



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto fotoprotector del ácido clorogénico sobre los daños  
ocasionados por la radiación UV en la piel de ratones SKH-1**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A**

**SANDRA IVONNE OCAMPO PÉREZ**

DIRECTOR (A) DE TESIS:

Dra. Ana María García Bores

Tlalnepantla de Baz, Estado de México

Febrero 2012.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	V
Índice de esquemas.....	V
1 Resumen.....	1
2 Introducción.....	3
2.1 Estructura de la piel.....	3
2.2 Epidermis.....	4
2.3 Capas de la epidermis.....	5
2.3.1 Estrato germinativo o basal.....	5
2.3.2 Estrato espinoso.....	6
2.3.3 Estrato granuloso.....	7
2.3.4 Estrato córneo.....	8
2.4 Tipos celulares de la epidermis.....	8
2.4.1 Melanocitos.....	8
2.4.2 Células de Langerhans.....	9
2.4.3 Células de Merkel.....	10
2.5 Dermis.....	10
2.6 Capas de la dermis.....	11
2.6.1 Dermis papilar.....	11
2.6.2 Dermis reticular.....	12
2.7 Tipos celulares de la dermis.....	12

2.8 Hipodermis.....	14
2.9 Funciones de la piel .....	15
2.10 Radiación Ultravioleta.....	16
2.11 Daños producidos por la RUV.....	18
2.12 Daños histológicos causados por la RUV.....	22
2.13 Fotoquimioprevención.....	23
2.14 Ácido clorogénico.....	26
3 Justificación.....	30
4 Hipótesis.....	31
5 Objetivo general.....	31
6 Objetivo particular.....	32
7 Metodología.....	32
8 Resultados y Discusión.....	36
9 Conclusiones.....	62
10 Lectura citada.....	63
11 Paginas web consultadas.....	68
12 Apéndice.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ratones SKH-1 sin pelo usados en las pruebas experimentales...	33
Figura 2	Piel de ratón SKH-1 sin ningún tratamiento. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), quiste sebáceo (Q). Tinción H y E, 100X.....	37
Figura 3	Corte histológico de la zona dorsal de piel de ratón SKH-1. Grupo testigo. Estrato corneo (EC), estrato granuloso (EG), estrato basal (EB). Tinción H y E, 400X.....	38
Figura 4	Corte histológico de la zona dorsal de piel de ratón SKH-1. Grupo testigo. Espongiosis (ES). Tinción H y E, 400X.....	39
Figura 5	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo testigo, con congestión de vasos (CV), 400X.....	40
Figura 6	Piel de ratón SKH-1. Grupo etanol. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), vasos sanguíneos (VS). Tinción H y E, 100X.....	41
Figura 7	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo etanol. Epidermis (E), dermis (D), papila (P), espongiosis (ES), células apoptóticas (CA). Tinción H y E, 100X.....	42
Figura 8	Sección de piel de ratón SKH-1. Grupo etanol. Dermis (D), hipertrofia (HI), células apoptóticas (CA). Tinción H y E, 400X.....	43
Figura 9	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo etanol. Congestión de vasos sanguíneos (CV). Tinción H y E. 400X.....	44
Figura 10	Piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Epidermis (E) dermis (D), hipodermis (H), quiste sebáceo (Q), músculo (M). Tinción H y E, 100X .....	45
Figura 11	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV células apoptóticas (CA), epidermis (E) dermis (D). Tinción H y E, 400X.....	46
Figura 12	Sección de la piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Atrofia (A), edema (ED), hipodermis. 400x.....	48

Figura 13	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Hipertrofia (HI), dermis (D). Tinción H y E, 400X.....	48
Figura 14	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV hiperplasia (HP), folículo piloso (FP), dermis (D). Tinción H y E 400X.....	49
Figura 15	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Congestión de vasos sanguíneos (CV) en dermis (D). Tinción H y E, 400X.....	50
Figura 16	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG, epidermis (E), dermis (D), infiltrados inflamatorios (IN), hipodermis (H). Tinción H y E, 100X.....	51
Figura 17	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo ACG con espongiosis (ES), células apoptóticas (CA). Tinción H y E, 400X.....	52
Figura 18	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG. Infiltrados inflamatorios (IN). Tinción H y E 400X.....	54
Figura 19	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), quistes sebáceos (Q). Tinción H y E, 100X.....	55
Figura 20	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Espongiosis (ES), papila (P), células apoptóticas (CA), quistes sebáceos (Q). Tinción H y E 400X.....	56
Figura 21	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), atrofia (A). Tinción H y E, 400X.....	58
Figura 22	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Epidermis (E), dermis (D), hiperplasia (HP), hipertrofia (HI). Tinción H y E, 400X.....	58
Figura 23	Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Congestión de vasos sanguíneos (CV). Tinción H y E 400X.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tratamientos para la evaluación del efecto fotoprotector en ratones SKH-1.....	34
Tabla 2	Lesiones cutáneas inducidas por la RUV.....	35
Tabla 3	Lesiones histológicas inducidas por la RUV y otros factores.....	61

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Estructura de la piel .....	3
Esquema 2	Capas celulares de la epidermis.....	5
Esquema 3	Función de la piel como mecanismo de protección .....	16
Esquema 4	Espectro electromagnético.....	18
Esquema 5	Representación esquemática de la penetración de la luz en la piel.....	19
Esquema 6.	Estructura química del ACG.....	27

## 1. RESUMEN

La exposición a la radiación ultravioleta (RUV) puede causar daños cutáneos que van desde el eritema hasta el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel. Existen compuestos que pueden ser útiles para la quimioprevención, es decir que puedan retardar o revertir los daños ocasionados por la RUV. Varios estudios han evaluado el efecto protector de los productos naturales contra el daño inducido por la RUV en las células y tejidos animales. Entre ellos se encuentra el ácido clorogénico (ACG), presente en frutas y vegetales, este compuesto es un atrapador de radicales libres y modula la expresión de genes en enzimas antioxidantes. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto fotoprotector del ácido clorogénico sobre los daños ocasionados por la radiación ultravioleta en ratones SKH-1.

Los animales se irradiaron con RUV en cajas de acrílico por 45 s cada tercer día durante 15 días. Los tratamientos (etanol y ACG) se aplicaron 10 minutos antes de cada irradiación. Otros dos grupos recibieron el respectivo tratamiento pero no la irradiación. 24 h después los animales fueron sacrificados en cámaras de CO<sub>2</sub> y se tomaron muestras de piel de la zona dorsal para el procesamiento histológico estándar. Se realizaron cortes de piel de 5 micras y se realizó la tinción de hematoxilina y eosina. Seguido de esto, se observaron al microscopio óptico y se evaluó el daño histológico inducido por la RUV.

Los ratones del grupo testigo presentaron apariencia normal en la piel. El grupo tratado con etanol presentó espongiosis, células de quemadura, hipertrofia focalizada leve y congestión focalizada en dermis. Los ratones SKH-1 que fueron irradiados presentaron un epitelio de 2 a 4 capas celulares, por lo que se diagnosticó como atrofia moderada multifocal con

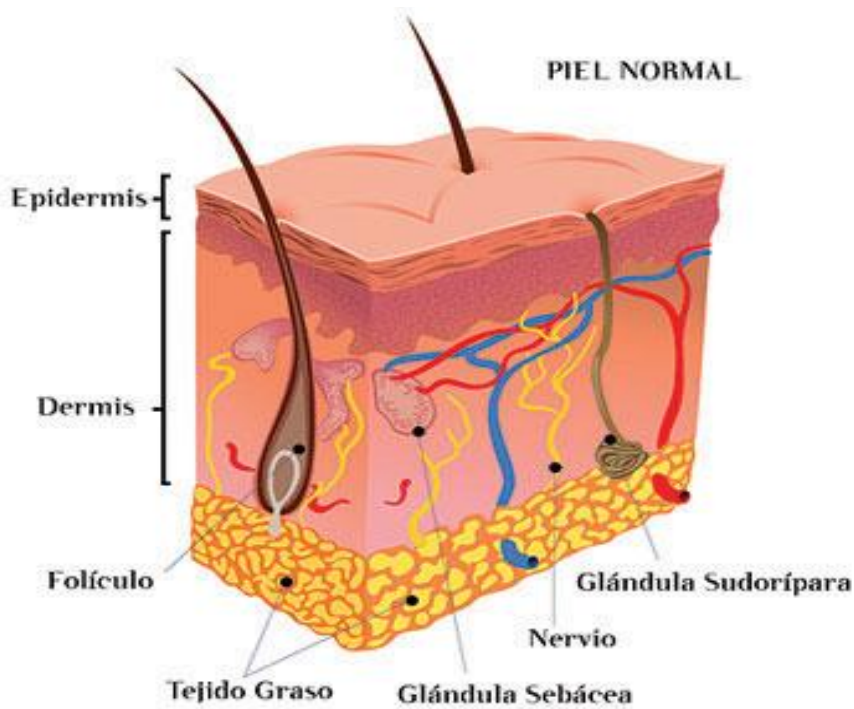


espongiosis, se observaron las células de quemadura, zonas con hipertrofia focal leve, mientras que la hiperplasia encontrada fue multifocal leve en epidermis. Aunado a esto, en dermis se encontró edema focal leve y congestión multifocal moderada. El grupo al que se le aplicó tópicamente el ACG presentó atrofia multifocal moderada y espongiosis, células de quemadura, algunas zonas con hipertrofia focal leve así como hiperplasia focal leve y atrofia multifocal moderado y en dermis la congestión fue focal leve y la presencia de infiltrados inflamatorios fue evidente. Finalmente, en el grupo tratado con ACG/UV se observó espongiosis, células de quemadura e hipertrofia focal leve. A diferencia de lo que se observó en el grupo irradiado con UV, tanto la hiperplasia y la atrofia como la congestión en dermis fueron menores a los ocasionados por la RUV ya que la extensión y el grado de los daños fue menor, por lo que se puede pensar que el ACG sí protege de los efectos adversos de la RUV.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel es un órgano complejo que forma una extensa capa, que cubre todo el cuerpo y es de grosor variable. Está formada por varios tejidos principales: El superficial, compuesto de un epitelio estratificado plano queratinizado llamado epidermis; el de tejido conectivo subyacente, la dermis; y por debajo de este último, se encuentra la hipodermis, formado en su mayoría por tejido adiposo (Fawcett, 1995). Esta estructura se observa en el esquema 1.

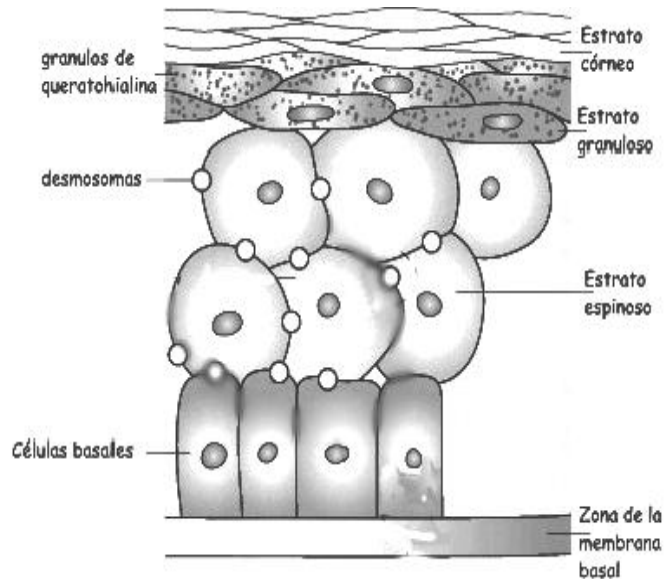


Esquema 1. Estructura de la piel.  
[www.fmd.org.mx/picture/nuestra\\_piel.jpg](http://www.fmd.org.mx/picture/nuestra_piel.jpg)

## 2.2. EPIDERMIS

La epidermis es un epitelio estratificado en renovación constante que se queratiniza y da origen a estructuras derivadas como son el aparato pilosebáceo, uñas y glándulas sudoríparas (Chu y cols., 2005). La piel puede absorber por la epidermis y por el componente pilosebáceo agua, grasa, sustancias hidro y liposolubles. Esta propiedad permite el uso tópico de medicamentos como estrógenos, esteroides, vitaminas y otros. El sebo, producto de las glándulas sebáceas, interviene en la lubricación de la piel y formación del manto ácido, ya que está formado por ácidos grasos libres y combinados además de colesterol (Amado, 1993).

La mayoría de las células de la epidermis son queratinocitos. Estas células están organizadas en cuatro capas, cuya denominación depende de su posición o de una propiedad estructural de las células que las componen. Las células viables se desplazan hacia el exterior desde el estrato basal para formar capas de células cada vez más diferenciadas. Los queratinocitos con diferenciación terminal (queratinizados) son las células del estrato córneo llamadas corneocitos (Chu y cols., 2005), como se ve en el esquema 2.



Esquema 2. Capas celulares de la epidermis.  
<http://www.uv.es/derma/CLindex/CLdiscromias/CLdisc1.gif&imgrefurl>

## 2.3. CAPAS DE LA EPIDERMIS

### 2.3.1. Estrato germinativo o basal

El estrato germinativo contiene queratinocitos de ubicación basal con actividad mitótica. Estas células son de forma cilíndrica y se fijan a las estructuras de la zona de la membrana basal. Las células basales contienen filamentos de queratina organizados en haces finos alrededor del núcleo que conectan a los hemidesmosomas (uniones entre las células basales y la lamina basal) y desmosomas (uniones entre queratinocitos adyacentes). También contienen un gran núcleo con escasa heterocromatina marginada y un nucléolo prominente, organelos tal como aparato de Golgi y retículo endoplásmico granular,

mitocondrias, lisosomas y ribosomas, presentes en el citoplasma (Chu y cols., 2005).

Los queratinocitos presentes en la capa basal del adulto normal y de la epidermis embrionaria se distinguen de los otros por un citoplasma particularmente denso. Estos han sido descritos como células “oscuras”. Comparados con otros queratinocitos, tienen mayor densidad de volumen de filamentos de queratina, desmosomas y melanosomas. Estas células también están presentes en la epidermis de roedores y en otros epitelios estratificados en donde se cree que son células madre particularmente sensibles a los estímulos hiperplásicos, indicadoras por lo tanto de transformación pre maligna o maligna (Chu y cols., 2005).

### **2.3.2. Estrato espinoso**

Las células espinosas suprabasales son poliédricas y tienen un núcleo redondeado. Las células más externas son aplanadas y contienen organelos conocidos como gránulos lamelares los cuales contienen glicoproteínas, glucolípidos, fosfolípidos, esteroides libres y una cantidad de hidrolasas ácidas, que incluyen lipasas, proteasas, fosfatasa ácida y glucosidasas. En los gránulos lamelares se encuentran glucoceramidas, precursoras de ceramidas y componentes dominantes de los lípidos del estrato córneo. Las células de todas las capas espinosas contienen haces grandes y notorios de filamentos de queratina. Al igual que en las células basales, los filamentos se organizan concéntricamente en torno del núcleo y en la periferia se insertan en

desmosomas. Las células de este estrato se caracterizan por presentar abundantes desmosomas, los cuales son modificaciones de la superficie celular dependientes de calcio, que promueven la adhesión entre las células epidérmicas y la resistencia al esfuerzo mecánico. Se han caracterizado los componentes moleculares del desmosoma. Dentro de cada célula hay una placa desmosómica asociada a la superficie interna de la membrana plasmática que está compuesta por seis polipéptidos: placoglobina, desmoplaquinas I y II, queratocalmina (desmocalmína), y está asociada con la placa. Estas proteínas desempeñan un papel importante en la regulación del calcio requerido para el ensamblado y el mantenimiento de los desmosomas (Chu y cols., 2005).

### **2.3.3. Estrato granuloso**

El estrato granuloso, es la capa más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis, tiene de una a tres células de espesor. Las células poseen numerosos gránulos de queratohialina, de ahí su nombre. Los gránulos contienen proteínas con abundancia de cistina e histidina, que son las precursoras de la proteína filagrina que aglomera los filamentos de queratina presentes dentro de las células cornificadas del estrato córneo. Los gránulos de queratohialina son de forma irregular y de tamaño variable (Ross y Pawlina, 2008).

### **2.3.4. Estrato córneo**

El estrato córneo es la capa mas diferenciada de la epidermis, y esta formada por un sistema bicompartimental de corneocitos pobres en lípidos y ricos en proteínas rodeados por matriz extracelular lipídica continua. El corneocito es aplanado y poliédrico, es la célula más grande de la epidermis. Su forma y superficie se adaptan para mantener la integridad del estrato córneo y a la vez permite la descamación. Las queratinas de alto peso molecular, estabilizadas por puentes disulfuro intermoleculares, forman el 80% de la célula cornificada. Las capas de células cornificadas o córneas resultantes confieren protección mecánica a la piel y actúan como una barrera contra la perdida de agua y filtración de sustancias solubles del ambiente, sin embargo también esta capa protege contra la invasión por parte de agentes tóxicos, microorganismos y rayos UV (Chu y cols., 2005)

## **2.4. TIPOS CELULARES DE LA EPIDERMIS**

### **2.4.1. Melanocitos**

Entre los queratinocitos de los diferentes niveles de la epidermis están intercalados los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel (Chu y cols., 2005).

Los melanocitos son células dendríticas que se dispersan entre las células del estrato basal. En la piel posnatal el cuerpo del melanocito se extiende hasta la dermis por debajo del estrato basal pero siempre por encima de la lámina

densa. Las prolongaciones de los melanocitos entran en contacto con los queratinocitos en el estrato basal y en las capas más superficiales pero nunca forman uniones con ellos. El melanosoma es el orgánulo característico del melanocito, y al ser observado al microscopio electrónico se ve como una estructura ovoide unida a la membrana en la que se produce melanina por una serie de reacciones catalizadas por enzimas, mediadas por receptores y estimuladas por hormonas. El tamaño de los melanosomas esta determinado por la genética; en la piel oscura son más grandes y en mayor número que la piel blanca. Como resultado el pigmento se distribuye a lo largo del estrato basal y, en menor medida, en las capas más superficiales, donde cumple una función protectora de la piel al absorber y dispersar la radiación potencialmente nociva (Chu y cols., 2005).

#### **2.4.2. Células de Langerhans**

Las células de Langerhans son células dendríticas y no forman uniones con ninguna de las células que lo rodean, están presentes en cantidad y distribución casi constante para cada región del cuerpo. Están distribuidas en la capa basal, espinosa y granulosa y muestran preferencia por una posición suprabasal. Las células de Langerhans migran desde la medula ósea a la circulación para dirigirse a la epidermis durante el desarrollo embrionario, desempeñando un papel en la vigilancia inmune cutánea y protegen al organismo contra los antígenos que logran atravesar el estrato córneo. En la epidermis, las células son las principales responsables del reconocimiento, la captación, el



procesamiento y la presentación a los linfocitos T sensibilizados de antígenos y haptenos solubles (Chu y cols., 2005).

### **2.4.3. Células de Merkel**

Las células de Merkel son células epidérmicas modificadas que están localizadas en el estrato basal. Se encuentran unidas a los queratinocitos contiguos a través de desmosomas y contienen filamentos intermedios (de queratina) en su citoplasma. El núcleo es lobulado y el citoplasma es más denso que el de los melanocitos y las células de Langerhans (Chu y cols., 2005).

En la dermis se han encontrado fibras nerviosas, las cuales están asociadas a las células de Schwann. A diferencia de los melanocitos y las células de Langerhans, estas sí están conectadas a los queratinocitos por medio de los desmosomas; y presentan un nervio asociado mielinizado, por lo que se piensa que estas células tienen funciones sensoriales (Amado, 1993).

## **2.5. DERMIS**

La epidermis reposa sobre una lámina basal, la zona de la membrana basal que separa a la epidermis de la dermis y que interviene en su fijación (Chu y cols., 2005).

La dermis es un sistema integrado de tejido conectivo fibroso, filamentoso y amorfo que aloja redes nerviosas y vasculares, anexos derivados de la epidermis, fibroblastos, macrófagos, mastocitos, células plasmáticas, linfocitos y

otros leucocitos que ingresan en la dermis en respuesta a diferentes estímulos (Chu y cols., 2005).

La dermis constituye la mayor masa de la piel y le aporta flexibilidad elasticidad y resistencia a la tracción. Protege al cuerpo contra lesiones mecánicas, retiene agua, colabora en la regulación térmica e incluye receptores de estímulos sensitivos, presenta glándulas sudoríparas ecrinas y vasos sanguíneos que contribuyen a la regulación de la temperatura corporal (Chu y cols., 2005), eliminando agua a través de la transpiración y por la respiración invisible (Amado, 1993).

## **2.6. CAPAS DE LA DERMIS**

La dermis está organizada en dos regiones: papilar y reticular. La distinción entre las dos zonas se basa principalmente en sus diferencias en cuanto a organización del tejido conectivo, densidad celular, patrón vascular y nervioso (Chu y cols., 2005).

### **2.6.1. Dermis papilar**

La dermis papilar es proximal respecto a la epidermis, se amolda a sus contornos y por lo general no tiene más del doble de su espesor. Se caracteriza por pequeños haces de fibrillas colágenas de pequeño diámetro y fibras elásticas de oxitalano. Por lo común, en la dermis papilar normal no se encuentran fibras elásticas maduras. Los fibroblastos, los macrófagos y los

mastocitos son residentes normales de la dermis, se encuentran con mayor densidad en la piel normal en la región papilar y rodeando los vasos del plexo subpapilar (Chu y cols., 2005).

### **2.6.2. Dermis reticular**

La dermis reticular es la región más abundante de la dermis. El límite entre la dermis papilar y reticular está marcada por un plano horizontal de vasos y el plexo subpapilar. La dermis está compuesta principalmente por fibrillas de colágeno de gran diámetro, organizadas en grandes haces de fibras entrelazadas (Chu y cols., 2005).

## **2.7. TIPOS CELULARES DE LA DERMIS**

Los fibroblastos y los macrófagos son residentes habituales de la dermis. Su densidad es más elevada en la región papilar de la piel normal y alrededor de los vasos del plexo subpapilar, pero también están presentes en la dermis reticular donde se ubican en los intersticios entre los haces de fibras de colágeno. Los fibroblastos son células derivadas del mesénquima, que migra a través del tejido y es responsable de la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz del tejido conectivo fibroso. Por ende, la función de los fibroblastos consiste en proporcionar el esqueleto estructural de la matriz extracelular y además estimular la interacción entre la epidermis y la dermis con la síntesis de mediadores solubles (Chu y cols., 2005).

Los monocitos, macrófagos y dendrocitos dérmicos forman parte de un conjunto heterogéneo de células que constituyen el sistema mononuclear fagocítico de la piel. Sobre la base de su ultraestructura, la histoquímica y la inmunocitoquímica se los puede diferenciar en dos linajes; el de los de monocitos macrófagos y el de las células dendricas (Chu y cols., 2005).

Los macrófagos derivan de células precursoras de la medula ósea que se transforman en monocitos en la sangre y luego migran hacia la dermis, donde finalmente se diferencian. En la piel, los macrófagos poseen una serie de funciones que están en aumento. Son fagocíticos; procesan y presentan antígenos a las células linfoides inmunocompetentes; son microbicidas (por medio de la producción de lisozima, peróxido de hidrógeno y superóxido), secretores (factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas inmunomoduladoras) y hematopoyéticos, algunos que están involucrados en la coagulación la aterogénesis, la cicatrización de heridas y el remodelado de tejidos. Los mastocitos se presentan en pequeña cantidad en la dermis, como células fusiformes con núcleo ovalado, sintetizan gran cantidad de mediadores, algunos de ellos son preformados y almacenados en los gránulos. En el medio formado predominantemente por proteoglicanos del gránulo se encuentran histamina, heparina, triptasa, quimasa, carboxipeptidasa. Los estímulos inmunológicos y no inmunológicos, por ejemplo físicos (luz, calor, frío, traumatismo agudo, vibración y presión sostenida) pueden desencadenar la liberación del contenido de los gránulos de secreción. Los gránulos se hinchan y participan en la hipersensibilidad inmediata y tardía (Chu y cols., 2005).

El dendrocito dérmico es una célula fija al tejido conectivo de la dermis de la piel normal que tiene forma de estrella, dendrica y en ocasiones ahusada y que es muy fagocítica. Los dendrocitos son fibroblastos no especializados pero representan un subgrupo de macrófagos presentadores de antígenos u otros linajes que se originan en la médula ósea (Chu y cols., 2005).

Las células plasmáticas poseen citoplasma abundante, muy basofílico, homogéneo y bien definido. El núcleo redondeado es excéntrico, y a lo largo de la membrana presenta partículas de cromatina tosca, muy basofílica y de distribución regular, que le otorgan aspecto de rueda de carro. Las células plasmáticas provienen de los linfocitos B estimulados, denominados centroblastos o inmunoblastos. Los linfocitos miden 8  $\mu\text{m}$  de diámetro y poseen un núcleo redondeado, bastante pequeño, muy basofílico por la presencia de numerosas partículas de cromatina (Lever, 1991).

## **2.8 HIPODERMIS**

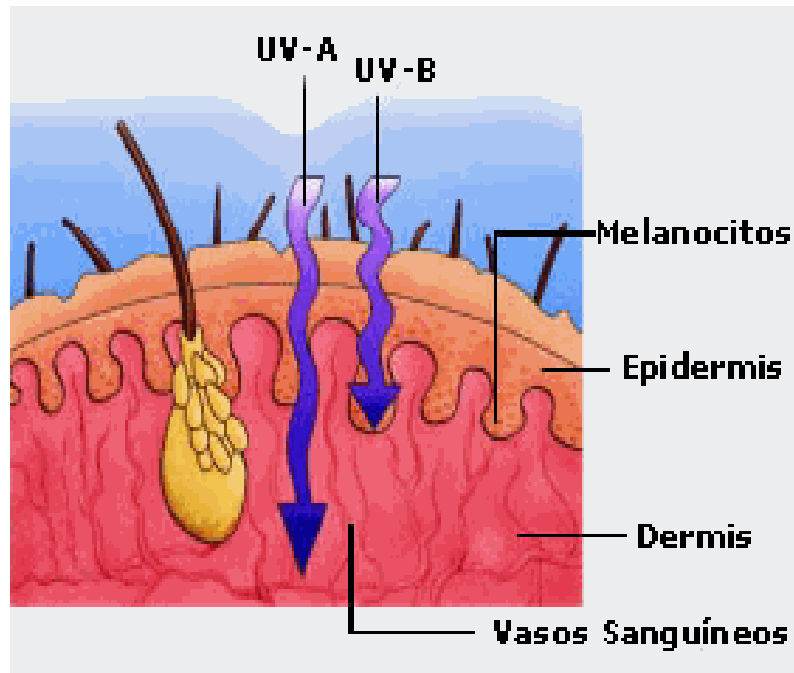
En profundidad, el límite entre la dermis y la hipodermis es definido por la transición entre los tejidos conectivos fibroso y adiposo. La hipodermis, o tejido celular subcutáneo, no forma parte de la piel, pero se halla tan íntimamente ligada a la misma, tanto por sus relaciones anatómicas como funcionales (Chu y cols., 2005).

Los adipocitos derivados del mesenquima son las células más importantes de la hipodermis. Están organizados en lóbulos limitados por tabiques de tejido conectivo fibroso, los nervios, los vasos sanguíneos y los linfáticos están

localizados entre los tabiques y otorgan una rica inervación e irrigación a la región (Chu y cols., 2005).

## **2.9 FUNCIONES DE LA PIEL**

La piel es un órgano que actúa como barrera delimitando el medio interno y externo del organismo. Su función principal es protegerlo de diversos factores ambientales como la pérdida de agua o desecación y proteger contra las radiaciones UV (RUV) uno de los factores físicos a los que están expuestos los seres vivos. Esta es una barrera concentrada en el estrato córneo la cual se opone a la penetración de las radiaciones luminosas en la piel. El estrato córneo ejerce un efecto protector mediante un doble mecanismo: donde refleja los fotones del espectro visible por los filamentos de queratina, también puede absorber los fotones UVB por los lípidos superficiales que constituyen la secreción sebácea, por el ácido urocánico presente en el sudor y, sobre todo, por los aminoácidos de la queratina. Después de exposiciones solares repetidas, los queratinocitos se multiplican, provocando un engrosamiento global de la epidermis y una barrera de melanina dispersas a través de la epidermis y esta va a depender del número de melanosomas maduros que hay en la epidermis, su tamaño y la su distribución en las diferentes zonas de la epidermis. La fotoprotección de la melanina es esencial, ya que permite absorber más del 90% de la radiación UV que ha sido capaz de atravesar la capa córnea y además inactivar los radicales libres fotoinducidos (Avril y cols., 2004), como se muestra en el esquema 3.



Esquema 3. Función de la piel como mecanismo de protección.

<http://www.monografias.com/trabajos40/enfermedades-profesionales/Image77.gif&imgrefurl=>

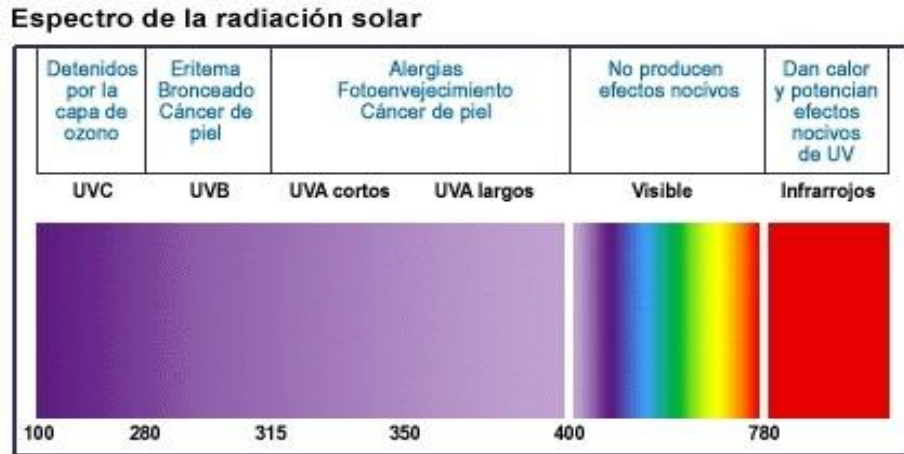
## 2.10 RADIACION ULTRAVIOLETA

El sol está situado a 149.000.000 millones de Km de la Tierra, libera en el espacio que lo rodea una inmensa cantidad de radiación electromagnética, formada por una infinita y continua serie de radiaciones constituidas por pequeñas partículas de energía llamadas fotones, que se propagan a una velocidad constante (Esquema 4). El tipo de radiación depende, por tanto, de la

energía de cada fotón que lo constituye y se han clasificado en tres categorías (Avril y cols., 2004):

- Las radiaciones ionizantes comprenden los rayos cósmicos (que no son capaces de atravesar el globo terráqueo), los rayos gamma y los rayos X.
- Radiación óptica, donde se incluye a la luz visible, de 400 a 800 nm, que puede ser percibida por el ojo humano y se puede descomponer a través de un prisma o en el arco iris: los rayos infrarrojos (IR), de 800 a 500 nm, que pueden ser absorbidos por las estructuras líquidas, agitan las moléculas de agua y producen calor y por último la radiación ultravioleta (UV), no visible para el ojo humano y que se divide en tres zonas: UVC (270-290 nm) UVB (290-320 nm) y UVA, la cual se clasifica en UVA2 (320-340 nm) y UVA1 (340-400 nm).
- Ondas hertzianas que no son absorbidas por las moléculas del cuerpo humano y no tienen efectos biológicos conocidos: microondas, ondas de radar, televisión y radio.





Esquema 4. Espectro electromagnético que incide en la superficie terrestre.  
[scielo.sld.cu/img/revistas/san/v14n6/](http://scielo.sld.cu/img/revistas/san/v14n6/)

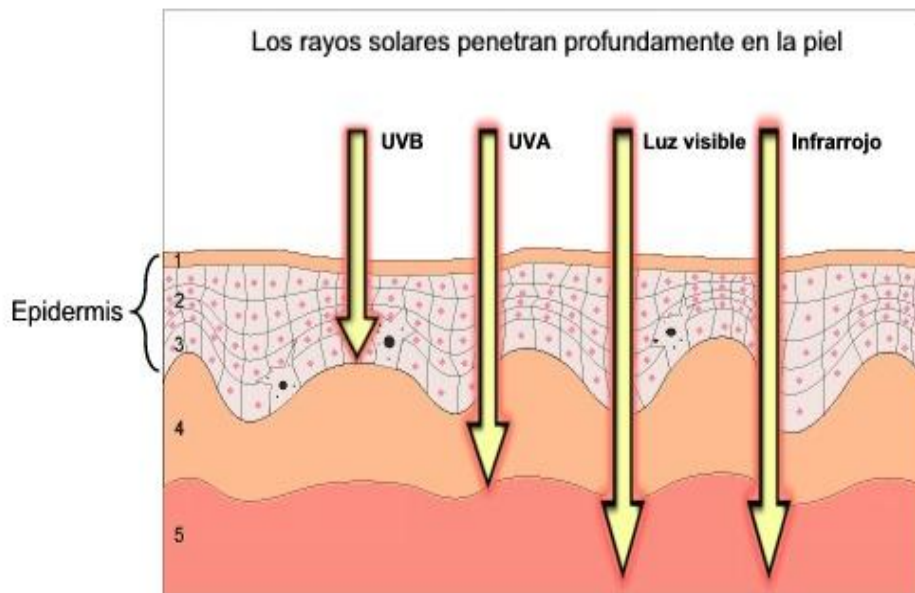
La radiación electromagnética emitida por el Sol se dirige a todas direcciones y sólo una pequeña parte de ella llega a la Tierra, después de haber sido filtrada por el ozono estratosférico. Esta capa retiene las radiaciones ionizantes y la radiación de muy corta longitud de onda, sin embargo, de los impactos que sufre la tierra aproximadamente el 50% son de luz visible, mientras que 40% son de radiación infrarroja y el 10% de luz UV (Avila y cols., 2005). Se cree que una reducción del 5% de la cantidad de ozono provocaría un aumento del 10% de la radiación UVB que llega a la superficie terrestre (Avril y cols., 2004).

La cantidad de radiación UVB y UVA que llega a la tierra se ve afectada por la latitud, altitud, las estaciones del año, la hora del día, la nubosidad y la capa de ozono. La irradiación es mayor en el ecuador (Kullavanijaya y Lim, 2005).

## 2.11 DAÑOS PRODUCIDOS POR LA RUV

La radiación UVC emitida por el sol es filtrada por el ozono en la estratósfera, por lo tanto no alcanza la superficie de la Tierra y no presenta efectos en el ser humano (Kullavanijaya y Lim, 2005).

De los rayos UVB, 70% son retenidos por el estrato córneo, el 20% alcanza el estrato espinoso y el 10% llega a la dermis superficial y representa uno de los más importantes factores que afectan la salud humana, aumentando así la incidencia de cáncer cutáneo, aparición precoz de cataratas, alteraciones en el sistema inmune, formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), etc. (Avril y cols., 2004), como se ve en el esquema 5.



Esquema 5. Representación esquemática de la penetración de la luz en la piel.  
[www.pce-iberica.es/medidor-detalles-tecnicos/](http://www.pce-iberica.es/medidor-detalles-tecnicos/)

La radiación UVA atraviesa el estrato córneo, pero sólo de un 20% a un 30% alcanzan la parte más profunda de la dermis. Debido a que los rayos UVA son de mayor longitud de onda en comparación con los UVB, son menos afectados por la altitud o la atmósfera, y no son filtrados por los cristales de las ventanas (Kullavanijaya y Lim, 2005). Se ha demostrado que la radiación UV-A puede provocar eritema, pigmentación cutánea y otros daños (Avril y cols., 2004).

La sobreexposición cutánea a la radiación solar, en especial la RUV causa severos desordenes relacionados con la piel (García-Bores y Avila, 2008). Los efectos perjudiciales producidos por la radiación UV sobre la piel pueden ser de dos tipos: agudos y crónicos. Dentro de los agudos se incluye el eritema, oscurecimiento que se produce en cuestiones de segundos siendo el resultado de la foto-oxidación de la melanina, el bronceado tardío (implica la síntesis de novo de la melanina) así como el engrosamiento de la epidermis y dermis (Gil y Kim, 2000).

Los efectos crónicos de la radiación UV en la piel son la inmunosupresión, el cáncer de piel, el envejecimiento ocular (cataratas) y el foto-envejecimiento, entre otros (Gil y Kim, 2000). La inmunosupresión juega un rol muy importante en el desarrollo de cáncer de piel. El envejecimiento es el resultado de la declinación progresiva de la capacidad proliferativa y la duración de la vida de las células cutáneas. Además, la exposición continua a la RUV da lugar a la acumulación progresiva de daño celular y molecular (Avril y cols., 2004).

La RUV al incidir en la piel interactúa con algunos de los componentes cutáneos debido a que sus fotones son absorbidos por ciertas moléculas denominadas cromóforos. El cromóforo puede modificar su estructura, establecer enlaces con

las macromoléculas que lo rodean y sobre todo transmitir la energía absorbida a moléculas vecinas, creando especies reactivas de oxígeno (ERO) entre las que se pueden encontrar, oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), etc. (Avril y cols., 2004).

Las ERO incluyen a los radicales libres que son especies químicas que tienen un electrón desapareado en la nube electrónica más externa. La energía creada por esta configuración inestable se libera a través de reacciones de óxido-reducción con moléculas adyacentes, tales como compuestos químicos orgánicos e inorgánicos. En las células las ERO pueden interactuar con proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono. Las ERO son moléculas extremadamente reactivas, las cuales van a modificar las funciones biológicas de las biomoléculas, sobre todo al ácido desoxirribonucleico (ADN), en él se producen alteraciones y rompimientos simples y dobles en las cadenas. Lo anterior puede ocasionar modificaciones de la expresión del material genético con riesgo de mutaciones (Avril y cols., 2004).

Los efectos de las ERO son de un rango amplio y pueden provocar daños dentro de la célula en el momento en el que la piel absorbe la RUV, provocando reacción con la timina en el DNA, tanto el nuclear como el mitocondrial, y producir roturas en la cadena del DNA. Este daño en el DNA se ha implicado en el envejecimiento celular (Avril y cols., 2004).

## 2.12 DAÑOS HISTOLÓGICOS CAUSADOS POR LA RUV

Dentro de los daños que ocasiona la luz UV a la piel podemos mencionar diversos cambios histológicos, como son la espongirosis epidérmica leve, el edema, el incremento del diámetro nuclear y el tamaño de los queratinocitos, la disminución de células de Langerhans, la presencia de células de quemadura, la hiperqueratosis, la paraqueratosis, la acantosis y la migración de células inflamatorias a las áreas expuestas (Nelson, 2000). La espongirosis se define como edema intraepidérmico, éste puede apreciarse con las tinciones habituales, y se observa sólo como una separación de las células epidérmicas. Al comienzo, los puentes intercelulares o desmosomas se elongan por acumulación de líquido, eventualmente puede generar más vesícula intraepidérmica y aumentar el tamaño de ésta, se hace clínicamente visible. Si el daño persiste, se desarrolla una hiperplasia epidérmica (Stevens y cols., 2003).

El edema es un aumento de líquido en los espacios intersticiales de los tejidos. Puede distribuirse de forma distinta según su origen, ser difuso o relativamente más intenso en lugares expuestos a una presión hidrostática máxima en dermis (Robbins y cols., 2005).

Las células de quemadura son en realidad queratinocitos apoptóticos en la epidermis, reconocidos a través de la tinción estándar y son de forma redonda con núcleos picnoticos. La apoptosis es una vía innata programada para la muerte de las células y es importante para el desarrollo normal y la homeostasis del tejido. La apoptosis juega un papel importante en la eliminación de las células dañadas (Nelson, 2000). Así mismo, es un acontecimiento patológico

cuando las células están dañadas sin remisión, especialmente cuando el daño afecta al DNA; en estas situaciones, la célula irremediablemente dañada se elimina (Robbins y cols., 2005). Las similitudes entre las células apoptóticas y células de quemadura apoyan la teoría de que el ADN se ve afectado por la RUV (Nelson, 2000).

Otros procesos que pueden presentarse después de la exposición de la RUV son la paraqueratosis, el eritema, la hiperplasia y la hipertrofia. La paraqueratosis es el tipo de lesión en donde la queratina del estrato córneo es histológicamente anormal ya que contiene restos nucleares fusiformes y se suele asociar con pérdida o marcado adelgazamiento de la capa granular subyacente. El eritema o quemadura solar es una inflamación cutánea aguda, reacción acompañada de enrojecimiento debido a la exposición excesiva a la RUV, es fácilmente visible por métodos no invasivos. La reacción del eritema a la RUV depende de la banda de frecuencias. La hiperplasia es un aumento del número de células como consecuencia de la división celular y por otro lado la hipertrofia es el aumento del tamaño de células existentes, sin embargo se pueden producir habitualmente juntas en respuesta al aumento de los requerimientos funcionales (Stevens y cols., 2003).

### **2.13 FOTOQUIMIOPREVENCIÓN**

Para reducir o mitigar los efectos nocivos de la radiación UV, es necesario tomar medidas de protección como: evitar la exposición prolongada en las horas de mayor irradiación (12 AM a 3 PM) el uso personal de gafas de sol,

sombreros, ropa adecuada, protectores solares bloqueadores con un factor de protección solar (FPS) de 15 o más y evadir las camas de bronceado. El FPS es la relación que existe entre la dosis de radiación que es capaz de producir un eritema en la piel recubierta de producto solar y la dosis de radiación responsable de producir el mismo eritema en la piel no protegida (Kullavanijaya y Lim 2005).

Los protectores solares son productos químicos que pueden absorber la luz ultravioleta de manera eficiente, se aplican tópicamente protegiendo de los efectos adversos de la luz solar, sobre todo de eritema. La mayoría de las formulas comerciales contienen ingredientes activos para un FPS amplio de 280 a 400 nm (UVB y UVA) (Kullavanijaya y Lim 2005).

Los agentes de protección solar pueden dividirse en orgánicos e inorgánicos (Nelson, 2000). Sin embargo los protectores solares provocan efectos secundarios como la irritación, alergias, reacciones fototóxicas que afectan a la síntesis de vitamina D, y generan ERO actuando como fotosensibilizadores (Kullavanijaya y Lim 2005). Por eso se buscan alternativas que puedan ser de manera natural y puedan ayudar a proteger la piel de la luz UV. La fotoquimiopreención es el uso de sustancias sintéticas o naturales que retardan o revierten los daños ocasionados por la RUV (Agarwal y Mukhtar 1996; Surh, 1999; Afaq y cols., 2005).

Varios estudios han evaluado el efecto protector de los productos naturales contra el daño inducido por la RUV en las células y tejidos animales. Dentro de este concepto encontramos una variedad de compuestos polifenólicos con

propiedades anti-inflamatorias, inmunomoduladoras, antimutagénicas y antioxidantes (Afaq y cols., 2005; Adhami y cols., 2008).

Los antioxidantes son moléculas orgánicas producidas por las plantas en respuesta al estrés ambiental (Márquez y Farah, 2009) y desempeñan un papel importante en la prevención o retraso de la peroxidación lipídica, así como en el daño fotobiológico en la inducción del cáncer en la piel. Para contrarrestar los efectos perjudiciales de la ERO, la piel es protegida con un sistema de defensa el cual consiste en una variedad de antioxidantes y enzimas de defensa de bajo peso molecular. Esta red es responsable de mantener el equilibrio entre los antioxidantes y prooxidantes (Chaudhuri, 2000). También se ha visto que la aplicación tópica de estos compuestos tiene efectos protectores contra el fotoenvejecimiento inducido por ERO tanto en animales como en humanos. En este contexto la administración tópica de antioxidantes naturales presentes en las plantas lograría proporcionar un procedimiento eficaz para la protección cutánea. Varios estudios enfocados a la aplicación tópica de fármacos antioxidantes recientemente han confirmado este hecho y se ha demostrado la disminución en el daño cuando la piel se suplementa con antioxidantes (Jurkiewicz et al. 1995; Jin-Yin et al. 2003; Marti-Mestres y cols., 2007).

La aplicación directa de los antioxidantes en la piel tiene ventajas sobre la administración oral debido a que es más fácil de dirigir los antioxidantes a la zona de la piel que más necesitan protección. El estrato córneo en particular puede beneficiarse de una mayor capacidad antioxidante debido a la aplicación tópica cutánea por que los antioxidantes disminuyen de manera significativa el estrés oxidativo (Chaudhuri, 2000). Su capacidad para hacer esto en algunos



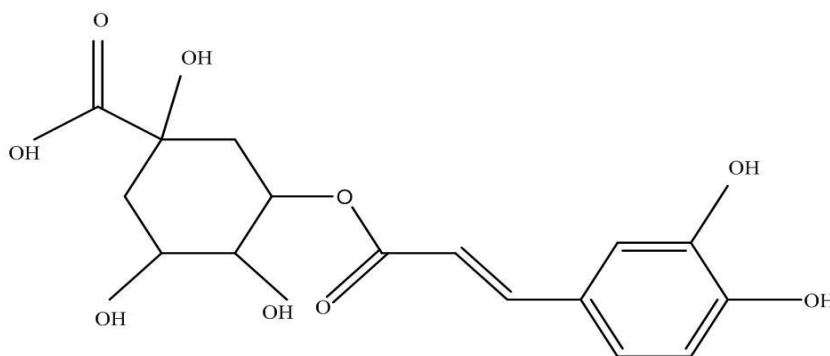
compuestos se basa principalmente en su estructura de fenólica (Marinova y cols., 2009).

Las polifenoles comprenden una amplia variedad de productos naturales de origen vegetal. Casi todas las plantas proporcionan una marcada actividad antioxidante ejemplos típicos son catecoles oligoméricos, flavonoides, fenilproanoides etc. Muchas de estas plantas son consumidas en la dieta y se cree tienen efectos benéficos para la salud de los seres humanos. Recientemente algunos polifenólicos han demostrado propiedades fotoprotectoras cuando se usan tópicamente. La administración de diferentes extractos de plantas, particularmente los fenilpropanoides, han reportado reducir los daños en la piel agudos y crónicos después de la exposición a la RUV. Los compuestos como los polifenoles pueden eliminar las ERO provocadas por la RUV, disminuyendo la peroxidación de lípidos y así reduciendo posibles daños a nivel celular (Chaudhuri, 2000).

## **2.14 ÁCIDO CLOROGÉNICO**

Los compuestos fenólicos poseen al menos un anillo aromático con 1 ó más grupos hidroxilos. Entre ellos, los fenilpropanoides presentan la estructura básica de los fenoles más una cadena tricarbonada como grupo lateral. Los más comunes son los ácidos fenílico, cumárico, cafeíco y el ácido clorogénico (ACG). Este último es un éster del ácido cafeíco y el ácido quínico (Gutiérrez, 2002).

El ACG ó ácido 3-D-cafeoilquínico (Xiang y Ning, 2008) es un compuesto natural perteneciente a la familia de los ésteres y existe ampliamente en frutas y vegetales (Esquema 6). Este metabolito es el compuesto fenólico mas abundante en las hojas de tomate, café, cacao, té, vino, piña, manzanas, girasol, arándano y fresa (Clé y cols., 2008; Gugliucci y cols., 2009). El ácido clorogénico se caracteriza por ser un atrapador de radicales libres y metales pesados, puede interferir en la absorción de glucosa y se ha demostrado que modula la expresión en genes de enzimas antioxidantes en cerdo, ratón y jitomate (Gugliucci y cols., 2009).



Esquema 6. Estructura química del ACG.

[www.gluon.com.br/.../09/acido-clorogenico.jpg](http://www.gluon.com.br/.../09/acido-clorogenico.jpg)

Marti-Mestres y cols. (2007) trabajaron con compuestos fenil-propanoides como el ácido cafeíco, ACG y orapósido. Estos productos naturales presentan actividad antioxidante y pueden ser usados en la dermocosmética para proteger la piel del estrés oxidativo inducido por la radiación UV. Con este fin, se evaluó *in vitro* la penetración del ACG, ácido cafeíco y orapósido a través de la piel de la oreja del cerdo. En este estudio sobre la piel de cerdo, el valor del flujo resulto ser igual a 0,32 y 0,48  $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$  para los ácido cafeíco y ACG, respectivamente, para orapósido los niveles estaban por debajo del límite de detección y el flujo no fue evaluado. Estos resultados fueron corroborados por microscopia de fluorescencia. El ácido cafeíco y el ACG se encontraron en todas las secciones de la piel, y estos podrían representar una actividad sistémica, mientras que orapósido permaneció en la parte superior de la capa superficial de la piel.

Clé y cols. (2008) estudiaron la relación que existe en la acumulación de compuestos fenólicos y la susceptibilidad de la UV en las plantas transgénicas de jitomate con la expresión alterada de hidroxicinamoil CoA quitina transferasa (HQT). El ACG es uno de los compuestos fenólicos más abundantes en jitomate (*Solanum lycopersicum*) y la HQT, es la enzima clave que cataliza ACG en la biosíntesis del jitomate. En general, el incremento de la acumulación de ACG esta asociada con el aumento en la protección UV. Sin embargo, la manipulación genética de la expresión HQT también dio lugar a la búsqueda de alteraciones más complejas en los perfiles de compuestos fenólicos. Los niveles de rutina fueron relativamente altos en las plantas donde se alteró la expresión de HQT, tanto en genes silenciados como en plantas que sobreexpresan HQT. Esto sugiere que la plasticidad a lo largo de las diferentes vías del metabolismo

de los fenilpropanoides y la existencia de distintos mecanismos en la regulación de de los precursores fenólicos en respuesta tanto a los parámetros metabólicos y de las condiciones ambientales. Los cambios en la composición de los compuestos fenólicos afectan relativamente los niveles de la tolerancia a la radiación UV. Estos autores concluyen que la capacidad de estos para proteger contra la radiación UV potencialmente dañina está determinada tanto por el nivel total que se acumula en las hojas de tomate así como por la composición específica del perfil fenólico.

Márquez y Farah (2009) estudiaron la composición del ACG de 14 plantas medicinales por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-UV y LC-DAD-ESI-MS). Las plantas con un alto contenido de ACG fueron yerba mate (*Llex paraguariensis*), Karveja (*Genistelloides bracharis*), Anis (*Pimpinella anisum*), Marcela (*Achyrochine satureioides*), Te verde (*Camelia sinensis*), Toronjil (*Melissa officinalis*) y Cedrón paja (*Cymbopogon citratus*), con un intervalo de 84,7 mg/ 100 g a 9.7 g/ 100 g, en peso seco. La infusión de las plantas fue preparada a 0,5% con el fin de evaluar el consumo real del ACG a través de estas bebidas. El total de contenidos del ACG en las infusiones fueron similares a las del extracto con etanol e indicaron que se produce una extracción satisfactoria durante la preparación de infusiones. Los autores sugirieron que estas plantas ricas en ACG merecen atención por sus propiedades farmacológicas.

Cichock y cols., (2010) trabajaron los efectos de los ácidos protocatequico, ACG y tánico en el cáncer de la piel utilizando como promotor de tumor el 12-0-tetradecanoilforbol – 13-acetato (TPA) provocando que se exprese NF- $\kappa$ B en la

epidermis de ratón. La aplicación tópica de estos compuestos fenólicos fue 15 min antes de la TPA, y se obtuvo como resultado una disminución significativa en la activación de NF- $\kappa$ B midiéndose en términos de p65 el cual se va a unir al ADN. El ácido tánico fue el inhibidor más potente del TPA, mientras que el ACG fue el compuesto menos eficaz. El ácido tánico también redujo la translocación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B desde el citosol al núcleo y mejoró la retención I $\kappa$ B $\alpha$  en el citosol. Aunque el ácido protocatequico disminuyó la unión de p65 al ADN, no afectó a TPA en la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ . Todas las pruebas a los compuestos inhiben la actividad de I $\kappa$ B $\alpha$  quinasa (IKK) en la epidermis de ratón. Así, los ácidos fenólicos se han convertido de gran interés para la prevención de cáncer.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La sobreexposición solar, en especial a la RUV, causa severos daños relacionados con la piel, entre los que se destaca la presencia de eritema, oxidación de la melanina, hasta provocar el fotoenvejecimiento, inmunosupresión y fotocarcinogenesis, por mencionar algunos. Debido a lo anterior, es de suma importancia emplear alternativas que ayuden a mitigar estos efectos, como son: el uso de sombreros, gafas de sol, ropa adecuada, protectores solares siendo estos productos químicos capaces de poder absorber la luz UV de manera eficiente. Sin embargo, se ha visto que estos últimos pueden tener efectos secundarios. Por lo que actualmente se investiga si los productos naturales pueden prevenir los efectos adversos de la RUV en la piel al absorber la luz UV. Existen una variedad de compuestos polifenólicos

con propiedades antiinflamatorias, antimutagénicas y antioxidantes los cuales se pueden encontrar en vegetales y frutas. Dentro de éstos destaca el ácido clorogénico, el cual podría desempeñar un papel importante en la prevención del daño provocado por la RUV en la piel y a largo plazo en futuros estudios realizar experimentos para evaluar su probable prevención del cáncer de piel. Por lo tanto, nuestra pregunta científica es, ¿el ácido clorogénico podrá proteger a la piel de ratones SKH-1 de los daños provocados por la RUV a nivel histológico?

#### **4. HIPÓTESIS**

Siendo el ACG un compuesto fenólico que existe ampliamente en diversas plantas y del cual ha reportado actividad antioxidante, se podría utilizar como fotoprotector solar contra daños en la piel de ratones SKH-1 provocados por la radiación UV.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto fotoprotector del ácido clorogénico en la piel de ratón SKH-1 irradiado con UV.

## 6. OBJETIVO PARTICULAR

Estudiar a nivel histológico las anomalías en los tejidos cutáneos que fueron tratados con el ácido clorogénico y expuestos a radiación UV.

Determinar el efecto fotoprotector del ácido clorogénico de acuerdo al diagnóstico histológico de la piel de los ratones SKH-1 irradiado con UV con y sin protección.

## 7. METODOLOGÍA

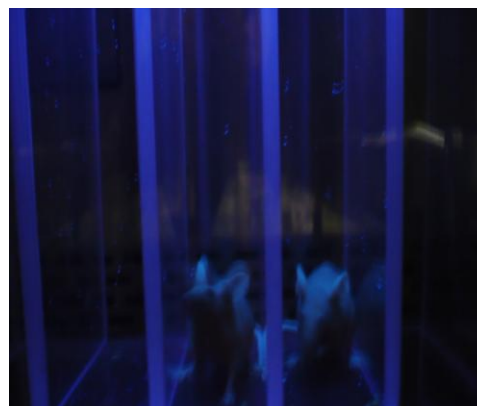
### Aplicación del tratamiento a los grupos

Los ratones hembras SKH-1 de 6 a 8 semanas de edad fueron adquiridos de Charles River Lab. Los animales se aclimataron en el bioterio de la FES-Iztacala al menos una semana antes de realizar los experimentos. Durante todo el estudio, los animales se mantuvieron con agua y alimento (Purina Chow 5001) *ad libitum*, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, a una temperatura de 23 a 25°C y a una humedad relativa del 45-55%. Para la irradiación, los animales se colocaron en cajas de acrílico especiales, a 15 cm de separación de la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La energía de irradiación a esta distancia es de 6.0 mJ/cm<sup>2</sup> (intensidad de campo 130 watt/m<sup>2</sup>) calculada con un radiómetro (Spectroline DM-300HA), las lámparas fueron sistemáticamente alternadas para compensar o minimizar cambios en el flujo de las mismas. El tiempo de irradiación en el que los

animales estuvieron expuestos fue de 45s cada tercer día durante 15 días (García-Bores, 2010).



Mantenimiento de los ratones SKH-1



Cámaras de irradiación

Figura 1. Ratones SKH-1 sin pelo usados en las pruebas experimentales

Los ratones se dividieron en cinco grupos. Los grupos 3, 4 y 5 tienen más número de ratones ya que son las pruebas experimentales como se muestra en el siguiente cuadro:



Tabla 1. Tratamientos para la evaluación del efecto fotoprotector en ratones SKH-1

Grupo	Tratamiento	No. Animales
Testigo	Sin ninguna manipulación	3
Control	Etanol (200 $\mu$ L)	3
Control	Etanol + UV (200 $\mu$ L)	6
Control	Ácido clorogénico + etanol (2 mg/mL)	5
Experimental	Ácido clorogénico+ etanol + UV (2 mg/mL)	5

El ACG se aisló en trabajos previos por el grupo del Dr. Alfonso Romo de Vivar, del Instituto de Química de la UNAM. La aplicación del fotoprotector se aplicó 10 minutos antes de llevar a cabo cada irradiación y 24 h después de la última exposición a la RUV, los animales fueron sacrificados en cámaras de CO<sub>2</sub>, y se tomaron muestras de piel de la zona dorsal de cada animal.

### Estudio Histológico

Las muestras de piel se fijaron 24 h en paraformaldehído al 2% en PBS, y posteriormente se deshidrataron con alcoholes en concentraciones crecientes (70%, 80%, 90%, 96%) hasta llegar a alcohol absoluto. Posteriormente se realizaron dos cambios en xileno para finalmente incluirlas en parafina. Se realizaron cortes de 5 $\mu$ m de grosor en un micrótopo de rotación, y se colocaron en portaobjetos. Se realizó la tinción histológica de rutina con hematoxilina y eosina (H-E); seguido de esto se observaron al microscopio óptico y se evaluó

el daño histológico donde se tomaron en cuenta las lesiones reportadas para la quemadura solar, la extensión y el grado del daño (Tabla 2).

Tabla 2. Lesiones cutáneas inducidas por la RUV (Robbins y cols., 2005).

TEJIDO	LESIONES CUTÁNEAS	CRITERIO DE IDENTIFICACIÓN
EPIDERMIS	Paraqueratosis	El estrato córneo contiene restos nucleares fusiformes
	Espongiosis	Edema intraepidérmico
	Apoptosis (células de quemadura)	Muerte celular programada
	Necrosis	Muerte celular con pérdida de la integridad de la membrana
	Hiperplasia	Aumento de tamaño por proliferación celular
	Hipertrofia	Aumento del tamaño de las células y del tejido
	Atrofia	Disminución en el tamaño de una estructura o en el número celular
DERMIS	Edema	Acumulación de líquido en el intersticio
	Hemorragia	Extravasación de eritrocitos
	Infiltrados inflamatorios	Presencia de polimorfos nucleares (neutrófilos y macrófagos)
	Congestión de vasos sanguíneos	Acumulación de sangre en vasos sanguíneos

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ratones SKH-1 presentan después de nacer un pelaje normal, a los 12 días de edad sufren la pérdida espontánea del pelo y por el día 18 ó 20 todo el cuerpo está desnudo. La causa de la repentina pérdida del pelo, al parecer es por la queratosis folicular. Después de que el pelo se pierde la piel se vuelve más gruesa, particularmente alrededor de la cabeza (Montagna y cols., 1952).

El resumen de las lesiones histológicas se pueden observar en la tabla 3. Los animales del grupo testigo presentaron de 4 a 7 capas celulares en la epidermis con los estratos característicos: el estrato córneo, estrato granuloso, espinoso y basal (Figuras 2 y 3). Estos animales no fueron manipulados, sin embargo mostraron espongiosis (Figura 4). Aunado a esto, una característica importante de los ratones es que manifiestan dermatitis leve difusa, probablemente causada por las alteraciones genéticas que presentan (Crew y Mirskaia, 1932). En la literatura se reporta que en todos los tipos clásicos de dermatitis hay alteraciones histológicas epidérmicas y dérmicas como la espongiosis que es edema intraepidérmico y aparece como espacio en el tejido (Gallin, 2001).

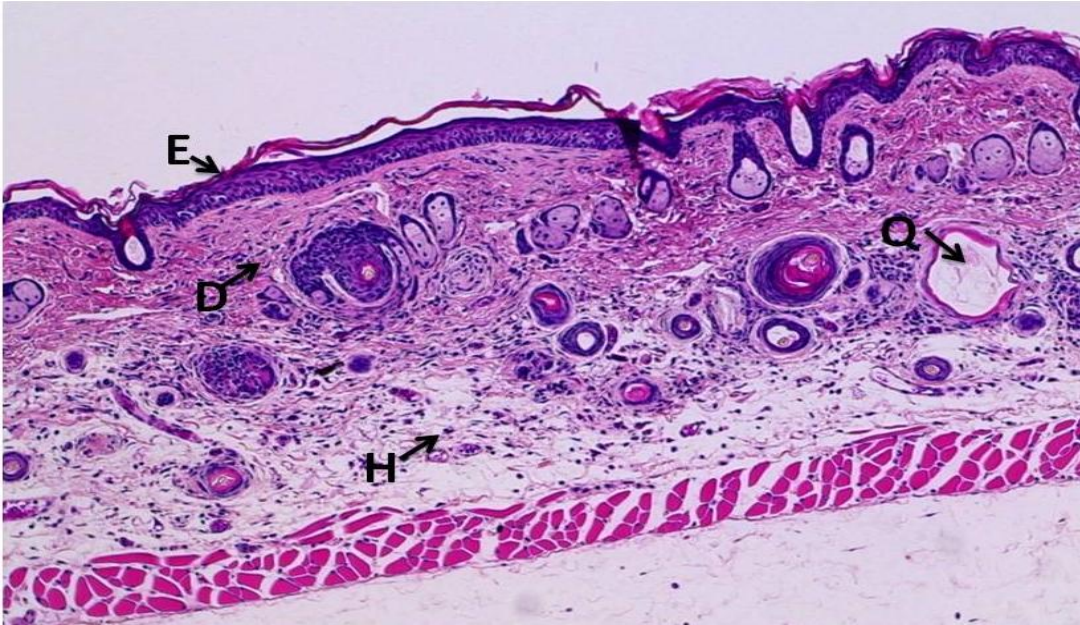


Figura 2. Piel de ratón SKH-1 sin ningún tratamiento. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), quiste sebáceo (Q). Tinción H y E, 100X.



Figura 3. Corte histológico de la zona dorsal de piel de ratón SKH-1. Grupo testigo, estrato córneo (EC), estrato granuloso (EG), estrato basal (EB). Tinción H y E, 400X.

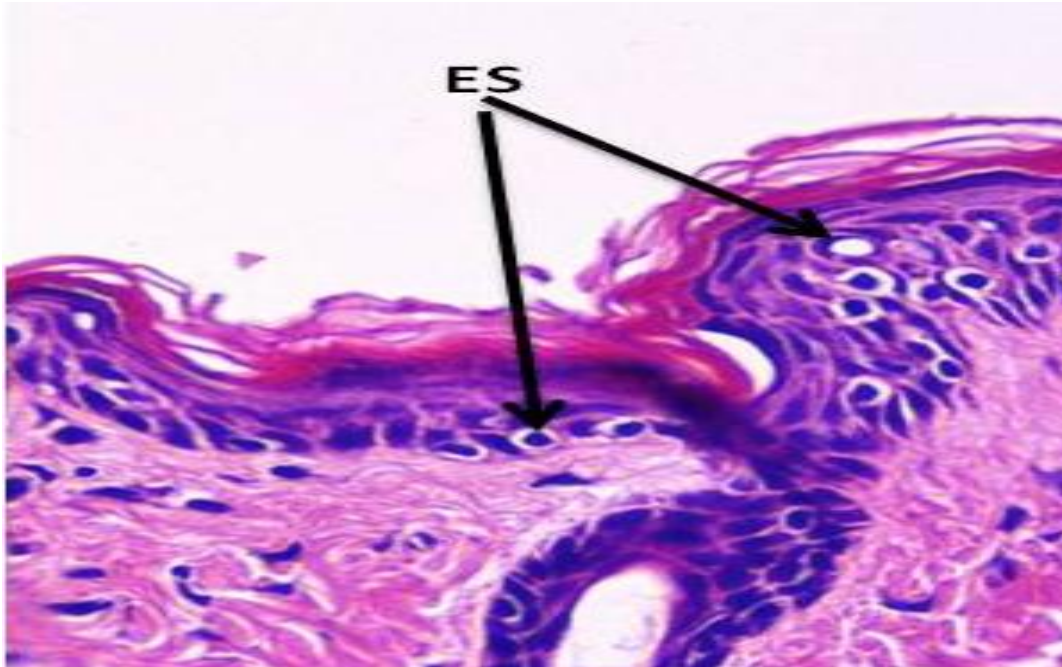


Figura 4. Corte histológico de la zona dorsal de piel de ratón SKH-1. Grupo testigo, espongiosis (ES). Tinción H y E, 400X.

En la dermis de los ratones SKH-1 se observaron las fibras de colágena y fibroblastos característicos del tejido conectivo. Además, fueron evidentes los quistes sebáceos. Se ha reportado que en estos ratones a partir de los 2 meses de edad comienzan a tener agregados celulares sebáceos que posteriormente se transforman en quistes, al envejecer se llenan de láminas concéntricas de queratina y el número de células sebáceas disminuye en la periferia formando así a los quistes sebáceos (Montagna y cols., 1952), ver Figura 2.

El grupo testigo también presentó congestión, en los vasos cercanos a los quistes. Estos resultados concuerdan con la descripción de (Crew y cols., 1932) quienes reportaron que la dermis se encuentra saturada de quistes, por lo tanto al haber muerte celular se desencadena una serie de respuestas inflamatorias, lo que ocasiona congestión en respuesta a éste estímulo (Figura 5).

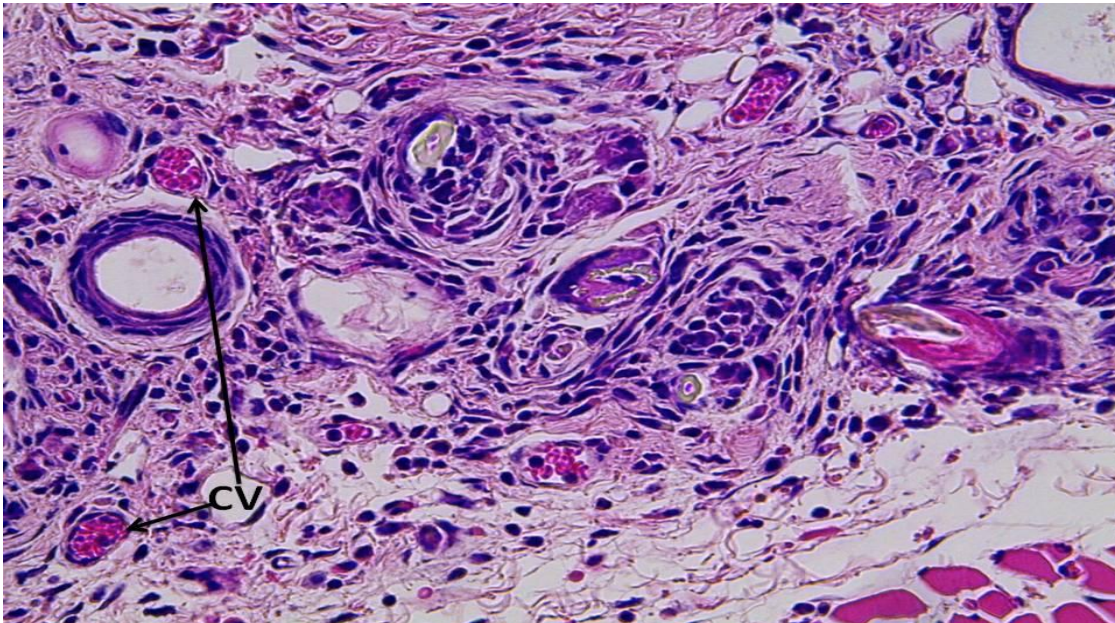


Figura 5. Sección de piel de ratón SKH-1. Grupo testigo. Congestión de vasos sanguíneos (CV). Tinción H y E, 400X.

El grupo al que se le aplicó tópicamente etanol (vehículo) presentó de 4 a 7 capas celulares (Figura 6), también se encontró espongiosis y células apoptóticas. El etanol es un vehículo de uso común para preparaciones

farmacéuticas de uso tópico. Una gran variedad de alcoholes en concentraciones diferentes se utilizan tanto en productos cosméticos como en desinfectantes, la aplicación tópica del etanol en la piel como vehículo es por lo tanto muy común (Neuman y cols., 2010).

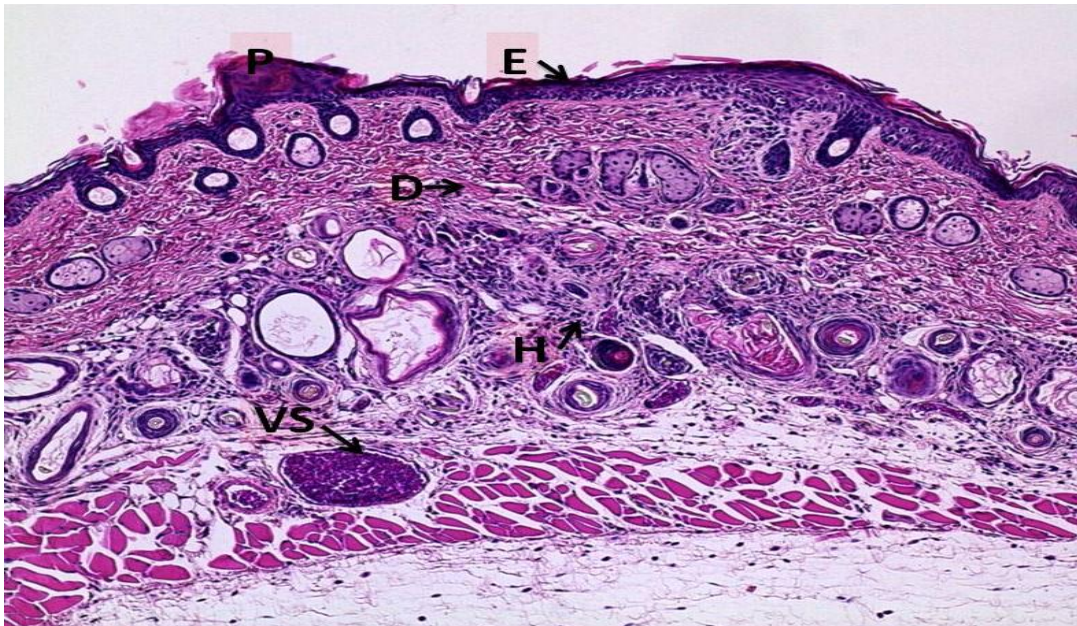


Figura 6. Piel de ratón SKH-1. Grupo etanol. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), vasos sanguíneos (VS). Tinción H y E 100X.

Además de su uso en cosméticos, el etanol se utiliza como un vehículo para las pruebas de alergia de contacto y para mejorar la permeabilidad de la piel a los medicamentos. Sin embargo, se ha reportado que esta sustancia produce daños tales como inflamación, espongiosis acompañadas de células de quemadura llamadas también células apoptóticas por lo que confirma los resultado que se obtuvieron al revisar las muestras (Neuman y cols., 2010),



Aunado a lo anterior durante la apoptosis ocurre una condensación de la cromatina y el ADN se degrada. Las células se convierten en cuerpos apoptóticos, aparecen como una masa redonda u oval de citoplasma eosinófilo, con fragmentos densos de cromatina nuclear, la integridad de la membrana se mantiene, de manera que los metabolitos potencialmente tóxicos que podrían dañar a las células vecinas no son liberados (Robbins y cols., 2005). Como se ve en la (Figura 7).

En los ratones tratados con etanol hubo en epidermis la presencia de papilas con una extensión focal y grado leve. La papila es una prominencia provocada por el engrosamiento de la epidermis (Figura 7).

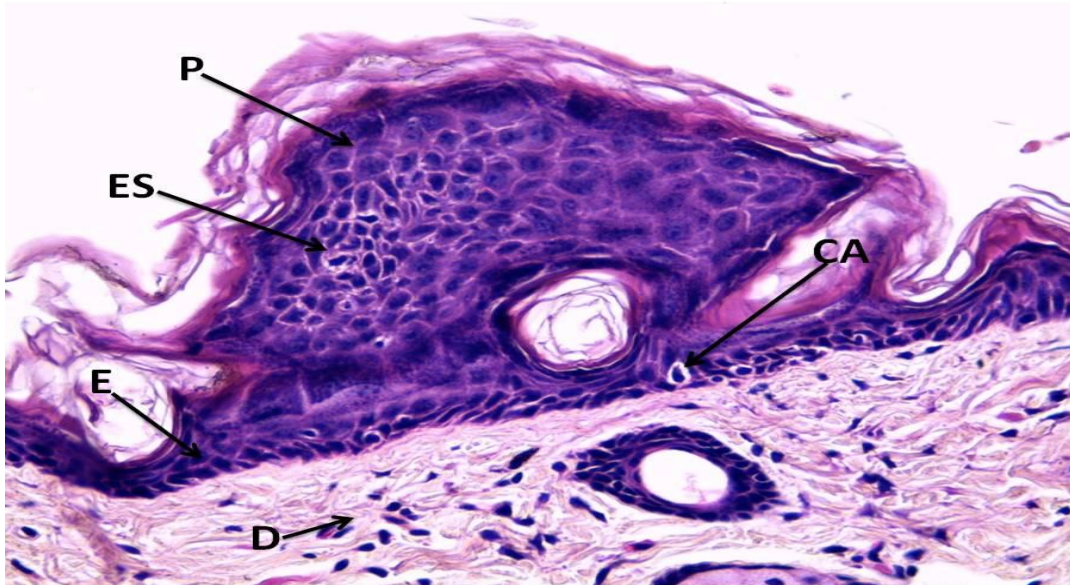


Figura 7. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo Etanol. Epidermis (E), dermis (D) papila (P), espongiosis (ES) células apoptóticas (CA). tinción H y E, 100x.

La hipertrofia también estuvo presente en los ratones tratados con etanol lo cual se podría explicar debido a que se ha demostrado que la administración de etanol causa la degradación oxidativa y daño del ADN mitocondrial jugando un papel importante en la producción de las lesiones que aparecen en órganos y tejidos (Brand y Jendrzewski, 2008), como se muestra en la (Figura 8).

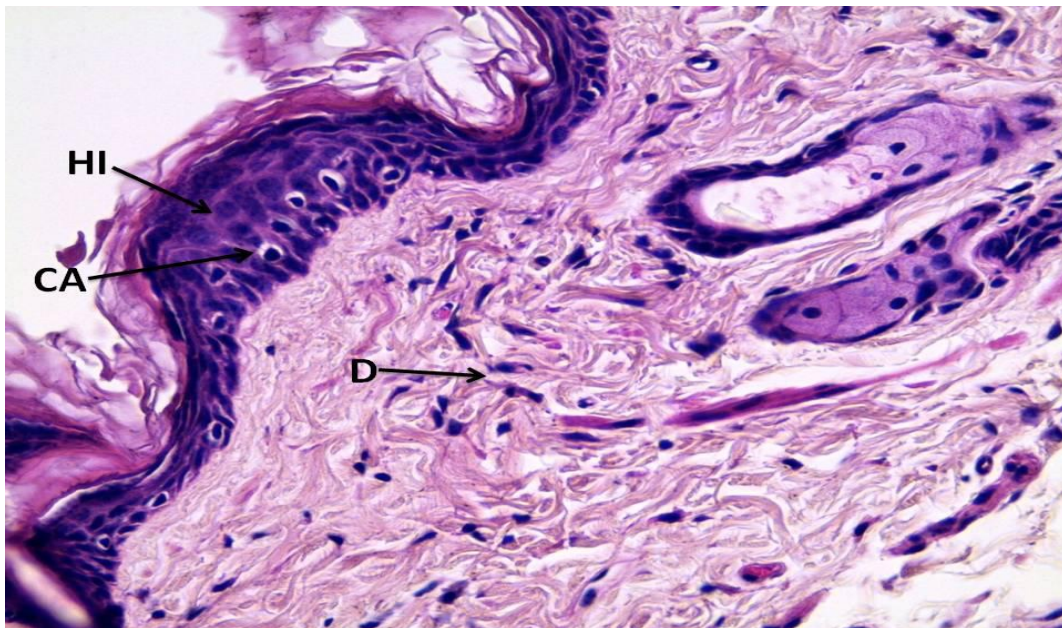


Figura 8. Sección de piel de ratón SKH-1. Grupo Etanol. Dermis (D), hipertrofia (HI), células apoptóticas (CA). Tinción H y E, 400x.

El etanol también provoca vasodilatación en la dermis, lo cual podría explicar por que en el grupo tratado con etanol se encontró congestión de vasos sanguíneos, ya que es el resultado de un aumento del flujo sanguíneo que es la causa del calor y el eritema (Brand y Jendrzewski, 2008). Esto se puede apreciar en la (Figura 9).

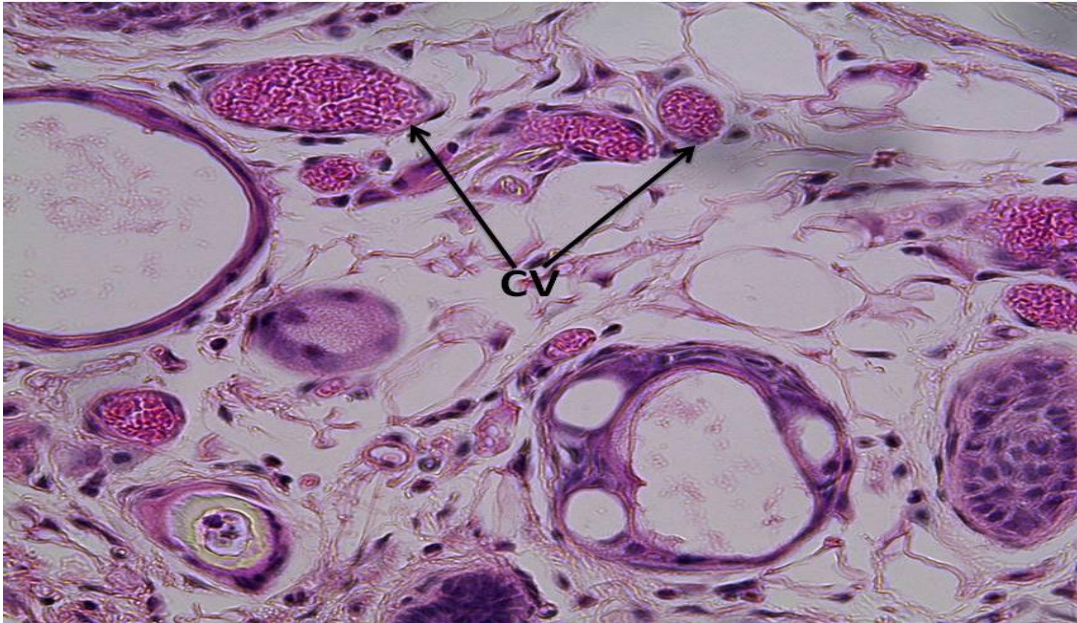


Figura 9. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo Etanol. Congestión de vasos sanguíneos (CV).Tinción H y E, 400X.

Los grupos de ratones irradiados con UV presentaron de 2 a 4 capas celulares en epidermis (Figura 10). Así como apoptosis, espongiosis e hipertrofia focal leve, mientras que la hiperplasia y atrofia fue multifocal de grado leve.

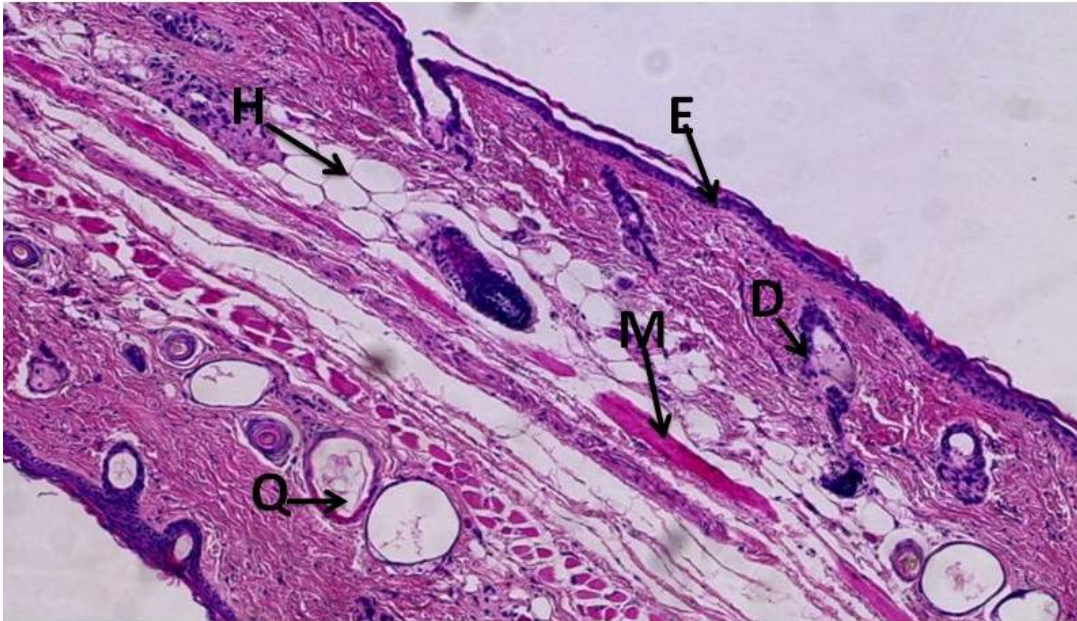


Figura 10. Piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), quiste sebáceo (Q), músculo (M). Tinción H y E 100x.

Típicamente la radiación UVB induce células apoptóticas en la epidermis (Figura 11), que aparecen alrededor de los 30 min después de la exposición y alcanzan su número máximo a las 24 h, más tarde se originan las células de quemadura en los queratinocitos dañados y se asemejan a las células disqueratóticas. El citoplasma de las células afectadas se hialiniza y a menudo adquiere eosinofilia en los cortes teñidos con H y E, mientras el núcleo es picnótico y puede desaparecer de manera prematura. Es típico que las células de quemadura solar aparezcan en grupos adyacentes a células de aspecto normal en la porción inferior de la epidermis, y que se muevan hacia arriba (Norris y cols., 1990). La apoptosis es un mecanismo que actúa en la eliminación de las células dañadas por la exposición a la UV; esta pérdida de

células puede ayudar a evitar el daño a DNA (Robbins y cols., 2005). Después de la irradiación UV hay edema intercelular llamado espongiosis y vacuolización perinuclear en la epidermis, además de alteraciones nucleares, como prominencia del núcleo (Norris y cols., 1990), esto se ve en la (Figura 11).



Figura 11. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Células apoptóticas (CA), espongiosis (ES). Tinción H y E, 400X.

La exposición a la UVB también provoca atrofia (Figura 12), hiperplasia (Figura 13) e hipertrofia (Figura 14) en epidermis. La respuesta resulta del aumento de la actividad mitótica cutánea, en particular epidérmica, asociada con un aumento de la síntesis de DNA, RNA y proteínas, inmediatamente después de la irradiación y precediendo a esta respuesta hay una depresión transitoria de esa actividad. La exposición a la UV también puede aumentar el espesor

epidérmico, pero en menor grado. El aumento de mitosis, que persiste durante varios días, induce el engrosamiento epidérmico y dérmico. Esto tiene lugar después de un periodo transitorio de detención del ciclo celular, regulado por la actividad de la proteína supresora tumoral (TGF- $\beta$ ), que ejerce un papel crucial en la reparación del DNA y protege al genoma de mutaciones potencialmente deletéreas antes que comience la mitosis. Los mecanismos exactos del aumento de la mitosis y de la hiperplasia aun no han sido establecidos, pero diversos mediadores inflamatorios inducidos por UV, en particular el factor de transformación de crecimiento (TGF, por sus siglas en inglés) y la ornitina descarboxilasa (ODC), pueden inducir la proliferación de los queratinocitos. El aumento de la mitosis persiste entonces durante días a semanas, lo que determina que el espesor de la epidermis y la dermis prácticamente se duplique, incluso después de una única exposición a UV (McGregor y Hawk, 2001).

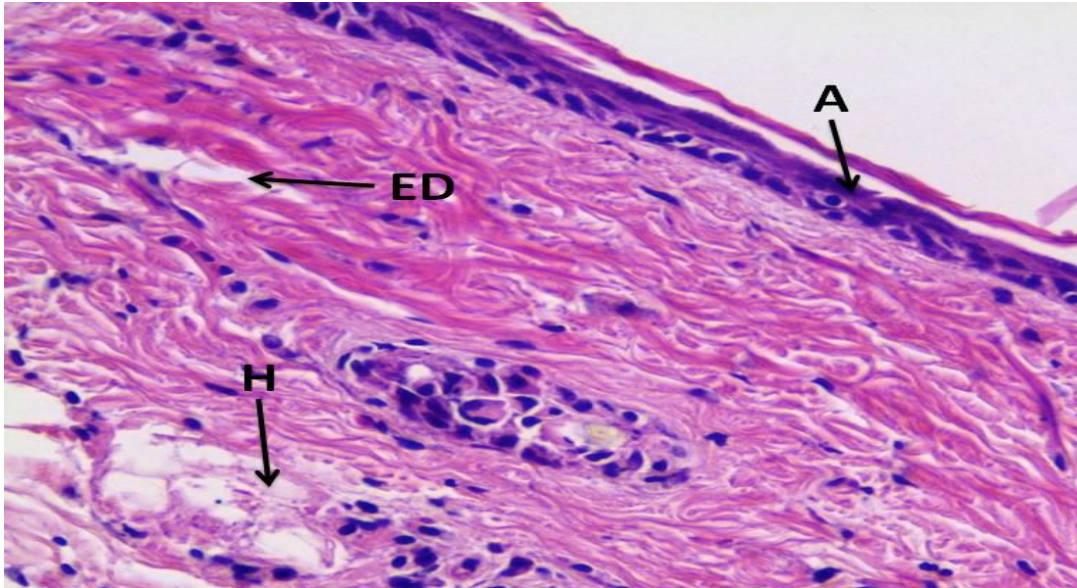


Figura 12. Sección de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Atrofia (A), edema (ED), hipodermis (H). 400X.



Figura 13. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Hipertrofia (HI), dermis (D). Tinción H y E, 400X.

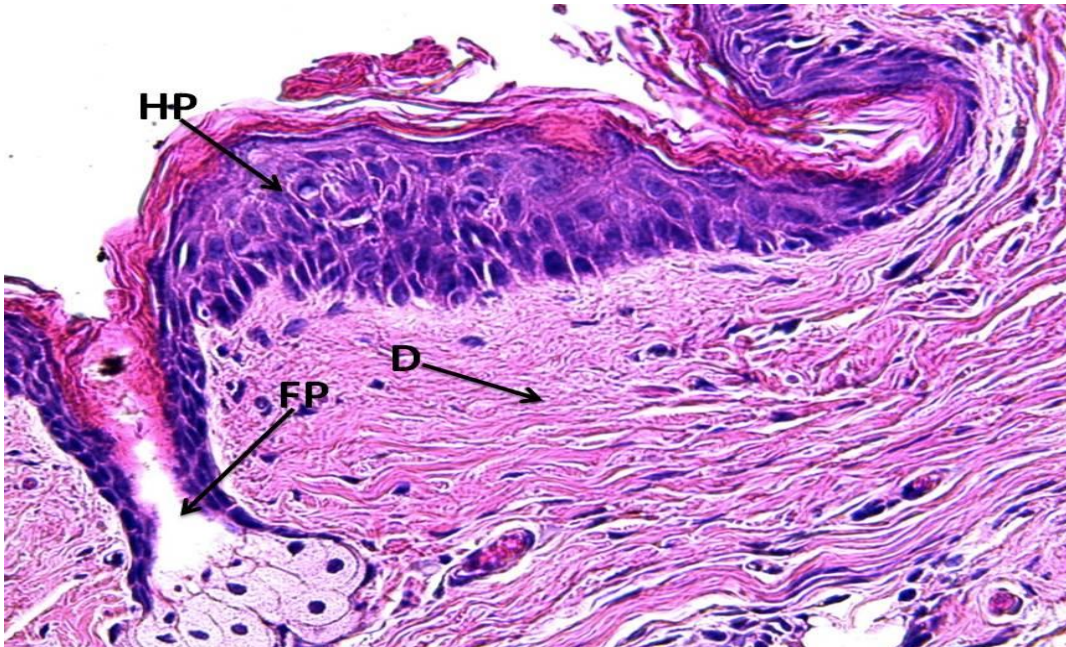


Figura 14. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Hiperplasia (HP), folículo piloso (FP), dermis (D). Tinción H y E, 400X.

En la dermis de los ratones SKH-1 irradiados con UV es evidente un edema focal leve (Figura 12) y congestión de vasos con una extensión multifocal con grado leve (Figura 15). Aunado a esto, los rayos UVB y UVA también ocasionan modificaciones en la dermis. Los vasos sanguíneos superficiales y algunos más profundos muestran tumefacción temprana de las células endoteliales que ocasiona oclusión parcial de los vasos con edema perivascular, el daño vascular se presenta en ocasiones con extravasación de glóbulos rojos (hemorragias) (McGregor y Hawk, 2001). El edema y la congestión de vasos sanguíneos ocurre juntos del lecho capilar puede producir edema por una mayor trasudación del líquido (Robbins y cols., 2005).



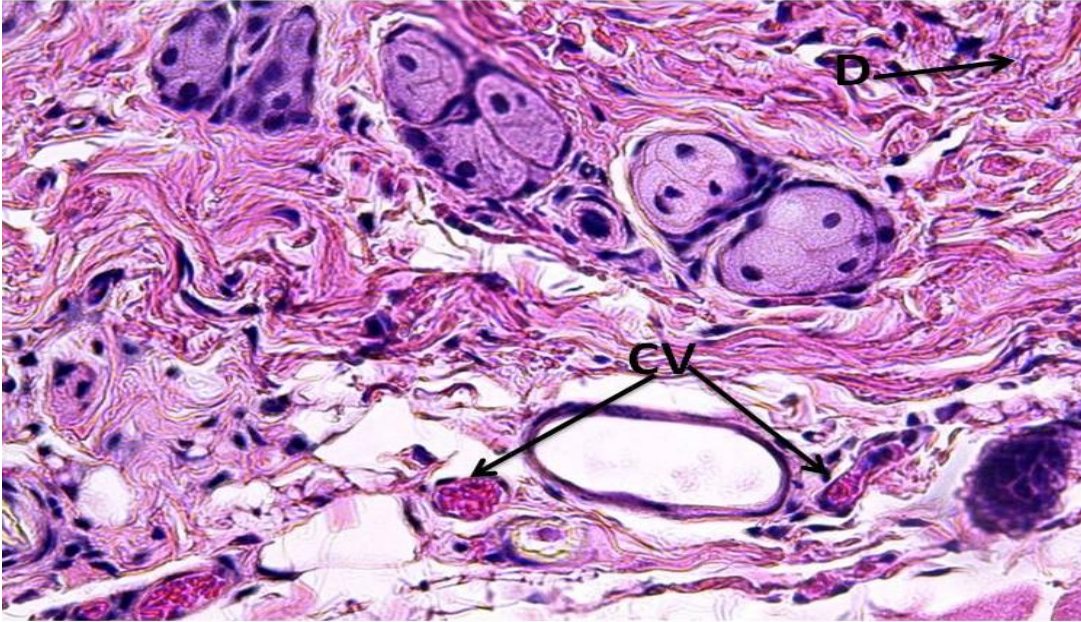


Figura 15. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo irradiado con UV. Congestión (CV), dermis (D). Tinción (H y E) (40x).

El grupo de ratones SKH-1 que se le aplicó ACG presentaron en epidermis de 2 a 5 capas de células (Figura 16). Se observaron espongiosis, células apoptóticas, hiperplasia, hipertrofia, y atrofia en epidermis con extensión focal y grado leve y congestión de vasos, así como infiltrados inflamatorios en dermis.

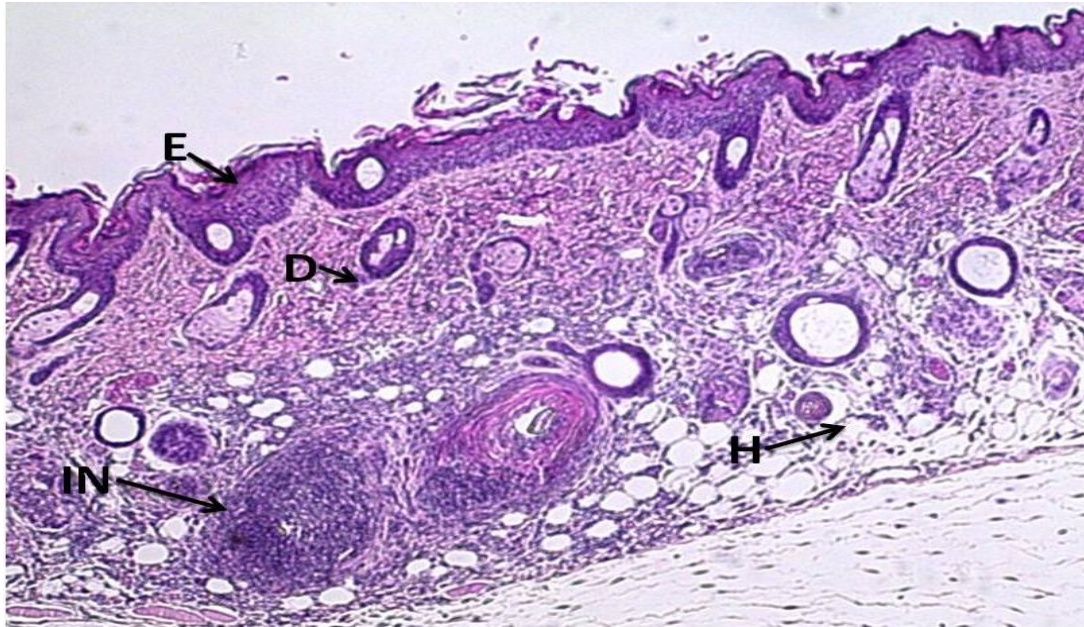


Figura 16. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG. Epidermis (E), dermis (D), infiltrados inflamatorios (IN), hipodermis (H). Tinción H y E 100x.

El grupo tratado con ACG presentó apoptosis en epidermis focalizado leve lo cual se podría explicar debido a que en estudios anteriores el ACG puede ejercer un papel como prooxidante (Figura 17). Los polifenoles que tienen en posición orto en grupos hidroxilo pueden tener efecto prooxidante provocando daño oxidativo al ADN. El ACG puede provocar daños en el ADN en presencia de cobre (II) en un modelo *in vitro*. Se ha propuesto que el daño causado al material genético puede inducir apoptosis en células cancerosas. Lo anterior podría tener un efecto benéfico al limitar la división en las células transformadas (Li-Fang y cols., 2008). También reducen iones de metales lo que conduce a la generación de radicales libres a través de la reacción de Fenton. La importancia relativa de las actividades de los antioxidantes como pro-oxidantes y

antioxidantes es un área de investigación actual. Sin embargo hay menos datos disponibles para los antioxidantes de la dieta, como los polifenoles antioxidantes. Todo va en función de su estructura y las condiciones en las que pueden actuar como antioxidantes y prooxidantes (Rakshit y cols., 2010).

En las muestras tratadas con ACG se pudieron observar cambios morfológicos como espongiosis focal leve lo cual se podría explicar con los hallazgos histopatológicos de otros autores en donde describen el proceso espongiótico de epidermis en respuesta al contacto de la piel con compuestos de origen natural o químicos (Harber, 2001), tal como se observa en la (Figura 17).

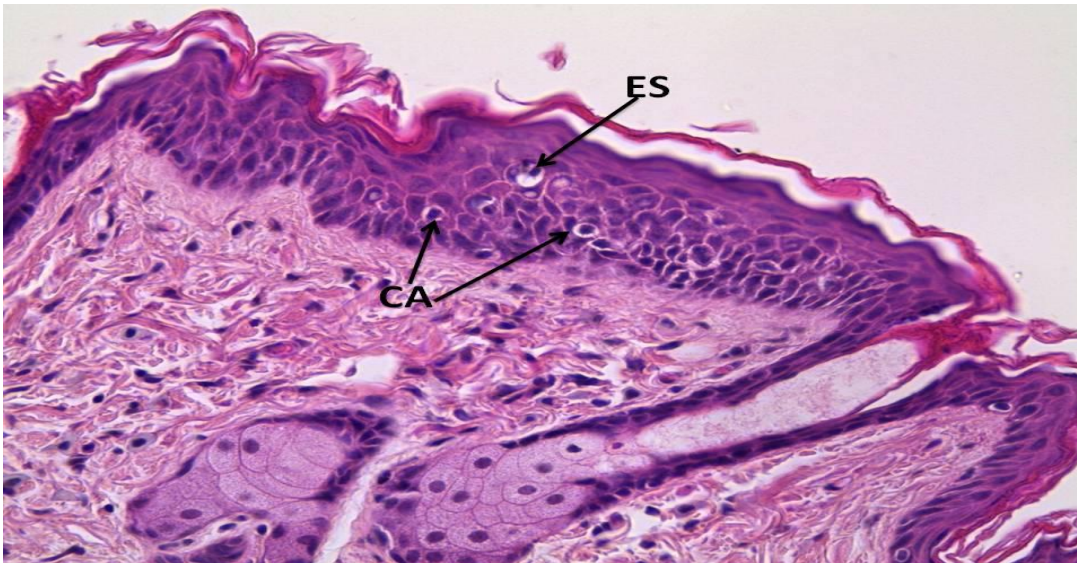


Figura 17. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG. Espongiosis (ES), células apoptóticas (CA). Tinción H y E, 400X.

También se encontraron en las muestras tratadas con ACG infiltrados inflamatorios (Figura 18). Se puede pensar que probablemente el ACG causó alguna reacción irritante al ser aplicada en los ratones, siendo esta una

respuesta inflamatoria del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos o por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química o física (Barreno, 2008), siendo la inflamación una respuesta reparadora en donde participan células cebadas, células de Langerhans (CL), neutrófilos los cuales se encargan al igual que los macrófagos de fagocitar y destruir microbios, bacterias participando en el inicio del proceso inflamatorio. Los macrófagos y los neutrófilos suelen trabajar juntos. Los macrófagos inician una respuesta inmune y envían señales para movilizar a los neutrófilos con el fin de que se lleguen a la zona afectada. Cuando llegan los neutrófilos, digieren a los invasores o a las células afectadas y así los destruyen. El antígeno se asocia en las células dendríticas, como los macrófagos y neutrófilos, los blastos o los linfocitos pequeños. Se han encontrado estas células en los vasos linfáticos dérmicos y en los nódulos linfáticos que drenan en los sitios de estas lesiones (Castrillón y cols., 2008).

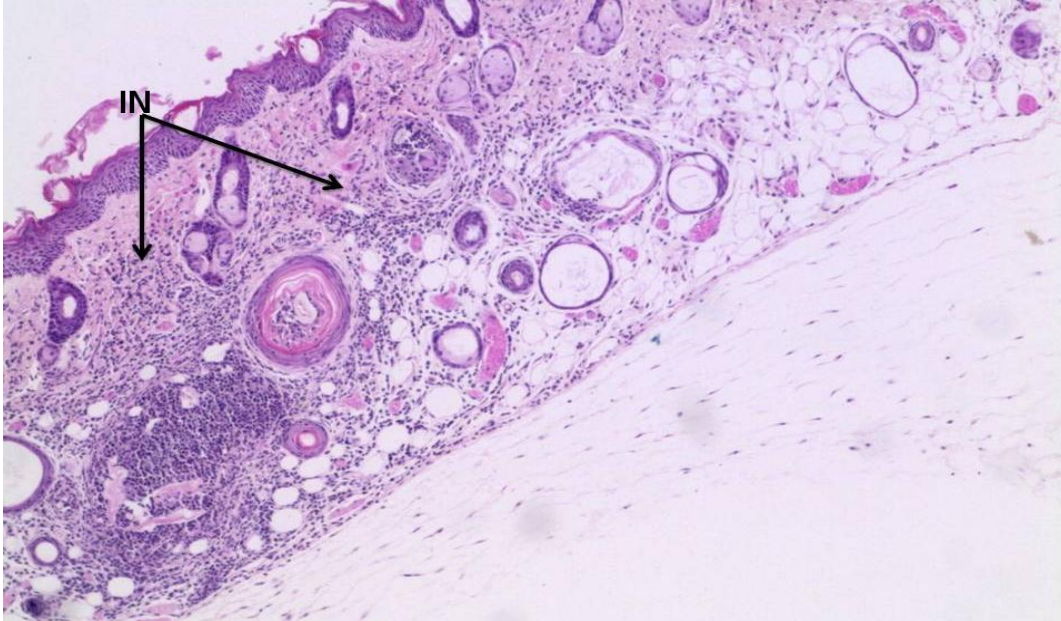


Fig.18 Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG. Infiltrados inflamatorios (IN). Tinción H y E, 400X.

El grupo al que se le aplicó tópicamente ACG+UV presentó de 2 a 6 capas celulares en epidermis con espongiosis, células de apoptóticas, hiperplasia, hipertrofia y atrofia focal leve, mientras que en dermis hubo infiltrados inflamatorios y congestión de vasos de extensión focalizada y grado leve (Figura 19).



Figura 19. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), quistes sebáceos (Q). Tinción H y E 100X.

El grupo tratado con ACG+UV presentó apoptosis en epidermis focalizado leve (Figura 20), aunado a esto cuando la luz interactúa con una sustancia fotosensibilizante en la piel, esta va a excitar sus electrones, transfiriendo esta energía, produciendo moléculas inestables volviendo después a su estado basal. La energía transferida causa daño a macromoléculas celulares y orgánulos así como la generación de apoptosis y mediadores inflamatorios, reaccionando con el oxígeno para formar radicales libres que luego van a oxidar a la célula como pudo suceder con el ACG que utilizamos, el cual provocó apoptosis (Gould y cols., 1995).

En el grupo ACG+UV se encontraron en la epidermis papilas y espongiosis (Figura 20), mientras que en dermis se halló congestión de vasos sanguíneos e infiltrados inflamatorios; aunado a esto la manifestación clínica más común es la quemadura solar (eritema) seguida por cambios histológicos en epidermis induciendo degeneración de las células (papilas), ya que existen reacciones causadas por los efectos combinados de agentes externos (productos químicos o drogas) que son capaces de absorber energía radiante provocando respuestas anormales tanto en epidermis como en dermis (McGregor y Hawk, 2001).

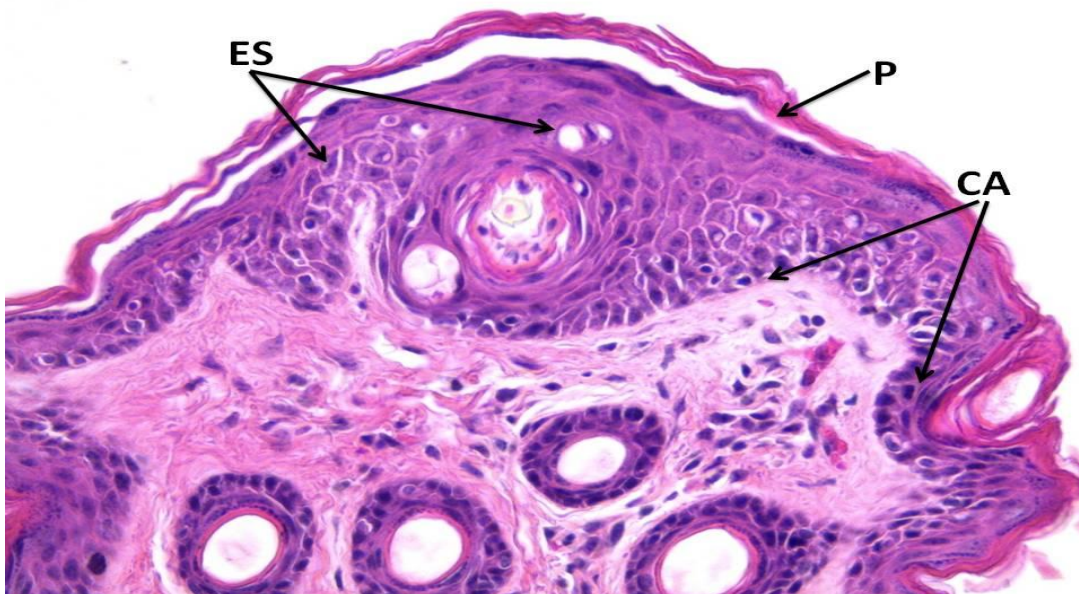


Figura 20. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Espongiosis (ES), papila (P), células apoptóticas (CA), quistes sebáceos (Q). Tinción (H y E) (40x).

Las muestras con ACG+UV mostraron atrofia en la epidermis (Figura 21), hipertrofia e hiperplasia en estas dos últimas se pudo observar una disminución muy evidente en comparación con el grupo con UV, ya que aquí la extensión fue multifocal leve y focal leve respectivamente (Figura 22) lo cual se puede explicar debido a que en cualquier reacción fotoquímica la energía radiante debe ser absorbida por una molécula. Las moléculas que absorben la luz se denominan cromóforos, y los presentes en la piel pueden ser endógenos (por ejemplo ADN y melanina) o exógenos, por ejemplo (drogas o productos químicos). El espectro de absorción de un cromóforo en particular se refiere a las longitudes de onda que lo absorben. La absorción característica de cada molécula se determina por la disposición de sus átomos. Los cromóforos responsables de iniciar la inflamación cutánea por la quemadura solar no se han identificado con precisión, pero su espectro de acción es compatible con la hipótesis de que la interacción de la UV con el ADN es de importancia crucial, por lo que se cree que el ADN es el cromóforo que causa el eritema y muchas otras anomalías en la piel humana. Es probable que los queratinocitos de la epidermis sean el sitio predominante para este daño ocasionando las lesiones ya mencionadas inducidas por la UVB (McGregor y Hawk, 2001).



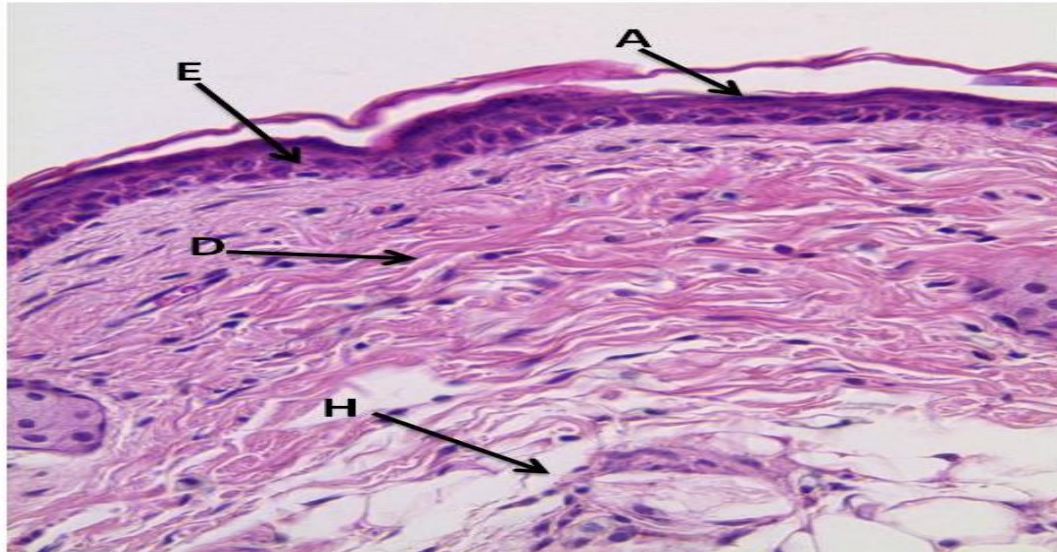


Figura 21. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), atrofia (A). Tinción H y E 400X.

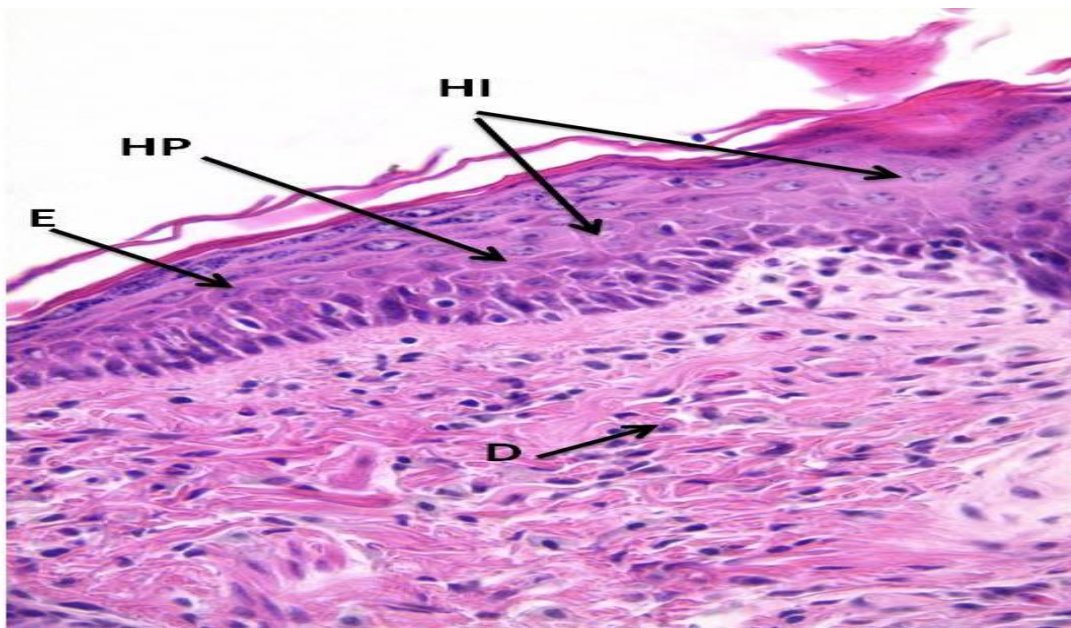


Figura 22. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Epidermis (E), dermis (D), hiperplasia (HP), hipertrofia (HI). Tinción H y E 400X.

En el grupo con ACG+UV se pudo detectar que en la dermis la congestión de los vasos sanguíneos presentó disminución en la extensión y el grado de la lesión con respecto al grupo con UV. En los infiltrados inflamatorios la extensión fue focal leve, el edema también fue un factor muy importante para poder determinar que el ACG si protege, ya que en este grupo no se presentó. Aunado a esto, existen mediadores farmacológicos que se sintetizan y liberan muchos infiltrados inflamatorios en la piel después de la irradiación por UV, probablemente como resultado del daño del DNA, aunque también pueden estar involucrados cromóforos no nucleares. Muchos tipos celulares como las células cebadas, queratinocitos linfocitos, fibroblastos y células endoteliales se sintetizan y se liberan luego de la exposición a RUV provocando también congestión de vasos sanguíneos (McGregor y Hawk, 2001) como se muestra en la Figura 23.

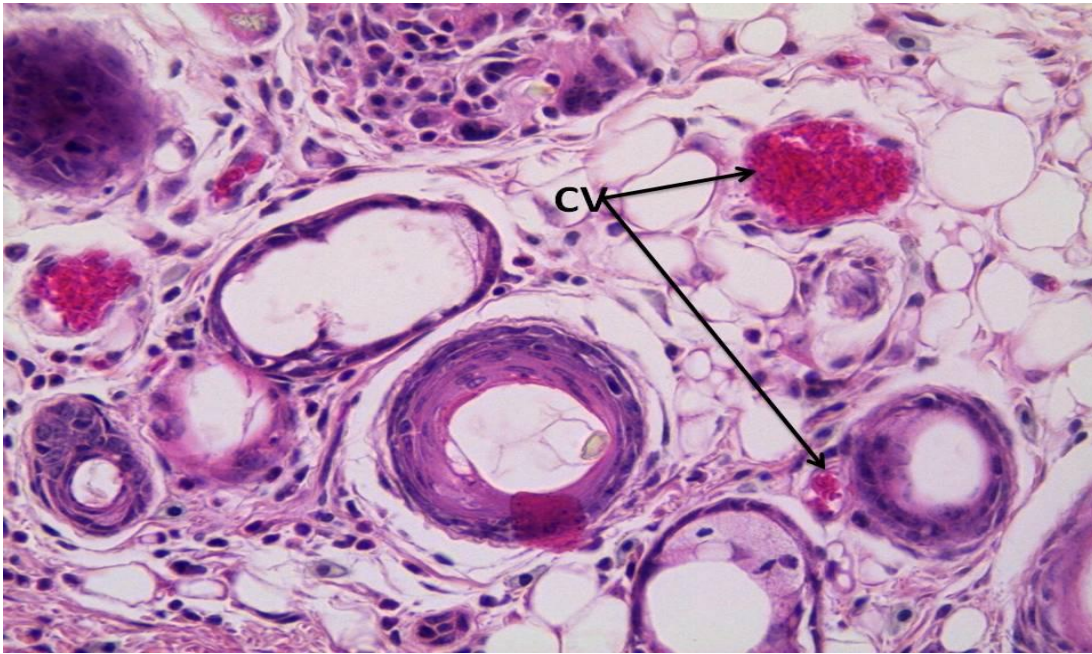


Figura 23. Corte histológico de piel de ratón SKH-1. Grupo con ACG+UV. Congestión de vasos sanguíneos (CV). Tinción H y E 400X.

Tabla 3. Lesiones histológicas inducidas por la RUV y otros factores

Lesiones cutáneas	Testigo	Etanol	UV	ACG	ACG+UV
Paraqueratosis					
Espongiosis	Focal leve	Focal leve	Focal leve	Focal leve	Focal leve
Apoptosis (células de quemadura)		Focal leve	Focal leve	Focal leve	Focal leve
Necrosis					
Hiperplasia			Multifocal leve	Focal leve	Focal leve
Hipertrofia		Focal leve	Focal leve	Focal leve	Focal leve
Atrofia			Multifocal moderado	Multifocal leve	Multifocal leve
Edema			Focal leve		
Congestión de vasos	Focal leve	Focal leve	Multifocal moderado	Focal leve	Focal leve
Hemorragia					
Infiltrados inflamatorios (neutrófilos, basófilos, eosinófilos)				Focal leve	Focal leve
Necrosis					

## **9. - CONCLUSIONES**

- 1.- Los ratones SKH-1 sin ningún tratamiento presentaron espongiosis, que es característica de estos ratones.
- 2.- La aplicación tópica del etanol provoca apoptosis e hipertrofia.
- 3.- La radiación ultravioleta induce cambios histológicos que implican la inflamación, la atrofia, la hiperplasia e hipertrofia.
- 4.- El ACG provoca una reacción irritante al ser aplicada en ratones ya que fue evidente la presencia de infiltrados inflamatorios y congestión de vasos. También provocó hipertrofia, hiperplasia, atrofia, células apoptóticas y espongiosis focal leve.
- 5.- Al comparar los resultados de los grupos irradiados y a los que se les aplicó el ACG de forma tópica, se observó que el ACG protegió la piel de los ratones SKH-1 de los efectos adversos que provoca la RUV, ya que la extensión y grado de los daños fue menor en este grupo.

## 10. - LITERATURA CITADA

- Adhami, V.M., Syed, D.N., Khan, N., Afaq, F. 2008. Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages. *Photochemistry and Photobiology* 84: 489-500.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research* 571: 153-173.
- Agarwal, R., Mukhtar, H. 1996. Chemoprevention of photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology* 63: 440-444.
- Amado S. 1993. Lecciones de dermatología. Editorial Méndez editores. México 670 pp.
- Avila, A. J. G., Castañeda, C. M. C., Benitez F. J. C., Duran D. A., Barroso, V. R., Martinez C. G., Muñoz, L. J. L., Martinez C. A., Romo de Vivar, A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* 76: 301– 309.
- Avril, M. F., Brodin, M., Dréno, B., Dréno P., Gotman, A., Jeanmougin, M., Maitre Le M., Mischlich, D., Reuter, G. 2004. Sol y piel “Beneficios, riesgos y prevención”. Editorial Masson. Mexico. Pp 275.
- Barreno G. P. 2008. Inflamación. *Real academia de ciencias exactas, físicas y naturales* 102: 91-159
- Brand, R. M., Jendrzewski, J. L. 2008. Chronic ethanol ingestion alters xenobiotic absorption through the skin: Potential role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 1940–1948.
- Castrillón R. L. E., Palma R. A., Padilla D. C. 2008. La función inmunológica de la piel. *Dermatología Revista Mexicana* 52(5): 211-24.

- Chaudhuri, R. K. 2000. Role of antioxidants in sun care products. En: Peter E., Maibach H. I. (Eds). *Cosmeceuticals and Active cosmetic "Drugs vs cosmetics"*. Edit. Taycor & Francis. United States of America pp. 617-629.
- Chu D. H., Haake, A. R., Halbrook, K., Loomis C. A. 2005. Estructura y desarrollo de la piel. En: Fitzpatrick, M. D., Thomas B., Arthur Z., Elsen, M.D., Klaus, Wolff M.D., Irwin M., Fredbeg, M.D. K, Frank Austin, M.D. (Eds). *Dermatología en medicina general*.6<sup>a</sup> Ed. Edit Medica Panamericana. Argentina. pp. 64.
- Cichocki M., Blumczyn J., Baer- Dubowska S. W. 2010. Naturally occurring phenolic acids inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced NF- $\kappa$ B, INOS and COX-2 activation in mouse epidermis. *Toxicology* 268: 118-124
- Clé C., Hill L. M., Niggerweg R., Martin C. R., Guisez Y., Prinsen E., Jansen M. A. K. 2008. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*: consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69: 2149–2156.
- Crew F. A. E. Mirskaia L. 1932. The character "hairless in the mouse. *Journal of Genetics* 25: 17-24.
- Elias, P. M., Feingold, K. R., Fluhr, J. W. La piel como órgano protector. En: Fitzpatrick, M. D., Thomas B., Arthur Z., Elsen, M.D., Klaus, Wolff M.D., Irwin M., Fredbeg, M.D. K, Frank Austin, M.D. (Eds). *Dermatología en medicina general*.6<sup>a</sup> Ed. Edit Medica Panamericana. Argentina. pp. 120.
- Fawcett, D.W. 1995. *Tratado de histología*.2<sup>da</sup> Ed. Edit Interamericana Mc-Graw Hill. Madrid España. Pp 577.

- García-Bores A. M., Avila G. J. 2008. Natural products: Molecular mechanisms in the photochemoprevention. *Revista Latinoamericana de Química* 36/3: 83-100.
- Gallin J. L. 2001. *Dermatología clínica*. Edit Anzures. México. Pp 247.
- Gil EM, Kim TH. 2000. UV-induced immune suppression and sunscreen. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*.16:101-10.
- Gould J. W., Mercurio, M. G., Elmetts C. A. 1995. Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 33:551-573.
- Gugliucci, A., H. Deborah., Bastos, M., Schulze, J., F. Marina., Souza, F. 2009. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 80:339-344.
- Gutiérrez, M. A. 2002. Café, antioxidantes y protección a la salud. *Medisan* 6 [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol6\\_4\\_02/san12402.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol6_4_02/san12402.htm) consultada el día 2 de diciembre del 2010
- Harber L. C., 2001. Respuestas anormales a la radiación ultravioleta: fotosensibilidad inducida por fármacos. En: Fitzpatrick, M. D., Thomas B., Arthur Z., Elsen, M.D., Klaus, Wolff M.D., Irwin M., Fredbeg, M.D. K, Frank Austin, M.D. (Eds). *Dermatología en medicina general*.3ª Ed. Edit Medica Panamericana. Argentina. pp. 253-265.
- Jin-Yin Lin, M.D., Angelica S. M., Christopher, M.D., Shea R. 2003. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 48: 866–874.



- Jurkiewicz, B.A., Bissett, D.L., Buettner, G.R., 1995. Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *Journal of Investigation Dermatology*. 104: 484–488.
- Kullavanijaya, P., Lim, H.W. 2005. Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology* 52: 937-958.
- Lever F. W. 1991. *Histopatología de la piel*. Editorial Intermedica. Buenos Aires Argentina. Pp 875.
- Li-Fang Z., Fang D., Bo Z., Li Y., Zhong-Li L., 2008. Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Food and Chemical Toxicology* 46: 149–156.
- Liu Z., Shi Y. Zhou G., 2010. Evaluation of the immunosensitizing potential of chlorogenic acid using a popliteal lymph node assay in BALB/c mice. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1059-1065
- McGregor J. M., Hawk J. L. M., 2001. Efectos agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Fitzpatrick, M. D., Thomas B., Arthur Z., Elsen, M.D., Klaus, Wolff M.D., Irwin M., Fredbeg, M.D. K, Frank Austin, M.D. (Eds). *Dermatología en medicina general*. 3ª Ed. Edit Medica Panamericana. Argentina. pp. 253-265.
- Marti-Mestres G, J.P. Mestres, J. Bres, S. Martin, J. Ramos, L.Vian. 2007. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. *International Journal of Pharmaceutics* 331: 139–144.
- Marinova, E. M. Toneva, A. Yanishlieva, N. 2009. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chemistry*. 114: 1498–1502.

- Márquez, V. Farah, A. 2009. Chlorogenic acids and related compounds in medical plants and infusions. *Food Chemistry*. 113: 1370-1376.
- Montagna W. Chase H. B. Melaragno H. 1952. The skin of hairless mice the formation of cysts and the distribution of lipids. *Investigation Dermatology*. 19: 83-94.
- Nelson J. R., Christopher G. 2005. Photoprotection. En: Shaath N.A. (Eds). *Sunscreens "Regulations and commercial development*. Taylor & Francis. Pp. 22.
- Neuman M. G., Oruña L., Coto G., Lago G., Nanau R., Vincent M. 2010. Hyaluronic acid signals for repair in ethanol-induced apoptosis in skin cells in vitro. *Clinical Biochemistry*. 43: 822–826.
- Norris P. G., Gange R. W., Hawk J. L. M. 1990. Efecto agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Fitzpatrick, M. D., Thomas B., Arthur Z., Elsen M.D., Klaus Wolff M.D., Irwin M., Fredbeg, M.D. K, Frank Austin M.D. (Eds). *Dermatología en medicina general*. 3ª Ed. Edit Médica Panamericana. Argentina. pp. 253-265 Vol. 2
- Rakshit S., Mandal L., Pal B. C., Bagchi J., Biswas N., Chaudhuri J., Chowdhury A. A., Manna A., Chaudhuri A. K., Mukherjee T., Jaisankar P., Bandyopadhyay S., 2010. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells. *Biochemical Pharmacology*. 80:1662–1675.
- Robbins, S. L., Cotran, R. S., Kumar, V. M. D. 2005. *Patología estructural y funcional*. Séptima edición. Editorial Elsevier. España Pp. 1517
- Ross, H. M.; Pawlina, W. 2008. *Histología "Texto y atlas de color con biología celular y molecular"*. 5ª ed. Panamericana. Mexico. Pp.974.

- Stevens A., Lowe J. S., Young B. 2003. Histopatología básica "atlas y texto en color". 3<sup>era</sup> Edición. Edit Elsevier. España. Pp 293.
- Surh, Y.J. 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal substances. Mutation Research 428:305-327.
- Xiang, Z., Ning Z. 2008. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in south-china honeysuckle. Food Science and Technology 41: 1189-1203.

#### **11.- PAGINAS WEB CONSULTADAS:**

- [www.fmd.org.mx/picture/nuestra\\_piel.jpg](http://www.fmd.org.mx/picture/nuestra_piel.jpg) consultada el día 4 de abril del 2011.
- [scielo.sld.cu/img/revistas/san/v14n6/f0114610.gif](http://scielo.sld.cu/img/revistas/san/v14n6/f0114610.gif) consultada el día 4 de abril del 2011.
- [www.gluon.com.br/.../09/acido-clorogenico.jpg](http://www.gluon.com.br/.../09/acido-clorogenico.jpg) consultada el día 4 de abril del 2011.

# 12.- APÉNDICE

## **LA TÉCNICA HISTOLÓGICA**

La técnica histológica es un método que nos permite la observación de la estructura microscópica de los tejidos de cualquier organismo vivo. Debe ser concebida como una herramienta de estudio cuyos alcances están en función de las relaciones complementarias que se establezcan con otras ciencias distintas de la histología. Como en el caso de otros procesos metodológicos, las técnicas histológicas descansan sobre una gran base teórica, cuyos fundamentos cuando se conocen con precisión aumentan la eficiencia en la interpretación del fenómeno estudiado.

Los pasos fundamentales de la técnica histológica son:

- a).- Obtención de la muestra a estudiar
- b).- Fijación
- c).- Inclusión
- d).- Corte en microtomo
- e).- Tinción
- g).- Aclaramiento y montaje.

## **OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Una condición indispensable para la buena elaboración de preparaciones es que la muestra se haya obtenido correctamente, para ello hay que tomar en cuenta ciertas reglas:

- 1.- Al cortar los trozos de órganos voluminosos hay que tener en cuenta la configuración anatómica del mismo. Esto es, deben tomarse zonas donde se

represente las variaciones estructurales del órgano como la zona cortical y la zona medular, o la porción luminal, etc.

2.- Hay que orientar las muestras de tejido.

3.- El tamaño del material a investigar debe ser el adecuado para la buena penetración del fijador a los componentes tisulares. Para microscopía óptica debe ser de 1 a 2 cm.<sup>3</sup> Para microscopía electrónica debe ser de 1mm<sup>3</sup>.

4.- Cuando se trate de un organismo completo se deben hacer incisiones a lo largo del cuerpo para una mejor penetración del fijador. Cuando se seleccionen los tejidos a procesar es recomendable seguir las reglas anteriores y postfijar.

5.- Es recomendable lavar los tejidos inmediatamente después de la obtención con solución salina isotónica para evitar contaminación de sangre, pelos y otros artefactos.

6.- Si por alguna circunstancia el tejido obtenido no puede ser fijado inmediatamente es recomendable dejarlo sólo unos minutos en la solución salina. La fijación debe ser inmediata. No se debe dejar secar o deshidratar la muestra obtenida (una excepción es la sangre).

7.- Los instrumentos de corte (tijeras, navajas, bisturí) deben tener filo. Debe evitarse al tomar las muestras maltratadas con las pinzas, agujas, etc.

## **FIJACIÓN**

Por medio de la fijación se busca evitar los procesos degenerativos de las células, para que conserven de la manera más fidedigna posible el estado y la situación en que se encontraban en los tejidos vivos. Con la fijación se pretende:

1.- Prevenir los cambios *postmortem* a través de la inactivación de enzimas.

- 2.- Preservar los constituyentes celulares lo mejor posible.
- 3.- Convertir la consistencia semifluida de las células en una consistencia semisólida.
- 4.- Prevenir la putrefacción debida a bacterias y/u hongos

La preservación impropia del material a estudiar puede deberse a varios factores como:

- 1.- Cantidad inadecuada de fijador, la cual debe ser de una proporción mínima de 10:1
- 2.- Pobre penetración del fijador al tejido a estudiar.
- 3.- Utilización de un fijador impropio para el material de estudio
- 4.- Mantener la muestra en el fijador por un tiempo inadecuado

Si se mantiene poco tiempo la muestra en un fijador determinado la fijación no es completa y los componentes tisulares sufren modificaciones morfológicas y bioquímicas. Si por el contrario el tiempo es prolongado, dependiendo del tipo de fijador, los componentes tisulares y celulares sufren modificaciones y con algunos fijadores se precipitan cristales en los tejidos.

El fijador que debe ser utilizado depende del tipo de tejido de la muestra, tipo de tinción que se desee, el tiempo que se pretenda tener la muestra guardada en un fijador, entre otras muchas consideraciones. El fijador universal o más ampliamente utilizado en los laboratorios de histología es el formol o formalina al 10% o en casos un poco más selectos formol amortiguado con fosfatos.

### **Fijación por deshidratación**

Los fijadores que eliminan agua del tejido con rapidez y producen precipitación de proteínas, como la acetona y el alcohol etílico. Se usan para la preservación de glucógeno, pigmentos, sangre, etc.

### **INCLUSIÓN**

Con el objeto de obtener cortes suficientemente finos para ser observados en el microscopio, la pieza por estudiar tiene que ser embebida e incluida en una sustancia de consistencia firme, sin modificar la forma del tejido ni sus relaciones con el resto de su estructura. De esta manera se obtienen bloques fáciles de manejar dentro de los cuales se colocan las piezas por estudiar, orientándolas en la forma deseada para poder cortarlas en el plano necesario en láminas delgadas (desde 1 micra).

Los tejidos se impregnan con una sustancia líquida, llamada medio de inclusión, que de una fase líquida pasa a una fase consistente y homogénea; el medio de inclusión se deposita en todos aquellos lugares donde hay un hueco, en especial, donde se encuentra agua o donde esta fue extraída. Cuando se trata de medios insolubles en agua es necesario extraer primero esta y luego sustituirla por el solvente apropiado al medio de inclusión que se utilice, de esta manera el solvente primero queda saturado por el medio de inclusión y luego es reemplazado por él.

Prácticamente todos los métodos de inclusión necesitan de una deshidratación y aclaramiento previos. La deshidratación es la eliminación de agua, mediante



un agente deshidratante que se difunde a través del tejido, y es considerada como un paso preparatorio para la inclusión.

Entre los agentes deshidratantes más usados está el Alcohol Etílico aunque también pueden ser usados otros compuestos como la Acetona, el Dioxano, el Alcohol Isopropílico, etc.

La deshidratación de una muestra se lleva a cabo por el uso de agentes deshidratantes en concentración creciente (70, 80, 90 96) hasta llegar a aquella donde el soluto no está diluido (alcohol etílico absoluto). Para muestras que contienen mucha agua como los organismos acuáticos o los fetos se requiere que la deshidratación comience desde concentraciones muy bajas de alcohol etílico, para que no ocurra una deshidratación severa que provoque arrugamiento y daño severo en la morfología macroscópica y microscópica de la muestra. Generalmente se comienza con alcohol etílico graduado a partir de 30% y se lleva hasta alcohol absoluto.

Posterior a la deshidratación se debe realizar el aclaramiento el cual consiste en colocar la muestra en una sustancia llamada líquido de transición, el cual debe ser miscible tanto en alcohol etílico absoluto como en la parafina. El reactivo más usado para este fin es el Xilol aunque puede utilizarse tolueno o cloroformo.

Se pueden utilizar otros medios de transición, el uso de aceites minerales es muy recomendable, como el aceite de cedro y el aceite de clavo. También se ha

reportado el uso de otros solventes como cloroformo, benzol, tolueno o éter aunque por su volatilidad no resultan muy útiles. El alcohol amílico ha sido usado por los autores con excelentes resultados.

Una vez deshidratado el tejido y aclarado en el medio de transición se realiza la inclusión; aunque no debemos olvidar que algunos métodos de inclusión no requieren los pasos anteriores.

Los métodos de inclusión más utilizados son:

- 1.- Inclusión en Gelatina
- 2.- Inclusión en Polietilenglicol
- 3.- Inclusión en Celoidina
- 4.- Inclusión en Celoidina-Parafina (doble inclusión)
- 5.- Inclusión en Parafina o paraplást

### **INCLUSIÓN EN PARAFINA O PARAPLAST**

Esta técnica es de la más usual (se le llama de rutina). La parafina es una mezcla de hidrocarburos saturados y sólidos, extraídos del petróleo, viene en forma de placas o escamas, el punto de fusión varía de 45 a 60°C y es insoluble en agua y en alcohol etílico.

El paraplást es una mezcla de parafina altamente purificada y polímeros plásticos de bajo peso molecular, su presentación es en forma de pastillas delgadas, su punto de fusión es de 56°C, se maneja de igual forma que la parafina.

Como medio de inclusión la parafina y el paraplast presenta numerosas ventajas frente a otras sustancias. Químicamente es inactiva por lo que se le puede conservar indefinidamente. Presenta una consistencia homogénea a la temperatura del laboratorio. Una desventaja es que los tejidos al ser incluidos tienen que estar a temperaturas cercanas a 60°C.

A.- Después de la fijación de las muestras, deben ser lavadas para eliminar los restos de líquido fijador, que puede interferir con el proceso de deshidratación e inclusive en el de tinción. El lavado se realiza poniendo la muestra en agua corriente esto es, bajo flujo de agua en la llave por 2 hrs. Para evitar que la muestra se salga cuando este bajo el chorro de agua es conveniente usar gasa sujeta con una liga a la boca del frasco.

B.- El tejido se deshidrata en alcohol etílico de concentración creciente, desde alcohol etílico al 50% hasta alcohol etílico absoluto (con duración de 30 a 60 min. el tiempo depende del tamaño de la muestra, se pueden hacer dos cambios de cada uno).

C.-El aclaramiento se hace en xilol, mínimo 10 min en tejido pequeño y máximo 20 min o cambiar al momento de transparentar el tejido Paso rápido por xilol II.

D.- La parafina o paraplast deberán estar fundidos se hacen 2 cambios de parafina o paraplast (permaneciendo de 1 a 2 hrs en cada una).

E.- Para la inclusión definitiva, el tejido se coloca en parafina o paraplast fundido dentro de los moldes o las escuadras de Leukart y se deja enfriar a temperatura ambiente. Una vez que se han enfriado, los bloques están listos para ser cortados en el microtomo.

### **CORTE AL MICROTÓMO.**

La finalidad del corte al microtomo es la obtención de cortes lo suficientemente delgados que permitan su observación bajo el microscopio óptico. Para estos fines el grosor de corte más utilizado es de 5 a 10  $\mu$ . El corte de una muestra puede ser un corte aislado en donde no interesa saber en qué parte del órgano se sitúa, generalmente se realiza cuando se pretende hacer diagnóstico o para docencia; puede ser un corte seriado, que consiste en una secuencia ordenada sobre un portaobjetos de la cual es posible deducir la estructura anatómica de órganos complejos. En un corte seriado que es básicamente un estudio de reconstrucción, si el órgano es muy grande se hacen cortes que van de 100 a 1 mm, o si es muy pequeño pueden ser de 3 a 5  $\mu$ m.

Se debe montar perfectamente el bloque y la navaja en el microtomo ya que es importante evitar las vibraciones que producen cortes irregulares.

Es muy importante la calidad de los líquidos que se emplean para pegar nuestros cortes al portaobjetos, la gelatina no debe quedar muy espesa y el ruyter debe estar sin precipitados.

La temperatura del baño de tejidos o de la plancha de tejidos debe ser la adecuada generalmente 50 a 55° C.

La gelatina que se utiliza para pegar los cortes únicos puede ser hecha en dos formas:

- A la cantidad de agua que puede contener el baño de flotación se le agrega media cucharadita de gelatina.
- Hacer solución de gelatina al 10% con unos granos de timol en agua destilada, agregar de 10 a 15 ml de esta solución en el baño de flotación.

Si al extenderse el corte lo hace demasiado rápido y la muestra se deshilacha o se despega de su envoltura de parafina en la plancha o en el baño de tejidos, es que la temperatura es muy elevada. Por otro lado si el corte tarda mucho en extenderse es que esta por debajo de la temperatura adecuada.

Cuando se observa que los cortes salen con artefactos procurar cambiar el sitio donde se esta cortando, es probable que sea alguna mella en la navaja.

Después de haber escurrido nuestro corte del líquido cementante, es conveniente marcar la muestra con siglas cortas entendibles y pequeñas, esto se realiza con un lápiz de punta de diamante.

Cuando la canastilla este completa de portaobjetos con los cortes, es conveniente meterlas al horno a temperatura de 55° C y no más de 60° C, un mínimo de 60 min. Las laminillas se dejan enfriar antes de empezar la tinción.

## **Montaje**

La finalidad de los medios de montaje es evitar que la preparación, situada entre el porta y cubreobjetos se ponga al contacto con el aire. No deben ejercer acción alguna sobre la coloración, conservándola durante largo tiempo. Existen diversos medios de montaje según se trate de preparaciones hidratadas o deshidratadas, dentro de las primeras está la gelatina glicerinada y dentro del segundo el Bálsamo de Canadá, Permont y Entellan, que son los más utilizados.

## **TINCIÓN**

### **Técnica de Hematoxilina - Eosina (rutina)**

La tinción de Hematoxilina - Eosina ha sido llamada una tinción de rutina en el sentido de que su uso es regular y más o menos sin variaciones importantes. Se trata de una coloración donde se establece un contraste entre los dos colorantes para poner de manifiesto estructuras de diferente composición química.

La hematoxilina es un colorante que en sí, tiene poca afinidad por los tejidos, pero cuando se combina con sales de aluminio, cromo o cobre, que se encuentran en forma de alumbre solo, es un excelente colorante nuclear. Son varias las fórmulas conocidas que se utilizan para preparar la hematoxilina y de forma general el uso de cada una depende de cada técnica.

La hematoxilina que contiene algún alumbre (hemalumbre) como las de Harris, Delafield ó Bullard; pueden ser contrateñidas con eosina, safranina, floxina, etc.

La eosina es un colorante ácido de color que varía del anaranjado al rojo, tiene afinidad por el citoplasma, colágena y otras estructuras eosinofílicas.

## **MÉTODO**

### **DESPARAFINAR**

- 1.- Xilol - 5 min
- 2.- Xilol - 5 min

### **HIDRATAR**

- 3.- Alcohol etílico absoluto - 3 min
- 4.- Alcohol etílico al 96% - 3 min
- 5.- Alcohol etílico al 90% - 3 min
- 6.- Alcohol etílico al 80% - 3 min
- 7.- Alcohol etílico al 70% - 3 min
- 8.- Agua corriente – 3 min

### **TINCIÓN NUCLEAR**

- 9.- Hematoxilina de Harris – 5 a 7 min
- 10.- Agua corriente – lavar (hasta quitar exceso de colorante)

### **DIFERENCIAR**

- 11.- Alcohol ácido al 1% - pasó rápido
- 12.- Agua corriente – lavar

### **VIRAR**

- 13.- Agua amoniacal - hasta virar a azul
- 14.- Agua corriente – lavar

### **TINCIÓN CITOPLÁSMICA**

- 15.- Eosina – 3-5 min

## DESHIDRATAR

16.- Alcohol etílico al 96% - 30 segundos

17.- Alcohol etílico absoluto – 3 min

18.- Alcohol etílico absoluto - 5 min

## ACLARAR

19.- Xilol - 5 min

20.- Xilol - 5 min

21.- Montar con resina

## RESULTADOS

Núcleo - azul

Nucleólo - azul

Citoplasma – rosa

Fibras musculares - rosa intenso

Eritrocitos - rosa

Tejido conectivo - rosa intenso

## SOLUCIONES

### ALCOHOL ETÍLICO AL 90%

Alcohol etílico al 96%                      94 mL

Agua destilada                                6 mL

### ALCOHOL ETÍLICO AL 80%

Alcohol etílico al 96%                      84 mL

Agua destilada                                16 mL



#### ALCOHOL ETÍLICO AL 70%

Alcohol etílico al 96%	74 mL
Agua destilada	26 mL

#### HEMATOXILINA DE HARRIS

Cristales de hematoxilina	5.0 gr
Alcohol etílico absoluto	50.0 mL
Alumbre de amonio o potasio	100.0 gr
Oxido rojo de mercurio	2.5 gr
Llevar con agua destilada a	1000.0 mL

Disolver la hematoxilina en el alcohol etílico, aparte poner a calentar el agua y agregarle el alumbre de potasio hasta disolver, separarlo del calor y mezclar las dos soluciones. Volver a calentar las dos soluciones juntas y dejarlas hasta ebullición (1 min. como máximo), quitar lo más rápido posible del calor y agregar el óxido de mercurio lentamente, calentar nuevamente hasta hervir, la solución debe quedar de color púrpura oscuro, retirar del fuego e inmediatamente enfriar bajo el chorro del agua, hasta que esté a temperatura ambiente.

Por cada 100 ml de solución agregar de 2-4 ml. de ácido acético glacial. Filtrar y usar.

#### SOLUCIÓN STOCK DE EOSINA ALCOHÓLICA

Eosina Y \_\_\_\_\_ 10 gr  
Llevar con alcohol etílico al 96% a \_\_\_\_\_ 1000 mL

#### SOLUCIÓN DE TRABAJO

Sol Stock de eosina alcohólica \_\_\_\_\_ 125 mL  
Alcohol etílico al 96% \_\_\_\_\_ 375 mL  
Ácido acético glacial \_\_\_\_\_ 3 mL

#### ALCOHOL ÁCIDO AL 1%

Alcohol etílico al 70% \_\_\_\_\_ 99 mL  
Acido clorhídrico \_\_\_\_\_ 1 mL

#### AGUA AMONIACAL al 2%

Agua corriente \_\_\_\_\_ 98 mL  
Hidróxido de amonio 28% \_\_\_\_\_ 2 mL