la piel, existiendo una disminución de los haces de colágeno en la dermis. Alteración asociada a neoplasias cutáneas de cualquier tipo (Robbins y col, 2000).

3.2.10 Técnica de inmunohistoquímica para p53 (Thermo Scientific, Instructivo de Uso).

Se analizó la expresión de proteína p53 mutada mediante inmunohistoquímica (técnica de Streptavidina-biotina), en muestras de cortes verticales de 5 micras de grosor de los cuatro grupos en estudio, dichos cortes fueron montados sobre láminas de vidrio. Previo a la incubación del anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anti-proteína p53 Ab-5, Thermo Scientific), los cortes histológicos fueron calentados hasta ebullición y lavados con *buffer* fosfato.

Posteriormente, fueron incubados con anticuerpo secundario (Biotinylated Goat Anti-Polivalent, Thermo Scientific), durante una hora y finalmente revelados con diaminobenzidina, que corresponde a un sustrato-cromógeno, que da una tinción color marrón. 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 les había demostrado positividad para esta oncoproteína.

Forma de medición de la positividad: La tinción positiva para la proteína del gen p53 fue de tipo nuclear. 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.

4. Resultados

4.1 Estudio fitoquímico

Se realizó una batería de ensayos fitoquímicos a las hojas secas y trituradas de *Haplopappus remyanus*, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 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 ₃	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	-

4.2 Evaluación del efecto antioxidante

Se sometieron a este ensayo la infusión filtrada de las hojas y tallos de *Haplopappus remyanus*, como también, las infusiones de:

- *Haplopappus baylahuen* Remy, Bailahuen (hojas y tallo).
- *Ruta graveolens* L., Ruda (Hojas).
- *Peumus boldus*, Boldo (Hojas).
- *Matricaria recutita*, Manzanilla (Flores y hojas).
- *Ilex Paraguariensis*, Mate (Hojas).
- *Plantago lanceolata*, Llantén (Hojas).
- *Silybum marianum*, Cardo Mariano (Extracto soluble).
- *Mentha piperita*, Menta (Hojas).
- *Buddleja globosa*, Matico (Hojas).
- *Rosa eglanteria*, Rosa Mosqueta (Frutos y hojas).
- *Camellia sinensis*, Té verde, blanco, negro (Hojas).
- *Vaccinium macrorpon*, Cranberry (Fruto seco).
- *Chenopodium ambrosioides*, Paico (Hojas).
- Frutilla, Frambuesa, mora, arándanos, Berries (Fruto seco).
- *Lavandula angustifolia* Miller, Lavanda (Flores).
- *Melisa officinalis* L, Toronjil (Hojas).

Se observó que la mayor parte de las hierbas usadas en infusiones empleadas frecuentemente en la medicina popular resultan tener una importante capacidad antioxidante. De interés para este estudio resalta el hecho de que la infusión de hojas y tallos de *Haplopappus remyanus* posee un alto porcentaje de inhibición de radicales libres.

Absorbancia (Abs) de Estandar y Hierbas sometidas a DPPH

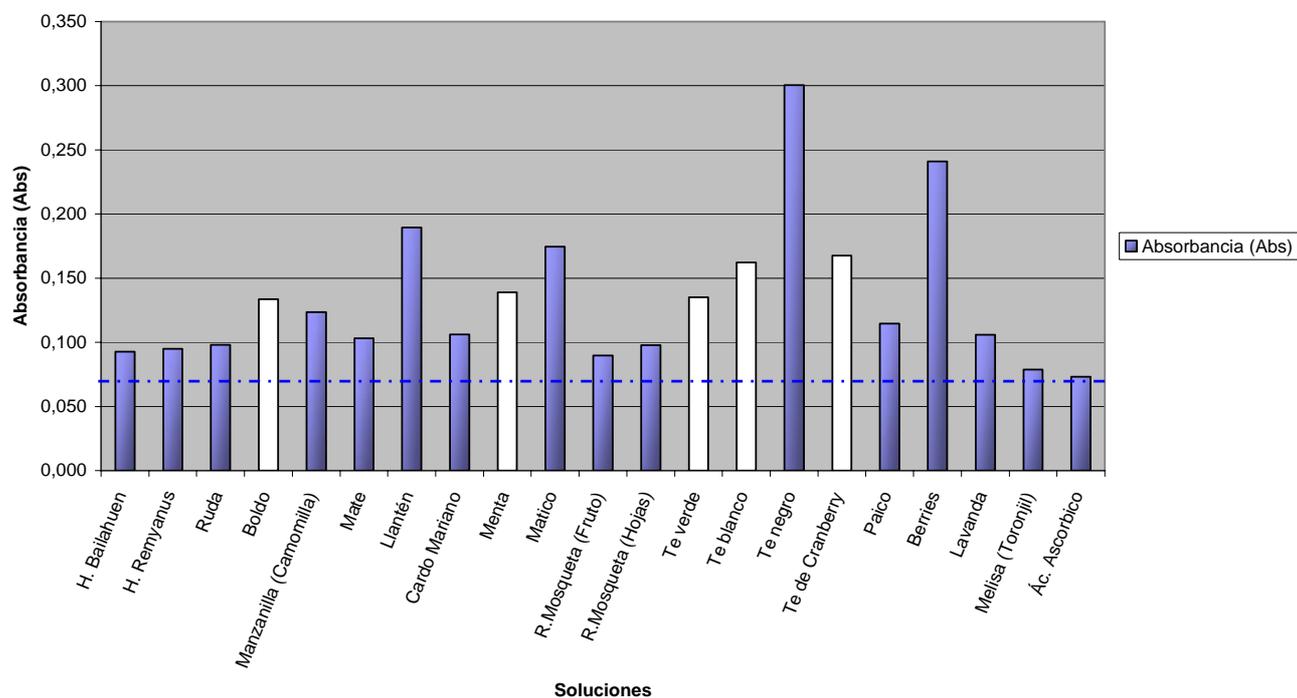


Gráfico 1. Absorbancia de solución estándar de ácido ascórbico e infusiones sometidas a ensayo de DPPH.

Porcentaje de Inhibición de radicales libres de Estandar y Hierbas.

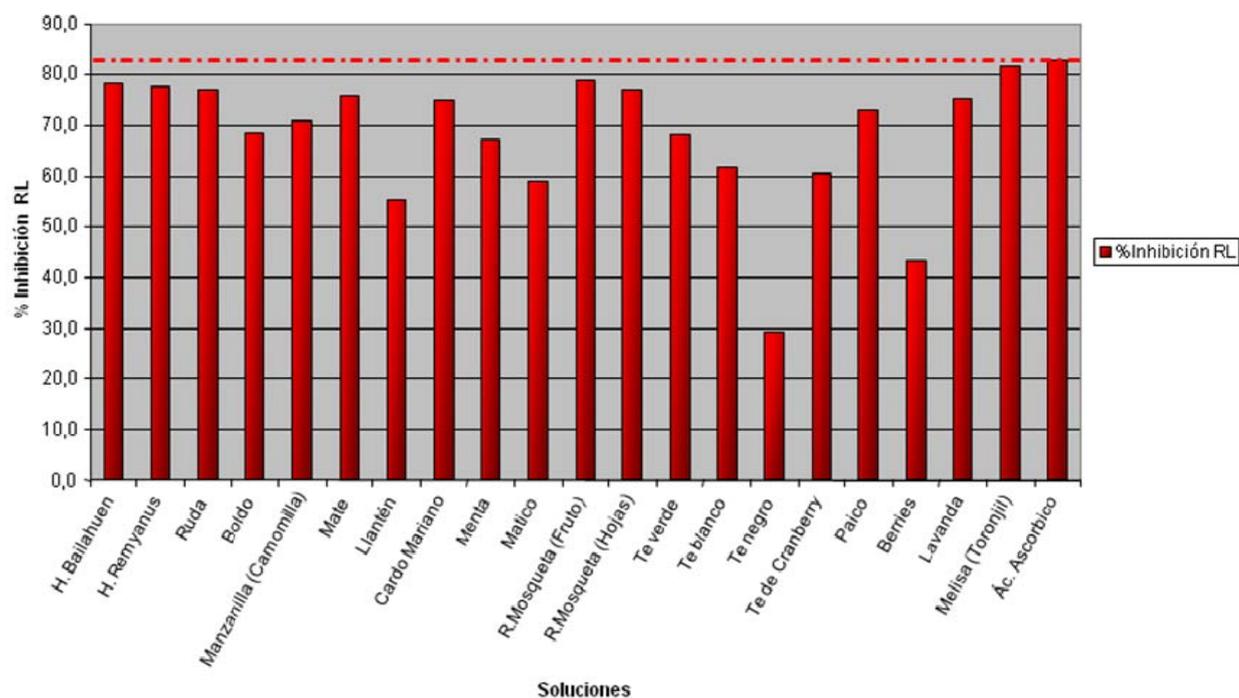


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición de radicales libres de solución estándar de ácido ascórbico e infusiones sometidas a ensayo de DPPH.

4.3 Estudio histopatológico de piel

La evaluación de las muestras se realizó a través del estudio histológico con la tinción de Hematoxilina - Eosina, luego de terminadas las sesiones de irradiación y las posteriores doce semanas de observación. Se examinaron las muestras por microscopía de luz (aumento de 40x y 400x) para la determinación de células anormales en la piel. Los criterios utilizados fueron el tipo de lesión y su localización.

4.4 Piel de ratas control

Características del grupo:

Grupo constituido por seis ratas, animales sin ninguna intervención. Se mantuvieron en observación durante las 15 semanas que duró el trabajo experimental.

Observaciones:

Se observa en el total de los casos piel de histología conservada, sin muestras de daño celular (Figura 4).



Figura 4. Grupo control. H.E.. 40X. Piel normal de rata.

4.5 Piel de ratas grupo I

Características del grupo:

Grupo constituido por cuatro ratas, animales a los cuales se les administró infusión de bailahuén cinco días previos a la irradiación con UVB y se continuó esta administración durante el periodo de exposición a la radiación (una hora diaria por 20 días). Luego, se mantuvieron en observación por doce semanas.

Observaciones:

Se observa en todas las muestras signos de daño epidérmico agudo por radiación UVB, los cuales son espongiosis, paraqueratosis y úlceras.

Se observa en todos los casos queratosis actínica leve, lesión que no compromete a todo el espesor del epitelio. Hay presencia de células atípicas sólo en el estrato basal de la epidermis. No se observa neoplasia maligna invasora de ninguna estirpe, ni tampoco degeneración basófila del tejido conectivo dérmico (Figura 5).

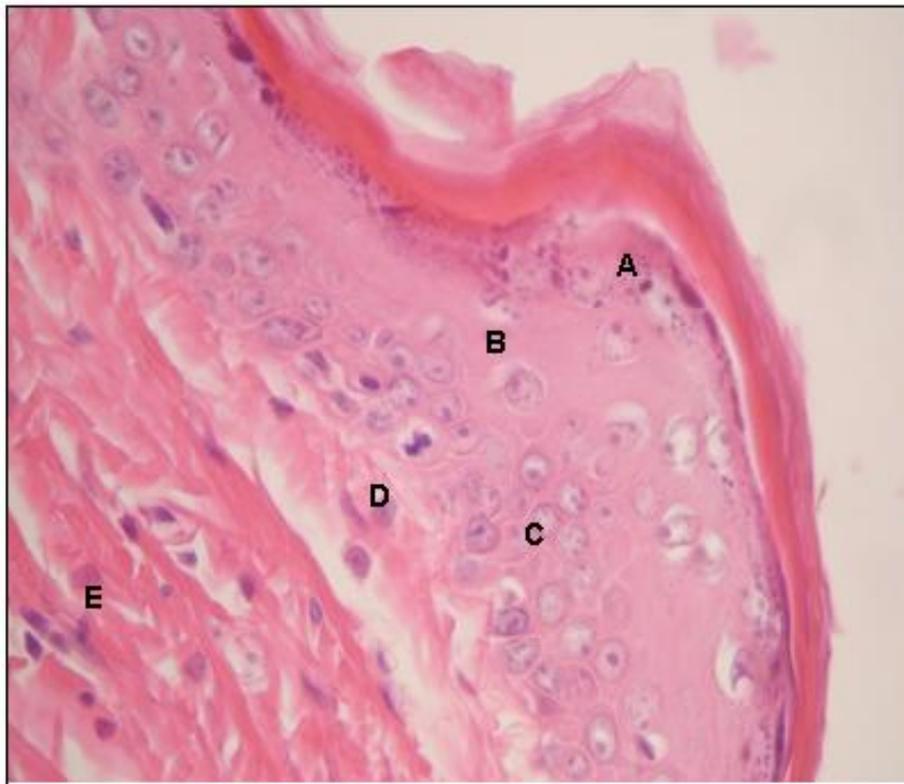


Figura 5. Grupo I. H.E. 40X. Queratosis actínica con atipias leves. **A** estrato córneo de la epidermis. **B** estrato granuloso de la epidermis. **C** células confinadas al estrato basal de la epidermis. **D** célula en mitosis. **E** dermis de la piel.

4.6 Piel de ratas grupo II

Características del grupo:

Grupo constituido por seis ratas, animales a los cuales se les irradió con luz UVB una hora diaria por veinte días y posterior aplicación tópica de peróxido de benzoilo dos veces por semana por un mes. Luego, se mantuvieron en observación por doce semanas.

Observaciones:

Se observa en todas las muestras signos de daño epidérmico agudo por radiación UVB, los cuales son espongiosis, paraqueratosis y úlceras.

Se observa en todas las muestras atipías y mitosis intraepidérmicas concordantes con queratosis actínica leve y moderada. No se observa neoplasia invasora de ninguna estirpe, ni tampoco degeneración basófila del tejido conectivo dérmico (Figura 6).

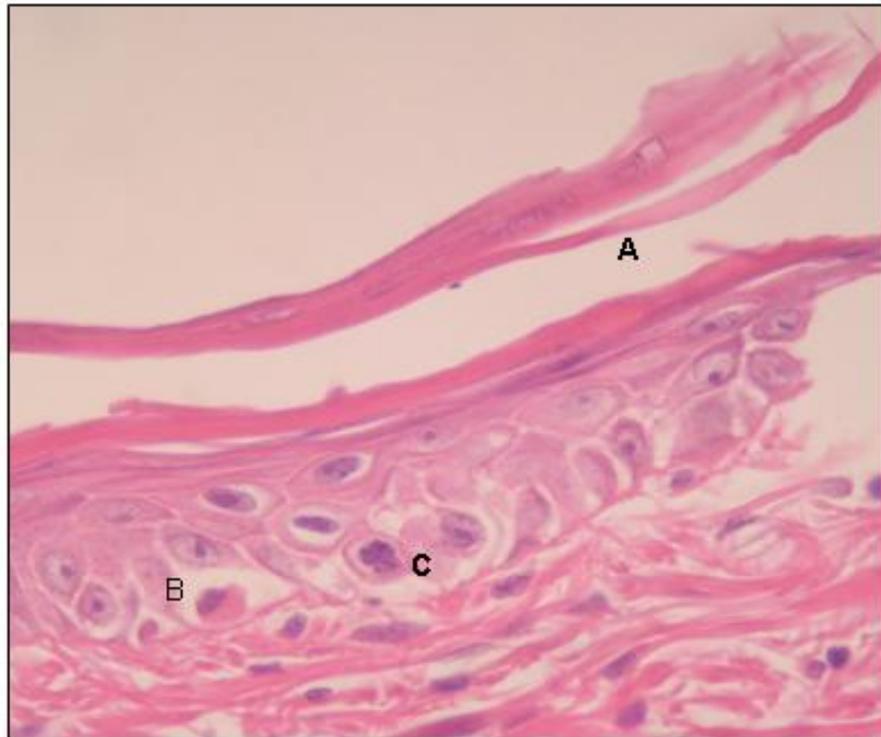


Figura 6. Grupo II. H.E. 40X. Queratosis actínica con atipias moderadas. **A** Paraqueratosis en el estrato córneo. **B** célula necrótica. **C** células en mitosis.

4.7 Piel de ratas grupo III

Características del grupo:

Grupo constituido por cuatro ratas, animales a los cuales se les irradió con luz UVB un total de veinte horas y posterior aplicación tópica de peróxido de benzoilo dos veces por semana por un mes. Finalmente, fueron tratados con infuso de bailahuén por doce semanas.

Observaciones:

Se observa en todas las muestras signos de daño epidérmico agudo por radiación UVB, los cuales son espongiosis, paraqueratosis, costra y úlceras.

Se observa en sólo dos de los cuatro casos atípías escamosas intraepidérmicas y mitosis, alteración compatible con queratosis actínica leve. En ambos casos con queratosis actínica leve se ve presencia de células atípicas sólo en el estrato basal de la epidermis. No se observa neoplasia maligna invasora de ninguna estirpe, ni degeneración basófila del tejido conectivo dérmico (Figura 7).

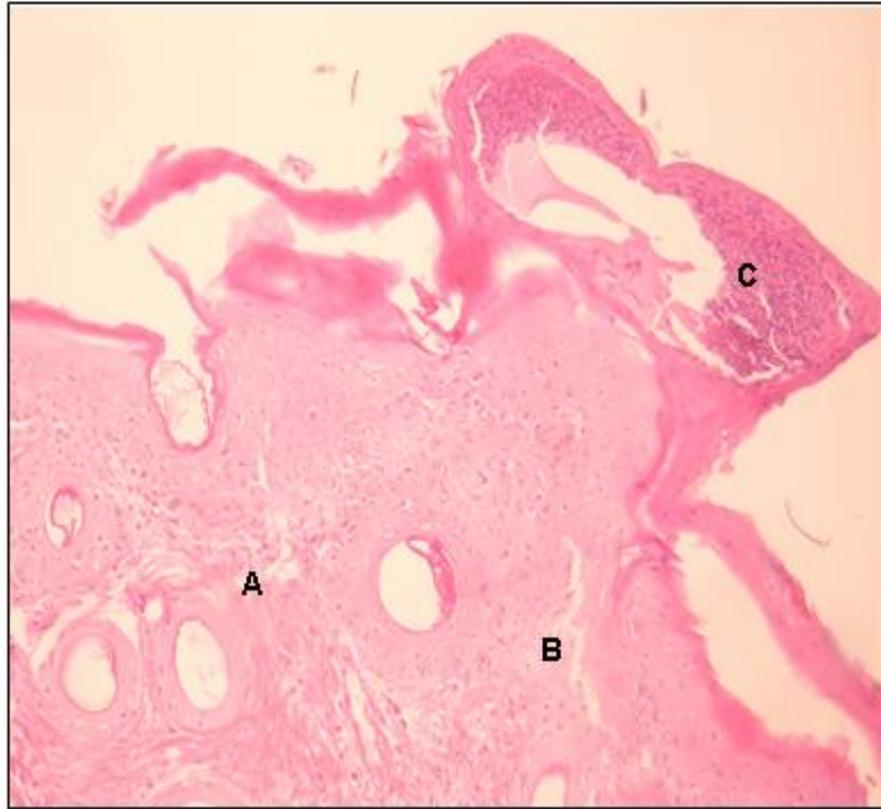


Figura 7. Grupo III. H.E. 4X. Daño agudo por UVB. **A** y **B** espongiosis. **C** costra.

4.8 Determinación de inmunohistoquímica para p53.

En la determinación inmunohistoquímica de p53 mutada se observa positividad nuclear intensa focal de células escamosas en doce de los catorce casos de piel de ratas dañadas con radiación UVB y peróxido de benzoílo, el p53 es un gen supresor de tumores que se expresa en una gran variedad de tipos de tejido y esta envuelto en regulación de células de crecimiento, replicación y apoptosis. Acontecimientos relacionados con la formación de tumores malignos en diversos órganos.

La positividad para p53 corresponde a los casos en los que se observa queratosis actínica leve o moderada, estos incluyen a todas las ratas del grupo I y II, junto con dos de los cuatro casos del grupo III (Figura 8). Dos muestras del grupo III no presentan positividad nuclear para p53 (Figura 9).

Para el grupo control que corresponde a seis casos se obtuvo tinción nuclear negativa para p53.

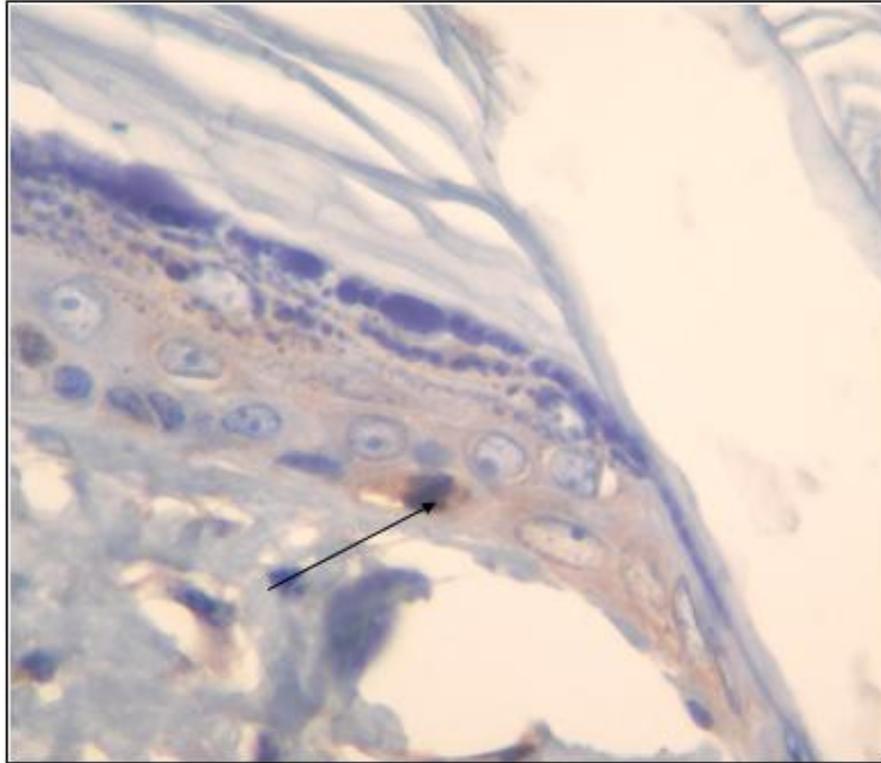


Figura 8. Grupo II. 40X. Determinación de inmunohistoquímica para p53 mutada. Inmunotinción nuclear positiva (Flecha).

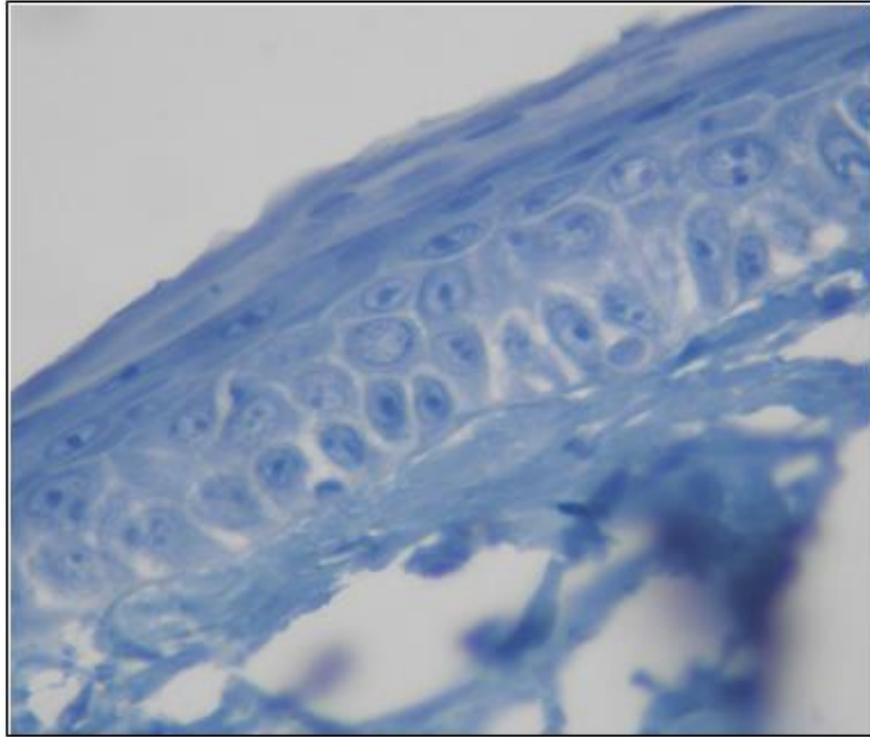


Figura 9. Grupo III. 40X. Determinación de inmunohistoquímica para p53 mutada. Inmunotinción nuclear negativa.

5. Discusión

Los resultados obtenidos de los estudios histopatológicos y de la determinación de positividad para p53 mutada, son consecuencia del daño cutáneo por exposición solar prolongada.

Se observa queratosis actínica leve o moderada en 12 del total de 14 ratas irradiadas, es decir, corresponden a animales tratados y no tratados con infusión de bailahuén.

Para la queratosis actínica, lesión premaligna cuyo riesgo de degeneración neoplásica se calcula en 10 a 20%, algunos autores han señalado que la presencia de un fondo inflamatorio facilitaría la progresión a cáncer de células basales o cáncer de células escamosas y, por lo tanto, la alteración de genes involucrados en el control del ciclo celular como p53 y bcl-2 (Arévalo y Alfaro, 2006).

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 o células escamosas, 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. Algunas lesiones pueden producir tanta queratina que se desarrolla un “cuerno cutáneo”. Los sitios de la piel comúnmente expuestos al sol (cara, brazos, dorso de las manos) son los afectados con mayor frecuencia (Robbins y Cotran, 2005).

Se detectaron diferencias mínimas en los resultados sobre la intensidad del daño epidérmico ocasionado por radiaciones UVB y peróxido de benzoílo, entre los grupos de ratas que fueron tratadas con infuso de bailahuén al 20% p/v.

El grupo al que se les administró infuso de bailahuén antes y durante el tiempo de exposición a radiación UVB, presentó en su totalidad queratosis actínica leve. A diferencia del

grupo que, además del daño a la piel por exposición a radiación, se le suma el daño por aplicación tópica de peróxido de benzoílo, presentan en la totalidad de sus casos queratosis actínica leve o moderada.

Y finalmente, el grupo al que se le irradió con luz UVB y se le aplicó peróxido de benzoílo y luego de esto se le administró oralmente infuso de bailahuén por 12 semanas, presentó en que la mitad de los casos queratosis actínica leve y el resto de los casos no presentaron lesiones neoplásicas en la piel.

Con estos resultados, los cuales no son concluyentes, se puede observar que el grupo que presenta un leve menor daño ocasionado por las mismas 20 horas de exposición a luz UVB es el grupo tratado con infuso de *Haplopappus remyanus*. Además, se vió que el grupo que en su totalidad resultó con un ligero mayor daño cutáneo a causa de la irradiación y aplicación de peróxido de benzoílo es el grupo no tratado con infuso de *Haplopappus remyanus*.

Las lesiones epidérmicas de mayor importancia presentes en 12 de los 14 ratas de este experimento son debidas al daño producto de la acumulación de radiaciones del tipo UVB y el daño oxidativo provocado por la aplicación tópica de peróxido de benzoílo, lesiones existentes que no fueron notoriamente disminuidas por la administración del infuso de bailahuén.

La mutación en el gen p53 es un evento primario en la carcinogénesis en la piel inducida por la irradiación crónica de UVB. Los grupos de células epidermales que expresan p53 en su conformación mutada puede ser detectada por inmunohistoquímica (Mathur y col., 2003)

La positividad para p53 en doce de los catorce casos tratados corroboraría el daño celular provocado por la acumulación de radiación y el agente químico peróxido de benzoílo, indicando la presencia de p53 mutada en el interior del núcleo.

En los casos con queratosis actínica leve o moderada se observó mayor inmunorreactividad de p53 mutada.

En otros estudios, se midió la expresión de p53 en un grupo de casos diagnosticados con queratosis actínica, encontrando una mayor expresión de este marcador tumoral en aquellos casos con mayor compromiso inflamatorio, y sostienen que ciertas citoquinas liberadas durante el proceso inflamatorio promueven el crecimiento de células tumorales y la neovascularización, facilitando de esta manera el desarrollo del tumor. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el incremento de la proteína p53 detectado por inmunohistoquímica, puede deberse a una acumulación de copias mutantes del mismo, como también a una sobre expresión de la proteína p53 nativa como respuesta a la presencia de otros genes alterados por el daño lumínico, lo que igualmente se interpreta como evidencia de trastornos a nivel del ciclo celular (Arévalo y Alfaro, 2006).

Después de una exposición prolongada a las radiaciones ultravioletas, la piel manifiesta daño en una variedad de formas, incluyendo respuestas agudas y crónicas. El daño agudo más evidente por radiación UV es el eritema. La respuesta crónica fototóxica puede resultar en hiperpigmentación y condensación de las áreas afectadas (Katiyar y col., 1997)

La radiación UVB es un mutágeno eficiente y la exposición a radiación UVB causa cambios genéticos en muchos sistemas biológicos. Algunos eventos moleculares que ocurren en las células luego de exponerse a luz UV son daño en el DNA, inducción de p53 y proteínas p53-reguladoras, detención del ciclo celular, reparación en el DNA y apoptosis (Mathur y col., 2004).

Otros estudios histopatológicos prueban que el principio activo (1-oxo-5 β , 6 β -epoxi-witha-2-enolido) de *Withania somnifera*, tiene potencial prevención en la incidencia de carcinoma de piel inducida por radiación UVB y radiación UVB más peróxido de benzoílo. Grupos de ratas

tratados con peróxido de benzoílo más radiación mostraron tejidos cutáneos malignos. Por el contrario grupos irradiados con UVB y posterior aplicación de peróxido de benzoílo, que fueron pretratados con *W. somnifera* o tratados posteriormente con ella presentaron significativa protección en la piel expuesta a radiación, es decir no desarrollaron malignidad en el tejido cutáneo (Mathur y col., 2004).

En un estudio sobre la Silimarina y su capacidad antioxidante, se observó que los efectos de componentes generadores de radicales libres y fuertes agentes oxidantes, como peróxido de benzoílo, sobre piel de ratones es posible asociarlo a alteraciones bioquímicas y moleculares, asociadas con inflamación y promoción de tumores. En este trabajo la Silimarina inhibió significativamente la promoción de tumores y la depleción de la actividad de enzimas antioxidantes inducido por peróxido de benzoílo. La Silimarina, además, protege contra el edema cutáneo inducido por peróxido de benzoílo (Zhao y col., 2000).

En este trabajo puede ser que la cantidad de tiempo y el régimen de exposición de radiación UVB usado no fuesen suficientes para la iniciación de un tumor maligno invasivo, ya que los resultados arrojaron que ninguno de los catorce casos tratados en este estudio presentaron neoplasia maligna invasora de ninguna estirpe, ni tampoco degeneración basófila del tejido conectivo dérmico, alteración asociada a las neoplasias cutáneas de cualquier tipo.

Según la evaluación del efecto antioxidante que se le realizó a la infusión de hojas y tallos de *Haplopappus remyanus*, tuvo un alto porcentaje de inhibición de radicales libres, es decir, mostró un elevado poder antioxidante.

Haplopappus remyanus según el análisis fitoquímico realizado, contiene en sus hojas, flavonoides, compuestos químicos involucrados en el proceso de protección contra la radiación UVB. En los resultados obtenidos dicha protección no se ve claramente manifestada, esto pudo

deberse a varios factores, tales como una concentración insuficiente de *Haplopappus remyanus* (20% p/v) en la infusión administrada oralmente a las ratas del estudio, dicha infusión no contendría la cantidad adecuada de componentes antioxidantes necesarios para ejercer una función protectora contra la radiación UVB y peróxido de benzoílo.

También, es posible que el modelo animal elegido para este trabajo no fuese el adecuado, ya que la piel de las ratas machos cepa Sprague Dawley no desarrollaron elocuentes daños malignos como neoplasias invasoras, sobre las cuales se podría evidenciar más claramente un efecto de atenuación del infuso de *Haplopappus remyanus* sobre el daño cutáneo provocado por las radiaciones UVB y aplicación tópica del agente oxidante peróxido de benzoílo. Una alternativa de modelo animal usado en otros estudios de especies vegetales contra el desarrollo de carcinogénesis, son ratas hembras SKH-1 peladas (Lu y col., 2001). Sin embargo, para demostrar lo propuesto en este trabajo hará falta realizar más estudios.

6. Conclusiones

En el estudio tanto la exposición a la radiación UVB como la aplicación tópica de peróxido de benzoílo dañan el tejido cutáneo de las ratas machos cepa Sprague Dawley tratados o no con una infusión de bailahuén al 20 % p/v.

Como muestran los resultados, en la mayoría de los casos se encontró una lesión displásica de localización epidérmica conocida como queratosis actínica, lesión preneoplásica que estuvo presente en la piel de animales tratados y no tratados con infusión de *Haplopappus remyanus*.

Con lo que se puede concluir de este estudio que la infusión de *Haplopappus remyanus* al 20% p/v, no ejerce considerablemente, bajo las condiciones de trabajo, un efecto de atenuación del desarrollo de cambios histológicos en la piel como displasias de la epidermis atribuidos a la radiación ultravioleta y a la acción oxidante del peróxido de benzoílo aplicado tópicamente sobre piel de ratas.

7. Referencias

- Alias, Y., Awang, K., Hadi, H.A., Thoison, O., Sévenet, T., País, M. (1995) An antimetabolic and cytotoxic chalcone from *Fissistigma lanuginosum*. *Journal of natural products* 58: 1160-1166.
- Arévalo, F., Alfaro, A. (2006) Queratosis actínica y presencia de p53: Hallazgos histopatológicos. *Dermatol* 16 (2):1-6.
- CONAMA. (2008) Protección de la capa de Ozono. (Disponible en: <http://www.conama.cl/portal/1301/article-34649.html>. Consultado el: 9 de abril de 2008).
- Cotran, RS., Kumar, V., Collins, T. (2000) *Patología Estructural y Funcional de Robbins SL*. Sexta edición. Madrid: Ed. McGraw Hill. 8:308-309; 329.
- 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.
- Gajardo, R. (1994) *Vegetación natural de Chile, clasificación y distribución geográfica*. Ed. Universitaria Santiago 165.
- Harborne, J., Williams, C. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- 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.

Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. (2005) Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional. Séptima edición. Ed. Elsevier España S.A. 25:1244-1245.

Lu, Y., Lou, Y., Lin, Y., Joe, W., Huang, M., Yang, C., Conney, A. (2001) Inhibitory effect of orally administered green tea, black tea, and caffeine on skin carcinogenesis in mice previously treated with ultraviolet B light (High-risk mice): Relationship to decreased tissue fat. *Cancer Research* 61: 5002-5009.

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

Manual Merck. (2005) Sección 18 Enfermedades de la piel. *Biología de la piel*. (Disponible en: <http://www.msd.com.mx/publicaciones/mmerck-hogar/sección-18-190.html>. Consultado el: 22 de abril de 2007).

Martindale Cd Rom (2004) Guía completa de consulta fármaco terapéutica. Pharma Editores – Grupo Ars XXI.

Martin, R., Wittwer, F., Núñez, J. (1988) Efecto de la infusión de *Haplopappus baylahuen* en el hígado alterado con tetracloruro de carbono en perro. *Journal of Veterinary medicine* 35: 691-695.

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 β , 6 β -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, L., Ayala, M. (2000) An action spectrum for UV-B radiation and the rat lens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41(9): 2642-2647.

Muñoz, M., Barrera, E., Meza, I. (1981) El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. *Public. Ocas* 33MNHN 88.

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.

Salas, C. (2007) ¿Qué son los radicales libres?. (Disponible en: http://www.lukor.com/ciencia/radicales_libres.html. Consultado el: 29 de agosto de 2007).

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 *Monotes engleri*. *Phytochemistry* 45: 509-515.

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

Soguero, M., Sanz, A., Vidal, S., Ariona, C., Paez, J., Barcala, L., Hernandez, I., Perez, A. (2000) Estudio para determinar la eficacia y tolerancia de la formulación de Peróxido de Benzoílo al 4% en un excipiente de Hidrofase en el tratamiento del acné vulgar. *Dermocosmética* 3(7):458-461.

Somparn, P., Phisalaphong, Ch., Nakornchai, S., Unchern, S., Phumala, N. (2007) Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol. Pharm. bull.* 30(1): 74-78.

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.

ThermoScientific. (2008) Instructions for use TP-015-HD, Ultravision detection system anti-polivalent, HRP/DAB (ready-to-use).

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

Triviño, A., López, A. (1994) La oncoproteína p53. *Medicina Clínica* 103(2):54-58.

UACH, Programa Administrativo Ambiental Corporativo (PAAC). (2007) Lineamientos básicos para el manejo de residuos en la UACH. (Disponible en: <http://www.paac.uach.cl/sec.php?sec=5.html>. Consultado el: 30 de marzo de 2007).

Vituro, C., Molina, A., Schmeda-Hirschmann, G. (1999) Free radical scavengers from *Mutisia fresiana* (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*-species known as bailahuén. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 97-100.

Vogel, H., Razmilic, I., San Martín, J., Doll, U., González, J. (2005) *Plantas medicinales chilenas*. Ed. Universidad de Talca 5:85-88.

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.

8. Anexos



Figura 1. Preparación de la infusión de *H. remyanus*.



Figura 2. Filtrado de la infusión de *H. remyanus*.



Figura 3. Administración con sonda buco-gástrica del infuso de *H. remyanus*.



Figura 4. Grupo de ratas en cámara de irradiación.

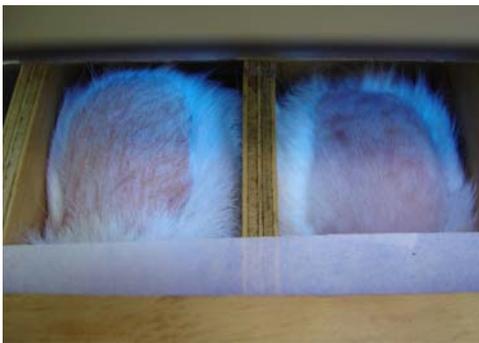


Figura 5. Ratas irradiadas con luz UVB.

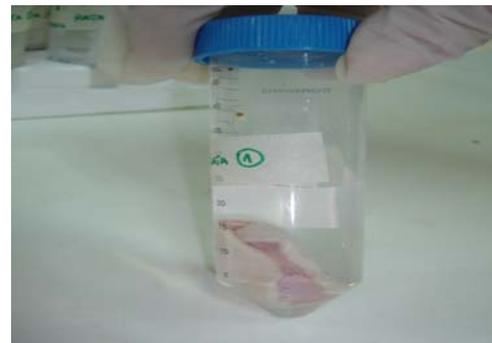


Figura 6. Corte de piel de rata.