

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Efecto fotoprotector del medio acondicionado
por las hASCs pre-acondicionadas con H₂O₂
sobre fibroblastos dérmicos sometidos a la
radiación UV-B**

María Burón Aizpiri

Leioa, 2021

Directores:

Prof. Dr. Teodoro Palomares Casado

Prof. Dra. Ana Alonso Varona

A mi familia

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, el Doctor Teodoro Palomares y la Doctora Ana Alonso, la oportunidad que me dieron de incorporarme a su grupo de investigación, la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto y su dedicación durante todos estos años.

En segundo lugar, Patri, Vero e Irene, gracias por vuestros consejos, vuestros ánimos, por vuestro apoyo incondicional y, sobre todo, gracias por compartir tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Sin vosotras este camino no habría sido lo mismo.

Al mismo tiempo, gracias a todos mis compañeros de departamento, por el buen compañerismo, generosidad y gran ayuda.

Gracias a los miembros de SGIker por su colaboración para sacar adelante esta investigación.

A la fundación Jesús de Gangoiti Barrera por su gran aporte a la ciencia, apoyando año tras año a jóvenes investigadores.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, por creer en mí, sin vuestro apoyo habría sido más difícil.

Y, en especial, gracias Germán, por apoyarme en todo lo que me proponga.

Índice

Resumen	1
I. Introducción	5
I.1. LA PIEL: ALTERACIONES DE SUS COMPONENTES EN EL ENVEJECIMIENTO	7
I.2. FOTOENVEJECIMIENTO	12
I.2.1. Alteraciones celulares y moleculares de la piel fotoenvejecida.....	16
I.2.1.1. Incremento de la población celular senescente.....	17
I.2.1.2. Disminución de la síntesis de colágeno	18
I.2.1.3. Aumento en la expresión de MMPs	19
I.2.1.4. Degradación de elastina	20
I.2.2. Estrés oxidativo asociado al fotoenvejecimiento.....	21
I.2.3. Mecanismos de defensa de la piel frente al fotoenvejecimiento	23
I.2.3.1. Engrosamiento de la capa córnea	24
I.2.3.2. Aumento de la síntesis de melanina	24
I.2.3.3. Capacidad antioxidante	25
I.3. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL FOTOENVEJECIMIENTO	27
I.3.1. Prevención primaria: Fotoprotección.....	28
I.3.2. Prevención secundaria	30
I.3.1.1. Antioxidantes de uso tópico	30
I.3.1.2. Suplementos orales	33
I.3.1.3. Retinoides y sus derivados	33
I.3.3. Prevención terciaria: tratamiento	35
I.3.3.1. Alfa hidroxiácidos	35
I.3.3.2. Microdermoabrasión.....	35
I.3.3.3. Sistemas de láseres.....	36
I.3.3.4. Biopéptidos.....	36
I.3.3.5. Agentes despigmentantes.....	37
I.3.3.6. Componentes enzimáticos	38
I.4. MEDICINA REGENERATIVA	38

I.4.1. Células madre.....	39
I.4.1.1. Células madre mesenquimales (MSCs)	43
I.4.1.2. Mecanismos de acción de las MSCs.....	46
I.4.1.3. Factores de influencia en la eficacia de las MSCs	51
I.4.1.4. Limitaciones y riesgos de la terapia con MSCs	56
I.4.2. Secretoma de las MSCs: propiedades terapéuticas.....	57
I.4.2.1. Inmunomodulación.....	58
I.4.2.2. Propiedades anti-apoptóticas.....	60
I.4.2.3. Neuroprotección	61
I.4.2.4. Regulación de la angiogénesis	62
I.4.2.5. Propiedades antioxidantes	63
I.4.2.6. Remodelación tisular y propiedades anti-fibróticas	64
I.4.3. Estrategias para mejorar el potencial terapéutico	65
I.4.3.1. Modificación genética.....	66
I.4.3.2. Pre-acondicionamiento.....	67
I.4.4. Las hASCs como estrategia terapéutica en el fotoenvejecimiento...73	
II. Hipótesis y objetivos	77
III. Capítulo 1.....	801
III.1. MATERIAL Y MÉTODOS	84
III.1.1. Células, mantenimiento y conservación de los cultivos	84
III.1.2. Modelo de irradiación <i>in vitro</i> con UV-B.....	88
III.1.3. Determinación del efecto de la radiación UV-B sobre los HFFs y las hASCs.....	90
III.1.3.1. Evaluación de la viabilidad celular y cálculo de la dosis letal 50 (LD ₅₀)	90
III.1.3.2. Análisis de la morfología celular	91
III.1.3.3. Determinación de la citotoxicidad	91
III.1.3.4. Determinación de los niveles intracelulares de ROS	93
III.1.3.5. Evaluación de la senescencia celular	94
III.1.3.6. Análisis de la migración celular	95

III.1.4. Análisis estadístico.....	97
III.2. RESULTADOS.....	98
III.2.1. Análisis del efecto de la irradiación sobre las células HFFs y hASCs	98
III.2.1.1. Efecto sobre la viabilidad celular y determinación de la LD ₅₀ .	98
III.2.1.2. Efecto sobre la morfología celular.....	100
III.2.1.3. Efecto citotóxico de la radiación	102
III.2.1.4. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS.....	103
III.2.1.5. Efecto sobre la senescencia celular	104
III.2.1.6. Efecto sobre la migración celular	106
IV. Capítulo 2.....	111
IV.1. MATERIAL Y MÉTODOS	114
IV.1.1. Modelo de pre-acondicionamiento de hASCs con H ₂ O ₂	114
IV.1.2. Determinación del efecto del pre-acondicionamiento sobre las hASCs	114
IV.1.2.1. Análisis de la morfología celular	115
IV.1.2.2. Análisis del ciclo celular.....	115
IV.1.2.3. Análisis de la proliferación celular	116
IV.1.3. Determinación del efecto del pre-acondicionamiento en la resistencia de las PC-hASCs a la radiación UV-B.....	116
IV.1.3.1. Evaluación de la viabilidad celular	116
IV.1.3.2. Determinación de los niveles intracelulares de ROS.....	117
IV.1.3.3. Análisis de la expresión del factor de transcripción Nrf2	118
IV.1.3.4. Determinación de la localización intracelular del factor de transcripción Nrf2.....	120
IV.1.3.5. Análisis de la migración celular	121
IV.1.4. Análisis estadístico	122
IV.2. RESULTADOS	123
IV.2.1. Análisis del efecto del pre-acondicionamiento en las hASCs.....	123
IV.2.1.1. Efecto sobre la morfología celular	123
IV.2.1.2. Efecto sobre el ciclo celular.....	124

IV.2.1.3. Efecto sobre la proliferación celular.....	125
IV.2.2. Análisis del efecto del pre-acondicionamiento sobre la resistencia de las PC-hASCs a la radiación UV-B	125
IV.2.2.1. Efecto sobre la viabilidad celular	126
IV.2.2.2. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS.....	127
IV.2.2.3. Efecto sobre la respuesta antioxidante	128
IV.2.2.4. Efecto sobre la migración celular	131
V. Capítulo 3	11437
V.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	140
V.1.1. Obtención del medio acondicionado derivado de las células PC-hASCs.....	140
V.1.2. Modelo de tratamiento de HFFs con PC/CM.....	140
V.1.3. Determinación del efecto del tratamiento con PC/MC sobre los HFFs en condiciones basales	141
V.1.3.1. Análisis de la morfología celular	142
V.1.3.2. Análisis de la proliferación celular	142
V.1.4. Determinación del efecto del tratamiento con PC/MC sobre la resistencia de los HFFs a la radiación UV-B.....	142
V.1.4.1. Evaluación de la viabilidad celular	143
V.1.4.2. Determinación de la citotoxicidad.....	143
V.1.4.3. Análisis de la apoptosis.....	144
V.1.4.4. Determinación de los niveles intracelulares de ROS	145
V.1.4.5. Evaluación de la senescencia celular	145
V.1.4.6. Análisis de la integridad estructural celular	146
V.1.4.7. Análisis de la expresión génica	147
V.1.3.8. Análisis de la síntesis proteica	150
V.1.4.9. Análisis de la migración celular.....	152
V.1.5. Análisis estadístico.....	152
V.2. RESULTADOS	153
V.2.1. Análisis del efecto del tratamiento con PC/CM en los HFFs.....	153
V.2.1.1. Efecto sobre la morfología.....	153

V.2.1.2. Efecto sobre la proliferación celular	154
V.2.2. Análisis del efecto del tratamiento con PC/CM en la resistencia de los HFFs a la radiación UV-B	154
V.2.2.1. Efecto sobre la viabilidad celular.....	154
V.2.2.2. Efecto sobre el grado de citotoxicidad.....	155
V.2.2.3. Efecto sobre el nivel de apoptosis	156
V.2.2.4. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS	158
V.2.2.5. Efecto sobre el fenotipo senescente	159
V.2.2.6. Efecto sobre la expresión génica y síntesis de proteínas relacionadas con la inflamación y la remodelación de la MEC	163
V.2.2.7. Efecto sobre la migración celular	167
VI. Discusión	140
VII. Conclusiones	176
VIII. Bibliografía	194

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estratos y componentes celulares de la piel.....	9
Figura 2. Porcentaje de mortalidad ocasionada por patologías cutáneas en EE. UU. (<i>Gould</i> y cols. ⁵).	11
Figura 3. Espectro de longitudes de onda de la radiación solar y sus efectos sobre la piel.....	13
Figura 4. Efectos biológicos de la radiación UV en la salud humana.....	14
Figura 5. Diagrama esquemático que muestra las principales vías de señalización involucradas en el proceso de fotoenvejecimiento en fibroblastos dérmicos. La irradiación UV actúa sobre diversas vías de señalización que controlan la progresión del ciclo celular y la regulación transcripcional de los genes implicados en la síntesis y degradación de la MEC. La activación o bloqueo de estas vías conduce a la detención del ciclo celular y al deterioro de la función de la MEC durante el fotoenvejecimiento. Esquema adaptado de <i>Cavinato</i> y cols. ³³	23
Figura 6. Representación esquemática de las diferentes estrategias de prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento. Esquema adaptado de <i>Rabe</i> y cols. ⁵⁸	28
Figura 7. Potencial de diferenciación de las células madre. Representación adaptada de <i>Tewary</i> y cols. ⁸⁶ . ESCs (células madre embrionarias), HSCs (células madre hematopoyéticas), MSCs (células madre mesenquimales), iPS (células madre pluripotentes inducidas).....	40
Figura 8. Descripción general de los mecanismos moleculares que facilitan cada etapa del homing sistémico en MSCs. Representación adaptada de <i>Ullah</i> y cols. ¹⁰⁸	49
Figura 9. Efecto inmunosupresor de las MSCs en células inmunes. Inhibición de la proliferación de células T y B, inducción y regulación de las células Treg, polarización y migración de macrófagos, inhibición de la función de las células NK e inhibición de la maduración y activación de las células dendríticas. Los efectos inmunosupresores de las MSCs están mediados por factores solubles y el contacto célula-célula. Representación adaptada de <i>Gao</i> y cols. ¹⁴³	60

Figura 10. Efectos de la modificación genética y el pre-acondicionamiento de las MSCs. Esquema adaptado de Schäfer y cols. ¹⁶⁶	66
Figura 11. Estrategias de pre-acondicionamiento in vitro de las MSCs para aumentar su potencial terapéutico.....	88
Figura 12. Imagen de contraste de fases de un cultivo de hASCs en frasco de 175 cm ²	84
Figura 13. Imagen de contraste de fases de un cultivo de HFFs en frasco de 175 cm ²	85
Figura 14. Esquema del proceso de irradiación in vitro con UV-B.....	89
Figura 15. Esquema del proceso de cuantificación de la actividad de LDH.	93
Figura 16. Esquema del proceso de siembra y eliminación del inserto de silicona en el ensayo de migración celular. Representación adaptada de <i>Ibidi</i>	96
Figura 17. Curva dosis-respuesta para el cálculo de LD ₅₀ (línea discontinua) de cultivos de HFFs (A) y hASCs (B), sometidos a dosis crecientes de radiación UV-B, a las 48 horas tras su exposición. La figura muestra la media ± DE representativa de tres experiencias independientes.....	98
Figura 18. Imagen de contraste de fases de cultivos de HFFs y hASCs en placas de 6 pocillos, irradiados con dosis crecientes de UV-B (11, 22, 35 y 75 mJ/cm ²). Imágenes representativas de cada intensidad de irradiación tomadas 48 horas después de la irradiación (barra de escala 100 μm).....	101
Figura 19. Porcentaje de citotoxicidad en los cultivos de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, en función del tiempo y en comparación con sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua). La figura muestra la media ± DE de tres experiencias independientes. *p<0.05 con respecto a su correspondiente control; #p<0.05 entre las dos líneas celulares.	103
Figura 20. Niveles intracelulares de ROS en cultivos de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B. Los valores fueron obtenidos a los 60 minutos desde la irradiación, y fueron relativizados a los valores de sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua). La figura muestra la media ± DE de cuatro experiencias independientes. *p<0.01 con respecto a su correspondiente control; #p<0.01 entre las dos líneas celulares.	104

Figura 21. Marcaje de células senescentes de cultivos de HFFs y hASCs en placa de 24 pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 6 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μ m).	105
Figura 22. Porcentaje de células senescentes de los cultivos de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B en comparación con sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua), a las 6 horas de la irradiación. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.001$ con respecto a su correspondiente control; # $p < 0.001$ entre las dos líneas celulares.	106
Figura 23. Migración de cultivos de HFFs en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μ m).	107
Figura 24. Migración de cultivos de hASCs en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μ m).	108
Figura 25. Migración de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B en comparación con sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua), a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.05$ con respecto a su correspondiente control; # $p < 0.05$ entre las dos líneas celulares.	109
Figura 26. Imágenes de microscopía de contraste de fases representativas de los cultivos de hASCs y PC-hASCs en frasco de 175 cm^2 (barra de escala 100 μ m).	123
Figura 27. Distribución de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, después de cada ciclo de oxidación del pre-acondicionamiento de las PC-hASCs y en las mismas condiciones sin oxidación (hASCs). Figura representativa de tres experiencias independientes.	124
Figura 28. Ratio proliferativo entre las hASCs (valores normalizados en la línea discontinua) y las PC-hASCs a las 0, 24 y 48 horas tras el pre-acondicionamiento. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. $p < 0.05$	125

Figura 29. Viabilidad de los cultivos de hASCs y PC-hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B (11, 22 y 35 mJ/cm²), a las 24 y 48 horas tras su exposición. Valores relativizados a los del control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media ± DE de tres experiencias independientes. *p<0.05 con respecto al control de las hASCs no irradiadas; #p<0.05 entre las hASCs y PC-hASCs. 126

Figura 30. Niveles intracelulares de ROS en cultivos de hASCs y PC-hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B. Valores relativizados a los del control no irradiado de las hASCs (línea discontinua), transcurridos 60 minutos desde la irradiación. La figura muestra la media ± DE de tres experiencias independientes. *p<0.001 con respecto al control de las hASCs no irradiadas; #p<0.01 entre las hASCs y PC-hASCs. 127

Figura 31. Expresión de la proteína Nrf2 en las fracciones citoplasmática y nuclear de las células hASCs y PC-hASCs mediante *Western Blot* en condiciones basales (A) y sometidas a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación (B). La proteína Nrf2 nuclear y citoplasmática se detectó a 100 y 70 kDa respectivamente. El control de carga de la proteína nuclear, Lamin A/C, se detectó a 73 kDa y el control de carga de la proteína citosólica, β-actina, a 43 kDa. Imágenes representativas de tres experiencias independientes. Cuantificación de la expresión de Nrf2-n/c de las hASCs y PC-hASCs en condiciones basales (C) y sometidas a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación (D). Valores relativizados al control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media ± DE representativa de tres experiencias independientes. *p<0.05 con respecto al control de las hASCs no irradiadas; #p<0.01 entre hASCs y PC-hASCs. 129

Figura 32. Inmunofluorescencia de la distribución intracelular de la proteína Nrf2 (verde) en los cultivos de hASCs y PC-hASCs sometidos a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (barra de escala 25 μm). 130

Figura 33. Ratio de los valores de intensidad de la inmunofluorescencia de Nrf2 entre la región nuclear y la región citoplasmática de las hASCs y PC-hASCs, en condiciones basales (A) y sometidas a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación (B). Valores relativizados al control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media ± DE representativa de tres experiencias independientes. *p<0.01 con respecto al control de las hASCs no irradiadas; #p<0.001 entre hASCs y PC-hASCs. 131

Figura 34. Migración de cultivos de hASCs en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μm).....	132
Figura 35. Migración de cultivos de PC-hASCs en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μm).	133
Figura 36. Cuantificación de la migración de las células hASCs y PC-hASCs en condiciones basales (A) y sometidas a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 y 48 horas de la irradiación (B). Valores relativizados a los del control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.05$ con respecto al control de las hASCs no irradiadas; # $p < 0.05$ entre las hASCs y PC-hASCs.....	134
Figura 37. Esquema del proceso de obtención del PC/CM.	140
Figura 38. Esquema del proceso de tratamiento de los HFFs con PC/CM.	141
Figura 39. Esquema del proceso de extracción y purificación del ARNm.	148
Figura 40. Imágenes de microscopía de contraste de fases representativas de los cultivos de HFFs PC/CM+ y PC/CM+ en placas de cultivo de 6 pocillos (barra de escala 100 μm) a las 24 y 48 horas de la siembra.....	153
Figura 41. <i>Ratio</i> proliferativo entre los HFFs PC/CM- (valores normalizados en la línea discontinua) y los HFFs PC/CM+ a las 24 y 48 horas tras el tratamiento. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. * $p < 0.01$.	154
Figura 42. Viabilidad de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B (11, 22 y 35 mJ/cm^2), a las 24 y 48 horas tras su exposición. Valores relativizados a los del control no irradiado de los HFFs PC/CM- a tiempo 0 horas. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$	155
Figura 43. Porcentaje de citotoxicidad en los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, estimada a las 24 horas tras su exposición mediante la cuantificación de la LDH liberada al medio extracelular.	

La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. #p<0.05.
..... 156

Figura 44. Análisis de la apoptosis temprana y tardía de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 horas tras su exposición. A) Histogramas representativos de los resultados de tres experiencias independientes. Ensayo de anexina V/PI realizado mediante citometría de flujo. Anexina V-/PI- indica células vivas (azul); anexina V+/PI- o anexina V+/PI+ representa la fase de apoptosis temprana o tardía respectivamente (verde); anexina V-/PI+ representa la población de células necróticas (rojo). B) Cuantificación del porcentaje de células que experimentan apoptosis temprana y tardía (media \pm DE representativa de tres experiencias independientes). #p<0.01. 157

Figura 45. Niveles intracelulares de ROS en cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B. Los valores fueron obtenidos a los 60 minutos desde la irradiación. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. #p<0.05..... 158

Figura 46. A) Marcaje de los filamentos de actina del citoesqueleto de los HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 48 horas tras su exposición. El color verde corresponde a la distribución de los filamentos de F-actina. En azul, los núcleos marcados con *Hoechst*. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (barra de escala 50 μ m). B) Relación entre el área del citoplasma y el número de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 48 horas tras su exposición. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. #p<0.05.
..... 161

Figura 47. A) Imágenes de microscopía óptica (contraste de fases) de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, 48h tras la irradiación. Las células senescentes se identifican por la coloración azul del citoplasma debido a la actividad de la enzima SA- β -gal (barra de escala 50 μ m). B) Porcentaje de células senescentes de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. #p<0.01..... 162

Figura 48. Niveles de expresión génica (A) y síntesis de IL-6 de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 (B) y 48 horas (C). La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. #p<0.05..... 164

Figura 49. Niveles de expresión génica (A) y síntesis de la proteína MMP-1 de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 (B) y 48 horas (C) tras su exposición. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$165

Figura 50. Niveles de expresión génica (A) y síntesis de pro-colágeno tipo I de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 (B) y 48 horas (C) tras su exposición. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$167

Figura 51. Migración de cultivos de HFFs PC/CM- en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μm).168

Figura 52. Migración de cultivos de HFFs PC/CM+ en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μm).169

Figura 53. Migración de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ en condiciones basales (A) y sometidos a distintas dosis de radiación UV-B a las 24 y 48 horas de la irradiación (B). Valores relativizados a los del control no irradiado de los HFFs PC/CM (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. * $p < 0.001$ con respecto al control de los HFFs PC/CM-; # $p < 0.05$ entre los HFFs PC/CM- y PC/CM+.170

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios clínicos e histológicos causados por el fotoenvejecimiento de la piel. Tabla adaptada de <i>Riahi</i> y cols. ³¹	15
Tabla 2. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos involucrados en la fotoprotección endógena de la piel y su función.....	26
Tabla 3. Antioxidantes tópicos usados ampliamente en fotoprotección. Tabla adaptada de <i>Yeager</i> y cols. ⁶⁴	31
Tabla 4. Principales factores tróficos liberados por las MSCs y sus respectivos efectos terapéuticos. Tabla adaptada de <i>Kot</i> y cols. ¹⁰⁴	58
Tabla 5. Densidad celular, tanto de HFFs como de hASCs, sembrada en los distintos soportes de cultivos utilizados en la experimentación.	88
Tabla 6. Valores de la LD ₅₀ y R ² de HFFs y hASCs sometidos a dosis crecientes de radiación UV-B a las 48 horas.....	99
Tabla 7. Relación entre la intensidad de irradiación con UV-B y el tiempo de exposición de los cultivos.....	99
Tabla 8. Porcentaje de viabilidad de HFFs y hASCs a las dosis de irradiación seleccionadas para llevar a cabo los ensayos.....	100
Tabla 9. Secuencia directa e inversa de los cebadores de los genes MMP-1, COL1A2, IL-6 y GAPDH.....	150

ABREVIATURAS

•HO: radical hidroxilo

•O₂⁻: anión superóxido

¹O₂: oxígeno singlete

6-4 PPs: fotoproductos de 6-4 pirimidina-pirimidona

8-oxoG: 8-oxoguanina

AHA: alfa hidroxilácido

Akt: proteína quinasa B

ANGP: angiopoyetina

ANOVA: análisis de la varianza

AP-1: proteína activadora del factor de transcripción 1

ARE: elemento de respuesta antioxidante

ASCs: células madre adultas, *Adult Stem Cells*

ATP: adenosina trifosfato

ATRA: ácido transretinoico

Bax: proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2: linfoma de células B2

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

bFGF: factor de crecimiento de fibroblasto básico

BM-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*

BMP-2: proteína morfogenética ósea 2

BSA: albúmina de suero bovino

CAT: catalasa

CDK: inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, *cyclin-dependent kinase*

cDNA: ADN complementario

CF: citómetro de flujo

c-fos: proteína codificada en humanos por el gen fos

CFU-F: unidades formadoras de colonias fibroblásticas

CM: medio acondicionado, *Conditioned Medium*

CNTF: factor neurotrófico ciliar

COL1A1: cadena alfa 1 de colágeno tipo I

COL1A2: cadena alfa 2 de colágeno tipo I

CPDs: dímeros de ciclobutano pirimidina

Cu-SOD: cobre superóxido dismutasa

CXCR: receptor de quimiocinas

DCF: diclorofluoresceína
DE: desviación estándar
DMEM: medio de cultivo *Eagle* modificado de Dulbecco, *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO: dimetil sulfóxido
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares
ESCs: células madre embrionarias, *Embryonic Stem Cells*
EVs: vesículas extracelulares

FAK: quinasa de adhesión focal
FBS: suero bovino fetal, *Fetal Bovine Serum*
FDA: administración de alimentos y medicamentos
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
FSCs: células madre fetales, *Fetal Stem Cells*

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos
GDNF: factor neutrófico derivado de células gliales
GPx: glutatión peroxidasa
GRO: oncogén relacionado con el crecimiento
GSH: glutatión
GSSG: disulfuro de glutatión
GVHD: enfermedad de injerto contra huésped

H₂DCF-DA: 2,7-diclorofluoresceína diacetato
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
hASCs: células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, *Human Adipose derived Stem Cells*
HB-EGF: factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina
HFFs: fibroblastos derivados de prepucio humano, *Human Foreskin Fibroblasts*
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos
HIF: factor inducible por hipoxia
HO-1: hemo oxigenasa
hPL: lisado de plaquetas humano
HRP: peroxidasa de rábano

HSCs: células madre hematopoyéticas, *Hematopoietic Stem Cells*
hUCB: células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical, *Human Umbilical Cord Blood*

IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN- γ : interferón gamma

IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina 1

IGFBP: proteínas de unión a factores de crecimiento similares a la insulina

IL: interleucina

iPSs: células madre pluripotentes inducidas, *Induced Pluripotent Stem Cells*

ISCT: sociedad internacional para la terapia celular y génica

JNK: c-Jun quinasa N-terminal

Keap1: proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch

KFG: factor de crecimiento queratinocítico

KTTKS: propéptido carboxilo terminal del colágeno tipo I, compuesto de lisina, treonina, treonina, lisina y serina

LD₅₀: dosis letal 50

LDH: lactato deshidrogenasa

LIF: factor inhibidor de la leucemia

L-OOH: lipoperóxido

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

MDC: quimiocina derivada de macrófagos

MEC: matriz extracelular

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad I

MIP: proteína inflamatoria de macrófagos

MMPs: metaloproteinasas de matriz extracelular

Mn-SOD: manganeso superóxido dismutasa

MO: microscopio óptico

MSCs: células madre mesenquimales, *Mesenchymal Stem Cells*

MT: de tipo membrana

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NF- κ B: factor nuclear κ B

NGF: factor de crecimiento nervioso

NIH: instituto nacional de la salud,

NO: óxido nítrico
NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1
Nrf2: factor nuclear eritroide 2
NT-3: neurotrofina-3

OMS: organización mundial de la salud

pal-KTTKS: derivado del KTTKS conjugado con palmitoil
PB: *PrestoBlue*[®]
PBS: tampón fosfato en solución salina, *Phosphate Buffered Saline*
PC/CM: medio acondicionado por las células PC-hASCs
PC-hASCs: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo pre-acondicionadas
PDGF-AB: factor de crecimiento derivado de plaquetas AB
PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada
PFA: paraformaldehído
PGE2: prostaglandina tipo E2
PI: yoduro de propidio
PIGF: factor de crecimiento placentario
pRb: proteína del riboblastoma,
PSGL-1: glicoproteína ligando 1 de la selectina P

RANTES: quimiocina expresada y secretada tras la activación de las células T normales
RAR: receptor del ácido retinoico
RNS: especies reactivas del nitrógeno
RO: alcoxilo
ROO: peroxilo
ROS: especies reactivas del oxígeno, *Reactive Oxygen Species*
RT: retrotranscriptasa
RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RXR: receptor X retinoide

SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia
SA- β -gal: enzima lisosómica β -galactosidasa asociada a la senescencia
SCC: sin correlación clínica
SDF-1: factor derivado de células estromales
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SIPS: senescencia prematura inducida por estrés
SOD: superóxido dismutasa

STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3

STC1: estancalcalcina-1

TCA: ácido tricloroacético

TCEP: tris-(2-carboxietil) fosfina clorhidrato

TGF: factor de crecimiento transformante

TIMPs: inhibidores de las metaloproteinasas de matriz extracelular

TiO₂: dióxido de titanio

TLR: agonistas de receptores tipo toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TSG-6: proteína del gen 6 del factor inducible de necrosis tumoral

UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia

UV: radiación ultravioleta

VCAM-1: molécula 1 de adhesión vascular

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VLA-4

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

ZnO: óxido de zinc

Zn-SOD: zinc superóxido dismutasa

β-gal: β-galactosidasa

Resumen

El fotoenvejecimiento es un proceso complejo caracterizado por un conjunto de alteraciones cutáneas inducidas por la exposición continuada a la radiación UV-B y el consecuente estrés oxidativo celular.

Actualmente, la terapia celular con células madre mesenquimales (MSCs) surge como una alternativa prometedora en la prevención del fotoenvejecimiento, gracias a su capacidad de regeneración celular, sus propiedades pro-angiogénicas y su protección frente al estrés oxidativo. Sin embargo, a pesar de su potencialidad terapéutica, la utilización de MSCs no está exenta de dificultades, fundamentalmente relacionadas con el mantenimiento de su viabilidad, propiedades y función antes y después de la implantación *in vivo*. Para hacer frente a estas limitaciones se han desarrollado distintas estrategias de pre-acondicionamiento *in vitro* de las MSCs basadas, entre otras, en incrementar la resistencia frente al estrés oxidativo mediante su exposición durante un corto periodo de tiempo a bajas concentraciones de H₂O₂. Dicho pre-acondicionamiento permite además estimular la actividad paracrina de dichas células, la cual puede reducir los factores pro-inflamatorios y limitar el desarrollo de fibrosis.

En este trabajo hemos demostrado, en primer lugar, que las células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hASCs, unas de las más frecuentemente utilizadas en medicina regenerativa) poseen mayor resistencia frente al efecto nocivo de la radiación UV-B respecto a la de los HFFs. En segundo lugar, que el pre-acondicionamiento de las hASCs con H₂O₂ aumenta la capacidad de respuesta de estas células al estrés oxidativo causado por la radiación UV-B, evidenciado por la mayor actividad del sistema antioxidante celular inducido por Nrf2, el aumento de su viabilidad y de su capacidad de migración. En tercer lugar, hemos demostrado, que el tratamiento con el medio acondicionado (CM) de las hASC preacondicionadas (PC/CM) ejerce un efecto citoprotector de los HFFs frente al daño lesivo de la radiación UV-B, demostrado

por un aumento de la viabilidad y disminución del porcentaje de apoptosis y de senescencia de estas células. Además, ante dichas condiciones lesivas, se reducen la síntesis de MMP-1 y el efecto deletéreo de dicha radiación sobre la capacidad migratoria y sobre la síntesis de colágeno tipo I de dichas células, fundamentales en el proceso de remodelación de la MEC y de regeneración dérmica.

En conclusión, el tratamiento con el CM de las hASCs pre-acondicionadas con H₂O₂ ejerce un efecto protector de los HFFs frente a la radiación UV-B, lo que sugiere que la actividad paracrina de los derivados de las hASCs puede resultar una terapia prometedora en la prevención del fotoenvejecimiento.

I. Introducción

I.1. LA PIEL: ALTERACIONES DE SUS COMPONENTES EN EL ENVEJECIMIENTO

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano con funciones primordiales para su supervivencia. Es una cubierta externa que actúa, por un lado, como barrera protectora, lo que permite mantener íntegras sus estructuras, y por otro lado, constituye un complejo sistema de comunicación con el entorno; asimismo, provee información inmunitaria y participa en la homeostasis mediante la regulación de la temperatura corporal y la pérdida de agua ^{1,2}. Además de sus funciones biológicas, la piel desempeña un papel muy importante en la estética corporal. Así, nuestra apariencia física influye en el bienestar emocional, mental y psicosocial ³.

Estructuralmente, la piel se divide en tres capas bien diferenciadas por su estructura tisular y su origen embriológico: la epidermis, un epitelio que deriva del ectodermo, la dermis y la hipodermis, tejidos conectivos que derivan del mesodermo ⁴ (figura 1).

Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel. Se trata de un epitelio plano estratificado con diferentes grados de queratinización, cuya población celular se renueva constantemente desde su estrato basal hasta el apical, cada 30-40 días ^{5,6}. Los queratinocitos representan más del 95% del total de las células de esta capa, mientras que el 5% restante corresponde a melanocitos, células del sistema inmune (células de Langerhans) y células implicadas en la sensibilidad táctil (células de Merkel) ⁷. Al igual que el resto de los epitelios, la epidermis carece de vascularización. Está organizada en cinco estratos del exterior al interior: el estrato córneo, el estrato lúcido (sólo presente en la piel gruesa, como la de la planta de los pies), el estrato granuloso, el estrato espinoso y el estrato basal ². Su función principal es proteger la piel de los factores

ambientales como la polución o la radiación solar, así como de los microorganismos, y evitar una excesiva pérdida o absorción de agua.

Dermis

La dermis es la capa de tejido conjuntivo que se encuentra inmediatamente debajo de la epidermis. Ambas capas se encuentran separadas entre sí por la membrana basal. La dermis está constituida por una matriz extracelular en la que predominan las fibras de colágeno (alrededor de un 80-90% del tipo I y un 10-20% del tipo III) y fibras elásticas que aportan elasticidad y resistencia a la piel, además de una sustancia fundamental amorfa hidratada ⁸. La población celular de la dermis incluye los fibroblastos, que son las células encargadas de sintetizar los componentes de la matriz extracelular (MEC), y células del sistema inmune (mastocitos, macrófagos y células dendríticas).

Hipodermis

Es una capa de espesor variable, localizada en un plano más profundo que la dermis. Está constituida fundamentalmente por tejido adiposo, siendo un importante lugar de almacenamiento de energía y funcionando al mismo tiempo como aislante térmico. El componente celular mayoritario son los adipocitos, además de fibroblastos, macrófagos y células madre de origen mesenquimal. Esta capa conecta la dermis con el músculo y el hueso ⁵.

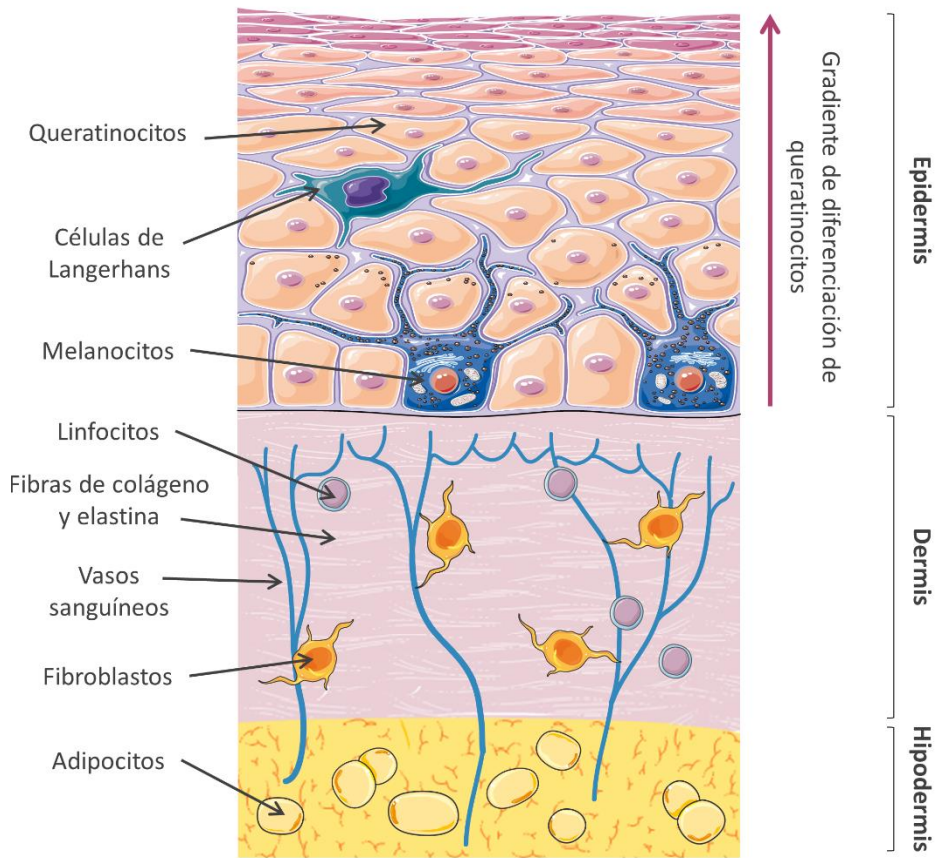


Figura 1. Estratos y componentes celulares de la piel.

La piel, al igual que el resto de los órganos, también envejece. Con el paso del tiempo, se produce una pérdida progresiva de la función y la estabilidad estructural de este órgano. Así, durante el proceso de envejecimiento disminuye el ritmo de reemplazo de células epidérmicas, lo que puede explicar que la cicatrización de heridas sea más lenta y una descamación de los queratinocitos superficiales menos eficaz ⁷. Por otro lado, en la capa dérmica se identifican una serie de alteraciones como: *i)* la acumulación de elastina inmediatamente debajo de la unión demo-epidérmica, alteración conocida como elastosis, *ii)* la atrofia y fragmentación de las fibras de colágeno, y *iii)* la disminución de la

superficie de la interfaz dermo-epidérmica, lo que contribuye a una mayor fragilidad de la piel y a una menor transferencia de nutrientes entre la dermis y la epidermis ⁷. Por su parte, la hipodermis también sufre modificaciones en su estructura y volumen debidas a la pérdida del tejido adiposo subcutáneo y la degradación del colágeno, lo que conlleva a alteraciones en las propiedades mecánicas de las capas adyacentes ⁹.

El envejecimiento de este órgano puede producirse como consecuencia de procesos intrínsecos y extrínsecos. El envejecimiento intrínseco es un proceso fisiológico inevitable que ocasiona el adelgazamiento y deshidratación de la piel apareciendo pliegues finos y una atrofia dérmica gradual. Por su parte, el envejecimiento extrínseco (responsable del 80% del envejecimiento cutáneo) está causado por factores ambientales externos (como la exposición a la radiación ultravioleta o la contaminación del aire) y por el estilo de vida (tabaquismo, alimentación, sueño o estrés), lo que conlleva la aparición de pliegues cutáneos más gruesos, pérdida de elasticidad, sequedad y pigmentación irregular ¹⁰.

La pérdida sustancial de función de la piel debida al envejecimiento es un área de interés importante para los sectores farmacéutico y cosmético en todo el mundo. Se requiere una cantidad considerable de gasto e inversión económica para desarrollar productos destinados a retrasar o revertir el envejecimiento ¹¹.

Aunque la mayoría de las investigaciones y tratamientos se centran en minimizar o revertir los signos visibles y estéticos no deseados del envejecimiento de la piel, el deterioro cutáneo es más que un simple problema cosmético. La piel envejecida es más propensa a padecer una amplia variedad de patologías. En conjunto, estas enfermedades son la cuarta causa más común de todas las patologías no mortales, afectando a un tercio de la población mundial ^{12, 13}. Entre ellas, caben citar eczemas, dermatitis alérgica y de contacto, enfermedades autoinmunes con manifestaciones cutáneas y queratosis

seborreicas¹⁴. Por otro lado, existen multitud de trastornos dermatológicos con un impacto significativo en la calidad de vida de las personas como heridas, quemaduras, infecciones cutáneas y procesos tumorales como el carcinoma basocelular y de células escamosas y el melanoma maligno¹⁴. El cáncer de piel es responsable del 60% de las muertes relacionadas con la piel (figura 2)⁵. Según datos de la OMS, se estima que uno de cada tres cánceres diagnosticados es un cáncer de piel y que cada año se diagnostican entre 2 y 3 millones de casos nuevos de carcinomas originados en la epidermis a nivel mundial¹⁵.

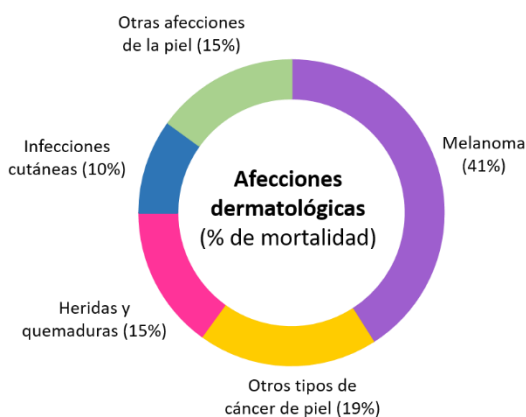


Figura 2. Porcentaje de mortalidad ocasionada por patologías cutáneas en EE. UU. (Gould y cols.⁵).

El factor etiológico más frecuente de las patologías cutáneas es la exposición a la radiación ultravioleta (UV). En este contexto, el alto grado de concienciación social acerca del efecto nocivo de una excesiva y no controlada exposición a la radiación solar ha llevado a los investigadores a buscar niveles de protección cada vez más elevados. Como consecuencia, se están desarrollando estrategias de investigación para identificar nuevos ingredientes activos y agentes de fotoprotección más eficaces.

I.2. FOTOENVEJECIMIENTO

El principal factor que afecta al envejecimiento de la piel inducido por factores extrínsecos es la exposición continuada a la radiación UV. Este proceso se conoce como fotoenvejecimiento.

Descubierta a principios del siglo XIX por *Johann Wilhelm Ritter*, la radiación electromagnética UV es invisible para el ojo humano, con una longitud de onda comprendida entre los 100 nm y los 400 nm, más corta que la longitud de onda de la luz visible (400-780 nm) y más larga que la de los rayos X (0.01-10 nm).

Dentro de la radiación UV, se establecen los siguientes tres rangos en función también de su longitud de onda y, por tanto, del nivel de energía que transmiten (figura 3):

Radiación UV-A (320-400 nm)

Se divide a su vez en dos bandas, UV-A1 (340-400 nm) y la UV-A2 (320-340 nm). La radiación UV-A1 representa hasta un 95% del total de la radiación UV, es la de menor energía y prácticamente no se absorbe en la capa de ozono. Aunque tiene poca capacidad para producir eritema, ocasiona con frecuencia alteraciones en la pigmentación de la piel. Penetra hasta la capa más profunda de la dermis, afectando al normal funcionamiento de las células, a los vasos sanguíneos y a las fibras de colágeno. Además, genera daños indirectos en el ADN a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*)^{16,17}. La radiación UV-A2 tiene menor capacidad de penetración, alcanzando la dermis superficial, genera también la producción de radicales libres y puede provocar fotosensibilidad y fotoenvejecimiento.

Radiación UV-B (290-320 nm)

Incluye cerca del 5 al 10% del espectro completo de la radiación UV que llega a la superficie terrestre. Es la responsable de los efectos biológicos más

importantes, como la síntesis de vitamina D3, pero también de las quemaduras solares, desórdenes de pigmentación de la piel, daño directo en el ADN a través la formación de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) y fotoproductos de 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PPs), fotoenvejecimiento, inmunosupresión o carcinogénesis ^{18,19}. La mayor parte de la radiación UV-B es absorbida en el estrato córneo, sin embargo, en torno al 10-30% puede atravesar la epidermis, alcanzando la dermis e hipodermis ²⁰.

Radiación UV-C (100-290 nm)

Esta radiación corresponde a la de mayor energía, pero es absorbida casi en su totalidad por la capa de ozono. Causa eritema y posee importantes propiedades mutagénicas, siendo la más peligrosa para la piel. Posee también efectos beneficiosos, por su capacidad bactericida, por lo que es la radiación que se utiliza en las lámparas germicidas ¹⁷.

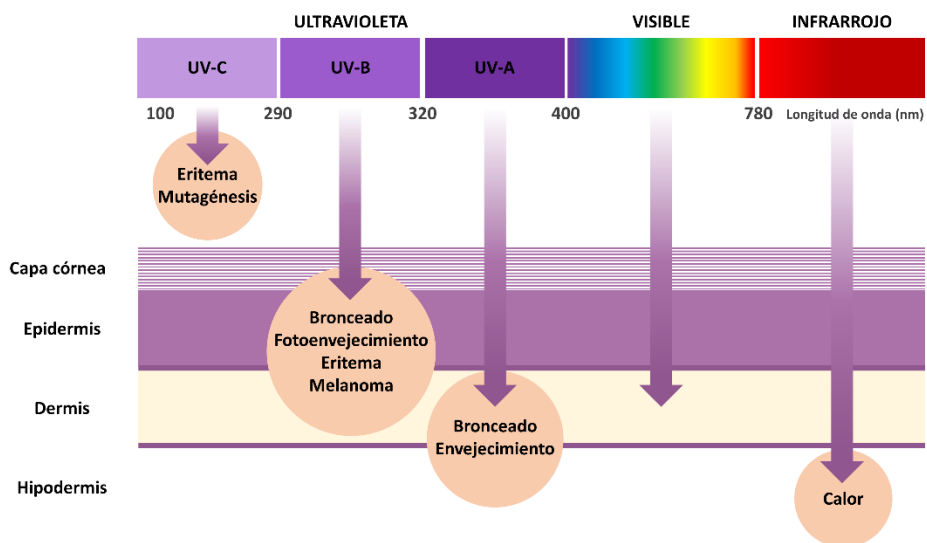


Figura 3. Espectro de longitudes de onda de la radiación solar y sus efectos sobre la piel.

La radiación UV es absorbida por gran cantidad de macromoléculas como el ARN, el ADN, la melanina, las proteínas o los aminoácidos aromáticos (por ejemplo, el triptófano y la tirosina), entre otros ²¹. Las regiones de estas moléculas capaces de absorber la energía obtenida de la radiación se denominan cromóforos. Estos cromóforos absorben eficientemente la radiación de alta energía y, en menor medida, la radiación de baja energía; por ello, las longitudes de onda más bajas penetran menos en la piel, aunque tengan mayor energía ²².

La absorción de la radiación genera reacciones fotoquímicas complejas responsables tanto de los efectos beneficiosos como perjudiciales para la salud. Los efectos positivos incluyen la síntesis de vitamina D, la síntesis de péptidos precursores de hormonas como las endorfinas y las neurohormonas, y en exposición controlada su efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor mediante la inducción de la apoptosis de las células T, permite su uso terapéutico en diferentes trastornos de la piel como la psoriasis, la dermatitis atópica y el vitíligo ^{23,24}. Pero, una exposición excesiva a la radiación UV puede provocar efectos adversos, entre los que se incluyen la inflamación (caracterizada externamente por las quemaduras solares o eritema), inmunosupresión, fotosensibilidad, fotoenvejecimiento y carcinogénesis ^{25,26} (figura 4).

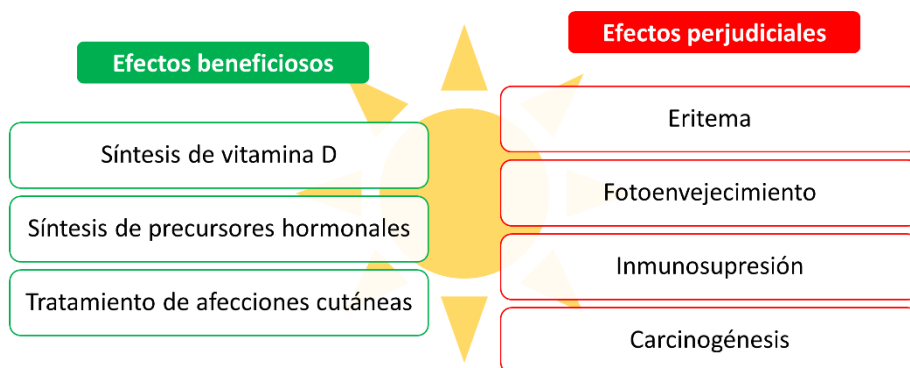


Figura 4. Efectos biológicos de la radiación UV en la salud humana.

El fotoenvejecimiento está caracterizado por la pérdida de la elasticidad, sequedad, aparición temprana de arrugas, alteraciones en la pigmentación y aumento en el grosor de la piel ^{27,28}. En casos más graves, puede producir lesiones pre-tumorales como la queratosis solar, o tumores como el carcinoma de células escamosas y el melanoma maligno ²⁹.

Así, el fotoenvejecimiento está asociado a diversos trastornos en las distintas capas de la piel (tabla 1): alteraciones en el número y presencia de atipias celulares en la epidermis, disminución de los componentes fibrilares de la unión dermo-epidérmica, y alteraciones en la composición de la MEC de la dermis (desorganización y disminución del componente fibrilar, disminución y malformaciones de la microvasculatura, acumulación de glicosaminoglicanos y alteraciones en el número de células) ³⁰.

Tabla 1. Cambios clínicos e histológicos causados por el fotoenvejecimiento de la piel. Tabla adaptada de *Riahi* y cols. ³¹.

Apariencia	Correlación histológica
Epidermis	
Piel atrofiada	Disminución del número de células basales con reducción en la producción de queratinocitos
Piel gruesa	Acantosis (hiperplasia)
Desarrollo de lesiones precancerosas y cancerosas	Atipia nuclear epidérmica
Alteraciones de la pigmentación	Inicialmente, hiperplasia reactiva de melanocitos, seguida de una disminución en su número
SCC*	Disminución del número de células de Langerhans
Unión dermo-epidérmica	
Fragilidad de la piel	Disminución de fibrillas de anclaje (colágeno VII).

	Disminución de las proyecciones microvellosas de las células basales en la membrana basal
Dermis	
Textura áspera	Acumulación de glicosaminoglicanos en material elastótico anormal
Piel arrugada	Desorganización de los filamentos de colágeno; reducción del colágeno I y III
Fragilidad vascular	Disminución de capilares sanguíneos. Vasos sanguíneos ectásicos con paredes engrosadas o atróficas
Hiperplasia sebácea	Hiperplasia de las glándulas sebáceas
SCC*	Aumento de histiocitos y linfocitos perivasculares

* (Sin correlación clínica).

I.2.1. Alteraciones celulares y moleculares de la piel fotoenvejecida

El ADN es la molécula intracelular capaz de absorber la radiación UV que provoca las consecuencias más graves en las células. De manera directa, las bases del ADN pueden absorber la energía de los fotones, ocasionando un reordenamiento estructural de los nucleótidos. De este modo, las bases de pirimidina pueden formar nuevos enlaces con pirimidinas adyacentes, lo que genera CPDs y 6-4 PPs que alteran la estructura de doble hélice, inhibiendo su replicación y transcripción³². Como consecuencia, se activan múltiples vías de señalización celular relacionadas con la reparación del ADN, la proliferación, la diferenciación, la senescencia, la degradación del tejido conectivo y la inflamación^{19,33}. Por otro lado, la absorción celular de la energía de la radiación UV puede ocasionar una mayor producción de ROS, lo cual, induce daño indirecto en el ADN nucleico y mitocondrial derivado de la oxidación de la guanina en 8-oxoguanina (8-oxoG). Además, dichos ROS también inducen la

peroxidación lipídica y proteica ^{30,34}. El incremento de los niveles de ROS desencadena a su vez un desequilibrio entre la producción y la degradación de los componentes de la MEC, responsables de proporcionar soporte estructural y funcional a la piel.

Como consecuencia de las alteraciones moleculares señaladas, se derivan una serie de alteraciones histopatológicas de la piel fotoenvejecida, entre las que destacan, el incremento de la población celular senescente, la disminución de la síntesis de colágeno, el aumento en la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y la degradación de la elastina.

I.2.1.1. Incremento de la población celular senescente

La senescencia celular fue descrita por primera vez a principios de la década de 1960 por *L. Hayflick* ³⁵. Puede definirse como una parada irreversible de la proliferación y una resistencia a los estímulos mitogénicos por parte de células competentes para la proliferación ³⁶. Se conoce con el nombre de senescencia replicativa, estando caracterizada por la parada irreversible del ciclo celular en la fase G0/G1.

Además de la senescencia celular asociada al agotamiento de la capacidad proliferativa de las células y al acortamiento crítico de los telómeros, estudios más recientes han demostrado que existen otros estímulos que pueden inducir senescencia celular, independientemente del número de duplicaciones que haya acumulado una célula. Así, el estrés oxidativo, la exposición a la radiación UV, la hiperoxia, el deterioro de la autofagia o la inhibición del proteosoma pueden inducir la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) ^{37,38}. Dependiendo de la naturaleza del estrés, su intensidad y el tipo de célula afectada, cualquier célula estresada puede bloquear transitoriamente su ciclo celular, dando tiempo a la célula para reparar el daño y, después, reiniciar la división celular o entrar en apoptosis si el daño es excesivo.

Las células senescentes muestran un fenotipo definido por características tales como el aumento del tamaño celular y de la actividad de la enzima β -galactosidasa (β -gal), la pérdida del potencial replicativo, el aumento de la biogénesis de lisosomas, la disminución de la velocidad de síntesis y degradación de proteínas, y la alteración en la regulación y expresión de genes específicos. En el caso concreto de los fibroblastos humanos senescentes, se observa un incremento en la expresión de colagenasa y estromelisina, y disminuye la expresión de los inhibidores de MMPs 1 y 3 (TIMP-1 y -3) ³⁹.

Las células senescentes secretan moléculas que influyen en el microambiente celular y tisular, expresando estas células un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Existen tres categorías dependiendo del tipo de moléculas secretadas: *i*) quimiocinas como GRO α y β (oncogén relacionado con el crecimiento) y citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-8, entre otras), *ii*) proteasas de remodelación de matriz (MMP-1 y MMP-3) y *iii*) factores de crecimiento y proteínas asociadas como, IGFBP (proteínas de unión a factores de crecimiento similares a la insulina) ³⁶.

La senescencia es un importante mecanismo supresor de tumores, limitando la proliferación de células con riesgo de transformación neoplásica, y desempeñando un papel fisiológico importante en la cicatrización de las heridas, aunque también contribuye al deterioro asociado con el envejecimiento y al establecimiento de diversas enfermedades ⁴⁰.

I.2.1.2. Disminución de la síntesis de colágeno

La integridad estructural de la piel se debe principalmente a la presencia de unas proteínas fibrosas insolubles (colágeno) que se encuentran en la MEC del tejido conectivo, proporcionando a éste su base estructural y resistencia a la piel.

El colágeno es secretado hacia la MEC por los fibroblastos en forma de monómeros constituidos por tres cadenas de polipéptidos (tropocolágeno). En

la MEC, las moléculas de tropocolágeno se unen para formar las fibras de colágeno. Según su morfología, composición en aminoácidos y propiedades físicas, se distinguen hasta 28 tipos de colágeno, pero los más abundantes en la piel humana son el tipo I, III, IV y VII ⁴¹.

La síntesis del colágeno está regulada por dos proteínas: el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual promueve la producción de colágeno y es esencial en el proceso de reparación de las heridas, y la proteína activadora del factor de transcripción 1 (AP-1), que inhibe la síntesis de colágeno y promueve su degradación ⁴². En el fotoenvejecimiento, se producen cambios cuantitativos y estructurales en las fibras de colágeno debidos a una disminución de su síntesis y a un aumento de su degradación inducida por las MMPs. La pérdida de colágeno induce cambios morfológicos en la piel, como la aparición de pliegues y la pérdida de la elasticidad ^{43,44}. Además, a nivel neoplásico, la degradación de la MEC también facilita la invasión local y la diseminación metastásica de las células cancerosas.

1.2.1.3. Aumento en la expresión de MMPs

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que degradan proteínas de la MEC como el colágeno, fibronectina, elastina y proteoglicanos. Son secretadas por células de la piel, incluidos los fibroblastos dérmicos y los queratinocitos epidérmicos, aunque también pueden ser sintetizadas por las células endoteliales y las del sistema inmunitario. Estas endopeptidasas se pueden clasificar en cinco subgrupos según el sustrato que degradan y la organización de sus dominios estructurales: *i*) colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13); *ii*) gelatinasas (MMP-2 y MMP-9); *iii*) estromelinas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11); *iv*) matrilisinas (MMP-7 y MMP-26); y *v*) MMPs de tipo membrana (MT) (MMP-14, MMP-15 y MMP-16). Entre estas enzimas, la

MMP-1 (colagenasa intersticial) es la principal responsable de la degradación de los colágenos tipo I y III en la piel humana ⁴⁵.

La síntesis de las MMPs está regulada por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Durante el fotoenvejecimiento, aumentan los niveles de MMPs, pero no aumentan los niveles de TIMPs para mantener el equilibrio. De hecho, los niveles de TIMP-1 en una piel fotoenvejecida pueden incluso reducirse. Este desequilibrio acelera la fragmentación progresiva de las fibras de colágeno.

I.2.1.4. Degradación de elastina

La elastina es el principal constituyente proteico de las fibras elásticas, es sintetizada por los fibroblastos y queratinocitos, y su función es proporcionar elasticidad a las paredes de los vasos sanguíneos, al parénquima pulmonar y a la piel, entre otros órganos ⁴⁶. Aunque únicamente representa el 2% del total de la proteína dérmica, interviene en procesos importantes para la homeostasis cutánea. El precursor de la elastina es la tropoelastina, la cual es sintetizada en el retículo endoplasmático de los fibroblastos de la dermis superficial. Esta proteína se libera a la matriz extracelular y forma agregados amorfos formados por aminoácidos hidrófobos responsables de las propiedades elásticas, y aminoácidos no hidrófobos que constituyen los puntos de unión entre moléculas de tropoelastina próximas, para formar el polímero de elastina.

En la piel joven, las fibras elásticas adoptan una arquitectura característica altamente ordenada, con microfibrillas ricas en fibrilina orientadas perpendicularmente en la dermis papilar y fibras elásticas de gran diámetro en la dermis reticular. Sin embargo, en la piel fotoenvejecida se produce una acumulación de fibras distróficas en la dermis, conocida como elastosis solar. Esta alteración se produce como consecuencia de un ciclo de degradación de las fibras elásticas, seguido de la producción de MEC y su reensamblaje en una

organización diferente de la estructura original ⁴⁶. Este aumento en la degradación de las fibras elásticas se debe principalmente a la activación de MMPs, específicamente las MMP-2, -3, -9, -12 y -13. La MMP-12, también conocida como metaloelastasa de macrófagos humanos, es la proteasa más activa en la degradación de la elastina ⁴⁴ y es secretada por varios tipos celulares, incluidos los queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias.

I.2.2. Estrés oxidativo asociado al fotoenvejecimiento

Uno de los mecanismos principales implicados en el fotoenvejecimiento es el estrés oxidativo, consecuencia de la limitada capacidad de las células para eliminar el exceso de ROS. El resultado es un aumento de radicales libres (radicales de especies de oxígeno, ROS, y radicales de nitrógeno, RNS), producidos por la interacción de la radiación UV con la piel ⁴⁴. Así, al recibir la radiación UV, los cromóforos intracelulares interactúan con las moléculas de oxígeno, dando lugar a la producción de intermediarios reactivos como el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido (ROO), alcoxilo (RO) o el radical hidroxilo ($\bullet\text{HO}$), entre otros ^{46,47}.

Esta situación pro-oxidativa tiene consecuencias relevantes en la homeostasis celular, como la oxidación de lípidos y proteínas, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el daño del ADN. Además, los niveles elevados de ROS son el principal estímulo para que se active la síntesis de MMPs durante el fotoenvejecimiento. Los niveles elevados de ROS activan una serie de vías de señalización a través de la expresión de moléculas de señalización que incluyen quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), c-Jun quinasa N-terminal (JNK) y p38 en la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) e inducen el factor de transcripción AP-1 y el factor nuclear κB (NF- κB). La actividad de NF- κB es responsable del aumento de la expresión de MMPs, como las MMP-1 y MMP-3 en fibroblastos dérmicos. Por su parte, AP-1 inhibe la

señalización del factor de crecimiento TGF- β , lo que conduce a la fragmentación y a la disminución de la biosíntesis del colágeno ⁴⁷. Como consecuencia de esta degradación progresiva de la MEC, las uniones intercelulares de los fibroblastos se ven afectadas, lo que resulta en alteraciones en su morfología como son la reducción de su tamaño y la disminución de sus elongaciones citoplasmáticas. Los fibroblastos envejecidos producen una mayor cantidad de ROS que aumentan aún más la expresión de las MMPs e inhiben la señalización de TGF- β , creando un circuito de retroalimentación positiva que acelera el envejecimiento dérmico ⁴⁴.

De manera similar a lo descrito en la deposición aberrante del colágeno, la degradación fotoquímica de las fibras elásticas se desencadena por las vías de señalización MAPK y NF- κ B.

Por otro lado, las células responden al daño en el ADN generado por el incremento de los niveles intracelulares de ROS deteniendo, de forma irreversible, la progresión del ciclo celular y aumentando la expresión de genes asociados a la senescencia mediante la activación de la vía supresora del crecimiento p53/p21 y/o pRb/p16. La activación de p53, a través de su fosforilación, da como resultado una regulación positiva de su efector p21, que inhibe la transición G1/S en respuesta al daño en el ADN. Además, el incremento de ROS produce una disminución de los niveles de la proteína del retinoblastoma (pRb) fosforilada acompañada de una regulación positiva del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), p16. En conjunto, estos eventos conducen a la detención temporal del ciclo celular ³³ (figura 5).

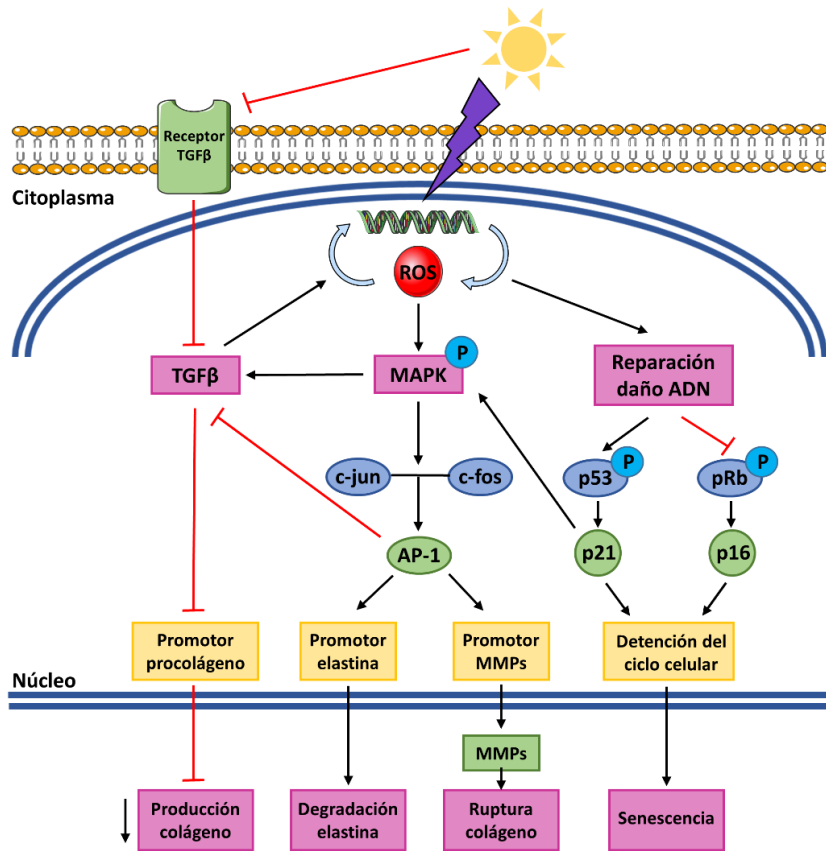


Figura 5. Diagrama esquemático que muestra las principales vías de señalización involucradas en el proceso de fotoenvejecimiento en fibroblastos dérmicos. La irradiación UV actúa sobre diversas vías de señalización que controlan la progresión del ciclo celular y la regulación transcripcional de los genes implicados en la síntesis y degradación de la MEC. La activación o bloqueo de estas vías conduce a la detención del ciclo celular y al deterioro de la función de la MEC durante el fotoenvejecimiento. Esquema adaptado de *Cavinato* y cols.³³.

I.2.3. Mecanismos de defensa de la piel frente al fotoenvejecimiento

La piel posee sus propios mecanismos de defensa contra la radiación UV, como son el engrosamiento de la capa córnea, el incremento de la síntesis de melanina y su capacidad antioxidante.

I.2.3.1. Engrosamiento de la capa córnea

La epidermis es un epitelio plano estratificado que se renueva cada 30-45 días aproximadamente, desde su estrato basal hasta el estrato córneo. Este proceso, conocido como cornificación, está regulado por el calcio. Se necesitan bajas concentraciones de calcio para que ocurra la división celular, mientras que altas concentraciones son necesarias para la diferenciación de las células de la epidermis. Por esta razón, existe un gradiente creciente de calcio desde el estrato basal hasta el estrato granuloso. En cambio, en la capa más externa, el estrato córneo, la concentración de calcio disminuye drásticamente ⁴⁸.

Tras la exposición a la radiación UV, la piel responde aumentando el grosor del el estrato córneo, que actúa como un espejo para reflejar y refractar la radiación UV ²². Sin embargo, tras una exposición elevada a la radiación UV, el gradiente de calcio se colapsa y todas las capas de la epidermis muestran una concentración de calcio equitativa, lo que imposibilita la correcta división y diferenciación celular.

I.2.3.2. Aumento de la síntesis de melanina

La radiación UV penetra a través de la epidermis hasta la unión epidérmico-dérmica, donde es absorbida por los melanocitos activándolos para producir melanina. La melanina se encapsula en melanosomas que se transfieren a otras células de la epidermis, donde se depositan sobre los núcleos actuando como un paraguas y absorbiendo la radiación UV-A y UV-B para impedir que dañe las células ^{22,49}. La actividad de los melanocitos está regulada por varios factores, algunos de los cuales inducen un incremento de su número y la producción de melanina. Estos factores incluyen interleucinas (IL), como la IL-1, IL-6, IL-8, y factores como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), TGF- β , el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Estas moléculas tienen un efecto directo sobre la proliferación y

supervivencia de los melanocitos y juegan un papel importante en la patogénesis de los cambios pigmentarios de la piel fotoenvejecida. De este modo, cuando hay un exceso de exposición a la radiación UV, se producen alteraciones pigmentarias de carácter benigno como la hiperpigmentación o, en el peor de los casos, lesiones malignas como el melanoma^{50,51}.

I.2.3.3. Capacidad antioxidante

La piel posee un elaborado sistema de defensa antioxidante para combatir el estrés oxidativo causado por la radiación UV, formado por agentes reductores con capacidad antioxidante que evitan o neutralizan la formación de los radicales libres. En general, estos antioxidantes se pueden clasificar en endógenos, los producidos por el organismo, y exógenos, los obtenidos de la dieta. A su vez, los antioxidantes endógenos pueden ser enzimáticos, como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx); y no enzimáticos de bajo peso molecular (sintéticos o naturales), como las isoformas de la vitamina E, vitamina C, glutatión (GSH), ácido úrico, ubiquinol o melatonina^{52,53} (tabla 2). En concreto, la CAT es la enzima más importante del sistema antioxidante de la piel, ya que transforma el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno, es por ello, que su expresión en este órgano es elevada⁵⁴. También se ha descubierto el papel homeostático de la enzima mitocondrial manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) en la respuesta de los queratinocitos a la radiación UV, mediada a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La enzima SOD3, una glicoproteína con un dominio de unión a la heparina, se expresa predominantemente en la matriz extracelular, donde se une al proteoglicano de sulfato de heparina. Fisiológicamente, SOD3 mantiene el equilibrio *redox* y la homeostasis de la piel, y modula las respuestas inmunes innatas y adaptativas⁵⁵. Por otro lado, la melatonina endógena intracutánea y sus metabolitos, que se forman en reacciones de oxidación enzimáticas y no enzimáticas, parecen representar los

antioxidantes más potentes contra el estrés oxidativo y la carcinogénesis inducidos por la radiación UV, debido a sus propiedades de captación de radicales hidroxilo en queratinocitos, melanocitos y fibroblastos dérmicos ^{56,57}.

La capacidad antioxidante de la piel disminuye tras la exposición a la radiación UV y recupera la normalidad en pocos días. Sin embargo, una exposición excesiva a la radiación UV u otros agentes oxidantes pueden disminuir la capacidad de respuesta inmunitaria y antioxidante cutánea debido al aumento de los niveles de ROS, provocando daño oxidativo e inmunotoxicidad, envejecimiento prematuro de la piel, enfermedades cutáneas y cáncer.

Tabla 2. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos involucrados en la fotoprotección endógena de la piel y su función.

Tipo de antioxidante	Modo de acción
Antioxidantes enzimáticos	
CAT	Enzima dependiente del hierro con función catalítica y peroxidativa. Forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD, que actúa en presencia de altas concentraciones de H ₂ O ₂ . Cataliza la descomposición del H ₂ O ₂ en O ₂ y agua.
SOD	Está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD, Zn-SOD y Mn-SOD. Su principal función es la protección contra el anión superóxido. Cataliza la dismutación de superóxido en O ₂ y H ₂ O ₂ .
GPx	Enzima selenio dependiente que cataliza la reducción de H ₂ O ₂ a lipoperóxido (L-OOH); usa como agente reductor el GSH.
Antioxidantes no enzimáticos	
Vitamina E	Neutraliza el ¹ O ₂ , captura radicales libres hidroxilo, neutraliza peróxidos.
Vitamina C	Neutraliza el ¹ O ₂ , captura radicales libres hidroxilo, regenera la forma oxidada de la vitamina E.

GSH	Es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina. Neutraliza los ROS, transformándose en una forma más reactiva, pero que se combina rápidamente con otro glutatión reactivo para formar disulfuro de glutatión (GSSG). Además, funciona como mantenimiento de otros antioxidantes como, por ejemplo, la vitamina E y C en sus formas reducidas.
Ácido úrico	Neutraliza el $^1\text{O}_2$, elimina radicales libres hidroxilos y oxidantes oxohemo. Al absorber un electrón, el ácido úrico se transforma en un radical, aunque no muy reactivo. Es el principal antioxidante en el suero, por lo que la contribución a la capacidad antioxidante de la piel es comparativamente baja.
Ubiquinol	Es la forma reducida de la coenzima Q10. Es un potente antioxidante lipofílico con capacidad de regenerar otros antioxidantes como la vitamina E y C. Además, protege de la oxidación lipídica.
Melatonina	Neutraliza el $^1\text{O}_2$, promueve la producción de GSH en queratinocitos, melanocitos y fibroblastos dérmicos.

I.3. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL FOTOENVEJECIMIENTO

El fotoenvejecimiento constituye uno de los retos terapéuticos de la dermatología moderna. Actualmente, existen tres estrategias para hacerle frente, clasificadas en: prevención primaria, prevención secundaria y prevención terciaria. La prevención primaria corresponde a la reducción de los factores de riesgo antes de que ocurra la lesión y se denomina fotoprotección. La secundaria tiene como objetivo la detección temprana de la lesión para poder atenuar una condición clínica en fase asintomática. Por último, la prevención terciaria hace referencia al tratamiento del fotoenvejecimiento una vez que ha aparecido la sintomatología ^{58,59}.

PREVENCIÓN PRIMARIA	PREVENCIÓN SECUNDARIA	PREVENCIÓN Terciaria
Fotoprotección	Antioxidantes de uso tópico Suplementos orales Retinoides	Alfa hidroxiácidos Factores de crecimiento y citocinas Láseres Biopéptidos Agentes despigmentantes Componentes enzimáticos

Figura 6. Representación esquemática de las diferentes estrategias de prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento. Esquema adaptado de *Rabe* y cols.⁵⁸.

I.3.1. Prevención primaria: Fotoprotección

La fotoprotección se ha convertido en un tema de interés creciente, siendo considerada una de las principales medidas contra los efectos nocivos de la radiación UV. La fotoprotección tiene como objetivo prevenir el daño que ocurre en la piel como consecuencia de una exposición continuada a la radiación UV. Si bien es cierto que la piel posee mecanismos de adaptación y defensa para protegerse de esta agresión, su eficacia varía en función de los individuos y del grado de exposición.

El uso tópico de lociones fotoprotectoras es la primera estrategia de prevención para combatir el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel. Se trata de cremas, lociones, geles o aerosoles que actúan a modo de filtro solar mediante tres

mecanismos fundamentales: reflexión, dispersión y absorción de la radiación. Su uso se lleva a cabo aplicando una fina capa en la piel antes de la exposición al sol, que absorbe la radiación UV. Este tipo de agentes no deben ser irritantes, sensibilizantes, ni fototóxicos, y deben permanecer estables en la piel humana cuando se exponen a la luz solar ¹³.

Las lociones empleadas en la fotoprotección se clasifican según su modo de acción en dos tipos:

Filtros físicos

Son moléculas inorgánicas que funcionan a modo de pantalla, creando una película gruesa en la superficie de la piel que actúa reflejando todo el rango de longitudes de onda del espectro electromagnético. Estas moléculas son pigmentos de gran tamaño (200 nm), generalmente de color blanco, cuya principal característica es su estabilidad estructural para mantener la protección, incluso después de largos períodos de exposición a la radiación UV. Los pigmentos más utilizados son el dióxido de titanio (TiO₂) y el óxido de zinc (ZnO), pero también se emplean los óxidos de hierro, el talco, el caolín y la mica. Debido a su gran tamaño, poseen un mayor índice de refracción, sin embargo, este factor también afecta en que la formulación de la loción sea opaca y deje residuos blancos en la piel. Es posible reducir el tamaño de estos pigmentos (pigmentos micronizados) permitiendo que sean lo suficientemente grandes (20-80 nm) como para no penetrar en la piel. De este modo disminuye su capacidad para reflejar la luz, volviéndose transparentes y mejorando la estética, pero disminuyendo su eficacia. Además, las partículas micronizadas pueden reaccionar fotoquímicamente con los ROS y contribuir a la reducción de la eficacia de la protección solar ¹⁷. Para evitar estas reacciones, las partículas se recubren con materiales como por ejemplo, la silicona ⁶⁰.

Filtros químicos

Son moléculas orgánicas de estructura aromática que actúan absorbiendo la radiación (captan la energía incidente y la emiten nuevamente en forma de energía térmica, inocua para la piel), pero únicamente en las longitudes de onda del UV. Están regulados y autorizados para su uso por los ministerios y departamentos de salud de todo el mundo. En función de la longitud de onda absorbida se distinguen los filtros UV-B (derivados del ácido paraaminobenzoico, derivados del ácido salicílico, derivados del ácido p-metoxicinámico, alcanfor y mezclas), filtros UV-A (derivados del dibenzoilmetano, derivados del bencilideno alcanfor, ácido fenilobencimidazol sulfónico) y filtros de amplio espectro.

Requieren del orden de 30 minutos para ejercer su acción, por lo que deben emplearse con la debida antelación antes de la exposición solar. Dado que pueden absorberse por la piel, estos productos pueden alterar la función endocrina y producir efectos nocivos para la piel, como alergias, reacciones de fototoxicidad o irritaciones cutáneas ⁶¹. Además, se degradan con la exposición a la radiación, lo que los hace inestables, perdiendo su capacidad de protección.

A pesar de la incorporación de nuevas tecnologías y enfoques innovadores en la fotoprotección tópica, el uso inadecuado y la falta de optimización de su formulación aún limitan la utilidad de los actuales protectores solares.

I.3.2. Prevención secundaria

I.3.1.1. Antioxidantes de uso tópico

Los protectores solares tradicionales (físicos y químicos) proporcionan una protección eficaz contra el eritema, pero no contra el aumento de los niveles de ROS generados en la piel después de la exposición a la radiación UV ⁶⁰. Es por ello que hoy en día es cada vez más común la incorporación de sustancias

naturales con capacidad antioxidante en muchos productos de protección solar para potenciar los antioxidantes endógenos de la piel ⁶². Éstos incluyen vitaminas, activadores de los sistemas enzimáticos antioxidantes presentes en la piel o compuestos derivados de plantas con fuertes propiedades antioxidantes ⁶³. Se ha demostrado que los protectores solares suplementados con antioxidantes son más eficientes que los protectores solares tradicionales ya que suprimen cambios en la piel, como el desarrollo de pigmentación, el agotamiento de las células de Langerhans y la inducción de MMP-9 ⁶⁰. Este tipo de lociones debe de cumplir varios requisitos: alta capacidad antioxidante, formulación estable, capacidad de penetrar en la barrera de la piel y estar presente en una concentración que cause un efecto protector significativo.

Actualmente, los antioxidantes más utilizados en el pretratamiento de la piel para la fotoprotección son las vitaminas C y E, los polifenoles presentes en las plantas como el té verde y el aloe vera, las enzimas antioxidantes como la coenzima Q10, los carotenoides y extractos de semillas, hojas y algas (tabla 3).

Tabla 3. Antioxidantes tópicos usados ampliamente en fotoprotección. Tabla adaptada de Yeager y cols. ⁶⁴.

Antioxidante	Función
Vitamina C (ácido ascórbico)	Concentraciones tópicas de al menos un 15% protegen del eritema y de quemaduras solares ⁶⁵ . Además, en ensayos <i>in vitro</i> con cultivos de fibroblastos, estimula la síntesis de colágeno y disminuye la producción de MMPs ⁶⁶ .
Vitamina E (α-tocoferol)	Disminuye la peroxidación lipídica, la fotocarcinogénesis, los niveles de transcripción de MMP-1 y la formación de dímeros de timina ⁴⁸ .
Polifenoles del té	La epigallocatequina-3-galato inhibe la liberación de H ₂ O ₂ inducida por la radiación UV y suprime la fosforilación de MAPK en los queratinocitos ^{62,67} . Reduce la inflamación a través de la vía de NF-κB y la formación de eritema.

Extracto de aloe vera	Reduce el desequilibrio <i>redox</i> inducido por la radiación, disminuye la oxidación de la membrana lipídica y aumenta la supervivencia celular.
Coenzima Q10	Protege contra la muerte celular inducida por el estrés oxidativo y mejora la síntesis de los componentes de la membrana basal en las células dérmicas y epidérmicas. Además, reduce los niveles de ROS, la peroxidación lipídica, el daño en el ADN y la síntesis de MMPs inducida por la radiación UV ⁵² .
Carotenoides	Los carotenoides más estudiados en fotoprotección son el β -caroteno y el licopeno. El β -caroteno (precursor de la vitamina A) elimina los radicales libres causados por la radiación UV y previene las quemaduras de la piel. El licopeno es el carotenoide más efectivo contra el 1O_2 , además de neutralizar los radicales del óxido nítrico ⁶⁸ .
Extracto de soja	El compuesto fitoestrógeno genisteína de la soja inhibe el daño oxidativo de la piel y la formación de CPDs ⁶⁴ .
Extracto de silimarina	Acelera la reparación del ADN en fibroblastos dérmicos humanos irradiados, a través de una vía de reparación dependiente de p53.
Extracto de semilla de uva	Inhibe la inflamación, reduce el H_2O_2 y disminuye la peroxidación lipídica. Su rápido metabolismo lo hace difícil para el uso tópico a menos que esté encapsulado en nanopartículas lipídicas.
Extracto de algas	Estimula la actividad de la peptidasa proteasómica en los queratinocitos humanos irradiados, reduciendo el alcance del daño oxidativo de las proteínas.
Melatonina	Protege contra el eritema, disminuye la producción de ROS, mejora de la expresión de p53, mejora la reparación del ADN y disminuye la generación de CPDs.
Selenio	Protege contra la oxidación del ADN, la expresión de IL-10 y la peroxidación lipídica. En humanos, aumenta la dosis mínima de eritema. En modelos murinos, reduce la probabilidad de cáncer de piel.

Sin embargo, los antioxidantes son compuestos inestables, por lo que son difíciles de formular en una composición aceptable, estable y biológicamente activa para productos de protección solar. Además, actualmente, no existe ningún antioxidante capaz de proporcionar la suficiente protección por sí sola, aunque, se ha demostrado que los antioxidantes complementan la fotoprotección de los filtros químicos.

I.3.1.2. Suplementos orales

Debido a las limitaciones que presentan los antioxidantes por vía tópica, existe un interés creciente en el potencial de los agentes orales y subcutáneos para proporcionar protección adicional contra la exposición a la radiación UV y reducir aún más el daño que normalmente conduciría al fotoenvejecimiento y al cáncer de piel. Estos agentes difieren de los protectores solares en su mecanismo de acción y en los beneficios de su uso. Contienen uno o más principios activos que activan diferentes mecanismos de fotoprotección, especialmente aquellos relacionados con sus acciones antioxidantes ⁶⁹. Se ha demostrado que varios agentes administrados por vía oral y subcutánea como la vitamina E, vitamina C, los carotenoides o el selenio, tienen el potencial de reducir la gravedad de la quemadura solar, disminuir la fotosensibilidad y prevenir el daño causado por la radiación. Sin embargo, todavía es necesario seguir estudiando estas sustancias para confirmar su eficacia y seguridad. De hecho, algunos investigadores sugieren que los antioxidantes como suplementos alimenticios no poseen efectos preventivos, además de ser potencialmente peligrosos en exceso, por lo que, la fuente óptima de antioxidantes debería provenir de la dieta y no de suplementos ¹⁰.

I.3.1.3. Retinoides y sus derivados

Los retinoides son un grupo de sustancias que incluyen la vitamina A y sus derivados, tanto naturales como sintéticos. El uso tópico de los retinoides se ha

expandido para tratar diversas afecciones de la piel, incluidas el acné, el fotoenvejecimiento y la queratosis actínica³¹. La tretinoína y el tazaroteno son los dos retinoides tópicos que actualmente están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EE.UU. para el tratamiento del fotoenvejecimiento⁴².

La tretinoína es la forma ácida de la vitamina A, también conocida como ATRA (ácido transretinoico). Es el primer retinoide tópico estudiado y en la actualidad continúa siendo uno de los pilares para tratar el fotoenvejecimiento. Actúa como una hormona que es absorbida por las células para llegar al núcleo, donde interactúa con los receptores correspondientes, los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores X retinoides (RXR), para activar o inhibir el proceso de transcripción de los elementos que modulan la queratinización de la epidermis, la síntesis de colágeno y la producción de MMPs. La radiación UV disminuye estos receptores. El pre-tratamiento con tretinoína inhibe la activación de c-Jun y AP-1, aumentando la síntesis de pro-colágeno I e inhibiendo la producción de MMPs, y acelera la recuperación de los receptores RAR y RXR después de la exposición a la radiación UV⁵⁸. Además, el ácido retinoico y sus derivados promueven la supresión de la expresión de la enzima tirosinasa, clave en la síntesis de melanina⁶⁵. El uso de la tretinoína de forma tópica puede producir irritabilidad de la piel, por lo que los retinoides de venta libre actuales se desarrollan a partir de formas intermedias como el retinol y los ésteres de retinilo (los menos irritantes de los dos) que poseen una capacidad regeneradora parecida, pero con efectos secundarios menores.

El tazaroteno es un retinoide de segunda generación que se une de forma selectiva a los receptores RAR- γ y RAR- β . Reduce la atipia celular y restaura la polaridad de los queratinocitos. Varios ensayos han demostrado que el tazaroteno es eficaz para reducir las arrugas finas, la hiperpigmentación

moteada, los lentigos, la despigmentación irregular, la elastosis y la rugosidad de la piel ⁴².

I.3.3. Prevención terciaria: tratamiento

El respaldo de la investigación y la base científica para la mayoría de los tratamientos que se usan hoy día para revertir los signos del fotoenvejecimiento, siguen siendo limitados, y solo unos pocos demuestran, a nivel histológico, modificaciones evidentes en la piel. Aun así, los avances en las últimas décadas han permitido formular productos con ingredientes biológicamente activos muy prometedores.

I.3.3.1. Alfa hidroxiácidos

Los alfa hidroxiácidos (AHAs) son un grupo de ácidos orgánicos solubles, derivados de productos lácteos (ácido láctico), frutas (ácido málico y ácido cítrico) o la caña de azúcar (ácido glicólico), con propiedades regeneradoras ⁶⁶. Actúan tanto en la epidermis como en la dermis y sus efectos dependen de su concentración y del pH. Su formulación en altas concentraciones (por ejemplo, ácido glicólico al 35% y más) promueve la exfoliación química de la epidermis y, en bajas concentraciones, normalizan las capas epidérmicas al adelgazar el estrato córneo, mientras promueven el engrosamiento de la capa granular. En la dermis, se cree que estimulan la síntesis de colágeno y de ácido hialurónico. Entre sus efectos secundarios destaca la irritabilidad de la piel.

I.3.3.2. Microdermoabrasión

En el proceso de cicatrización de las heridas, las citoquinas pro-inflamatorias, son las primeras moléculas en activarse tras producirse el daño en la piel, realizando un papel clave en la regulación de la respuesta de las células inmunes durante la regeneración de la piel ⁷⁰.

Mediante procedimientos mínimamente invasivos, como la microdermoabrasión, se produce una lesión epidérmica superficial con el objetivo de desencadenar una respuesta curativa al estimular la secreción de factores de crecimiento (como TGF- β 1) y citoquinas (IL-1, la IL-6 y el TNF, entre otras) que activan a los fibroblastos para inducir la síntesis de colágeno, con el fin de ayudar a la regeneración del tejido y la cicatrización de la herida ^{65,71}.

I.3.3.3. Sistemas de láseres

El principal tipo de láser utilizado en el tratamiento del fotoenvejecimiento y en general en dermatología, es el láser de CO₂ fraccionado. La energía emitida por este láser (10.600 nm) es absorbida por el agua contenida en los tejidos, calentándolos hasta la temperatura de vaporización del agua. De este modo, se consigue eliminar capas superficiales de la piel de forma controlada. El calor del láser también penetra hasta capas más profundas donde los fibroblastos dérmicos sintetizan nuevas fibras de colágeno y elastina ^{58,72}. Entre los efectos no deseados se encuentran la formación de cicatrices hipertróficas y alteraciones pigmentarias.

I.3.3.4. Biopéptidos

Los biopéptidos son fragmentos de proteínas que no presentan actividad biológica cuando se encuentran formando parte de una proteína; sin embargo, cuando ésta se hidroliza, los péptidos se separan y son capaces de ejercer efectos biológicos específicos, por lo que se les denominan péptidos bioactivos o biopéptidos. La actividad de los biopéptidos depende de su composición, secuencia, longitud (de 2 a 20 residuos de aminoácidos) y polaridad ⁷³. Los biopéptidos se suministran de forma oral o tópica, sin embargo, son inestables y poseen baja permeabilidad, por lo que, para su uso tópico, se suelen conjugar con ácidos grasos como el ácido palmítico y sus derivados, aumentando así su permeabilidad ⁷⁴. Después, son transportados por el torrente sanguíneo hasta

las células receptoras donde ejercen su acción. Actualmente se han sintetizado multitud de biopéptidos provenientes de proteínas tanto animales como vegetales, con actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora, antimicrobiana, analgésica, antioxidante y anticancerígena ⁷⁵, para tratar el desarrollo de muchas enfermedades crónicas como la diabetes o la hipertensión, alergias, enfermedades neoplásicas o el envejecimiento cutáneo ⁷⁶.

Uno de los biopéptidos más conocidos en el tratamiento tópico del fotoenvejecimiento es un subfragmento del propéptido carboxilo terminal del colágeno tipo I, compuesto de lisina, treonina, treonina, lisina y serina (KTTKS), y su derivado conjugado con palmitoil (pal-KTTKS). Estos polipéptidos poseen la capacidad de reducir las arrugas y mejorar significativamente la textura de la piel al desencadenar procesos celulares, como inhibir la degradación del colágeno, aumentar la producción de MEC y aumentar la expresión de colágeno tipo I y III ⁷⁷.

I.3.3.5. Agentes despigmentantes

Como ya se ha mencionado anteriormente, la melanina es el pigmento responsable del color de la piel y la enzima tirosinasa es la encargada de catalizar su síntesis. Es por ello, que la mayoría de los agentes despigmentantes se basan en la inhibición de la tirosinasa.

Uno de los agentes despigmentantes más ampliamente estudiado es la hidroquinona. Se trata de un principio activo de uso tópico que reduce la producción de melanina. A bajas concentraciones (2%) se une a la enzima tirosinasa para inhibir su actividad, impidiendo así la producción de melanosomas. Sin embargo, existe un gran número de controversias acerca de la seguridad de la hidroquinona, como su asociación con neoplasias malignas; es por ello, que en muchos países su uso en el blanqueamiento de la piel ha sido prohibido ^{65,78}. Otros inhibidores empleados en la despigmentación de la piel

como la arbutina, el ácido kójico, el ácido azelaico, el ácido L-ascórbico, el ácido elálgico y el ácido tranexámico también han demostrado ser inestables y causar toxicidad ⁷⁹.

I.3.3.6. Componentes enzimáticos

El objetivo principal es mejorar la reparación del ADN mediante el suministro de enzimas biológicas activas dispuestas en una formulación absorbible ⁸⁰. Diversos estudios han demostrado esta capacidad reparadora en dos enzimas: la fotoliasa y la endonucleasa.

La enzima fotoliasa no está presente en los genomas de todos los mamíferos, sin embargo, puede encontrarse en otras especies animales, plantas y bacterias. Esta enzima destruye los CPDs que se forman en el ADN dañado; además, ayuda a la regeneración celular y a reducir la inflamación de la piel mediante la inhibición de la IL-6 ^{17,80}.

La endonucleasa se obtiene de la bacteria *Micrococcus luteus*. Esta enzima mejora la eficiencia y la velocidad de reparación del ADN; además, estimula la regeneración de la piel, disminuye la degradación de los componentes de la MEC y reduce los mediadores pro-inflamatorios ^{17,80}.

I.4. MEDICINA REGENERATIVA

La medicina regenerativa ha surgido como una nueva disciplina médica impulsada fundamentalmente por los nuevos conocimientos sobre las células madre y su capacidad para diferenciarse en células de diferentes tejidos. El objetivo de este campo multidisciplinar es reparar, regenerar o reemplazar células, tejidos u órganos disfuncionales utilizando los propios mecanismos intra y extracelulares que el organismo emplea en su autorreparación ⁸¹. Para ello, la medicina regenerativa se sustenta, individualmente o en combinación, en: i) la

terapia celular, mediante el uso de células autólogas o alogénicas y elementos subcelulares, *ii*) la ingeniería de tejidos, mediante el uso de biomateriales de andamiaje, y *iii*) la terapia génica.

La terapia celular utiliza las células madre o sus derivados mediante dos mecanismos de acción: el injerto de células madre para reemplazar células o tejidos dañados, y la estimulación de los procesos de autorregeneración del tejido endógeno, a través de efectos tróficos mediados por la secreción de citoquinas y factores de crecimiento ⁸².

Debido a la alta proliferación, diferenciación múltiple y capacidad única de autorrenovación, las células madre constituyen un tratamiento prometedor en diversas patologías, entre las que se encuentran la diabetes mellitus, leucemia mieloide crónica, cirrosis, fibrosis pulmonar, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardíaca, trastornos del sistema nervioso o lesiones cutáneas ⁸³.

I.4.1. Células madre

Las células madre, presentes en la mayoría de organismos multicelulares, son células indiferenciadas que poseen dos condiciones fundamentales. En primer lugar, la célula debe tener la propiedad de autorrenovación. Esto significa que tiene la capacidad de preservar su estado indiferenciado después de numerosos ciclos de división celular. En segundo lugar, debe cumplir el criterio de plasticidad, que hace referencia a la capacidad de diferenciarse, adoptando la expresión de un perfil genético que con el tiempo conduzca hacia un fenotipo celular específico ^{84,85}. Son esenciales para el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación de los tejidos y órganos. Obedeciendo a su potencial de diferenciación, las células madre se clasifican en cuatro grupos:

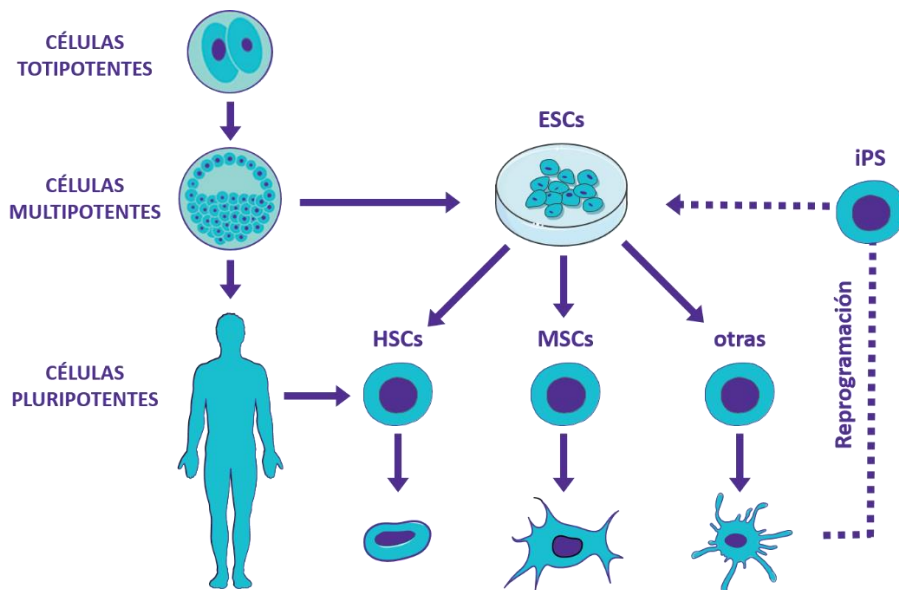


Figura 7. Potencial de diferenciación de las células madre. Representación adaptada de *Tewary y cols.* ⁸⁶. ESCs (células madre embrionarias), HSCs (células madre hematopoyéticas), MSCs (células madre mesenquimales), iPS (células madre pluripotentes inducidas).

Células madre totipotentes

Las células que pertenecen a este grupo son aquellas que se encuentran en los estadios iniciales del desarrollo embrionario: blastómeros, células de la mórula y cigoto. Este último constituye la célula madre totipotente por excelencia, formada mediante la unión del gameto masculino con el gameto femenino ⁸⁷. Tienen la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares que dan un organismo completo: tejido embrionario (ectodermo, mesodermo y endodermo) y tejido extraembrionario (placenta, amnios, saco vitelino, alantoides y corion).

Células madre pluripotentes

Poseen la capacidad de diferenciarse en cualquiera de las células correspondientes a los 3 linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), incluyendo las células sexuales o germinales que componen un

organismo adulto. Se localizan en la masa celular interna del blastocisto. Estas células pueden cultivarse *in vitro* dando lugar a las células madre embrionarias (ESCs, del inglés *Embryonic Stem Cells*), que se forman 7 días después de la fertilización.

Este tipo de células pueden ser obtenidas también mediante reprogramación genética, originando las células madre pluripotentes inducidas (iPS, del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*)⁸⁸.

- Células madre embrionarias (ESCs)

Derivan de la masa celular interna del blastocisto y tienen la capacidad de proliferar indefinidamente mientras se mantiene su pluripotencia y la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales y, por lo tanto, en cualquier tipo celular. Estas células pueden expandirse *in vitro* manteniendo su estado indiferenciado durante largos periodos de tiempo⁸³. Las ESCs humanas pueden usarse para tratar enfermedades como el Parkinson, la diabetes o lesiones de la médula espinal. Sin embargo, la utilización de las ESCs presenta importantes desventajas relacionadas con el problema ético planteado por la necesidad de destruir el embrión y la falta de seguridad en su uso por la formación de teratomas⁸⁹.

- Células madre pluripotentes inducidas (iPS)

Las iPS se desarrollan mediante la reprogramación de las células somáticas adultas en el laboratorio, obteniendo células desdiferenciadas con potencial de proliferación y diferenciación similares a las de las ESCs⁹⁰. Por razones éticas, y dado que las fuentes para obtener ESCs humanas son escasas, las células iPS se han utilizado principalmente para estudiar mecanismos de diferenciación y enfermedades con origen en el desarrollo, incluido el autismo y otros trastornos cerebrales.

En la actualidad existen dos procedimientos de reprogramación celular que han permitido desarrollar células madre con características similares a las ESCs. La primera técnica fue desarrollada en 1962 por el doctor *Gurdon*⁹¹ y es conocida como “*somatic cell nuclear transfer*”, también denominada clonación. Consiste en obtener el núcleo de una célula somática o célula diferenciada y trasplantarlo a un óvulo previamente enucleado. La segunda técnica fue desarrollada en el año 2006 por los doctores *Takahashi* y *Yamanaka*; se basa en la alteración genética de la célula adulta, introduciendo cuatro genes específicos de células madre (Oct3/4, Sox2, Klf4, y c-Myc), que son los responsables de controlar el proceso de diferenciación y, de esta manera, reprogramar la célula diferenciada hacia un estado de célula madre pluripotente⁹².

Células madre multipotentes

Las células madre multipotentes se encuentran en la mayoría de los tejidos y se diferencian en células de una única capa germinal. Es decir, las células madre multipotentes de un tejido mesodérmico no pueden producir células de una capa germinal diferente como el ectodermo o el endodermo⁹³. Se pueden obtener del feto (FSCs, del inglés *Fetal Stem Cells*) y de una gran variedad de tejidos como las células madre hematopoyéticas (HSCs, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) que derivan de la médula ósea, o las células madre mesenquimales, definidas también como las células del estroma mesenquimatoso (MSCs, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*)⁹⁴. La mayoría de las células madre adultas son células multipotentes.

- Células madre adultas (ASCs)

Las células madre adultas están presentes en tejidos y órganos adultos. Estas células son capaces de autorrenovarse, pero poseen una capacidad limitada de replicación en cultivo⁹³. Inicialmente se definieron como células multipotentes, sin embargo, años más tarde se observó que la potencialidad de algunos tipos de ASCs era mayor de lo esperado, con capacidad para diferenciarse en células

de diferentes linajes ⁸⁴. Algunas, como las MSCs y las HSCs son capaces de diferenciarse a diversos tipos celulares, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como las células madre de la piel o las células madre neuronales ⁹⁴.

Células madre unipotentes

A diferencia de los demás tipos de células madre, las unipotenciales, sólo pueden especializarse en un único tipo celular. En este grupo se incluyen las células madre musculares, las epidérmicas y las del resto de epitelios de revestimiento.

I.4.1.1. Células madre mesenquimales (MSCs)

Las MSCs fueron descubiertas por *Friedenstein* en el estroma de la médula ósea en la década de 1960. En aquella época, fueron descritas como células no fagocíticas, de aspecto fibroblástico y capaces de formar colonias adherentes, y se denominaron "unidades formadoras de colonias fibroblásticas" (CFU-F). Como resultado de su supuesta capacidad de autorrenovación y diferenciación, *Caplan* consideró por primera vez las células estromales derivadas de la médula ósea como células madre y las denominó MSCs ⁹⁵.

Las MSCs son células madre adultas presentes en la mayoría de los tejidos, habiéndose demostrado su presencia en la médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, la sangre periférica, el cordón umbilical, líquido amniótico, placenta, tejidos fetales, músculo esquelético, periostio, pulmones y líquido sinovial y cartílago ^{82,96}. Estas células pueden diferenciarse en diferentes tejidos como hueso, cartílago, piel o células del tejido adiposo ⁹⁴.

La sociedad internacional para la terapia celular y génica (ISCT) estableció en 2006 las características mínimas de identificación para las MSCs humanas ^{97,98}:

- a) Deben ser células adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.
- b) Deben expresar los marcadores de superficie específicos CD105⁺, CD73⁺ y CD90⁺, y no deben expresar el antígeno panleucocitario CD45⁻, el marcador progenitor hematopoyético y endotelial CD34⁻, los antígenos monocitos/macrófagos CD14⁻ o CD11b⁻, los antígenos linfocitos B CD79⁻ o CD19⁻, ni el antígeno leucocitario humano clase II antígeno (HLA)-DR⁻, para excluir la contaminación hematopoyética.
- c) Deben tener la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*.

La utilización de MSCs en medicina regenerativa presenta algunas ventajas en comparación con otros tipos de células madre. Su uso evita los problemas éticos derivados del uso de embriones y los problemas de seguridad relacionados con la formación de tumores en pacientes receptores de ESCs o iPS. Además, en trasplantes alogénicos, no activan las respuestas inmunitarias del huésped que generalmente son responsables del rechazo de las células y órganos implantados.

Las MSCs secretan un amplio espectro de factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas, factores antiinflamatorios y pro-angiogénicos, poseen funciones inmunomoduladoras y pueden activar la proliferación de las células madre endógenas. Por todo ello, las MSCs se han utilizado en multitud de estudios preclínicos y clínicos obteniéndose resultados prometedores en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, lesiones cerebrales y de la médula espinal, accidentes cerebrovasculares, diabetes, lesiones de cartílago y huesos, enfermedad de Crohn y enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), entre otras⁸².

Células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hASCs)

Las hASCs (del inglés *Human Adipose derived Stem Cells*) son células progenitoras multipotentes, indiferenciadas y autorrenovables que constituyen la fracción del estroma vascular del tejido adiposo. Muestran plasticidad de desarrollo de múltiples linajes como el cartílago, hueso o grasa, y comparten marcadores de superficie y el perfil genético con las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSCs, del inglés *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Las hASCs muestran la combinación de marcadores de superficie específica de células madre (CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD44⁺ y CD166⁺), y carecen de la expresión de los marcadores hematopoyéticos (CD45⁻ y CD34⁻).

El uso de las hASCs en terapia celular ofrece ciertas ventajas frente a otros tipos de MSCs^{99,100}:

- La facilidad de aislamiento de la grasa subcutánea mediante técnicas mínimamente invasivas como el lipoaspirado.
- La disponibilidad de hASCs en el tejido adiposo es muy superior que en la médula ósea. Comprenden aproximadamente el 2% de las células nucleadas en el lipoaspirado, en comparación con sólo el 0.001-0.004% en la médula ósea.
- Son genética y morfológicamente más estables en cultivos a largo plazo, con menor senescencia y mayor capacidad proliferativa.
- No muestran una correlación estadísticamente significativa entre la calidad y capacidad de proliferación de la línea celular, y la edad del paciente.

I.4.1.2. Mecanismos de acción de las MSCs

Las MSCs han sido objeto de una intensa investigación científica desde su descubrimiento inicial por *Alexander Friedenstein* a finales de la década de 1970. Sus importantes propiedades regenerativas, así como su aparente capacidad para alterar el microambiente en los tejidos lesionados ha motivado el desarrollo en los últimos años de múltiples estudios para analizar su potencial terapéutico en muchas enfermedades. Según datos del Instituto Nacional de la Salud (NIH) de los Estados Unidos, en 2020 se realizaron un total de 965 ensayos clínicos basados en las MSCs ¹⁰¹.

Dicho potencial terapéutico puede atribuirse a tres mecanismos clave de acción. El primero es la migración dirigida (**homing**), por el cual las células madre administradas por vía sistémica migran de manera dirigida al foco de la lesión debido a los gradientes de quimiocinas. El segundo mecanismo es la **capacidad de diferenciación** en múltiples tipos celulares, que se injertan localmente en los tejidos e inducen la restauración de su estructura y función. El tercer mecanismo de acción es la **función trófica** de las MSCs, llevada a cabo mediante la secreción paracrina de factores bioactivos que pueden modular los procesos fisiológicos locales y sistémicos ¹⁰².

Homing

El término *homing* describe la capacidad de las células madre para movilizarse de manera dirigida hacia los tejidos lesionados, lo cual es un mecanismo crítico para la organogénesis durante el desarrollo y para la homeostasis y la reparación en la edad adulta ¹⁰³. Este proceso de migración dirigida ocurre en respuesta a señales extracelulares producidas en el foco de la lesión, entre las que se encuentra la liberación de quimiocinas por parte de las células dañadas. El gradiente de quimiocinas liberado desde el lugar de la lesión atrae a las MSCs

trasplantadas, produciendo su migración mediante un proceso denominado quimiotaxis ¹⁰⁴.

La administración terapéutica de las MSCs se puede llevar a cabo de manera sistémica o local en el lugar de la lesión, razón por la cual es necesario distinguir los mecanismos del *homing* sistémico y no sistémico. En el *homing* no sistémico las MSCs se trasplantan localmente en el tejido dañado donde se dirigen al lugar de la lesión mediante el mencionado gradiente de quimiocinas ^{105,106}. El *homing* sistémico requiere el reclutamiento endógeno o el trasplante de MSCs dentro de la vasculatura de un tejido, seguido de la transmigración a través del endotelio para llegar al lugar de la lesión ^{107,108}. Se ha demostrado que la migración a los tejidos lesionados ocurre a través de un proceso similar al de la migración de leucocitos. Así, la quimioatracción está mediada por receptores de quimiocinas presentes en la superficie de las células madre. Aunque el mecanismo exacto de la interacción entre las células endoteliales y las células madre en el sitio objetivo no está bien establecido, parece que las integrinas y selectinas se encuentran implicadas en estas interacciones, que se desarrollan en los siguientes cinco pasos ¹⁰⁸:

Anclaje y rodado o *rolling*: las MSC expresan CD44⁺, que se adhiere a las selectinas expresadas por las células endoteliales, dando lugar a que la célula comience a rodar a lo largo de la pared vascular. Las selectinas implicadas en este proceso siguen siendo un área activa de investigación. *Rüster* y cols. demostraron que los anticuerpos anti-selectina P suprimen la unión de las MSCs a las células endoteliales, mientras que la selectina P inmovilizada es suficiente para inducir el *rolling* de las MSCs ¹⁰⁹. Sin embargo, las MSCs no expresan la glicoproteína ligando 1 de la selectina P (PSGL-1) para interactuar con la selectina P, por lo que algunos estudios sugieren que la galectina-1 o CD24 podría actuar como posible ligando de la selectina P en las hASCs.

Activación: esta fase ocurre gracias a los receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G, generalmente en respuesta a señales inflamatorias. El factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) liberado por las células endoteliales, se une al receptor de quimiocinas CXCR4 de las MSCs. Sin embargo, algunos investigadores sugieren que las MSCs no expresan CXCR4, por lo que deberían estar involucrados otros receptores como, por ejemplo, CXCR7.

Adhesión: las MSCs expresan la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), la cual se activa en respuesta a quimiocinas como SDF-1. Tras su activación, la integrina VLA-4 se une a la molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1) de las células endoteliales.

Transmigración endotelial (diapédesis): en esta etapa, las MSCs atraviesan la capa de células endoteliales y la membrana basal para alcanzar el espacio perivascular del tejido lesionado. Para ello, las MSCs secretan MMPs, que degradan la membrana basal endotelial en respuesta a las citocinas inflamatorias que sirven como señal para la migración hacia el tejido dañado.

Migración extravascular: finalmente, las MSCs migran al lugar de la lesión guiadas por señales quimiotácticas liberadas en respuesta al daño tisular. Estas señales incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB) o el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), y en menor medida, las quimiocinas RANTES (quimiocina expresada y secretada tras la activación de las células T normales), quimiocina derivada de macrófagos (MDC) y SDF-1.

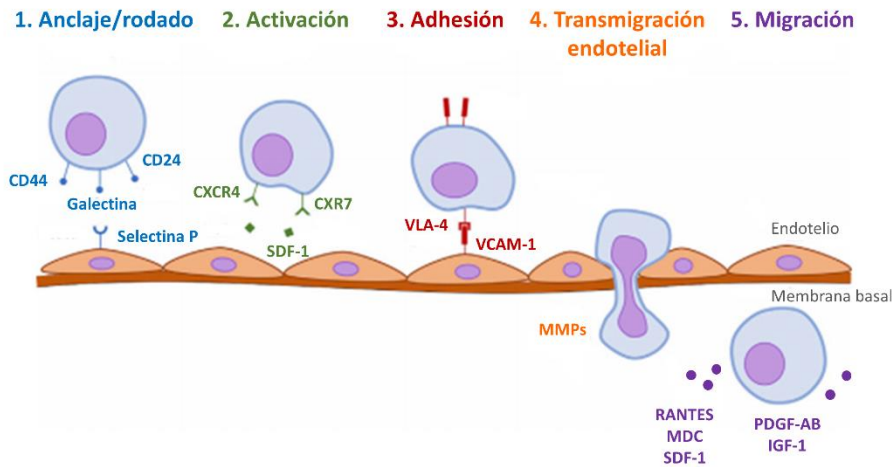


Figura 8. Descripción general de los mecanismos moleculares que facilitan cada etapa del *homing* sistémico en MSCs. Representación adaptada de Ullah y cols.¹⁰⁸.

Potencial de diferenciación

Aunque los diferentes tipos de MSCs comparten características fundamentales, deben ser consideradas como poblaciones heterogéneas, y sus propiedades y funciones de diferenciación pueden variar según la fuente celular y los métodos de aislamiento, cultivo y manipulación de las células^{110,111}.

Como se ha mencionado anteriormente, las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse a tipos celulares del linaje mesodérmico (adipogénico, osteogénico y condrogénico). Sin embargo, en ciertas condiciones de cultivo, que incluyen factores específicos inductores de la diferenciación, las MSCs también pueden adquirir las características propias de tipos celulares originados a partir de las demás capas germinales, como neuronas o fibroblastos, mediante un proceso de transdiferenciación¹¹².

Desde el primer descubrimiento del potencial de diferenciación de las MSCs, se han realizado multitud de ensayos para producir poblaciones de MSCs diferenciadas en hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo o estroma de

soprote hematopoyético, entre otros ¹¹³. El proceso de diferenciación en las células maduras específicas está controlado por diversas citocinas, factores de crecimiento, moléculas de matriz extracelular y factores de transcripción, siendo estos últimos los máximos responsables del aumento de la expresión de los genes encargados de la inducción y la progresión de la diferenciación celular ¹¹⁴. Por otro lado, los factores epigenéticos conducen a las MSCs a comprometerse con un linaje particular, al reprimir genes asociados con la diferenciación a linajes alternativos ¹¹⁵. Además, es fundamental considerar la influencia de su tejido de origen, su nicho. El nicho de células madre es un microambiente especializado que mantiene y regula el conjunto de células madre ¹¹⁶. Abarca todos los elementos que rodean inmediatamente a las células madre en su estado indiferenciado, incluyendo el resto de células, la matriz extracelular y las moléculas solubles que se encuentran en ese entorno ¹¹⁷.

Función trófica

La función trófica de las MSCs hace referencia a la capacidad funcional de estas células para producir un efecto reparador, bien mediante el contacto célula-célula o a través de la secreción paracrina de una amplia gama de moléculas bioactivas involucradas en las interacciones entre las propias MSCs o con el microambiente circundante ¹¹². El conjunto de estos compuestos producidos y liberados por las MSCs, conocido como secretoma, incluye proteínas solubles como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y hormonas, además se vesículas extracelulares (EVs) como los exosomas, cuerpos apoptóticos y micropartículas ¹¹⁸. Las moléculas bioactivas intervienen en diferentes procesos que favorecen la remodelación de los tejidos, como la proliferación celular, la quimiotaxis, la migración, angiogénesis, la inmunomodulación o la neuroprotección, ¹⁰⁴. La capacidad de secretar distintos factores bioactivos es específico de cada célula y depende de la fuente histológica de las MSCs, el microambiente circundante, e incluso de la edad de la persona. Todas estas

moléculas bioactivas pueden ser obtenidas en condiciones adecuadas de laboratorio; así, tras la correcta expansión *in vitro* de las MSCs, los factores bioactivos liberados al medio de cultivo pueden ser recogidos en el denominado medio acondicionado (CM, del inglés *Conditioned Medium*)¹¹⁹.

I.4.1.3. Factores de influencia en la eficacia de las MSCs

En los últimos años se han desarrollado gran cantidad de ensayos clínicos que han demostrado una buena tolerancia y seguridad en la terapia con MSCs, sin embargo, existen discrepancias con respecto a su eficiencia en el tratamiento de algunas enfermedades estudiadas. Este hecho puede deberse a la falta de procedimientos estándar para el aislamiento, cultivo, expansión y trasplante de las MSCs utilizadas en los ensayos clínicos, lo que dificulta las comparaciones y la reproducibilidad de los resultados. Además, es necesario seguir avanzando en la investigación para determinar y establecer protocolos acerca de la dosis óptima de células, el momento y la ruta de administración, el curso del tratamiento y el uso adecuado de coestimuladores para cada afección¹²⁰.

Tejido de origen

Las MSCs son poblaciones heterogéneas cuya eficacia biológica y fenotipo pueden variar según el tejido de origen o la edad de los donantes¹¹³. Tradicionalmente la fuente predominante de MSCs ha sido la médula ósea, pero con el paso del tiempo se han identificado otros tejidos de los que se pueden aislar las MSCs como el tejido adiposo, tejidos dentales, piel y prepucio, glándula salival o tejidos perinatales. Además, el número, la esperanza de vida máxima, y el potencial de diferenciación de las MSCs disminuyen con la edad, sin embargo, las MSCs derivadas de tejidos fetales tienen una alta capacidad de proliferación durante más tiempo. Algunos estudios han examinado el potencial adipogénico y osteogénico de las MSCs del cordón umbilical y han demostrado que las provenientes de la gelatina de *Wharton* y la arteria muestran mayor

diferenciación hacia linajes adipogénicos y osteogénicos, mientras que las células aisladas de la vena muestran una diferenciación más heterogénea siendo predominantemente adipogénica ¹¹³. Además, las MSCs derivadas de tejidos embrionarios y postnatal poseen mayor capacidad de diferenciación que las MSCs de tejidos adultos ¹²¹.

Protocolos de aislamiento celular

En segundo lugar, existe una falta de protocolos estandarizados para el aislamiento y expansión del cultivo. Las MSCs generalmente se aíslan como una población de células adherentes al plástico mediante protocolos de cultivo de explantes o mediante hidrólisis enzimática que degrada la MEC para aislarlas de los tejidos blandos. Se ha demostrado que el aislamiento celular mediante el cultivo de explantes proporciona poblaciones celulares más homogéneas que las obtenidas mediante procedimientos enzimáticos, probablemente debido a que las células están protegidas del estrés proteolítico y mecánico. Además, el aislamiento mediante explantes favorece la liberación de citocinas y factores de crecimiento al medio, reduce el tiempo de proliferación celular y permite la expresión simultánea de marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 y ausencia de CD14, CD31, CD34 y CD45 en todas las poblaciones de MSCs ¹¹³.

Expansión del cultivo

El número de células necesarias para su uso clínico (de 50 a 400 millones de células) es mucho mayor del que se puede aislar del tejido donante (0.01-0.001% de MSCs en médula ósea, por ejemplo), por lo que es necesaria la expansión del cultivo para obtener un número mayor de células. Sin embargo, las MSCs mantenidas en condiciones de cultivo estándar, alcanzan la senescencia después de un número limitado de divisiones, afectando a su capacidad de proliferación y potencial de diferenciación ¹²⁰. *Wagner* y cols. demostraron que las MSCs cultivadas durante 43-77 días mostraban anomalías

morfológicas, una reducción de la expresión de marcadores específicos y detención de la proliferación ¹²². También se ha relacionado la acumulación de ROS en los cultivos senescentes con una disminución de la adhesión en el injerto de MSCs trasplantadas ¹²³. Además, se ha sugerido que las alteraciones en la regulación de los mecanismos moleculares que mantienen a las MSCs en un estado quiescente, no proliferativo, puede producir carcinogénesis ¹²⁴.

Por otro lado, existen distintos factores que pueden afectar a la calidad de las MSCs durante su cultivo como la concentración de suero, la composición del medio, los sustratos de cultivo, la concentración de glucosa, la densidad de siembra celular, el número de pases, las concentraciones de O₂ y CO₂, el pH y la temperatura ¹¹³.

Tipo de medio de cultivo

El suero contiene factores de crecimiento y compuestos nutricionales necesarios para el mantenimiento de los cultivos, sin embargo, el suero es un compuesto xenogénico complejo con alta variabilidad entre lotes, riesgo de contaminación por patógenos y con efectos inmunizantes. Las MSCs previamente cultivadas en medios suplementados con suero bovino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) podrían contaminarse con proteínas bovinas causando una reacción inmunológica después del trasplante y su posterior rechazo ¹²⁵. Estas desventajas han hecho plantearse la seguridad del suero de origen animal y buscar alternativas como los derivados de sangre humana autóloga o alogénica, que incluyen el suero humano, lisado de plaquetas (hPL) y suero de sangre del cordón umbilical. Se ha observado que las MSCs cultivadas en suero humano muestran una mayor capacidad de proliferación en comparación con las cultivadas en FBS al 10%. Además, se ha demostrado que el hPL contiene factores de crecimiento que mantienen el potencial de diferenciación e inmunomodulador de las MSCs, junto con una tasa de proliferación significativamente mayor en comparación con las MSCs cultivadas

en FBS ¹¹³. Además de las ventajas en el uso de derivados de sangre humana en cuanto a la expansión de los cultivos, *Gottipamula* y cols. demostraron que el potencial de diferenciación de las MSCs también se ve aumentado con respecto al uso de FBS. Así, las BM-MSCs cultivadas en hPL muestran un mayor potencial de diferenciación condrogénico y osteogénico que las cultivadas en FBS, mientras que el potencial de diferenciación adipogénico es similar ¹²⁶.

Vía de administración

Existen diferencias en el efecto terapéutico de las MSCs según la vía de administración utilizada, que puede ser sistémica o local.

En general, la administración local es más ventajosa en la ingeniería de tejidos en combinación con biomateriales, aumentando el tiempo de supervivencia celular tras su administración. Además, el carácter invasivo del trasplante local no es factible para una aplicación clínica generalizada. De hecho, el tratamiento de determinados órganos de difícil acceso, como el corazón o el cerebro, a través de esta vía puede suponer un riesgo considerable.

En la administración sistémica, las MSCs son inyectadas en el sistema circulatorio y atraídas hacia el tejido dañado mediante gradientes químicos. Se trata de una vía de administración menos invasiva que la administración local, lo que permite prolongar el tiempo de tratamiento mediante la inyección reiterada de las MSCs. Además, el trasplante sistémico permite una mayor viabilidad celular y el mantenimiento de un secretoma estable. Sin embargo, muchas células no llegan al lugar de la lesión al quedarse retenidas en los órganos muy capilarizados como el pulmón, el bazo y el hígado, formando pequeños émbolos que pueden dañar la funcionalidad de esos órganos ^{105,123}.

Momento del tratamiento

Los resultados de los estudios en animales indican que la fase temprana de la lesión o las fases agudas y subagudas de las enfermedades pueden ser el momento óptimo para la terapia con células madre ¹²⁰. Así, *Behr* y cols., utilizando un modelo ovino de lesión inducida por isquemia y reperfusión, investigaron el efecto del injerto de MSCs autólogas inyectadas en la arteria renal para evaluar las consecuencias del trasplante celular en una fase tardía de la lesión. Los resultados mostraron que hubo un aumento significativo de estructuras tubulares y glomerulares cuando las células se inyectaron poco después de la lesión ¹²⁷. De manera similar, *De Vasconcelos dos Santos* y cols., utilizando un modelo de rata con isquemia cerebral focal, demostraron que hubo un aumento de las funciones sensorial y motora cuando las células fueron inyectadas un día después de la lesión ¹²⁸. Otros estudios, como los llevados a cabo por *Komatsu* y cols. con un modelo de infarto cerebral murino, sugieren que el momento de administración de las MSCs podría demorarse hasta un mes después del infarto ¹²⁹. En cualquier caso, dada la escasez de datos clínicos al respecto, es preciso disponer de un mayor número de evidencias sobre la influencia de los diferentes momentos de administración en la eficacia de las MSCs y la ventana terapéutica con estas células.

Dosis de administración

Existe una fuerte correlación entre el número de células trasplantadas y los resultados terapéuticos en el tratamiento de las distintas enfermedades ¹²⁰. *Henning* y cols. demostraron que el tamaño del infarto de miocardio disminuye al aumentar el número de células mononucleares de sangre de cordón umbilical humano trasplantadas ¹³⁰. En cualquier caso, la dosis óptima de células difiere en función del tipo de enfermedad y el estado del paciente, así como de otros factores ya comentados anteriormente, como el tipo, viabilidad y pureza de las MSCs, y la vía de administración celular, entre otros.

I.4.1.4. Limitaciones y riesgos de la terapia con MSCs

Las células madre interactúan con el microambiente específico que las rodea. Reciben y responden a las señales de su entorno inmediato para reaccionar a las necesidades cambiantes de los tejidos y para mantener su propia función ¹³¹. De hecho, está demostrado que las moléculas de señalización paracrina son primordiales para la migración y el injerto de las MSCs en el lugar de la lesión. El tejido lesionado muestra un microambiente pro-inflamatorio dañino, caracterizado por condiciones extremas de estrés oxidativo debido a la presencia de niveles altos de ROS, un pH bajo, baja tensión de O₂ y déficit de nutrientes ¹³². De este modo, el microambiente del huésped puede modular las propiedades y funciones biológicas de las MSCs, así como su capacidad terapéutica después de su administración ¹³³. Para ello, las MSCs deben sobrevivir el tiempo suficiente para migrar de manera eficaz al lugar de la lesión y ejercer plenamente sus funciones biológicas. Sin embargo, la mayoría de las células trasplantadas desaparecen en las primeras 24 horas y sólo el 1% sobreviven más de una semana después de la administración sistémica.

Por otro lado, en la actualidad, existen pocas evidencias de los efectos secundarios de la terapia con células madre, como la formación de granulomas o la inmunodeficiencia y, lo que es más importante, la bioseguridad a largo plazo. En este sentido, una de las mayores preocupaciones en este ámbito es el posible riesgo de tumorigénesis. Diversos estudios sugieren que las MSCs pueden contribuir a la progresión tumoral, al desarrollo de metástasis, e incluso a la resistencia al tratamiento ¹³⁴. *Cabarcas* y cols. han señalado que dicho estímulo de la progresión tumoral puede estar mediado por la secreción por parte de las MSCs de CXCL12, IL-6 e IL-8 ¹³⁵ o, como indican, *Davis* y cols., de factores como el inhibidor de la vía de señalización de TGF, Gremlin 1, que promueve un estado celular indiferenciado ¹³⁶.

I.4.2. Secretoma de las MSCs: propiedades terapéuticas

Desde que *Haynesworth* y cols.¹³⁷ descubrieron el secretoma, se han llevado a cabo multitud de estudios que han revelado que el beneficio terapéutico de las MSCs no sólo es atribuible a su capacidad de diferenciación, sino también a los factores que secretan. Se cree que el 80% del potencial terapéutico de las MSCs se debe a su actividad paracrina⁹⁶. Así, los productos paracrinos de las MSCs se consideran la alternativa al uso de las propias células en terapia regenerativa, lo cual ofrece las siguientes ventajas^{102,138}:

- Evita problemas de seguridad como la contaminación con células oncogénicas y la división celular no controlada. También evita problemas asociados con el trasplante de células vivas como la compatibilidad inmune, la posible tumorigenicidad, la formación de émbolos y la transmisión de infecciones.
- Los componentes del secretoma se pueden biomodificar y escalar a dosis específicas para obtener un producto final con mayor rendimiento. Además, se pueden almacenar y transportar de manera estable debido a su naturaleza no viva.
- El uso del CM es más económico y más práctico para la aplicación clínica.

Los factores tróficos secretados por las MSCs inducen la angiogénesis, reducen la apoptosis y la fibrosis, mejoran la supervivencia y diferenciación neuronal, estimulan la remodelación de la matriz extracelular, restringen la inflamación local y modulan la respuesta inmune¹³⁹ (tabla 4).

Tabla 4. Principales factores tróficos liberados por las MSCs y sus respectivos efectos terapéuticos. Tabla adaptada de Kot y cols. ¹⁰⁴.

FUNCIÓN	FACTORES TRÓFICOS
Inmunomodulación	IDO, PGE2, PDGF, HGF, IGF, IL-6, M-CSF, TGF- β 1,- β 2
Neuroprotección	BDNF, GDNF, NGF
Angiogénesis	VEGF-A,-C, HGF, ANGP-1,-2, bFGF, PDGF, IL-6, MMP-2, IGF, FGF, TGF- β 1, PIGF
Proliferación	VEGF, PDGF, HGF, FGF-2, bFGF, IGF-1
Migración	MMP-1,-2,-9, SDF-1, HGF, LIF, VEGF
Quimiotaxis	SDF-1, HGF, CSF, IGF, VEGF, LIF, M-CSF, G-CSF

1.4.2.1. Inmunomodulación

La inmunomodulación es la capacidad que tienen las MSCs para regular la actividad, proliferación y maduración de las células del sistema inmune innato y del adaptativo, mediante el contacto célula-célula y a través de la secreción paracrina de factores solubles ¹⁴⁰. La evidencia actual sugiere que las MSCs ejercen efectos inmunomoduladores variables sobre los mismos tipos de célula inmune dependiendo de los marcadores expresados en su superficie celular, la secreción de diversas citocinas y los niveles de estimulación del microambiente local ¹⁴¹. De este modo, las MSCs pueden desempeñar funciones pro-inflamatorias o anti-inflamatorias, dependiendo del estímulo recibido. Este comportamiento particular de las MSCs en presencia y ausencia de moléculas inflamatorias se denomina polarización de las MSCs ¹⁴². Así, su potencial terapéutico radica en el efecto supresor de la inmunidad del huésped, lo cual,

ofrece una opción de tratamiento prometedora para enfermedades autoinmunes, sepsis y GVHD.

Las MSCs poseen baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC) y carecen de expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras en la superficie celular (CD80⁻, CD86⁻ y CD40⁻) y, de este modo, escapan al reconocimiento de las células T. Esta característica permite utilizar las MSCs de manera segura para el entorno alogénico, sin riesgos potenciales de rechazo inmune ^{102,111}. Además, las MSCs también regulan la maduración de las células dendríticas, reduciendo la activación y proliferación de las células B e inhibiendo la proliferación y la citotoxicidad de las células NK ^{138,143}.

- Actividad pro-inflamatoria

Las MSCs muestran el fenotipo pro-inflamatorio cuando existen niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ) y el factor TNF- α . En esta situación, las MSCs producen quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α/β , RANTES, quimiocina (motivo CXC) ligando 9 (CXCL9) y CXCL10 dentro de su microambiente para activar las células T ^{142,144}.

- Actividad anti-inflamatoria

En su fenotipo anti-inflamatorio, las MSCs suprimen la respuesta inmune en microambientes ricos en citoquinas inflamatorias, como heridas, infecciones o trasplantes de órganos. Así, cuando existen altos niveles de IFN- γ y TNF- α , las MSCs producen moléculas y metabolitos inmunosupresores como PGE2, proteína del gen 6 del factor inducible de necrosis tumoral (TSG-6), lactato, ácido quinurénico y espermidina, que promueven la polarización de los macrófagos de un fenotipo pro-inflamatorio a uno anti-inflamatorio. Además, las MSCs mantienen a los macrófagos, monocitos y células dendríticas en un estado inmaduro o antiinflamatorio, evitando así la activación de las células T efectoras y promoviendo la formación de células T reguladoras (Treg). Las MSCs

también pueden ejercer efectos directos sobre las células T mediante la producción de moléculas inmunosupresoras, como el óxido nítrico (NO), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), PGE2, TGF- β , hemo oxigenasa 1 (HO-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1, también conocido como B7H1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y galectinas^{144,145}.

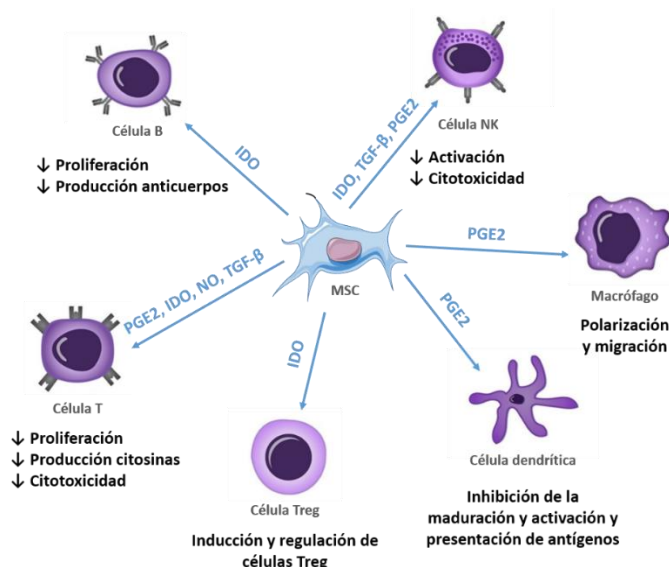


Figura 9. Efecto inmunosupresor de las MSCs en células inmunes. Inhibición de la proliferación de células T y B, inducción y regulación de las células Treg, polarización y migración de macrófagos, inhibición de la función de las células NK e inhibición de la maduración y activación de las células dendríticas. Los efectos inmunosupresores de las MSCs están mediados por factores solubles y el contacto célula-célula. Representación adaptada de *Gao* y cols.¹⁴³.

1.4.2.2. Propiedades anti-apoptóticas

La muerte celular programada es un proceso biológico fundamental que controla el desarrollo y crecimiento celular. Alteraciones de la apoptosis durante las enfermedades aumentan el daño celular y la inflamación¹⁴⁶. Las MSCs previenen la muerte celular programada mediante la restauración del

microambiente local, al producir proteínas inhibitoras de la apoptosis, como la proteína Bcl-2 (linfoma de células B2), la survivina y Akt (PKB, Proteína quinasa B), y al disminuir la expresión de proteínas pro-apoptóticas ¹⁰². La relación de Bcl-2 y la proteína X asociada a Bcl-2 (Bax) determina la sensibilidad de las células a un estímulo patológico. Bcl-2 predominantemente expresado evita la liberación de activadores de caspasa; por lo tanto, es menos probable que las células respondan a la señalización apoptótica y viceversa ¹⁴⁷. Por otro lado, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) previene la apoptosis mediante la regulación de la expresión de Bcl-2 y mediante la activación fosforilada de la quinasa de adhesión focal (FAK), una señal crítica de supervivencia que actúa suprimiendo la apoptosis mediada por p53 en células endoteliales vasculares.

Además de la capacidad de las MSCs para sintetizar proteínas que reprimen directamente la apoptosis, también pueden secretar citocinas que neutralizan la vía apoptótica.

I.4.2.3. Neuroprotección

La posibilidad de que las MSCs puedan diferenciarse en células del linaje neuronal y su capacidad para promover la neurogénesis y la supervivencia de células nerviosas en sistemas *in vitro* e *in vivo*, sugiere que la terapia basada en MSCs y su secretoma pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades neurológicas. Se ha demostrado que las MSCs pueden evitar la apoptosis neuronal *in vitro*, además de secretar factores neurotróficos que aumentan la supervivencia de las células neuronales, inducen la proliferación de células madre neuronales endógenas y promueven la regeneración de las fibras nerviosas en el lugar de la lesión ^{148,149}. *Crigler* y cols. correlacionaron la supervivencia y mejora del crecimiento de las neuritas con la actividad del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en experimentos de co-cultivo en la línea celular de neuroblastoma SHS-Y5Y ¹⁵⁰. Ensayos similares llevados a cabo

por Palomares y cols. demostraron el efecto neuroprotector del secretoma de las hASCs mediado por BDNF, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y TGF- β 1¹⁵¹. Además, el BDNF es un factor clave secretado por las MSCs de la gelatina de *Wharton* (en el cordón umbilical) que media el alargamiento axonal en las neuronas corticales e hipocámpales de rata¹⁰⁴. También se han realizado estudios para describir las subpoblaciones de MSCs que coexpresan neurotrofinas y otras potentes moléculas neuro-reguladoras, que contribuyen a la supervivencia de las células neuronales y la regeneración neural. Por ejemplo, las MSCs derivadas del cordón umbilical (hUCB, del inglés *Human Umbilical Cord Blood*) secretan varios factores inmunomoduladores y neurotróficos *in vitro*, como TGF- β 1, factor neurotrófico ciliar (CNTF), neurotrofina-3 (NT-3) y BDNF¹⁴⁹.

I.4.2.4. Regulación de la angiogénesis

La angiogénesis, proceso imprescindible en la curación de las heridas, se define como el proceso por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de unos preexistentes. Varios estudios han demostrado que las MSCs promueven la angiogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento como VEGF, HGF, FGF y SDF-1¹⁵², cuyo efecto es la inducción de la proliferación y migración de las células endoteliales, así como también previenen su apoptosis *in vitro*. Además de los factores estimuladores, las MSCs también secretan inhibidores de la angiogénesis. Recientemente, un extenso análisis proteómico del secretoma de las MSCs estimuladas con citocinas inflamatorias condujo a la identificación del inhibidor tisular de la MMP-1 (TIMP-1) como la molécula responsable de los efectos anti-angiogénicos de las MSCs¹⁰². Todos estos datos indican que las MSCs secretan un cóctel equilibrado de factores solubles que regulan la angiogénesis en función del microambiente.

I.4.2.5. Propiedades antioxidantes

Los procesos inflamatorios y la desregulación del metabolismo que se dan como consecuencia del daño celular, ocasionan una disminución de los antioxidantes endógenos y una reducción de la actividad de los enzimas catalizadores de las reacciones *redox*, lo que conlleva una acumulación de ROS. Este aumento en la producción de ROS conduce a un estado de estrés oxidativo que, finalmente, da como resultado un daño mitocondrial, el agotamiento de la adenosina trifosfato (ATP), el aumento de la peroxidación lipídica y la activación de las vías de muerte celular ¹⁵³.

Se ha observado que la terapia con MSCs y su secretoma reduce el estrés oxidativo durante los procesos inflamatorios a través de su actividad antioxidante. Actualmente, se ha propuesto que esta reducción se debe a la eliminación de radicales libres, mejora de las defensas antioxidantes del huésped, modulación de la respuesta inflamatoria o aumento de la respiración celular de las células del huésped ¹⁵⁴. Por ejemplo, se ha observado que la liberación por parte de las MSCs del IGF protege a los fibroblastos y a las células epiteliales intestinales de los radicales libres, el HGF protege el epitelio pigmentario de la retina contra el estrés oxidativo inducido por el agotamiento de GSH y la IL-6 reduce la muerte de las células epiteliales inducida por el peróxido de hidrógeno ¹⁵⁵.

Sin embargo, el mecanismo celular más importante para el control del estrés oxidativo se lleva a cabo a través del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes, anti-inflamatorias y detoxificantes ¹⁵⁶. En ausencia de estrés, Nrf2 se localiza en el citoplasma donde interactúa con la proteína de unión a la actina, la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1), lo que lleva a su ubiquitinación y degradación proteasomal ^{157,158}. Cuando los niveles de ROS son

elevados, Nrf2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo, donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE), iniciando la expresión de enzimas desintoxicantes y proteínas antioxidantes como NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), GSH, HO-1, SOD-1, GPx-1 y CAT ^{159,160}. En la actualidad, se han llevado a cabo diversos estudios que demuestran el efecto antioxidante de las MSCs a través de Nrf2, pero además, cada vez hay más evidencias de que los productos paracrinos de las MSCs pueden modular la respuesta antioxidante de las células diana. Así, *Zang* y cols. estudiaron el efecto de las EVs derivadas de MSCs y de fibroblastos dérmicos para analizar su efecto antioxidante en un modelo de lesión renal aguda en ratas, demostrando un aumento de Nrf2/ARE en las células del huésped únicamente con las EVs derivadas de las MSCs ¹⁵⁵. Por su parte, *Hong* y cols. han demostrado en un modelo de lesión de hígado en ratones que el CM derivado de ASCs cultivadas en hipoxia aumenta la expresión de Nrf2 en las células de ratón ¹⁶¹.

I.4.2.6. Remodelación tisular y propiedades anti-fibróticas

La fibrosis es una parte esencial del proceso de cicatrización de las heridas caracterizada por la formación y el depósito excesivo de matriz extracelular por parte de los fibroblastos, pericitos y miofibroblastos. En la gran mayoría de los casos, la fibrosis se desarrolla como consecuencia de una lesión epitelial o endotelial ¹⁶².

Las MSCs son capaces de remodelar el tejido dañado y acelerar el proceso de cicatrización de las heridas gracias a su capacidad para diferenciarse en queratinocitos, células epidérmicas, células endoteliales, pericitos y sebocitos de las glándulas sebáceas en la piel adyacente a la herida *in vivo*. Además, su actividad paracrina favorece la migración, el reclutamiento y la proliferación de queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos para acelerar el cierre de la herida ^{163,164}. Asimismo, el secretoma de las MSCs ejerce también un efecto anti-

fibrótico mediante una disminución de la acumulación de proteínas de la matriz extracelular ¹⁶⁵. De hecho, en el secretoma de las MSCs de ratas se han identificado 32 proteínas que regulan negativamente la expresión de factores fibróticos, como las MMPs, colágenos, TGF- β y proteínas Smad.

I.4.3. Estrategias para mejorar el potencial terapéutico

A pesar de la potencialidad de las propiedades terapéuticas de las MSCs, las principales dificultades encontradas en el tratamiento con esta población celular es mantener su viabilidad, propiedades y función antes y después de la implantación *in vivo*. Como se ha mencionado anteriormente, el microambiente adverso que existe en el lugar de la lesión puede reducir las propiedades y funciones biológicas de las MSCs. Por ello, es necesario potenciar las funciones de estas células para que puedan responder adecuadamente a los niveles altos de ROS, pH bajo, baja tensión de O₂ y déficit de nutrientes, característicos del microambiente del tejido dañado.

Se han propuesto dos enfoques principales para mejorar el potencial terapéutico de las MSCs con resultados prometedores: *i)* la ingeniería genética de genes funcionales y *ii)* el pre-acondicionamiento de las células con diversas moléculas bioactivas o con modificaciones en las condiciones de cultivo. El objetivo de estas estrategias es capacitar a las MSCs para hacer frente al citado microambiente adverso existente, de modo que se pueda aumentar su supervivencia celular, disminuir la apoptosis y facilitar la liberación de sus factores tróficos que lleven a cabo la acción inmunomoduladora y angiogénica que les caracteriza (figura 10).

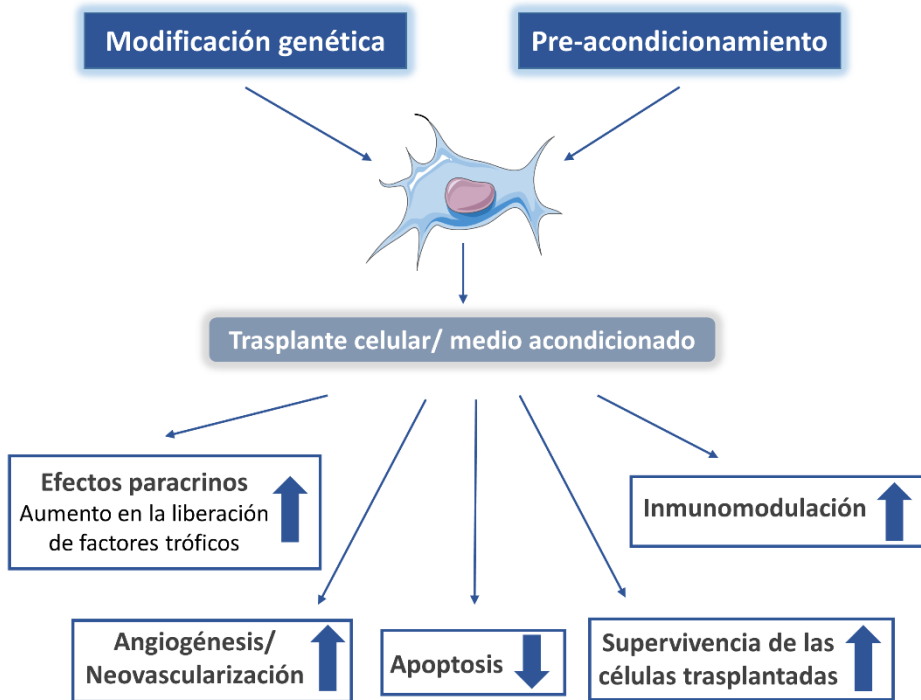


Figura 10. Efectos de la modificación genética y el pre-acondicionamiento de las MSCs. Esquema adaptado de Schäfer y cols.¹⁶⁶.

I.4.3.1. Modificación genética

La terapia génica es una rama de la medicina moderna que se define como la técnica experimental que introduce ADN exógeno en las células de un paciente o directamente *in vivo* para tratar una variedad de trastornos genéticos heredados o adquiridos. De este modo, se pueden transferir o transducir genes responsables de la supervivencia, la migración o las propiedades inmunomoduladoras, directamente en las propias MSCs para mejorar su potencial terapéutico¹³³. Para ello, existen métodos no virales (transfección) y virales (transducción) de manipulación genética. La técnica de la transfección utiliza métodos químicos o físicos para la incorporación del ADN que codifica el gen de interés. Se trata de una técnica sencilla, aunque existen ciertas

limitaciones debido a su baja eficiencia, a la posibilidad de perturbar las membranas celulares y nucleares, y a que es una técnica inadecuada para grandes poblaciones de células ¹³³. Además, el uso de agentes químicos puede provocar toxicidad. Una alternativa a los métodos no virales es la transducción. Esta técnica, explota la capacidad natural de los virus para infectar las células, lo que conduce a una expresión transgénica estable y a la preservación del transgen durante varios pases durante la división y diferenciación celular. Actualmente, los virus que se utilizan como vectores son los lentivirus, retrovirus, virus adenoasociados, adenovirus y baculovirus ^{167,168}. Aunque los vectores virales presentan una alta eficiencia de infección, su aplicación clínica actualmente es reducida debido a la posible transformación oncogénica, el riesgo patogénico y la inducción de respuestas inmunes ¹⁶⁸.

I.4.3.2. Pre-acondicionamiento

El pre-acondicionamiento es una de las principales estrategias propuestas para mejorar la función celular y las propiedades terapéuticas de las MSCs y, por tanto, la supervivencia en microambientes hostiles. El pre-acondicionamiento se fundamenta en el concepto biológico de la *hormesis*, entendida como una respuesta adaptativa de las células y los organismos a diferentes tipos de estrés ^{132,169}.

Las estrategias de pre-acondicionamiento en la terapia con células madre aumentan la tasa de supervivencia celular y el potencial de diferenciación, y mejoran los efectos paracrinos en la supresión de factores inflamatorios, respuestas inmunes y fibrosis. Estos efectos promueven la regeneración de órganos y tejidos y la recuperación funcional después de la implantación celular ¹⁷⁰. Actualmente, dichas estrategias se basan en la modificación de las condiciones de cultivo (hipoxia o anoxia), cultivos en 3D, adición de factores

tróficos (factores de crecimiento, citoquinas u hormonas), lipopolisacáridos, H_2O_2 , y agentes farmacológicos ¹⁶⁶ (figura 11).

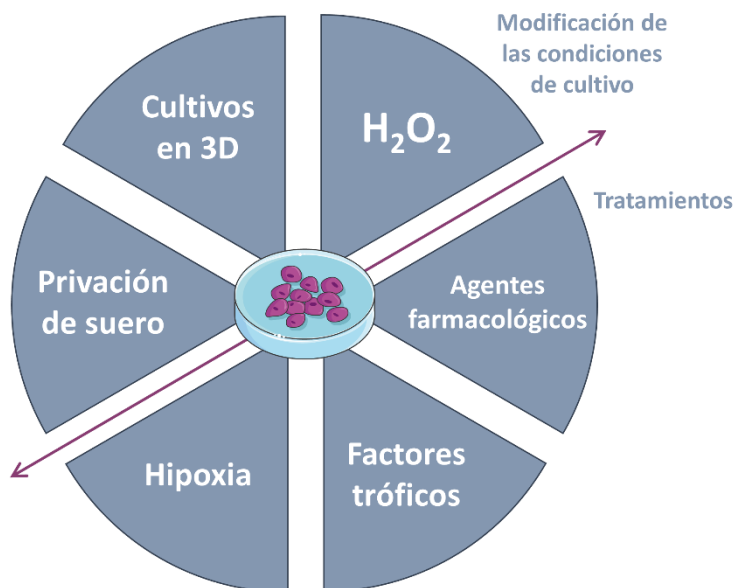


Figura 11. Estrategias de pre-acondicionamiento *in vitro* de las MSCs para aumentar su potencial terapéutico.

Los diferentes métodos de pre-acondicionamiento activan o suprimen diferentes señales moleculares y cascadas de transducción de señales, así como modifican la composición del secretoma celular.

- Hipoxia

La tensión de O_2 considerada como normóxica, en el cultivo celular *in vitro* es la de la presión atmosférica (21% de O_2), mientras que el término hipoxia, en el mismo contexto, se utiliza para referirse a las tensiones de O_2 comprendidas en el rango del 2 al 5%. Sin embargo, la tensión fisiológica en los tejidos *in vivo* puede variar desde un 1% en el cartílago y la médula ósea hasta un 12% en la sangre periférica; por lo tanto, el 21% de O_2 utilizado habitualmente para el cultivo *in vitro* de las MSCs es mucho mayor que la tensión fisiológica de O_2 ¹⁰¹.

Así, se ha demostrado que las condiciones de cultivo de las MSCs en normoxia pueden disminuir su actividad proliferativa, provocar una senescencia temprana y daños en el ADN, además de afectar a sus funciones, como su capacidad de diferenciación y de respuesta ante la inflamación ¹⁷¹. De este modo, una concentración adecuada de O₂ puede mejorar las propiedades y el crecimiento de las MSCs y el efecto trófico de su secretoma ¹⁰².

Numerosos estudios han demostrado que el cultivo celular en condiciones de hipoxia mejora el potencial regenerativo de las MSCs. De hecho, el pre-acondicionamiento con hipoxia induce cambios metabólicos en las MSCs que favorecen la supervivencia celular, el mantenimiento de la homogeneidad, el potencial de diferenciación, el aumento de la expresión de los receptores de quimiocinas y el retraso del proceso de envejecimiento celular *in vivo* después del trasplante ¹²⁵. Bajas concentraciones de O₂ también aumentan el potencial angiogénico e inducen la expresión de genes involucrados en la migración (por ejemplo, CXCR4, CXCR7 y SDF-1), principalmente regulados por la actividad del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) ¹⁶⁶. A su vez, la activación de HIF induce la síntesis de promotores de la vascularización como VEGF y la angiotensina. *Zang y cols.* observaron en un modelo de lesión renal aguda en rata, que el pre-acondicionamiento con hipoxia conduce a un aumento de los niveles de VEGF, bFGF y Akt, factores implicados en la mejora de los efectos antioxidantes, anti-apoptóticos y pro-angiogénicos de las MSCs ¹⁷². Asimismo, *Jun y cols.* han observado que el secretoma de las MSCs pre-acondicionadas con hipoxia, muestran niveles más altos de VEGF y TGF- β , lo que conduce a una mayor proliferación celular y migración de los fibroblastos dérmicos ¹⁷³.

- Cultivos en 3D

En general, el cultivo celular convencional se realiza como un sistema bidimensional (2D), en el que las células crecen en monocapa; sin embargo, es un ambiente altamente artificial, deficiente en interacciones de tipo célula-

célula o extracelulares, lo que conlleva una disminución en la proliferación celular, así como en el rendimiento terapéutico. El cultivo 3D, en el que las células se organizan formando esferoides, surge como una alternativa para simular las condiciones reales de las células *in vivo* y mejorar su potencial terapéutico. Los esferoides son estructuras multicelulares en las que las células adherentes se ven obligadas a agregarse entre sí mediante un sistema de cultivo en suspensión ¹³³.

Al comparar los cultivos tradicionales 2D con los cultivos 3D, se ha observado que en los esferoides: *i*) aumenta la expresión de moléculas de la MEC como la E-cadherina, fibronectina y laminina; *ii*) mejora la capacidad proliferativa y de supervivencia; *iii*) altera la preferencia de diferenciación; y *iv*) aumenta el nivel de secreción de factores tróficos asociados con la inflamación y vascularización ^{101,133}. Además, se ha demostrado que el CM derivado de esferoides de MSCs inhibe la producción de TNF- α , CXCL2, IL-6, IL-12p40 e IL-23 en los macrófagos estimulados por lipopolisacáridos y estimula una mayor producción de PGE2 ¹⁰². Otros estudios realizados en ratones por *Bartosh* y cols., han demostrado que las MSCs de esferoides formados mediante la técnica “*hanging-drop*” expresan niveles más altos de la proteína anti-inflamatoria TSG-6 y de estancalcalcina-1 (STC1), una proteína anti-apoptótica ¹⁶⁶.

Sin embargo, este tipo de cultivo celular presenta ciertos inconvenientes. Debido a su estructura esferoidal, la difusión de nutrientes, oxígeno y desechos a través del interior de los esferoides se ve comprometida de manera dependiente del tamaño. Este hecho puede contribuir a una expresión genética determinada en las MSCs, pero también puede comprometer la viabilidad de las células en el núcleo del esferoide, especialmente en condiciones adversas ¹⁷⁴.

- Adición de factores tróficos

La estimulación de las MSCs con factores tróficos como los factores de crecimiento EGF, GDNF e IGF-1, la citocina pro-inflamatoria TNF- α , la quimiocina SDF-1 (CXCL12) u hormonas como la angiotensina II, ha demostrado mejorar la capacidad regenerativa o las funciones paracrinas de las MSCs ¹⁶⁶. Por ejemplo, el pre-acondicionamiento de las MSCs con EGF estimula la secreción de VEGF, HGF, factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF), IL-6 e IL-11. Dicha secreción de VEGF y HGF resulta relevante ya que juegan un papel fundamental en la curación acelerada de heridas mediada por las MSCs, a través de la inducción de la angiogénesis y la mejora del suministro de oxígeno a los tejidos isquémicos. Además, *Herrmann* y cols. han demostrado que el pre-acondicionamiento con TGF- β también estimula la producción de VEGF *in vitro*, efecto que se ve incrementado si dicho pre-acondicionamiento se realiza en hipoxia o en combinación con TNF- α ^{101,166}. La presencia de este último factor, además de incrementar su actividad angiogénica, aumenta la proliferación, la migración y la diferenciación osteogénica de las MSCs a través de la regulación positiva de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2). Del mismo modo, la actividad regenerativa de las MSCs puede ser estimulada por lipopolisacáridos o agonistas de receptores tipo toll (TLR), mediante la inducción de la producción de factores paracrinos ¹⁰².

Por otro lado, el pre-acondicionamiento de las MSCs con hormonas como la melatonina, induce también la expresión de VEGF, HGF y FGF-2, y aumenta la supervivencia de las MSCs después del trasplante en un modelo de lesión renal aguda ¹⁶⁶.

- Agentes químicos

Se ha utilizado un amplio número de agentes químicos para el pre-acondicionamiento de las MSCs, alguno de ellos de uso farmacológico. Por

ejemplo, la atorvastatina, un agente hipolipemiente, mejora la expresión de CXCR4 y estimula la migración de las MSCs. La curcumina, un agente procedente del rizoma de la cúrcuma, muestra potentes propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Por otro lado, el diazóxido, un agente que permite la apertura de canales de potasio sensible al ATP mitocondrial, protege a las células del estrés oxidativo al regular la expresión de FGF-2 y HGF ¹⁶⁶. La antimicina y la rotenona, dos inhibidores mitocondriales, estimulan la secreción de factores pro-angiogénicos y anti-apoptóticos, como VEGF y HGF.

- Privación de nutrientes

Para promover la proliferación y el metabolismo celular *in vitro*, los medios de cultivo contienen aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero. Sin embargo, el microambiente que encuentran las células después de la implantación se caracteriza por un escaso aporte de nutrientes ¹⁷⁵.

Moya y cols., observaron que las MSCs cultivadas en ausencia de nutrientes entran en un estado quiescente que, a largo plazo, favorece su viabilidad en entornos isquémicos ¹⁷⁶. En este sentido, el pre-acondicionamiento mediante la privación de nutrientes tiene como objetivo reducir la demanda de energía de las MSCs, manteniéndolas en un estado de reposo, lo que facilita su supervivencia en entornos isquémicos ¹⁷⁷. Así, mientras la ausencia de suero durante periodos largos de tiempo produce un suministro restringido severo y prolongado de nutrientes, lo que conlleva la disfunción mitocondrial (debida a la liberación de citocromo C) y la muerte celular (debida a un aumento de la actividad de caspasa-3), la ausencia de suero durante periodos cortos de tiempo, permite mantener una morfología celular normal y una mayor viabilidad, tasa proliferativa y capacidad de diferenciación de las MSCs ¹⁷⁸. En este sentido, *Moya y cols.*, observaron que las MSCs cultivadas en ausencia de nutrientes entran en un estado quiescente que, a largo plazo, favorece su viabilidad en entornos isquémicos ¹⁷⁶.

- Tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El estrés oxidativo mediado por ROS es una de las principales causas de la apoptosis y muerte celular de las MSCs después del trasplante. Es por ello que se han realizado diversos estudios en los que se plantea que el pre-acondicionamiento con pequeñas concentraciones de H₂O₂ y durante un corto periodo de tiempo, podría facilitar la adaptación de las células al estrés oxidativo causado por altas concentraciones de ROS en los tejidos lesionados. Este proceso adaptativo ocurre gracias a la liberación transitoria de ROS en las mitocondrias de las MSCs, que activa las quinasas ERK. A su vez, la vía ERK promueve la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-X¹⁷⁷. En este sentido, en un estudio previo, hemos demostrado que las hASCs pre-acondicionadas con H₂O₂, aumentan su supervivencia en condiciones de estrés oxidativo a través de la sobreexpresión de Nrf2 y el incremento de enzimas relacionadas (HO-1, SOD-1, GPx-1 y CAT)¹⁷⁹. Además, el cultivo de la línea celular HOGd con el CM derivado de las hASCs pre-acondicionadas con H₂O₂ y/o su co-cultivo, disminuye los niveles de ROS y aumenta la capacidad antioxidante de las HOGd¹⁸⁰.

Por otro lado, *Pendergrass* y cols., demostraron que el pre-acondicionamiento de las MSCs con H₂O₂ induce la neo-angiogénesis, disminuye la fibrosis miocárdica y mejora la función cardíaca de los ratones¹⁸¹. Asimismo, *Zhang* y cols. observaron que dicha mejoría está correlacionada con valores más altos de VEGF, HGF e IL-6¹⁷².

I.4.4. Las hASCs como estrategia terapéutica en el fotoenvejecimiento

Las MSCs poseen muchas propiedades que las convierten en una modalidad de terapia celular prometedora en dermatología. Su capacidad regenerativa a través de su función paracrina sobre las células dérmicas, sus propiedades pro-angiogénicas y su protección frente al estrés oxidativo, está generando un gran

interés en este campo ¹⁸². Además, existe una especial atención a las características inmunológicas de las MSCs para uso terapéutico, especialmente en pacientes con afecciones cutáneas inflamatorias y con el sistema inmune debilitado, en los que han fallado otras terapias. Por otro lado, también ha sido explorado su papel en el ámbito de la estética, donde se ha observado una reducción de las arrugas provocadas por el fotoenvejecimiento ¹⁸³.

Como se ha indicado anteriormente, las hASCs poseen una serie de ventajas con respecto al uso de otras fuentes de células madre, como su facilidad de aislamiento, abundancia en el tejido de origen o una mayor capacidad proliferativa *ex vivo*, ofreciendo una alternativa muy prometedora en la reparación y regeneración de los tejidos ¹⁸⁴. Recientemente, se ha demostrado que las hASCs, a través de su función paracrina, aportan diversas ventajas a tener en cuenta en el abordaje terapéutico del fotoenvejecimiento. Así, *Park* y cols. han observado en modelos murinos que el CM de las hASCs estimula tanto la síntesis de colágeno como la migración de los fibroblastos dérmicos, lo que acelera la cicatrización de heridas en modelos animales ¹⁸⁵. Este medio también protege a los fibroblastos dérmicos del estrés oxidativo inducido por la radiación UV-B ¹⁵⁵. Por ejemplo, la IL-6 atenúa el estrés oxidativo mediante la activación del transductor de señal y el activador de la transcripción 3 (STAT3), la vía antioxidante de Nrf2 y regulando la Mn-SOD ¹⁸⁶. Por otro lado, *Palomares* y cols. demostraron que la capacidad antioxidante del CM de las hASCs es 1.8 veces superior a la del medio estándar ¹⁵¹. *Jeong* y cols. investigaron el uso de cultivos de fibroblastos humanos y hASCs para disminuir las arrugas de la piel fotoenvejecida en un modelo de ratón. Descubrieron que cuando se inyectaban las hASCs en la arruga, aumentaba la densidad de colágeno y la expresión de tropoelastina y fibrilina-1 en la dermis ¹⁸⁷. *Choi* y cols. comprobaron que los exosomas derivados de las hASCs suprimen la sobreexpresión de MMP-1

causada por la radiación y aumentan la expresión de colágeno I, II, III y V, y elastina en fibroblastos dérmicos ¹⁸⁸.

Todos estos datos tan prometedores justifican la necesidad de continuar investigando sobre la utilidad de las hASCs en el abordaje del fotoenvejecimiento, así como en posibles mecanismos moleculares que incrementen su capacitación terapéutica. En este sentido, el pre-acondicionamiento de las hASCs puede suponer una nueva estrategia para mejorar las propiedades biológicas que permitan paliar el envejecimiento prematuro de la piel.

II. Hipótesis y objetivos

La utilización de las hASCs se ha propuesto como nueva terapia celular en dermatología, en particular frente al fotoenvejecimiento. Estas células poseen importantes propiedades citoprotectoras y de reparación celular, ejercidas tanto por acción directa como por su efecto paracrino. Se han planteado diferentes estrategias de pre-acondicionamiento *in vitro* de las hASCs para mejorar dicho efecto paracrino, dirigidas a la modulación de la respuesta inflamatoria y a la limitación de la producción de fibrosis.

En este contexto, y teniendo en cuenta el relevante papel que el estrés oxidativo juega en la respuesta inflamatoria dérmica inducida por la radiación UV-B, en este trabajo se plantea la siguiente **Hipótesis**:

El medio acondicionado (PC/CM) de las hASCs pre-acondicionadas con dosis bajas de H₂O₂ ejerce un efecto fotoprotector sobre los fibroblastos dérmicos frente a la radiación UV-B.

Para demostrar esta hipótesis, se plantean los siguientes **Objetivos**:

1. Analizar el efecto de la radiación UV-B sobre el nivel de estrés oxidativo y la actividad biológica de los fibroblastos dérmicos y de las hASCs.
2. Evaluar la influencia del pre-acondicionamiento con H₂O₂ sobre las propiedades del cultivo de las hASCs.
3. Analizar el efecto del pre-acondicionamiento con H₂O₂ sobre la respuesta adaptativa frente al estrés oxidativo inducido por la radiación UV-B en las hASCs.
4. Analizar el efecto del PC/MC sobre la actividad biológica de los fibroblastos dérmicos.
5. Evaluar el efecto fotoprotector del tratamiento con PC/CM en la respuesta de los fibroblastos dérmicos a la radiación UV-B.

III. Capítulo 1

Respuesta de los HFFs y las hASCs a la radiación UV-B

La radiación UV es el principal factor etiológico del fotoenvejecimiento de la piel. Específicamente, la radiación UV-B puede atravesar la epidermis alcanzando la dermis e hipodermis, donde se localizan los fibroblastos dérmicos y las hASCs respectivamente ²⁰. Los fibroblastos son las células encargadas de sintetizar el componente fibrilar de la MEC y, por tanto, del mantenimiento de su equilibrio metabólico ¹⁸⁹. Por este motivo, la irradiación *in vitro* de fibroblastos con UV-B, con la consecuente inducción de estrés oxidativo en dichas células, se ha establecido como un modelo experimental para el envejecimiento cutáneo extrínseco ²⁰.

Por otro lado, la terapia celular con hASCs posee un gran potencial para el tratamiento del fotoenvejecimiento debido a las propiedades inmunomoduladoras, anti-inflamatorias, anti-fibróticas y antioxidantes de dichas células. Sin embargo, es preciso caracterizar de forma previa su respuesta frente al estrés oxidativo para poder valorar adecuadamente su potencial terapéutico en este ámbito.

En este capítulo se analiza la respuesta *in vitro* a la radiación UV-B de los fibroblastos dérmicos y las células hASCs. En primer lugar, se establece un modelo de irradiación *in vitro* con UV-B y se analiza el efecto de dosis crecientes de radiación para determinar las intensidades adecuadas de trabajo que se utilizarán en los siguientes experimentos que se describen en este capítulo. A continuación, se analizan los distintos parámetros biológicos relacionados con el fotoenvejecimiento.

III.1. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.1. Células, mantenimiento y conservación de los cultivos

Células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hASCs)

Las hASCs de origen humano fueron donadas por HistoCell S.L. (Parque Científico-Tecnológico de Zamudio, Vizcaya, España) para la realización de este estudio (figura 12). Fueron aisladas a partir de muestras de tejido adiposo procedentes de lipoaspirados, obteniéndose un *stock* de células que posteriormente se almacenó a -180°C en nitrógeno líquido. Mediante la expansión en cultivo de estas células, se obtuvo una reserva de material biológico suficiente para completar el estudio.



Figura 12. Imagen de contraste de fases de un cultivo de hASCs en frasco de 175 cm².

Dado su carácter de línea celular de proliferación limitada y con el fin de garantizar la experimentación en condiciones adecuadas de cultivo, se estableció el pase siete como límite máximo de subcultivo.

Fibroblastos humanos de origen dérmico (HFFs)

Las células utilizadas para analizar el efecto de la radiación UV-B fueron fibroblastos aislados a partir de prepucio humano (HFFs, *Human Foreskin Fibroblasts*; figura 13). El aislamiento y expansión de los HFFs fue realizada también por Histocell S.L., y donadas para la realización de este trabajo. Del mismo modo que en el caso anterior, se procedió a la expansión en cultivo de estas células en número suficiente para la realización del estudio. Se estableció también como límite máximo de subcultivo el pase siete.

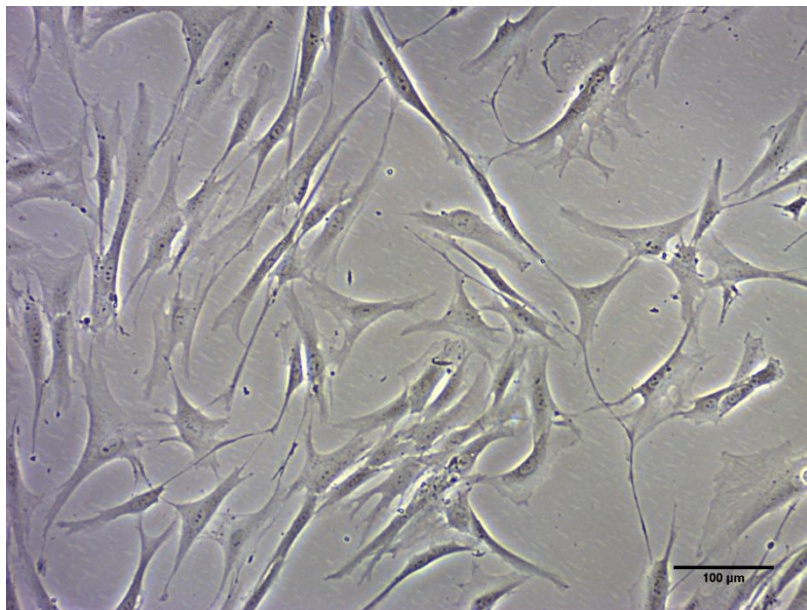


Figura 13. Imagen de contraste de fases de un cultivo de HFFs en frasco de 175 cm².

Mantenimiento y conservación de los cultivos

El stock y los viales donados se conservaron almacenados a -180°C en un tanque de nitrógeno líquido y a -80°C en un ultracongelador MDF-U52V (*Sanyo Electric Biomedical Co, Osaka, Japón*). Para el establecimiento de los cultivos, los viales almacenados se descongelaron en el baño termostático a 37°C . La manipulación de los cultivos se realizó en una cabina de flujo laminar vertical VP-100 (*Telstar, Madrid, España*).

La siembra inicial de las células se estableció en frascos de cultivo de 175 cm^2 de superficie (*Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Alemania*) a una densidad de 2×10^3 células/ cm^2 en medio completo. Este medio está compuesto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco® de Life technologies™, Waltham, MA, EE.UU.*), suplementado con piruvato sódico 1 mM (*Gibco® de Life technologies™, Waltham, MA, EE.UU.*), 1% glutamax (*Gibco® de Life technologies™, Waltham, MA, EE.UU.*), penicilina-estreptomicina 100 U/ml y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (*Lonza, Verviers, Bélgica*), y 10% de suero bovino fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum, Biochrom AG, Berlin, Alemania*).

Los cultivos se mantuvieron incubados en atmósfera húmeda a 37°C y un 5% de CO_2 (*CO₂ incubator MCO-18AIC, Sanyo Electric Biomedical Co, Osaka, Japón*). El medio de crecimiento se reemplazó cada dos días y se mantuvo la incubación para la expansión del cultivo.

Alcanzado el estado de semiconfluencia (80-90% de la superficie del frasco de cultivo ocupada) se realizó el subcultivo. Para ello, las células se despegaron con un tratamiento de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (tripsina-EDTA, *Gibco® de Life technologies™, Waltham, MA, EE.UU.*) al 0.05% durante 5 minutos a 37°C . La suspensión celular obtenida se diluyó al 50% con tampón fosfato en solución salina (PBS, *Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich® Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*) y con un 10% de FBS para detener la reacción

de la tripsina-EDTA. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 250 g (*Heraeus Labofuge 400R, Hanau, Alemania*) a 20°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el volumen de medio completo necesario para poder realizar un conteo óptimo (30-60 células/campo). El recuento celular se realizó en un hemocitómetro *Bürker (Blau-Brand®, Wertheim, Alemania)*, estimando la viabilidad celular por el método de exclusión del Azul Tripán (*Gibco® de Life technologies™, Grand Island, NY, EE.UU.*). Por último, se estableció de nuevo el cultivo, continuando la expansión celular de las densidades indicadas anteriormente.

Congelación de las células

Una vez realizada la expansión del cultivo se procedió a obtener un *stock* celular suficiente para cubrir las necesidades de experimentación. Para ello, a partir de los cultivos en semiconfluencia se obtuvo un *pellet* de células que fue resuspendido en medio completo para realizar el recuento celular y ajustar el volumen de congelación a una densidad de 10⁶ células/críoial en 1 ml de solución de congelación, compuesta por un 90% de FBS y un 10% de dimetil sulfóxido (*DMSO, Sigma-Aldrich® Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*). Los críoiales se trasladaron en un contenedor para congelación sumergido en propanol (*Mr. Frosty, Nalgene® Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.*) directamente al ultracongelador a -80°C. Este sistema permite atenuar la velocidad de enfriamiento, produciendo una congelación gradual desde la temperatura ambiente hasta -80°C.

Siembra de la suspensión celular en placa

Las células fueron sembradas en placas de 96, 24 (*Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Alemania*) y 6 pocillos (*Corning™, Corning, NY, EE.UU.*), o bien en insertos de cultivo de 2 pocillos (*Ibidi Cells in Focus, Planegg, Alemania*), cámaras de cultivo de 8 pocillos (*Ibidi Cells in Focus, Planegg, Alemania*) y

cubreobjetos de 12 mm de diámetro (*Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.*) a las densidades indicadas en la tabla 5. El tiempo de adhesión a la superficie del pocillo fue de 2.5 horas.

En todos los casos se utilizaron células con un mínimo de tres y un máximo de siete pases desde la descongelación, a excepción del control positivo en el estudio de senescencia celular.

Tabla 5. Densidad celular, tanto de HFFs como de hASCs, sembrada en los distintos soportes de cultivos utilizados en la experimentación.

Soporte de siembra	Superficie de cultivo (cm ²)	Volumen de siembra (μl)	Densidad celular (células/pocillo)
Placa de 96 pocillos	0.29	100	1×10^4
Placa de 24 pocillos	1.82	200	6.2×10^4
Placa de 6 pocillos	9.5	1.000	3×10^5
Placa con inserto de silicona de 2 pocillos	0.22	70	7×10^3
Cámaras de cultivo de 8 pocillos	1.00	200	3×10^4
Cubreobjetos	1.13	200	7×10^3

III.1.2. Modelo de irradiación *in vitro* con UV-B

Para establecer el modelo de irradiación *in vitro* con UV-B (figura 14), se procedió a la siembra de los cultivos en placa a las densidades indicadas previamente, seguida de un período de incubación de 24 horas. El soporte de siembra elegido dependió del parámetro a analizar.

Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo, se procedió a un lavado con PBS y se añadió PBS fresco en un volumen igual al volumen de siembra. Se procedió a la irradiación de los cultivos utilizando una

lámpara UVLM-26 (*Ultra-Violet Products, Cambridge, Reino Unido*) según las condiciones que se especifican a continuación:

- Longitud de onda: 302 nm
- Distancia fuente-placa de cultivo: 15 cm
- Irradiancia: 516 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
- Intensidad: 0-100 mJ/cm^2 . Los diferentes valores de intensidad se calcularon según la siguiente fórmula:

$$H = E \times t$$

donde “H” es la exposición a la radiación en J/cm^2 , “E” es la irradiancia en W/cm^2 y “t” el tiempo de exposición en segundos ¹⁹⁰.

Tras la irradiación de las células, se substituyó el PBS por medio completo y se mantuvieron los cultivos durante los tiempos establecidos para cada uno de los ensayos a realizar.

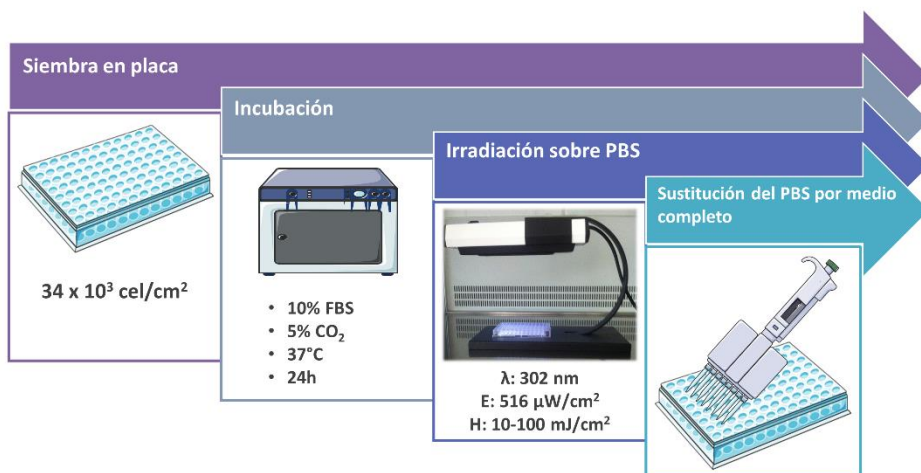


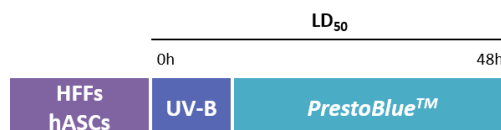
Figura 14. Esquema del proceso de irradiación *in vitro* con UV-B.

III.1.3. Determinación del efecto de la radiación UV-B sobre los HFFs y las hASCs

III.1.3.1. Evaluación de la viabilidad celular y cálculo de la dosis letal 50 (LD₅₀)

La viabilidad celular se cuantificó según el método colorimétrico del *PrestoBlue*[®] (PB, *Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.*). El compuesto activo del PB es la resazurina, un compuesto no tóxico, permeable a las células y de color azul no fluorescente. Al entrar en las células vivas, la resazurina se reduce a resorufina, que emite fluorescencia roja muy brillante o rosa, permitiendo así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad mediante una lectura colorimétrica o fluorimétrica¹⁹¹. La técnica del PB no produce lisis celular, lo que permite seguir la cinética de crecimiento de una misma muestra de células. Para este ensayo las células fueron tratadas con PB a una concentración final del 10% (v/v) sobre el medio de cultivo. Como blanco se utilizó medio completo sin células, para corregir los valores de absorbancia de las muestras.

Las experiencias se realizaron a partir de una siembra de 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo (5 réplicas por muestra). Tras 24 horas, se sustituyó el medio de cultivo por PBS y las células se irradiaron a dosis crecientes de radiación UV-B (0-80 mJ/cm²). Inmediatamente después de la irradiación, se sustituyó el PBS por medio completo y se incubó el cultivo durante 48 horas. Tras el periodo de incubación, se añadió PB durante 3 horas a 37°C y se midió la densidad óptica de las muestras en el lector de placas multiparamétrico *Synergy*TM *HT System*, (espectrofotómetro, *Biotek, HT Synergy, Winooski, VT, EE.UU.*) a 570 nm y 600 nm.



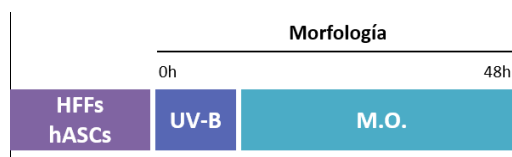
El cálculo de la LD₅₀ (dosis de irradiación que ocasiona la muerte del 50% de la población celular) se realizó a partir de una curva de las intensidades de irradiación (representada en el eje X) y los valores de absorbancia (en el eje Y), siguiendo un modelo de regresión exponencial negativo; en dicho modelo, la viabilidad celular disminuye de forma exponencial en función de la intensidad de irradiación según la siguiente ecuación ¹⁹²:

$$Y = a x e^{-bX}$$

donde “Y” es el porcentaje de viabilidad, “a” es la ordenada en el origen (valor constante), “b” es la constante de variación, “X” es la intensidad de irradiación en mJ/cm² y “e” es la constante de *Napier* (2.72).

III.1.3.2. Análisis de la morfología celular

Para analizar el efecto de la radiación UV-B sobre la morfología de ambas líneas celulares se realizaron capturas de la imagen de los cultivos a través del microscopio de contraste de fases. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos según las condiciones indicadas en la tabla 5. Tras 24 horas de incubación, se irradiaron a 11, 22, 35 y 75 mJ/cm². A continuación, se sustituyó el PBS por medio completo durante 48 horas. Al cabo de este tiempo, se obtuvieron imágenes de cinco campos de cada pocillo con el objetivo 10x.



III.1.3.3. Determinación de la citotoxicidad

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que es liberada por las células dañadas o muertas al medio extracelular al perder la integridad

de su membrana. Por tanto, el incremento en la actividad de LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas. La enzima LDH cataliza la reducción de NAD⁺ a NADH en presencia de L-lactato; la formación de NADH se puede medir mediante una reacción acoplada en la que la sal de tetrazolio se reduce hasta formar un producto de formazán, de color rojo¹⁹³. La cantidad e intensidad de color debido al formazán solubilizado puede medirse espectrofotométricamente a una $\lambda=490$ nm.

Para estos ensayos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo (5 réplicas por muestra). Tras 24 horas de incubación, se irradiaron en las condiciones mencionadas previamente a 11, 22, 35 y 75 mJ/cm². A continuación, se sustituyó el medio de irradiación por medio completo con un 1% de FBS y se incubaron durante 24 y 48 horas.



La medida de la cantidad de LDH se llevó a cabo mediante el kit de detección de citotoxicidad (*Cytotoxicity Detection kit, Roche, Mannheim, Alemania*). El porcentaje de citotoxicidad se calculó según se describe a continuación:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{LDHe}{LDH \text{ total } (LDHe + LDHi)} \times 100$$

donde LDHe (LDH extracelular) es la absorbancia obtenida a partir de la liberación de LDH al medio, y LDHi (LDH intracelular) es la absorbancia obtenida mediante la permeabilización de la membrana con un 1% v/v de Tritón X-100 (*Sigma-Aldrich® Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*) después de haber recogido el medio. La LDH total es la suma de los valores de absorbancia de LDHe y LDHi (figura 15).

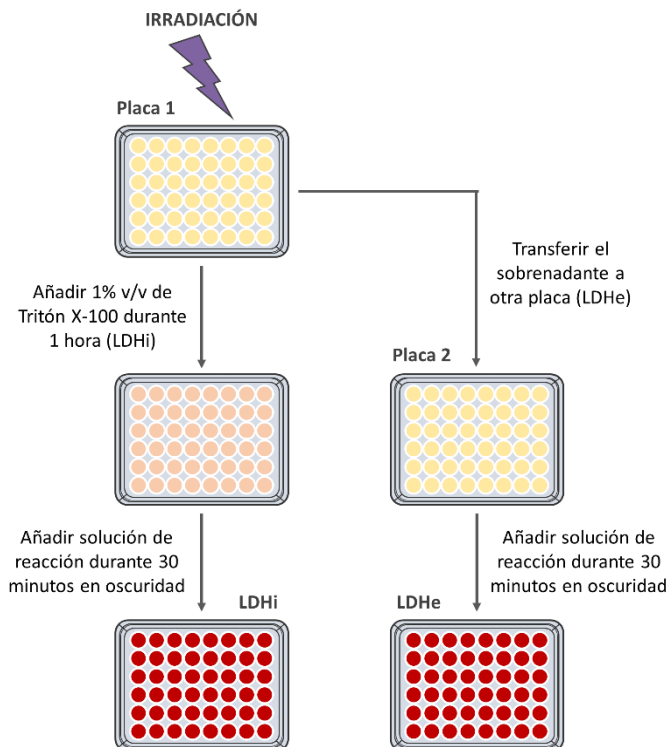


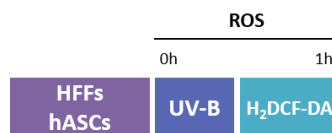
Figura 15. Esquema del proceso de cuantificación de la actividad de LDH.

III.1.3.4. Determinación de los niveles intracelulares de ROS

Los niveles intracelulares de ROS se determinaron mediante un ensayo fluorimétrico basado en la emisión de fluorescencia de la sonda 2,7-dichlorofluoresceína diacetato ($H_2DCF-DA$, *Molecular Probes*[®], Eugene, OR, EE.UU.), tras su oxidación por parte de los radicales libres intracelulares. La sonda, hidrolizada por las esterasas y oxidada por los ROS intracelulares, da lugar a la formación de diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia a una $\lambda_{em}=538$ nm cuando se excita a una $\lambda_{ex}=490$ nm.

En este ensayo se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos en 100 μ l de medio completo (5 réplicas por muestra). Tras 24 horas de incubación,

se añadió la solución de la sonda hasta obtener una concentración final en el medio de cultivo de 50 μM y las placas se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37°C. Transcurrido este tiempo, se retiró la sonda y se añadieron 50 μl de PBS con el objetivo de obtener el valor de la autofluorescencia. A continuación, se añadieron 50 μl adicionales de PBS y se procedió a la irradiación con UV-B a las intensidades de 11, 22, 35 y 75 mJ/cm^2 . La fluorescencia emitida por la sonda fue registrada en el espectrofotómetro de fluorescencia a los 60 minutos. Los valores de ROS se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), una vez restada la autofluorescencia de las células.

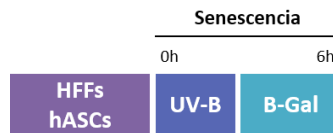


III.1.3.5. Evaluación de la senescencia celular

La senescencia celular está caracterizada por un incremento en la actividad de la enzima lisosómica β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal). El efecto de la radiación en la inducción de senescencia celular fue analizado mediante un kit específico para la detección histoquímica del incremento de la actividad de dicha la enzima (*Senescence Histochemical Staining Kit, Sigma-Aldrich® Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*). Este kit se fundamenta en la utilización del sustrato artificial 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido (X-gal), el cual es hidrolizado por la enzima β -gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol a pH 6.0. Este último compuesto es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble fácilmente detectable mediante microscopía óptica en el citoplasma de las células¹⁹⁴.

En este caso, se sembraron 6.2×10^4 células en placas de 24 pocillos, en 200 μl de medio completo (3 réplicas por muestra). Como control positivo se utilizaron

cultivos envejecidos (pases 10-14). Transcurridas 24 horas después de la siembra, los cultivos se irradiaron a 11, 22, 35 y 75 mJ/cm² y se incubaron durante 6 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS 1x y se fijaron con la solución fijadora (0.2% de formaldehído + 0.02% de glutaraldehído) durante 6-7 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS 1x para eliminar los restos de fijador y se incubaron durante toda la noche a 37°C, en ausencia de CO₂ con la solución de tinción que contiene X-gal.



La observación y cuantificación de las células senescentes se realizó mediante microscopía de campo claro y se expresó como porcentaje de células senescentes presentes en el cultivo, calculado según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Células senescentes}}{\text{Células totales}} \times 100$$

III.1.3.6. Análisis de la migración celular

El ensayo de migración celular o “cierre de la herida” tiene como objetivo evaluar la migración celular direccional *in vitro*¹⁹⁵. Se basa en un modelo experimental en el que las células son sembradas a ambos lados de un inserto de silicona que delimita un área vacía de células. Una vez alcanzada la confluencia, se retira el inserto para dejar una brecha en la monocapa celular. Las células de los dos bordes de la brecha se moverán hacia el área vacía de células hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida. En este ensayo, se sembraron 7 x 10³ células en 70 µl de medio completo en placas con inserto de silicona de dos pocillos (*Ibidi, Martinsried, Alemania*). Tras

la irradiación a 5, 11, 22 y 35 mJ/cm², se retiró el inserto y se sustituyó el PBS por medio completo con un 1% de FBS (figura 16).

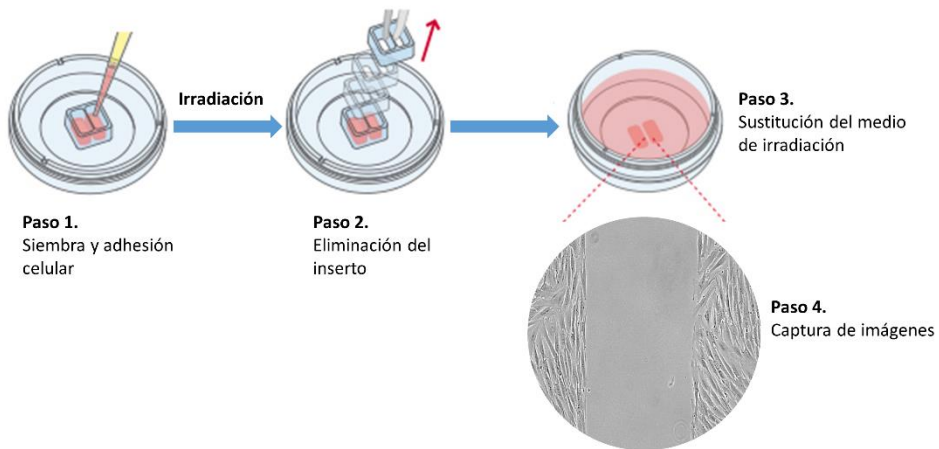
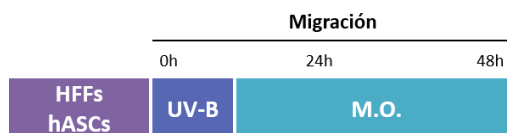


Figura 16. Esquema del proceso de siembra y eliminación del inserto de silicona en el ensayo de migración celular. Representación adaptada de *Ibidi*.

Inmediatamente después de la irradiación y cada 24 horas, se tomaron imágenes con el microscopio de contraste de fases. La cuantificación de la migración celular se determinó mediante el recuento del número de células que migraron al área de la herida. Los datos se representaron expresando el valor promedio de células migrantes en cada tiempo y para las diferentes intensidades de irradiación.



III.1.4. Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron con un mínimo de tres réplicas y, al menos, tres experiencias independientes.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa informático *GraphPad Prism* (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Las pruebas paramétricas utilizadas para determinar la significación fueron la *t-Student* y el análisis de la varianza (ANOVA), dependiendo del caso. Todos los datos están representados como la media \pm desviación estándar (DE).

III.2. RESULTADOS

III.2.1. Análisis del efecto de la irradiación sobre las células HFFs y hASCs

Para determinar el efecto de la radiación UV-B sobre los HFFs y las hASCs, se evaluaron los siguientes parámetros biológicos: morfología y viabilidad celular, niveles intracelulares de ROS, niveles de LDH, senescencia y migración.

III.2.1.1. Efecto sobre la viabilidad celular y determinación de la LD₅₀

La determinación del efecto de la radiación UV-B sobre la viabilidad y proliferación celular se llevó a cabo mediante un estudio de la respuesta celular a un amplio rango de dosis de radiación de 0 a 80 mJ/cm².

Tanto en los HFFs como en las hASCs se observó una correlación directa entre las dosis de irradiación aplicadas y la disminución de la viabilidad celular de manera dosis-dependiente (figura 17).

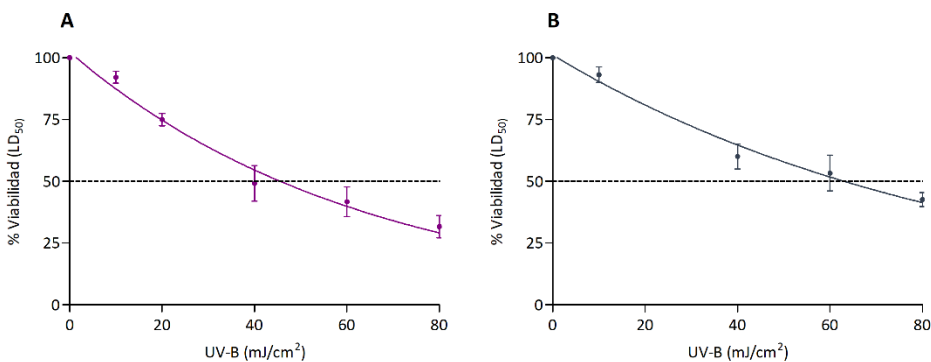


Figura 17. Curva dosis-respuesta para el cálculo de LD₅₀ (línea discontinua) de cultivos de HFFs (A) y hASCs (B), sometidos a dosis crecientes de radiación UV-B, a las 48 horas tras su exposición. La figura muestra la media ± DE representativa de tres experiencias independientes.

A partir de los datos de viabilidad observados en los cultivos de HFFs y hASCs tras 48 horas de la irradiación, se calculó el valor de la LD₅₀, estableciéndose en 45.67 mJ/cm² para los HFFs y 63.21 mJ/cm² para las hASCs, con un coeficiente de correlación (R²) superior a 0.96 en ambos casos (tabla 6). Se puede observar, por tanto, que la reducción de la viabilidad fue 1.4 veces mayor en el caso de los HFFs.

Tabla 6. Valores de la LD₅₀ y R² de HFFs y hASCs sometidos a dosis crecientes de radiación UV-B a las 48 horas.

Tipo celular	LD ₅₀ (mJ/cm ²)	R ²
HFFs	45.67	0.9601
hASCs	63.21	0.9662

A partir de estos valores se estableció el rango de dosis de irradiación por encima y por debajo de los valores de LD₅₀, así como el tiempo de exposición para llevarlos a cabo (tabla 7), a utilizar en los posteriores ensayos.

Tabla 7. Relación entre la intensidad de irradiación con UV-B y el tiempo de exposición de los cultivos.

Intensidad de irradiación (mJ/cm ²)	Tiempo (seg)
5	10
11	21
22	42
35	67
75	145

En estas condiciones se calculó el porcentaje de viabilidad para las dosis de irradiación seleccionadas (tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad de HFFs y hASCs a las dosis de irradiación seleccionadas para llevar a cabo los ensayos.

Intensidad de irradiación (mJ/cm ²)	Viabilidad (%)	
	HFFs	hASCs
5	94.5	95.6
11	86.0	89.4
22	72.4	79.0
35	57.1	66.9
75	31.5	43.7

III.2.1.2. Efecto sobre la morfología celular

Tanto los HFFs como las hASCs son células que, en condiciones normales, muestran una buena adhesión a la superficie del soporte del cultivo, adoptando una morfología fusiforme. Como se observa en la figura 18, la radiación UV-B, además de reducir la densidad de los cultivos en ambas líneas celulares de una manera dosis-dependiente, indujo cambios morfológicos en las propias células. En los controles no irradiados y a dosis bajas de irradiación (11 mJ/cm²) las células mantuvieron la adhesión al sustrato y mostraron las elongaciones y la morfología habitual de cada tipo celular. Sin embargo, a dosis más altas de irradiación (22, 35 y 75 mJ/cm²) las células comenzaron a perder los puntos de adhesión a la superficie de cultivo y las elongaciones, hasta finalmente, adoptar una morfología esférica.

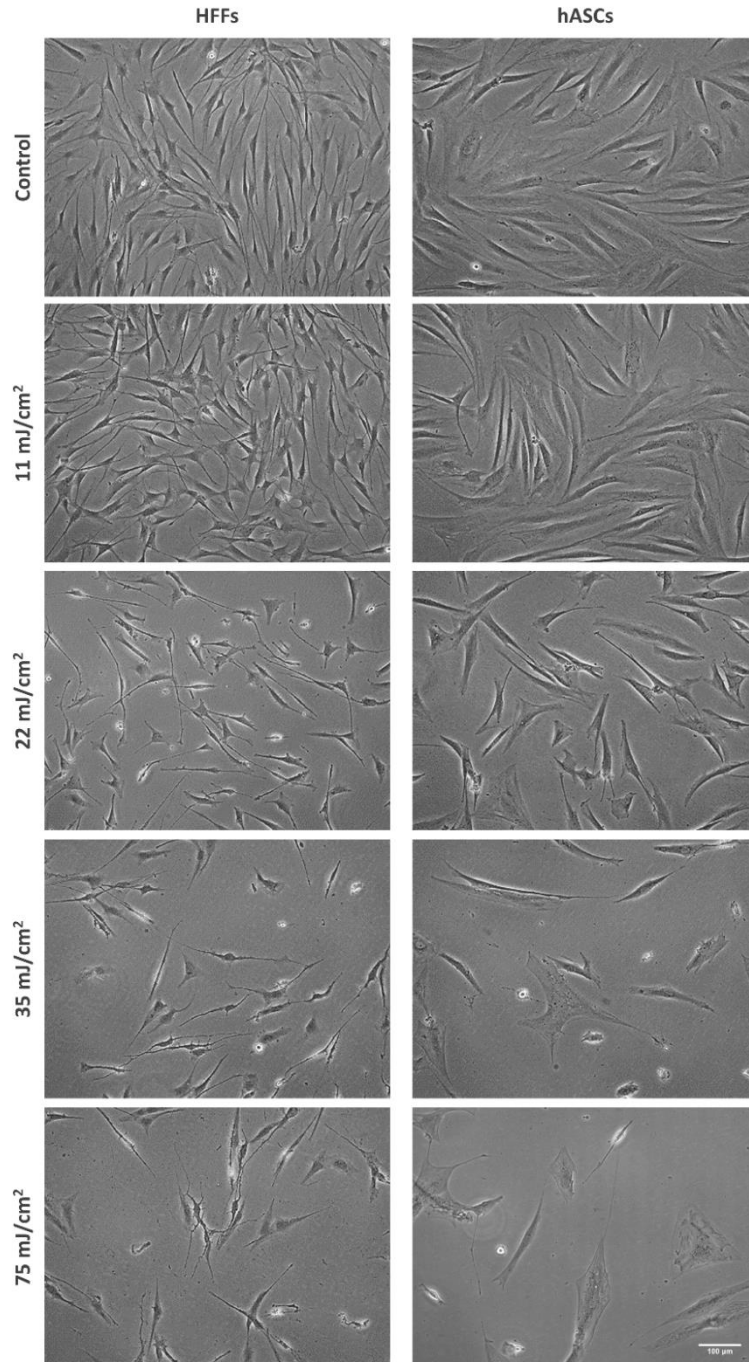


Figura 18. Imagen de contraste de fases de cultivos de HFFs y hASCs en placas de 6 pocillos, irradiados con dosis crecientes de UV-B (11, 22, 35 y 75 ml/cm²). Imágenes representativas de cada intensidad de irradiación tomadas 48 horas después de la irradiación (barra de escala 100 μm).

III.2.1.3. Efecto citotóxico de la radiación

El porcentaje de citotoxicidad inducido por la radiación UV-B se determinó mediante la estimación de la actividad de LDH liberada por las células dañadas a las 24 y 48 horas de la irradiación. En la figura 19 se observa en ambas poblaciones celulares un aumento dosis-dependiente del porcentaje de citotoxicidad en función de la intensidad de irradiación, tanto a las 24 como a las 48 horas de la irradiación. Dicho aumento fué significativo en las dos líneas celulares, cuando se compararon con los valores de sus respectivos controles no irradiados, a partir de la dosis de 22 mJ/cm² ($p < 0.05$).

Por otro lado, al comparar el daño producido en los HFFs y las hASCs, se observó un menor porcentaje de citotoxicidad en las hASCs, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con las dosis altas de irradiación, a las 24 y 48 horas. Así, en el tiempo de 24 horas, con las dosis de 35 y 75 mJ/cm², las hASCs mostraron un porcentaje de citotoxicidad 1.2 y 1.3 veces inferior, respectivamente, al de los HFFs. En cambio, a las 48 horas, sólo con la dosis de 75 mJ/cm² dicho porcentaje fue significativamente menor en la hASCs (1.5 veces inferior; $p < 0.05$).

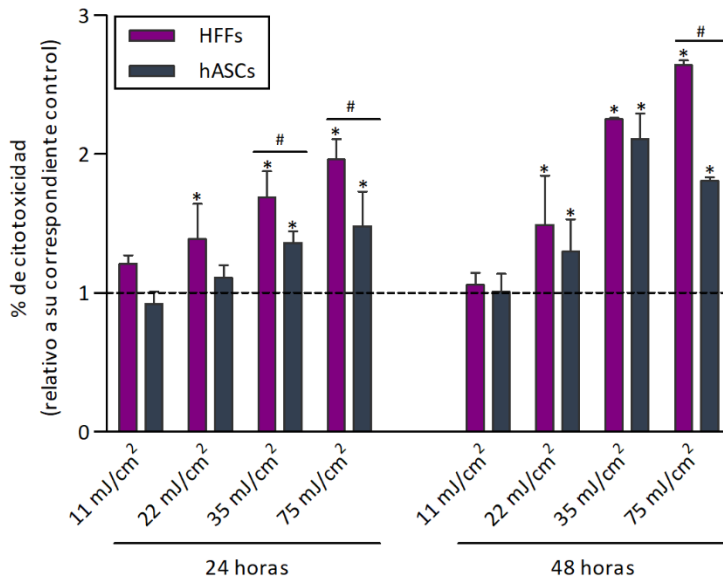


Figura 19. Porcentaje de citotoxicidad en los cultivos de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, en función del tiempo y en comparación con sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. * $p < 0.05$ con respecto a su correspondiente control; # $p < 0.05$ entre las dos líneas celulares.

III.2.1.4. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS

El nivel de estrés oxidativo provocado por la irradiación se determinó mediante el análisis de los niveles intracelulares de ROS. En la figura 20, se observa un aumento dosis-dependiente de dichos niveles 60 minutos después de la irradiación. En ninguna de las poblaciones celulares sometidas a bajas intensidades de irradiación (11 mJ/cm²) se observó un incremento significativo de los niveles de ROS con respecto a sus respectivos controles. Sin embargo, con las dosis de 22, 35 y 75 mJ/cm², los dos tipos celulares experimentaron un incremento significativo en los niveles de ROS con respecto a sus respectivos controles ($p < 0.01$). Dichos niveles de ROS fueron superiores en las hASCs

respecto a los HFF con todas las dosis de irradiación, aunque sólo con la dosis más alta (75 mJ/cm²) se observó un aumento significativo (1.4 veces mayor; p<0.01).

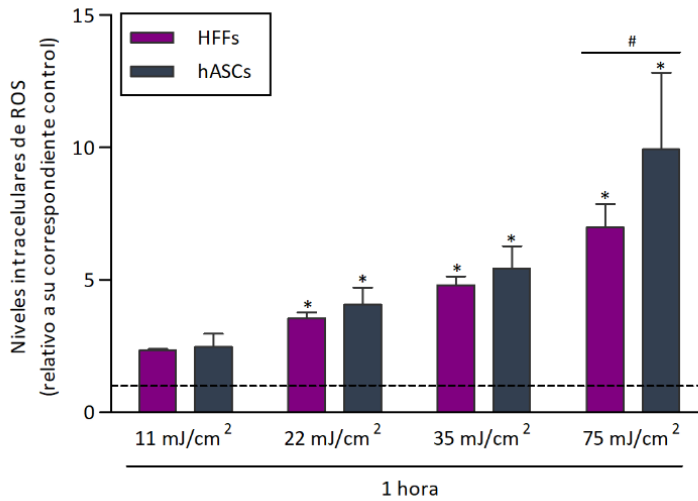


Figura 20. Niveles intracelulares de ROS en cultivos de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B. Los valores fueron obtenidos a los 60 minutos desde la irradiación, y fueron relativizados a los valores de sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua). La figura muestra la media ± DE de cuatro experiencias independientes. *p<0.01 con respecto a su correspondiente control; #p<0.01 entre las dos líneas celulares.

III.2.1.5. Efecto sobre la senescencia celular

La exposición de los cultivos a la radiación UV-B indujo un incremento del porcentaje de células senescentes, observándose un aumento del tamaño celular y de la actividad de la enzima β-gal, junto con la aparición de fibras de estrés (figura 21). Este aumento fue dosis-dependiente en ambos tipos celulares.

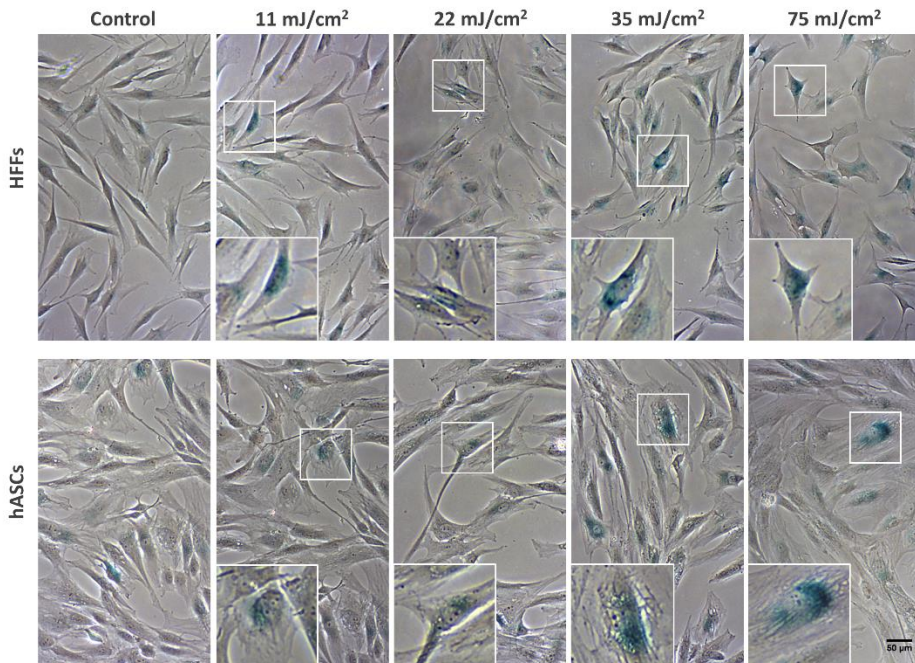


Figura 21. Marcaje de células senescentes de cultivos de HFFs y hASCs en placa de 24 pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 6 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μm).

Así, a las 6 horas de la irradiación, los HFFs mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en el porcentaje de senescencia con respecto a su control no irradiado con todas las dosis de irradiación. En el caso de las hASCs, únicamente se observaron diferencias con respecto a su control no irradiado, con la dosis de 75 mJ/cm² ($p < 0.001$). Al comparar los dos tipos celulares, se observó un incremento del porcentaje de células senescentes en los cultivos de los HFFs con respecto a los de hASCs (1.9, 2.3, 2.7 y 2.3 veces superior con las dosis de 11, 22, 35 y 75 mJ/cm², respectivamente; figura 22).

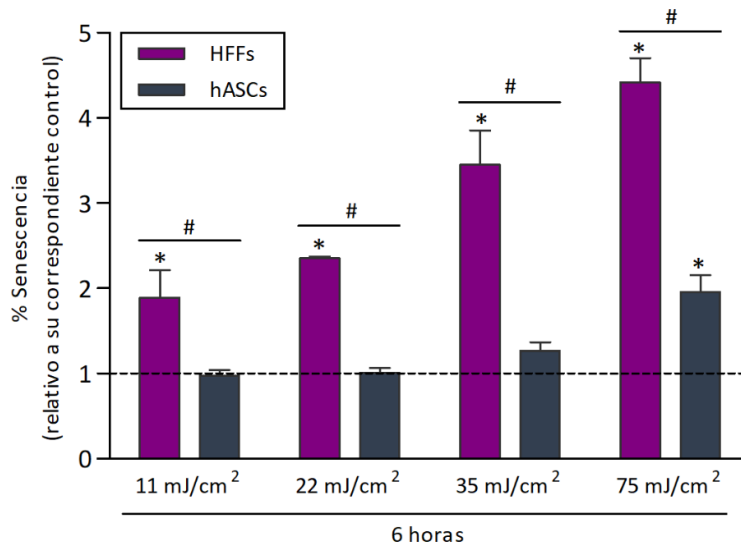


Figura 22. Porcentaje de células senescentes de los cultivos de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B en comparación con sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua), a las 6 horas de la irradiación. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.001$ con respecto a su correspondiente control; # $p < 0.001$ entre las dos líneas celulares.

III.2.1.6. Efecto sobre la migración celular

Como se observa en las figuras 23 y 24, mientras que en los controles no irradiados de HFFs y hASCs la superficie de la herida fue colonizada totalmente a las 48h, la radiación UV-B produjo una disminución dosis-dependiente de la capacidad migratoria en ambas poblaciones celulares.

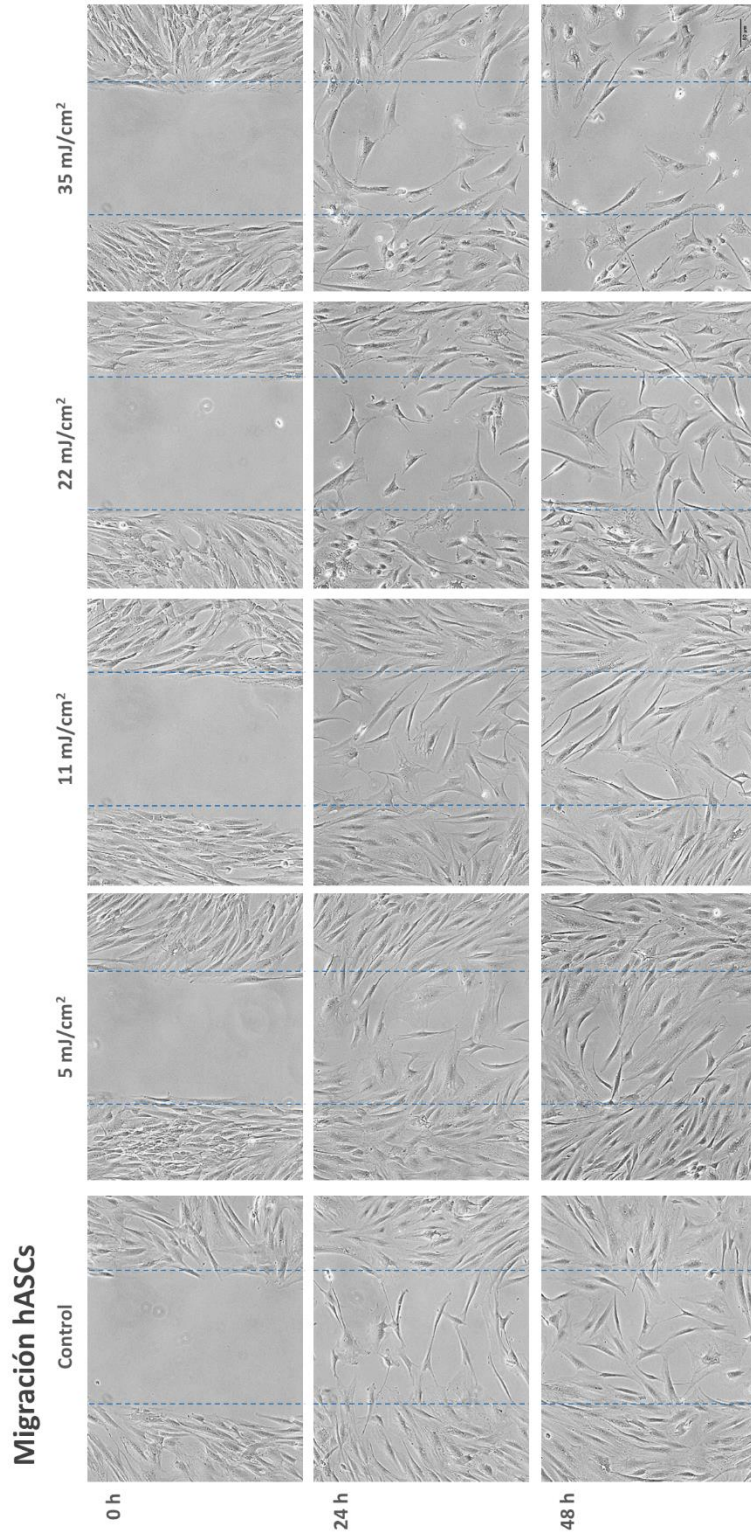


Figura 24. Migración de cultivos de hASCs en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barras de escala 50 µm).

Esta disminución en el número de células que migraron a la superficie de la herida con respecto a sus respectivos controles no irradiados fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para las intensidades de 11, 22 y 35 mJ/cm^2 para los HFFs, y únicamente para las intensidades de 22 y 35 mJ/cm^2 en el caso de las hASCs. Al comparar los dos tipos celulares, a las 24 horas la migración celular de las hASCs con respecto a los HFFs fue 3.5 y 4.3 veces superior para las intensidades de 22 y 35 mJ/cm^2 , respectivamente. A las 48 horas la diferencia en la capacidad migratoria entre los dos tipos celulares se hace evidente en todas las intensidades de irradiación, siendo 1.4, 1.5, 3.5 y 2.8 veces superior en las hASCs para las intensidades de 5, 11, 22 y 35 mJ/cm^2 , respectivamente (figura 25).

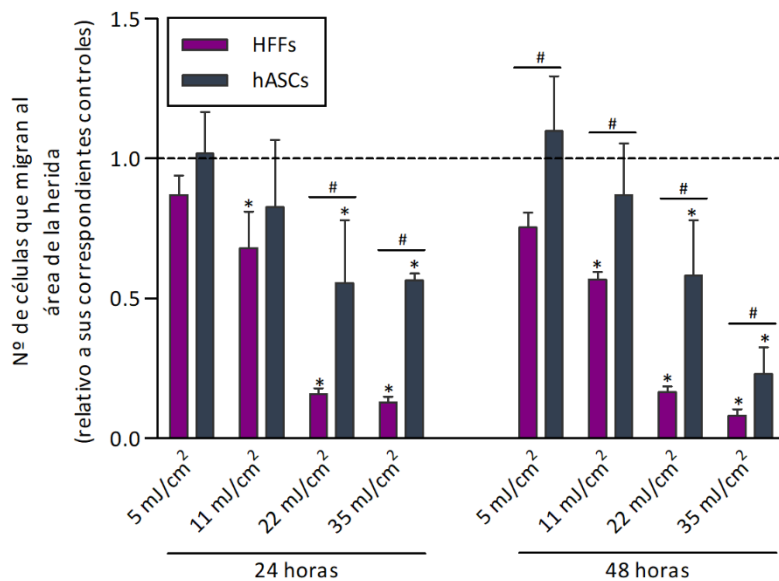


Figura 25. Migración de HFFs y hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B en comparación con sus respectivos controles no irradiados (línea discontinua), a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.05$ con respecto a su correspondiente control; # $p < 0.05$ entre las dos líneas celulares.

Una vez analizada la respuesta de los HFFs y las hASCs a diferentes intensidades de radiación UV-B, se puede concluir que las hASCs tienen mayor resistencia al daño producido por la irradiación que los HFFs. De hecho, el valor de la LD₅₀ de las hASCs es 1.4 veces superior a la de los HFFs. Así mismo, las hASCs muestran menor porcentaje de citotoxicidad y senescencia, y una mayor capacidad migratoria.

Con el objetivo de mejorar la resistencia de las hASCs a la radiación UV-B para su uso en terapia celular contra el fotoenvejecimiento, se planteó la utilización de las mismas para su pre-acondicionamiento, y se establecieron las dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm² para la realización de la siguiente fase experimental.

El siguiente capítulo presenta el estudio del pre-acondicionamiento de las hASCs mediante ciclos cortos de oxidación con H₂O₂ y el análisis del efecto de dicho pre-acondicionamiento: *i)* en condiciones de cultivo estándar, con el objetivo de determinar la ausencia de efectos no deseados y *ii)* sobre cultivos irradiados, para evaluar la capacidad de adaptación al estrés de las hASCs pre-acondicionadas (PC-hASCs).

IV. Capítulo 2

Influencia del pre-acondicionamiento en las hASCs y análisis de su efecto sobre la adaptación al estrés oxidativo de las PC-hASCs sometidas a radiación UV-B

El uso de MSCs como terapia celular contra el fotoenvejecimiento ha mostrado resultados muy prometedores. Sin embargo, pese al potencial terapéutico de las MSCs, una de las principales limitaciones es mantener la viabilidad, las propiedades y la función de las células madre antes y después de la implantación *in vivo* ¹⁷⁰. Para hacer frente a estas limitaciones se han desarrollado distintas estrategias de pre-acondicionamiento *in vitro* de las MSCs basadas, principalmente, en la modificación de las condiciones de cultivo y el pre-tratamiento con moléculas bioactivas ¹⁶⁶. Estas estrategias han demostrado un incremento de la tasa de supervivencia celular y del potencial de diferenciación. Además, estimulan los efectos paracrinos induciendo la supresión de factores pro-inflamatorios y del desarrollo de fibrosis ¹⁷¹.

En este capítulo se analiza el efecto del pre-acondicionamiento de las hASCs con dosis bajas de H₂O₂, con el objetivo de mejorar la resistencia de estas células al estrés oxidativo causado por la radiación UV-B.

IV.1. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.1. Modelo de pre-acondicionamiento de hASCs con H₂O₂

En este estudio se llevó a cabo un pre-acondicionamiento celular mediante el tratamiento de las hASCs con pequeñas dosis de H₂O₂ durante un periodo de tiempo prolongado. Se pretende que, de este modo, las células se adapten a condiciones ambientales de oxidación y refuercen sus mecanismos de defensa que les permitan responder a un futuro estrés oxidativo de manera más eficaz. Para obtener hASCs pre-acondicionadas (PC-hASCs), las células fueron sometidas a ciclos cortos de oxidación con H₂O₂ (*Panreac AppliChem*, Barcelona, España) a una concentración de 10 µM en medio completo durante siete días, renovando el medio de oxidación dos veces durante el procedimiento (ver detalles en la patente HC016; WO/2013/004859, 2013). Las hASCs no pre-acondicionadas fueron cultivadas de forma paralela renovando el medio de cultivo sin oxidación.

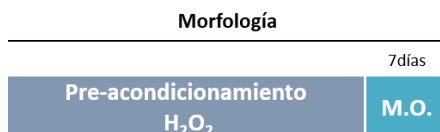
Transcurridas 24 horas del pre-acondicionamiento, las hASCs y PC-hASCs fueron sembradas según las condiciones establecidas (ver tabla 5) e incubadas a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂, durante 24 horas en medio completo sin FBS, hasta el comienzo de los experimentos.

IV.1.2. Determinación del efecto del pre-acondicionamiento sobre las hASCs

Para determinar el efecto del pre-acondicionamiento sobre la morfología, el ciclo celular y la proliferación celular, las hASCs y PC-hASCs fueron analizadas en condiciones estándar (sin inducción de estrés por irradiación).

IV.1.2.1. Análisis de la morfología celular

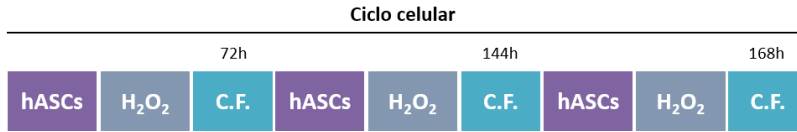
Para analizar el efecto del pre-acondicionamiento sobre la morfología celular, al término del último ciclo de oxidación se realizaron capturas de la imagen de los cultivos a través del microscopio óptico (MO) de contraste de fases con el objetivo 10x.



IV.1.2.2. Análisis del ciclo celular

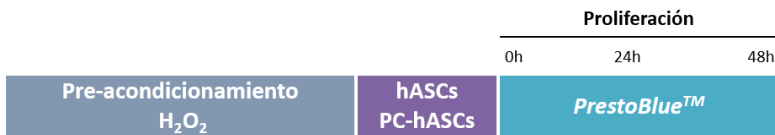
El ciclo celular de las hASCs y PC-hASCs en condiciones estándar se determinó mediante el marcaje del ADN con yoduro de propidio (PI, *Life technologies*TM, Eugene, OR, EE.UU.) y su posterior análisis en el citómetro de flujo (CF, *Gallios, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, EE.UU.*). El PI es un agente fluorescente que se intercala en el ARN y el ADN, por lo que la medida de la intensidad de fluorescencia emitida (λ_{ex} : 488 nm y λ_{em} : 617 nm) permite cuantificar el contenido en ADN y diferenciar la fase del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) en la que se encuentran las células¹⁹⁶.

Después de cada ciclo de oxidación, las células fueron despegadas del frasco de cultivo con tripsina-EDTA y centrifugadas a 250 g durante 5 minutos, ajustando posteriormente la concentración a 1×10^6 células para su fijación en 1 ml de etanol al 70% (*Panreac AppliChem, Barcelona, España*) y su almacenamiento a 4°C. Para el análisis con el citómetro de flujo, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4°C en 1 ml de PBS con PI (5 µg/ml) y RNasa (100 µg/ml, *Roche, Mannheim, Alemania*). Los resultados se expresaron en UAF y se representaron en escala logarítmica.



IV.1.2.3. Análisis de la proliferación celular

La proliferación celular de las hASCs y PC-hASCs se cuantificó según el método colorimétrico del PB. Para ello, las hASCs y PC-hASCs se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo sin FBS (5 réplicas por muestra). A los tiempos de 0, 24 y 48 horas, las muestras se incubaron con PB (10% v/v), durante 3 horas a 37°C, y se realizaron medidas de la absorbancia en el espectrofotómetro a 570 nm y 600 nm. Los valores obtenidos se expresaron relativizados a los valores de las hASCs.



IV.1.3. Determinación del efecto del pre-acondicionamiento en la resistencia de las PC-hASCs a la radiación UV-B

IV.1.3.1. Evaluación de la viabilidad celular

Para analizar el efecto del pre-acondicionamiento sobre la viabilidad de las PC-hASCs sometidas a radiación UV-B, ambos tipos de células (hASCs y PC-hASCs) fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo sin FBS (5 réplicas por muestra). Tras 24

horas de incubación, los cultivos fueron irradiados sobre 100 μl de PBS a 11, 22 y 35 mJ/cm^2 y se sustituyó el PBS por medio de cultivo fresco sin FBS.

Transcurridas 24 y 48 horas después de la irradiación, se añadió PB al 10% (v/v) y se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm y 600 nm. Los valores obtenidos se expresaron relativizados a los valores del control no irradiado de las hASCs.



IV.1.3.2. Determinación de los niveles intracelulares de ROS

El efecto del pre-acondicionamiento sobre los niveles intracelulares de ROS de las PC-hASCs irradiadas se analizó mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Para ello, 1×10^4 células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, en 100 μl de medio completo sin FBS (5 réplicas por muestra). Tras la medida de la autofluorescencia de los pocillos, se añadieron 50 μl adicionales de PBS y se procedió a la irradiación con UV-B a 11, 22 y 35 mJ/cm^2 . La fluorescencia emitida por la sonda (λ_{ex} :490 nm y λ_{em} : 538 nm) fue registrada en el fluorímetro de placas 1 hora después de la irradiación. Los valores de ROS se expresaron en función del número de células y relativizados a los valores del control no irradiado de las hASCs.



IV.1.3.3. Análisis de la expresión del factor de transcripción Nrf2

El efecto del pre-acondicionamiento en la expresión de Nrf2 se realizó mediante la técnica *Western Blot*. Para ello, las hASCs y PC-hASCs fueron sembradas en placas de 6 pocillos (3×10^5 células) en 1 ml de medio completo sin FBS. Tras 24 horas de incubación, los cultivos fueron irradiados a 11, 22 y 35 mJ/cm² e incubados, durante 1 hora en medio completo sin FBS. Tras el periodo de incubación, las células fueron lisadas en *Laemmli 1x* (*Sigma-Aldrich*[®] *Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*) y sonicadas para obtener una muestra homogénea. Se obtuvieron muestras de la fracción total, la fracción citoplasmática y la fracción nuclear empleando una adaptación del protocolo de fraccionamiento bioquímico de alta calidad de *Rosner* y cols.¹⁹⁷. Brevemente, las células se centrifugaron y resuspendieron después en tampón de extracción citoplasmática (Tris 20 mM, pH 7.6, EDTA 0.1 mM, MgCl₂·6H₂O 2mM, Na₃VO₄ 0.5 mM) para inducir en ellas un choque hipotónico. Con el objetivo de liberar las proteínas citoplasmáticas, se añadió *Nonidet P-40* (*Igepal, Sigma-Aldrich*[®] *Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*) a una concentración final del 1%. A continuación, se centrifugó la suspensión a 500 g durante 3 minutos para separar la fracción citoplasmática localizada en el sobrenadante; posteriormente, la fracción nuclear, contenida en el *pellet*, se resuspendió en tampón de lisis *Nonidet P-40* al 1% y se centrifugó a 4°C y 500 g durante 3 minutos. Este paso de lavado se repitió una vez más para obtener una fracción nuclear pura. La cuantificación proteica se realizó según el método colorimétrico descrito por otros autores, basado en la precipitación con ácido tricloroacético (TCA, *Fluka Biochemika, Steinheim, Alemania*) y albúmina de suero bovino (BSA, *Sigma-Aldrich*[®] *Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*) para determinar la curva de referencia¹⁹⁸.

La fracción total, la fracción citoplasmática y la fracción nuclear se calentaron a 95°C durante 5 minutos para permitir su desnaturalización. A continuación, las

muestras desnaturalizadas se cargaron en geles SDS-PAGE (SDS, dodecilsulfato sódico; PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida) al 10% y se procedió a la separación de las proteínas mediante electroforesis, utilizando el tampón SDS (Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS al 0,1% (p/v), pH 8.3) a 90 V durante 90 minutos en una celda *Mini-Protean*[®] 3 (*Bio-Rad, Segrate, MI, Italia*). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*GE Healthcare, Life Sciences, Freiburg, Alemania*), aplicando una corriente de 380 mA durante 180 minutos a 4 °C y usando un tampón de transferencia SDS (Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS al 0,1% (p/v), metanol al 20%, pH 8.3). A continuación, se comprobó la transferencia de las proteínas mediante la tinción de las membranas de nitrocelulosa con solución *Ponceau S* (*Sigma-Aldrich*[®] *Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*). Una vez comprobada la transferencia, se lavaron las membranas con TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, *Tween-20* al 0,1% (v/v), pH 7.5) para eliminar la solución *Ponceau* y, seguidamente, se bloquearon con leche en polvo al 5% en TBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente, para eliminar las uniones inespecíficas. Después, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios Nrf2 (1:500, *GeneTex, Barcelona, España*), β -Actina (1:5000, *EMD Millipore, Temecula, EE.UU.*) y *Lamin A+C* (1:5000, *GeneTex, Barcelona, España*) *anti-Rabbit* durante la noche a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación, se lavaron las membranas con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario (*Goat anti-Rabbit IgG*, 1:1000, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.*), durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las bandas de proteína fueron detectadas utilizando un substrato quimioluminiscente (*SuperSignal*[™] *West Pico PLUS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.*) y las imágenes se adquirieron con el sistema de documentación en gel, *G: Box Chemi HR16* (*Syngene, Frederick, MD, EE.UU.*).



IV.1.3.4. Determinación de la localización intracelular del factor de transcripción Nrf2

Para analizar el efecto del pre-acondicionamiento sobre la capacidad antioxidante de las PC-hASCs, se determinó la translocación nuclear de Nrf2 mediante el inmunomarcaje fluorescente de dicha proteína. Para ello, se sembraron 7×10^3 células en cubreobjetos de 12 mm de diámetro (*Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.*), en 200 μ l de medio completo sin FBS. Transcurridas 24 horas después de la siembra, los cultivos se irradiaron a 11, 22 y 35 mJ/cm^2 y se incubaron durante 1 hora, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA, *PanReac AppliChem, Barcelona, España*) al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Con el objetivo de permitir la entrada del anticuerpo a las células, se permeabilizaron las membranas con un 1% v/v de Tritón X-100 durante 5 minutos. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y se incubaron con BSA al 5% en PBS durante 1 hora para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo a otras proteínas. A continuación, las células fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario Nrf2 (*anti-Rabbit, 1:500, GeneTex, Barcelona, España*) en PBS con BSA al 1%. Finalmente, se lavaron los cultivos tres veces con PBS y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario *Goat anti-Rabbit IgG Alexa 488 (1:2000, Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.)* en PBS con un 1% de BSA y en oscuridad. Después de un lavado con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montaje acuoso *Fluoromount™ (Sigma-Aldrich® Chemical Co, St. Louis,*

MO, EE.UU.). Las muestras se analizaron mediante el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se obtuvieron cinco imágenes de cada condición para estimar la localización nuclear o citoplásmica del marcador fluorescente.



IV.1.3.5. Análisis de la migración celular

El efecto del pre-acondicionamiento sobre la migración de las PC-hASCs sometidas a radiación UV-B se determinó mediante el ensayo de “cierre de la herida”¹⁹⁵. Para ello, se sembraron 7×10^3 hASCs y PC-hASCs en 70 μ l de medio completo sin FBS, en placas con inserto de silicona de dos pocillos. Tras la irradiación a 5, 11, 22 y 35 mJ/cm², se eliminó el inserto y se sustituyó el PBS por medio completo sin FBS.

Inmediatamente después de la irradiación y cada 24 horas, se tomaron imágenes con el microscopio de contraste de fases. Los datos se representaron expresando el valor promedio de células migrantes en cada tiempo y para las diferentes intensidades de irradiación, relativizando los datos a los obtenidos en el control no irradiado de las hASCs.



IV.1.4. Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron con un mínimo de tres réplicas y, al menos, tres experiencias independientes.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa informático *GraphPad Prism* (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Las pruebas paramétricas utilizadas para determinar la significación fueron la *t-Student* y el análisis de la varianza (ANOVA), dependiendo del caso. Todos los datos están representados como la media \pm DE.

IV.2. RESULTADOS

IV.2.1. Análisis del efecto del pre-acondicionamiento en las hASCs

Para confirmar que el pre-acondicionamiento no altera la morfología, el ciclo celular y la proliferación, los cultivos de hASCs y PC-hASCs fueron analizados mediante microscopía de contraste de fases, citometría de flujo y espectrofotometría de placa con PB, respectivamente.

IV.2.1.1. Efecto sobre la morfología celular

Las hASCs poseen una morfología fibroblastoide y un carácter adherente, creciendo en monocapa sobre la superficie del soporte de cultivo. Las imágenes de la figura 26, muestran que las PC-hASCs mantuvieron las mismas características morfológicas y adhesivas que las hASCs.

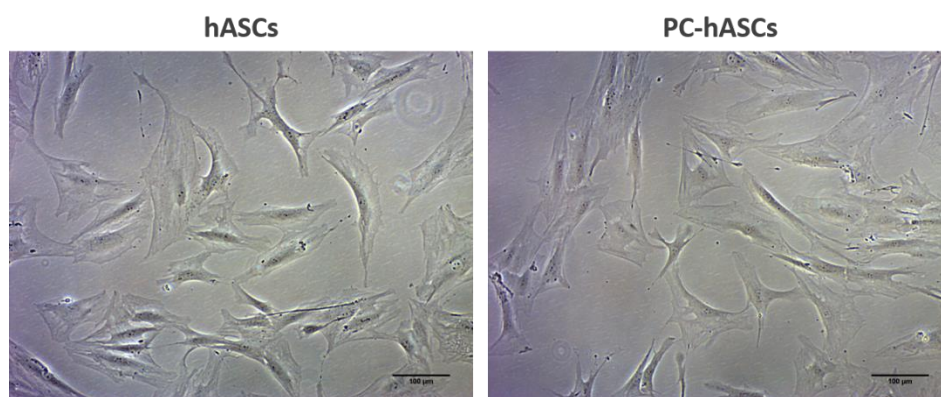


Figura 26. Imágenes de microscopía de contraste de fases representativas de los cultivos de hASCs y PC-hASCs en frasco de 175 cm² (barra de escala 100 μ m).

IV.2.1.2. Efecto sobre el ciclo celular

Para analizar el efecto del pre-acondicionamiento sobre el ciclo celular de las PC-hASCs, tras cada ciclo de oxidación se recogieron muestras de los cultivos para su marcaje con PI y análisis mediante citometría de flujo. El estudio del ciclo celular demostró la ausencia de diferencias significativas entre las hASCs y PC-hASCs. Así, el porcentaje de células PC-hASCs en la fase G₀/G₁ al término de cada ciclo de oxidación fue 85.8, 84.5 y 71.3%, respectivamente, valores muy similares a los de las hASCs (88.7, 85.1 y 75.3%, $p < 0.05$). Del mismo modo, el porcentaje de células PC-hASCs en fase G₂/M tampoco mostró diferencias con respecto a las hASCs, siendo estos valores 14.1, 15.4 y 28.2% para las PC-hASCs y 11.2, 14.8 y 24.3% para las hASCs ($p < 0.05$), figura 27.

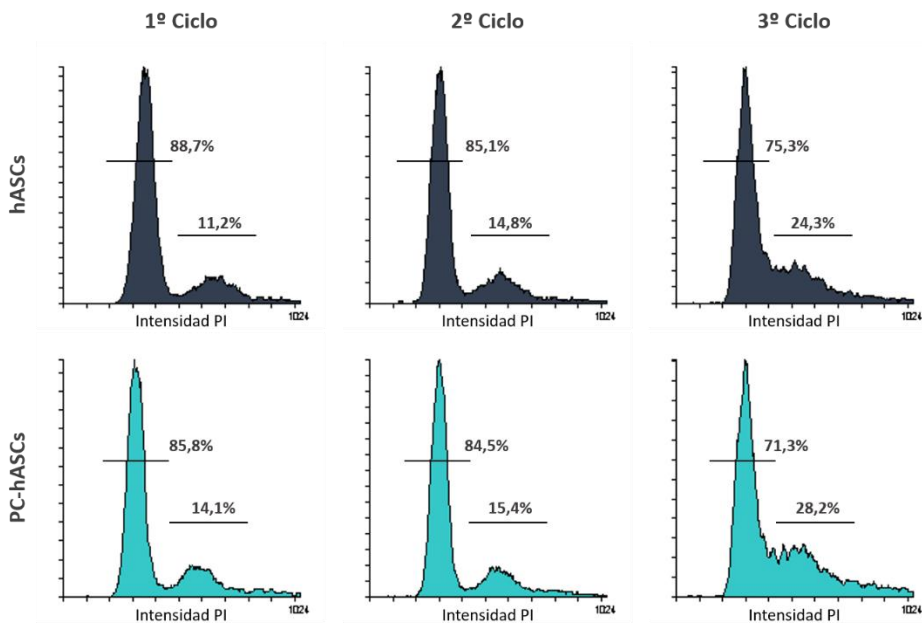


Figura 27. Distribución de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, después de cada ciclo de oxidación del pre-acondicionamiento de las PC-hASCs y en las mismas condiciones sin oxidación (hASCs). Figura representativa de tres experiencias independientes.

IV.2.1.3. Efecto sobre la proliferación celular

El efecto del pre-acondicionamiento sobre la proliferación celular se analizó mediante el ensayo colorimétrico con PB. Como se muestra en la figura 28, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el ritmo proliferativo entre las hASCs y las PC-hASCs a las 0, 24 y 48 horas tras el pre-acondicionamiento.

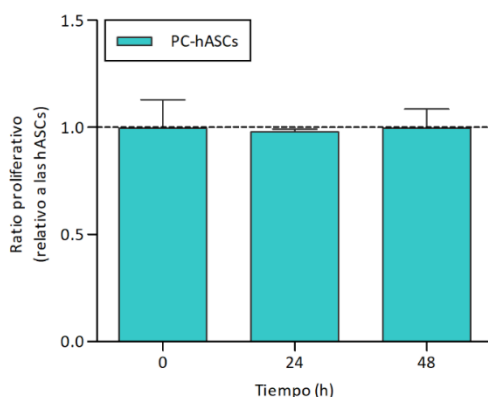


Figura 28. *Ratio* proliferativo entre las hASCs (valores normalizados en la línea discontinua) y las PC-hASCs a las 0, 24 y 48 horas tras el pre-acondicionamiento. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. $p < 0.05$.

IV.2.2. Análisis del efecto del pre-acondicionamiento sobre la resistencia de las PC-hASCs a la radiación UV-B

Una vez comprobado que el pre-acondicionamiento no altera la morfología, el ciclo celular y la actividad proliferativa de las hASCs, se procedió a evaluar el efecto del pre-acondicionamiento en la resistencia de las PC-hASCs a la radiación UV-B. Para ello, se analizaron los siguientes parámetros biológicos: viabilidad, niveles intracelulares de ROS, capacidad antioxidante (expresión y localización intracelular del factor de transcripción Nrf2) y capacidad de migración celular.

IV.2.2.1. Efecto sobre la viabilidad celular

El ensayo de viabilidad de las hASCs y PC-hASCs sometidas a las dosis establecidas de radiación UV-B se llevó a cabo mediante el método colorimétrico del PB. La figura 29 muestra que el pre-acondicionamiento indujo un incremento de la viabilidad de las PC-hASCs con respecto a las hASCs. Así, en comparación al control no irradiado de las hASCs, mientras la dosis de irradiación de 11 mJ/cm² no produjo modificaciones significativas en la viabilidad en ninguna de las poblaciones celulares, las dosis superiores (22 y 35 mJ/cm²) disminuyeron dicha viabilidad en ambas poblaciones celulares a las 24 horas de la irradiación; sin embargo, a las 48 horas, sólo las PC-hASCs recuperaron su viabilidad, llegando a alcanzar valores similares a los del control no irradiado, tanto con la dosis de 22 mJ/cm² como con la dosis máxima de 35 mJ/cm². De este modo, a dicho tiempo, la viabilidad de las PC-hASCs fue 1.3 y 1.2 veces superior con respecto a las hASCs irradiadas con las dosis de 22 y 35 mJ/cm², respectivamente ($p < 0.05$).

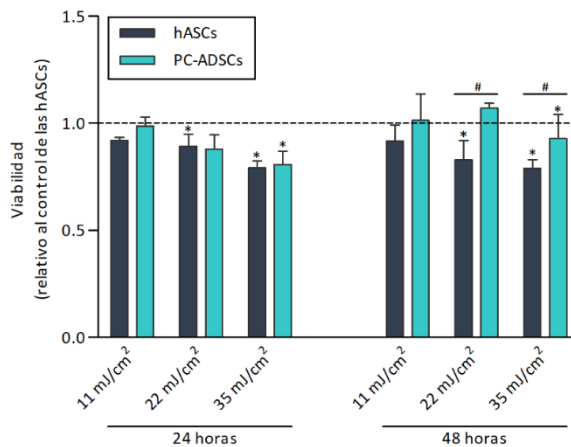


Figura 29. Viabilidad de los cultivos de hASCs y PC-hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B (11, 22 y 35 mJ/cm²), a las 24 y 48 horas tras su exposición. Valores relativizados a los del control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. * $p < 0.05$ con respecto al control de las hASCs no irradiadas; # $p < 0.05$ entre las hASCs y PC-hASCs.

IV.2.2.2. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS

El efecto del pre-acondicionamiento sobre el nivel de estrés oxidativo provocado por la irradiación se determinó mediante el análisis de los niveles intracelulares de ROS. Como se observa en la figura 30.A, no se encontraron diferencias significativas entre los controles no irradiados de las PC-hASCs y las hASCs. Al analizar los niveles de ROS en los cultivos expuestos a radiación (figura 30.B), se observó un aumento significativo dosis-dependiente de dichos niveles 60 minutos después de la irradiación, tanto en las hASCs como en las PC-hASCs. Únicamente se encontraron diferencias significativas entre ambas poblaciones celulares con la dosis de irradiación de 35 mJ/cm², siendo los niveles de ROS en este caso 1.2 veces superiores en las PC-hASCs ($p < 0.01$).

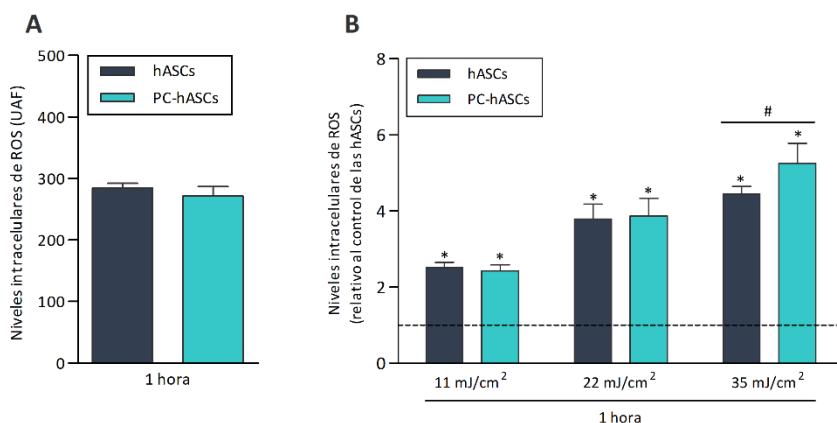


Figura 30. Niveles intracelulares de ROS en cultivos de hASCs y PC-hASCs sometidos a distintas dosis de radiación UV-B. Valores relativizados a los del control no irradiado de las hASCs (línea discontinua), transcurridos 60 minutos desde la irradiación. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. * $p < 0.001$ con respecto al control de las hASCs no irradiadas; # $p < 0.01$ entre las hASCs y PC-hASCs.

IV.2.2.3. Efecto sobre la respuesta antioxidante

Para determinar el efecto del pre-acondicionamiento sobre la respuesta antioxidante de las hASCs se analizó: *i)* la expresión del factor de transcripción Nrf2 mediante *Western Blot* y *ii)* su translocación desde el citoplasma al núcleo mediante inmunofluorescencia, 1 hora después de la irradiación.

Nrf2 es un factor de transcripción que estimula la expresión de genes citoprotectores frente al estrés oxidativo. En condiciones homeostáticas Nrf2 se localiza en el citoplasma formando un complejo con su inhibidor Keap1. Bajo condiciones de estrés oxidativo, este complejo se disocia y Nrf2 se transloca al núcleo donde se une al ADN, regulando la expresión de proteínas citoprotectoras.

En primer lugar, se analizó la expresión de Nrf2, tanto de la fracción nuclear como de la citoplasmática, mediante *Western Blot* (figura 31.A y B). Como se observa en la figura 31.B, las PC-hASCs mostraron una expresión mayor de Nrf2 en el núcleo que en el citoplasma con todas las intensidades de radiación, mientras que las hASCs mostraron mayor expresión de Nrf2 citoplasmático. Así, mientras la relación Nrf2-n/c del control no irradiado de las PC-hASCs fue 1.4 veces menor que el control de las hASCs ($p < 0.05$; figura 31.C), al someter los cultivos a radiación UV-B, dicha relación aumentó hasta ser 2.4 y 1.6 veces superior en las PC-hASCs con las intensidades de 11 y 35 mJ/cm^2 , respectivamente ($p < 0.01$). Para la dosis de 22 mJ/cm^2 , la relación Nrf2-n/c de las PC-hASCs también fue 1.4 veces superior respecto a las hASCs, pero este incremento no alcanzó significación estadística ($p < 0.05$; figura 31.D).

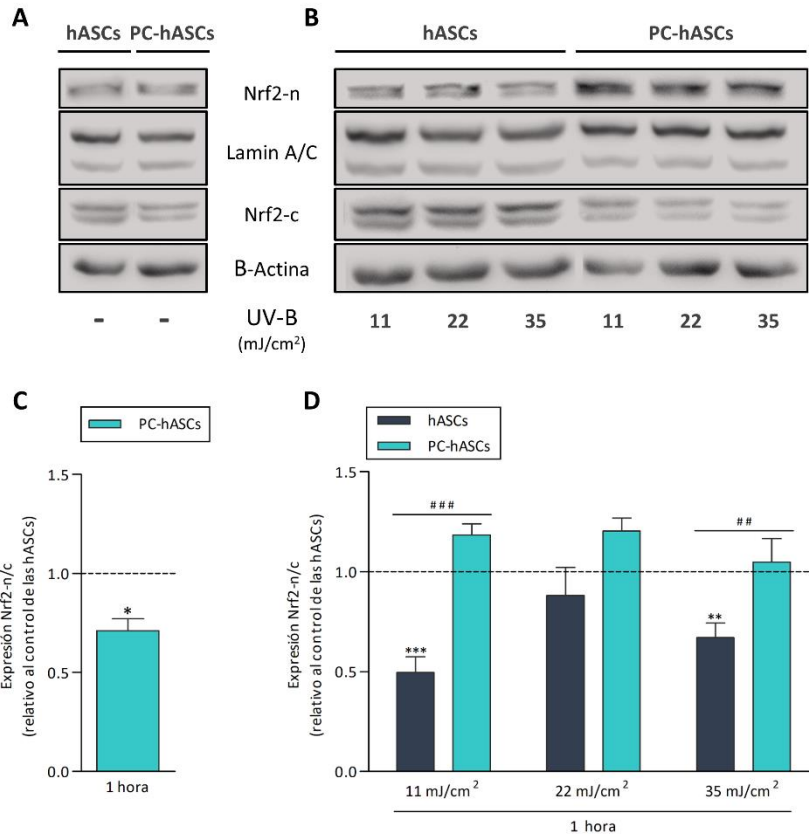


Figura 31. Expresión de la proteína Nrf2 en las fracciones citoplasmática y nuclear de las células hASCs y PC-hASCs mediante *Western Blot* en condiciones basales (A) y sometidas a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación (B). La proteína Nrf2 nuclear y citoplasmática se detectó a 100 y 70 kDa respectivamente. El control de carga de la proteína nuclear, Lamin A/C, se detectó a 73 kDa y el control de carga de la proteína citosólica, β -actina, a 43 kDa. Imágenes representativas de tres experiencias independientes. Cuantificación de la expresión de Nrf2-n/c de las hASCs y PC-hASCs en condiciones basales (C) y sometidas a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación (D). Valores relativizados al control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.05$ con respecto al control de las hASCs no irradiadas; # $p < 0.01$ entre hASCs y PC-hASCs.

En segundo lugar, se analizó la localización intracelular de Nrf2 mediante inmunofluorescencia. Como se observa en las microfotografías de la figura 32, en

condiciones basales, Nrf2 se localizó en el citoplasma, tanto en las hASCs como en las PC-hASCs. Sin embargo, en las condiciones de estrés oxidativo inducido por todas las dosis de irradiación (11, 22 y 35 mJ/cm²), la proteína Nrf2 se localizó en el núcleo en el caso de las PC-hASCs, mientras que permaneció en mayor medida en el citoplasma en las hASCs.

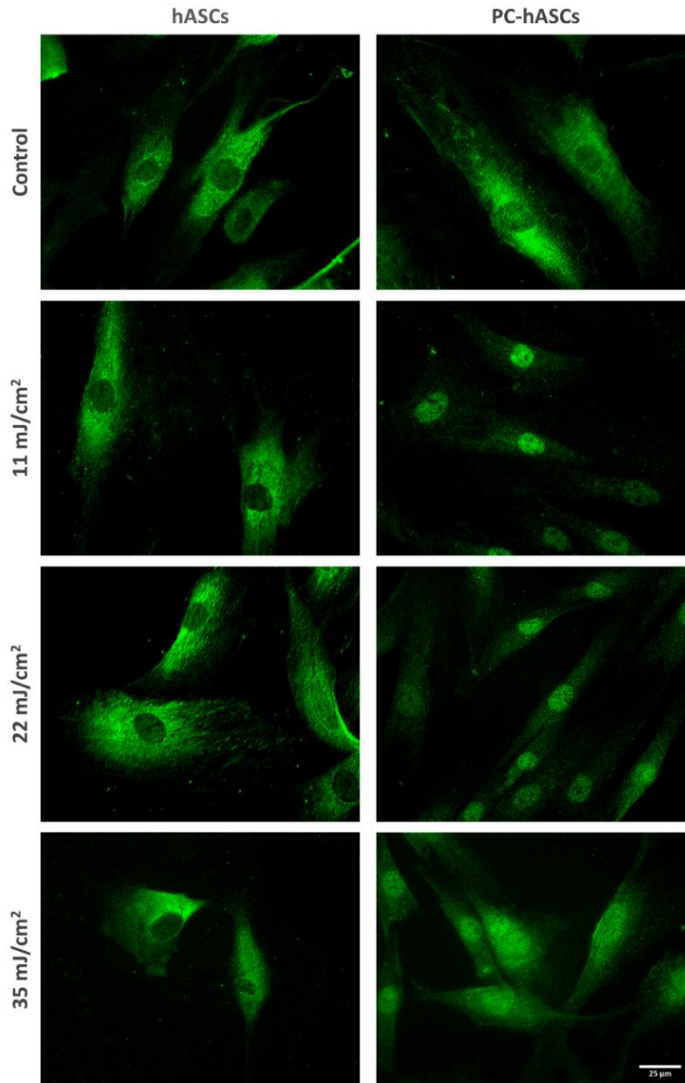


Figura 32. Inmunofluorescencia de la distribución intracelular de la proteína Nrf2 (verde) en los cultivos de hASCs y PC-hASCs sometidos a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (barra de escala 25 μm).

Así, no se encontraron diferencias en el *ratio* intensidad de fluorescencia de Nrf2 nuclear/citoplasmático (Nrf2-n/c) entre las células no irradiadas (figura 33.A). Después de una hora de la irradiación, dicha relación fue 1.5, 1.3 y 1.8 veces superior en las PC-hASCs con respecto a las hASCs con las intensidades de 11, 22 y 35 mJ/cm^2 , respectivamente ($p < 0.001$, figura 33.B).

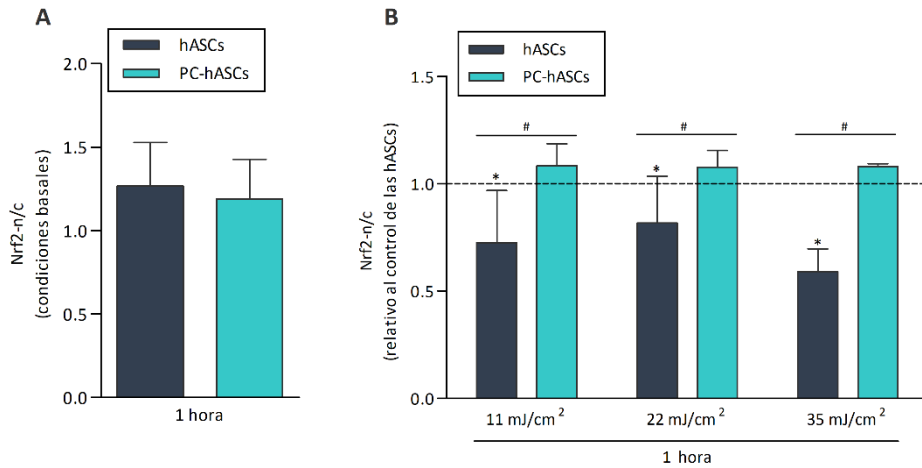


Figura 33. Ratio de los valores de intensidad de la inmunofluorescencia de Nrf2 entre la región nuclear y la región citoplasmática de las hASCs y PC-hASCs, en condiciones basales (A) y sometidas a diferentes dosis de radiación UV-B, 1 hora después de la irradiación (B). Valores relativizados al control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.01$ con respecto al control de las hASCs no irradiadas; # $p < 0.001$ entre hASCs y PC-hASCs.

IV.2.2.4. Efecto sobre la migración celular

El análisis del efecto del pre-acondicionamiento sobre la migración de las células expuestas a radiación UV-B mostró una mayor capacidad migratoria de las PC-hASCs con respecto a las hASCs, hecho que se evidencia con la dosis alta de irradiación (figuras 34 y 35).

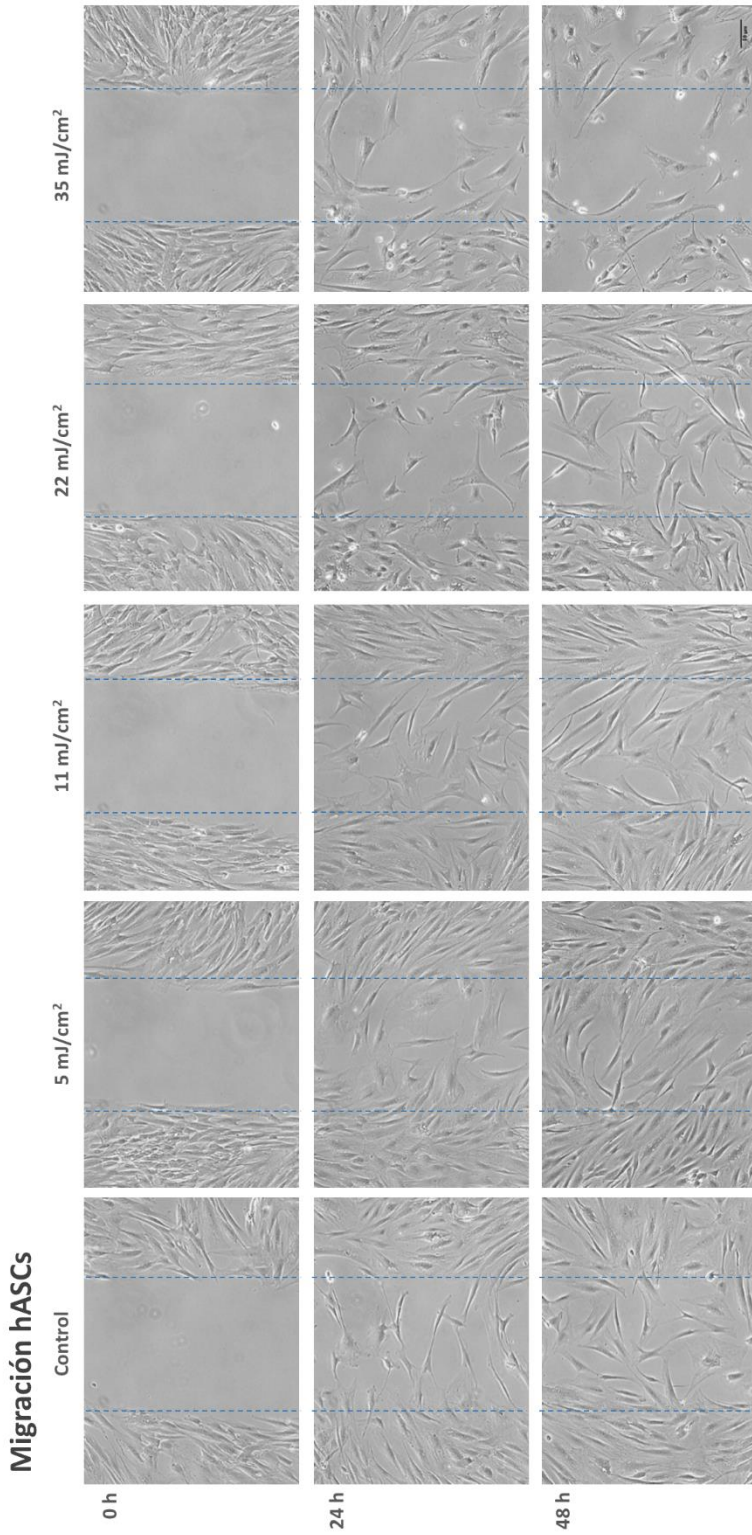


Figura 34. Migración de cultivos de hASCs en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 µm).

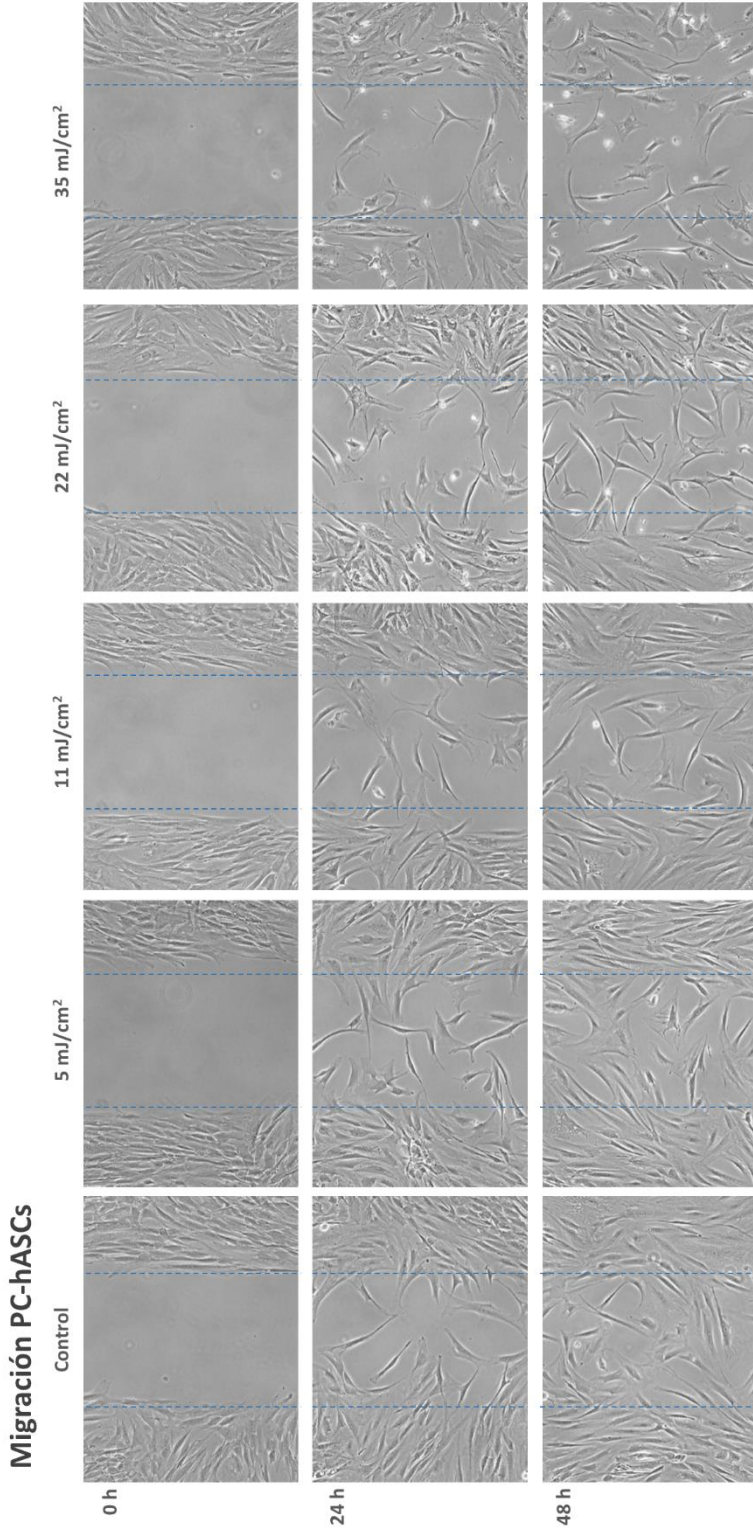


Figura 35. Migración de cultivos de PC-hASCs en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μm).

Así, a las 24 horas de la irradiación, la migración del control no irradiado de las PC-hASCs fue 1.2 veces superior al control de las hASCs ($p < 0.05$; figura 36.A), efecto que no se mantiene a las 48 h. También se observó un aumento de la capacidad migratoria de las PC-hASCs a las 24 horas de su irradiación con las dosis de 5, 11, 22 y 35 mJ/cm^2 pese a no encontrarse diferencias estadísticamente significativas. En cambio, a las 48 horas, dicho aumento se hizo evidente con la dosis de 35 mJ/cm^2 , siendo 1.7 veces superior en las PC-hASCs con respecto a las hASCs ($p < 0.05$; figura 36.B).

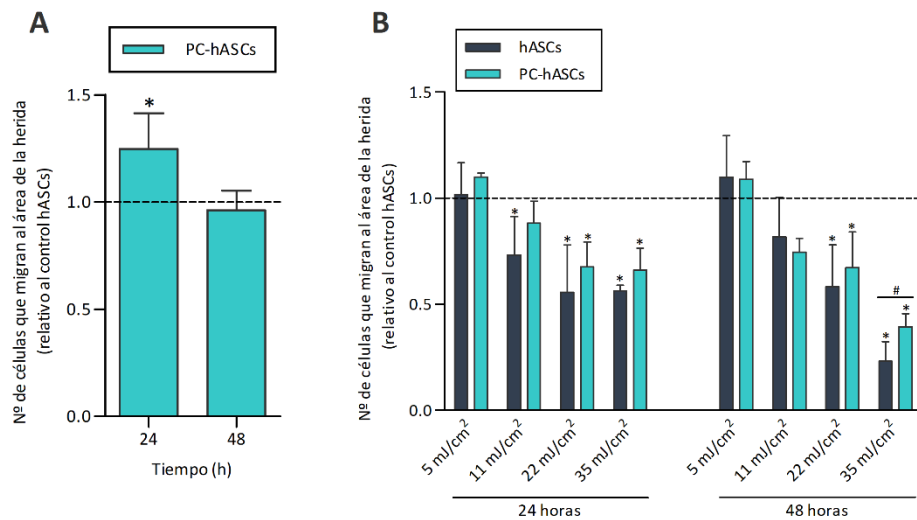


Figura 36. Cuantificación de la migración de las células hASCs y PC-hASCs en condiciones basales (A) y sometidas a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 y 48 horas de la irradiación (B). Valores relativizados a los del control no irradiado de las hASCs (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. * $p < 0.05$ con respecto al control de las hASCs no irradiadas; # $p < 0.05$ entre las hASCs y PC-hASCs.

El pre-acondicionamiento con dosis bajas de H₂O₂ no modifica la morfología, el ciclo celular y la actividad proliferativa de las hASCs. Tras la exposición de los cultivos a la radiación UV-B, las PC-hASCs muestran mayor viabilidad, actividad de migración y capacidad de respuesta al estrés oxidativo, al menos en parte relacionado con la activación del sistema antioxidante intracelular inducida por Nrf2.

A la vista de estos resultados, se planteó una estrategia terapéutica basada en la utilización del medio acondicionado por las PC-hASCs (PC/CM) privadas de suero durante 48 horas como mecanismo de protección del daño causado por la radiación en los fibroblastos de la dermis.

En el siguiente capítulo se presenta el estudio del tratamiento de los HFFs con PC/CM y el análisis del efecto de dicho tratamiento en la protección de estas células frente a la radiación UV-B.

V. Capítulo 3

Evaluación del efecto del medio acondicionado por las células PC-hASCs en la respuesta de los HFFs a la irradiación con UV-B

El beneficio terapéutico de las MSCs es atribuible tanto a su capacidad de diferenciación, como al efecto paracrino ejercido por los factores solubles que secretan. Estas células sintetizan y secretan una gran cantidad de sustancias biológicamente activas, principalmente antioxidantes y citocinas, que pueden ser obtenidas y almacenadas de forma segura durante períodos prolongados de tiempo, sin que se produzca una pérdida de su actividad ^{199,200}. Se cree que el 80% del potencial terapéutico de las MSCs se debe a dicha actividad paracrina ⁹⁶. Por esta razón, los productos paracrinos de las MSCs podrían ser considerados una alternativa al uso de las propias células en terapia regenerativa, con las siguientes ventajas ^{102,138}: *i)* evitar problemas asociados con el trasplante de células vivas como la compatibilidad inmune, la posible tumorigenicidad, la formación de émbolos y la transmisión de infecciones; *ii)* biomodificar y escalar a dosis específicas los componentes del secretoma para obtener un producto final con mayor rendimiento; y *iii)* reducir el coste de la terapia, ya que el uso del CM es más económico y más práctico para la aplicación clínica.

En este capítulo se analiza el efecto terapéutico del CM derivado de las células PC-hASCs (PC/CM) en la respuesta de los HFFs a la radiación UV-B. En primer lugar, se establece un modelo de tratamiento de los HFFs con PC/CM y, a continuación, se analizan distintos parámetros biológicos relacionados con el fotoenvejecimiento.

V.1. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1.1. Obtención del medio acondicionado derivado de las células PC-hASCs

Para la obtención del medio derivado de las PC-hASCs, al término del último ciclo de oxidación del pre-acondicionamiento, se realizó un lavado con PBS y se incubaron las células en medio completo (0.13 ml/cm^2) en ausencia de FBS durante 48 horas. A continuación, se recogió el medio, se centrifugó a 250 g durante 5 minutos y se filtró a través de una membrana de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Este medio acondicionado derivado de las PC-hASCs (PC/CM) se almacenó a -20°C para su posterior uso (figura 37).

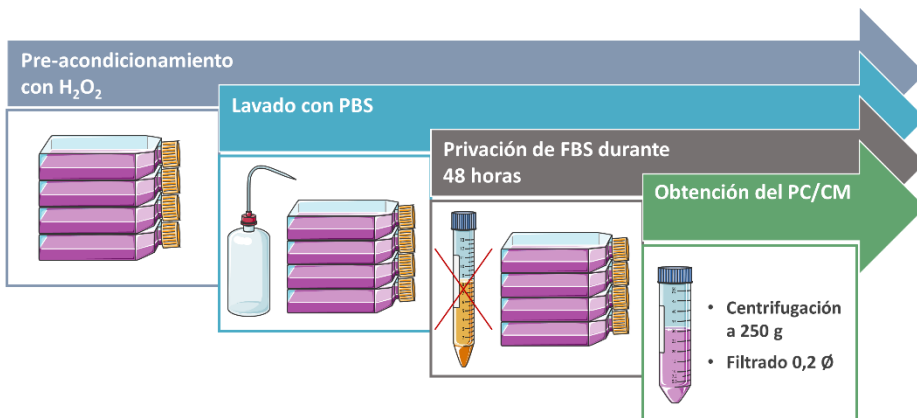


Figura 37. Esquema del proceso de obtención del PC/CM.

V.1.2. Modelo de tratamiento de HFFs con PC/CM

Para llevar a cabo el tratamiento de los HFFs con el PC/CM (HFFs PC/CM+), se procedió a la siembra de los cultivos según las condiciones indicadas en la tabla 5, seguida de un período de incubación de 24 horas con medio de cultivo estándar. El soporte de siembra utilizado dependió del parámetro a analizar.

El tratamiento consistió en la sustitución del medio de cultivo por el mismo volumen de PC/CM, mantenido durante un periodo de incubación de 24 horas. Pasado este tiempo, y tras un lavado con PBS, se procedió a la irradiación de las células a 11, 22 y 35 mJ/cm². Por último, se sustituyó el PBS por medio completo sin FBS y se incubaron los cultivos durante diferentes periodos de tiempo, dependiendo del tipo de ensayo a realizar (figura 38).

Los HFFs no tratados (HFFs PC/CM-) se cultivaron en paralelo, sustituyendo el medio de cultivo por medio fresco sin FBS.

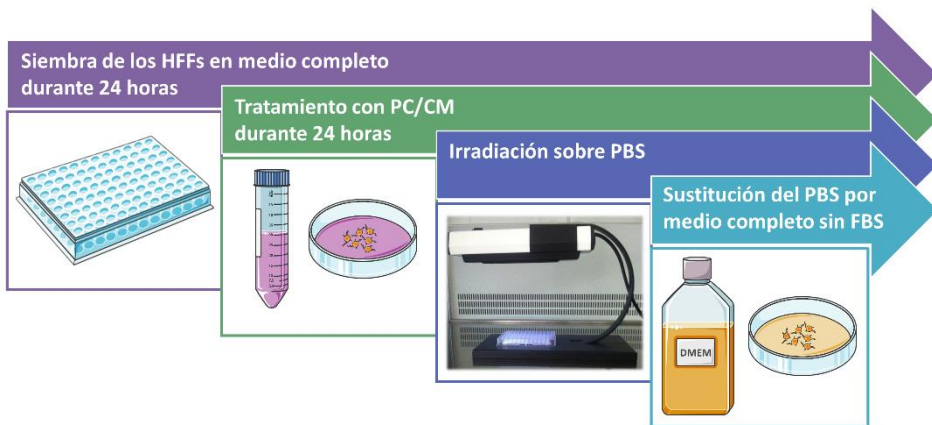


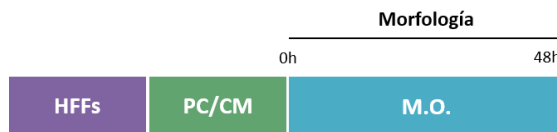
Figura 38. Esquema del proceso de tratamiento de los HFFs con PC/CM.

V.1.3. Determinación del efecto del tratamiento con PC/MC sobre los HFFs en condiciones basales

El efecto del tratamiento con PC/MC sobre los HFFs en condiciones basales (en ausencia de estrés por irradiación), se determinó mediante el estudio de la morfología y la proliferación celular.

V.1.3.1. Análisis de la morfología celular

El efecto del PC/CM sobre la morfología celular de los HFFs se analizó 48 horas después de aplicar el tratamiento, mediante capturas de la imagen de los cultivos a través del microscopio de contraste de fases.



V.1.3.2. Análisis de la proliferación celular

La proliferación celular de los HFFs PC/CM+ se determinó mediante el método colorimétrico del PB. Para ello, los HFFs fueron sembrados a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo (5 réplicas por muestra). Transcurridas 0, 24 y 48 horas del tratamiento, las muestras se incubaron con PB (10% v/v) durante 3 horas a 37°C y se realizaron medidas de absorbancia en el espectrofotómetro a 570 nm y 600 nm. Los valores se expresaron relativos a los obtenidos de los HFFs PC/CM-.



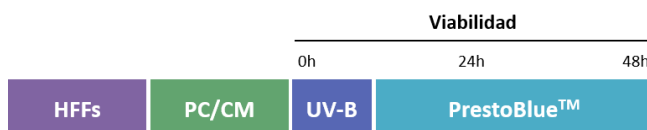
V.1.4. Determinación del efecto del tratamiento con PC/MC sobre la resistencia de los HFFs a la radiación UV-B

El efecto del tratamiento con PC/MC sobre la resistencia de los HFFs a la radiación con UV-B, se determinó mediante la evaluación de la viabilidad celular, los niveles intracelulares de ROS, el porcentaje de apoptosis, el análisis de

citotoxicidad celular, el porcentaje de células senescentes y las alteraciones en el citoesqueleto celular, la migración celular y las modificaciones en la expresión génica y síntesis de proteínas relacionadas con la remodelación de la MEC y la inflamación.

V.1.4.1. Evaluación de la viabilidad celular

Para analizar el efecto del tratamiento sobre la viabilidad de los HFFs sometidos a la radiación UV-B, los cultivos fueron sembrados a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo (5 réplicas por muestra). Tras el tratamiento, el PC/MC fue sustituido por PBS y se procedió a la irradiación de las células a 11, 22 y 35 mJ/cm^2 . A continuación, se sustituyó el PBS por medio de cultivo fresco sin FBS. Transcurridas 0, 24 y 48 horas de la irradiación, se añadió PB al 10% (v/v) y se midió la absorbancia de las muestras como se ha descrito previamente. Los valores de absorbancia obtenidos se expresaron relativizados a los valores del control no irradiado de los HFFs PC/CM- a tiempo 0 horas.



V.1.4.2. Determinación de la citotoxicidad

El efecto del tratamiento con PC/CM sobre la citotoxicidad de los HFFs sometidos a radiación UV-B se llevó a cabo mediante la cuantificación de la enzima LDH liberada al medio por las células dañadas. Para ello, se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo (5 réplicas por muestra). Tras el tratamiento con PC/CM, los cultivos fueron irradiados sobre 100 μ l de PBS con dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm^2 . A continuación,

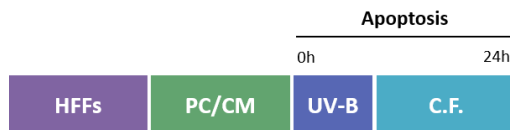
se sustituyó el PBS por medio completo sin FBS y las células se incubaron durante 24 horas. La medida de la cantidad de LDH liberada se llevó a cabo mediante el kit de detección de citotoxicidad (*Cytotoxicity Detection kit*) según el protocolo detallado previamente en la página 92.



V.1.4.3. Análisis de la apoptosis

La determinación del porcentaje de HFFs en apoptosis se llevó a cabo mediante citometría de flujo, utilizando para ello el kit *Alexa Fluor® annexin 488 V/Dead Cell Apoptosis (Molecular Probes®, Eugene, OR, EE.UU.)*. Este método permite diferenciar las células vivas de las apoptóticas y necróticas mediante el doble marcaje con PI y anexina V. La membrana celular es impermeable al PI, un agente fluorescente que se une a los ácidos nucleicos en las células muertas, mientras que la anexina V, se une a la fosfatidilserina expuesta en la membrana externa de las células apoptóticas.

En este caso, los HFFs fueron sembrados a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos, en 1 ml de medio completo. Tras el tratamiento con PC/CM y la irradiación de las células, los cultivos se mantuvieron durante 24 horas, momento en el que las células fueron despegadas del soporte de cultivo con tripsina-EDTA y la suspensión celular se centrifugó a 250 g durante 5 minutos a 4°C. Después de un lavado con PBS a 4°C, el *pellet* celular fue marcado con los fluoróforos anexina V *Alexa Fluor 488* (5%) y PI (100 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la medida de fluorescencia con el citómetro de flujo (λ_{em} : 499 y 617 nm, λ_{ex} : 488 y 535 nm). Los datos obtenidos fueron expresados en UAF.



V.1.4.4. Determinación de los niveles intracelulares de ROS

El efecto del tratamiento con PC/MC sobre los niveles intracelulares de ROS de los HFFs sometidos a radiación UV-B se analizó mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda H₂DCF-DA. Para ello, 1×10^4 células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, en 100 μ l de medio completo (5 réplicas por muestra). Finalizado el tratamiento, se midió la autofluorescencia de los pocillos sobre 50 μ l de PBS. A continuación, se procedió a la irradiación de las células con UV-B (11, 22 y 35 mJ/cm^2) sobre 100 μ l de PBS. La fluorescencia emitida por la sonda (λ_{ex} : 490 nm y λ_{em} : 538 nm) fue registrada en el fluorímetro de placas 1 hora después de la irradiación. Los valores de ROS se expresaron en UAF relativizados al número de células.

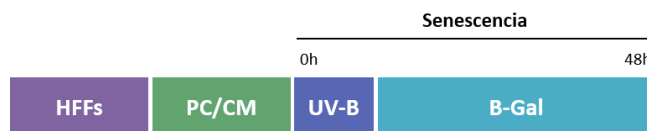


V.1.4.5. Evaluación de la senescencia celular

El análisis del efecto del tratamiento con PC/CM sobre la senescencia celular inducida por la radiación UV-B en los HFF, se determinó mediante la medida del incremento de la actividad de la enzima SA- β -gal en dicha población celular. Para ello, se sembraron 6.2×10^4 células en placas de 24 pocillos, en 200 μ l de medio completo (3 réplicas por muestra). Como control positivo se utilizaron cultivos envejecidos (pases 10-14). Tras el tratamiento con PC/CM, los cultivos se irradiaron a 11, 22 y 35 mJ/cm^2 y se incubaron durante 48 horas.

Posteriormente, se lavaron las células con PBS 1x y se fijaron con la solución fijadora (0.2% de formaldehído + 0.02% de glutaraldehído) durante 6-7 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS 1x para eliminar los restos de fijador y se incubaron durante toda la noche a 37°C, en ausencia de CO₂, con la solución de tinción que contiene X-gal. Las células senescentes se identifican por la coloración azul que adopta el citoplasma tras la hidrólisis del sustrato X-gal.

La observación y cuantificación de las células senescentes se realizó mediante microscopía de campo claro y se expresó como porcentaje de células senescentes en el cultivo.



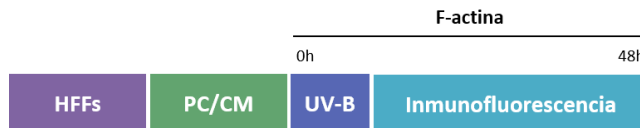
V.1.4.6. Análisis de la integridad estructural celular

Para evaluar el efecto del tratamiento con PC/CM sobre el mantenimiento de la morfología celular de los HFFs, se llevó a cabo el análisis del citoesqueleto mediante el marcaje de los filamentos de actina (F-actina) con *Phalloidin-iFluor 488* (Abcam, Cambridge, Reino Unido). La faloidina es un péptido presente en el género *Amanita* que se une fuertemente a la F-actina de las células. Su uso como sonda conjugada con un fluoróforo permite analizar la distribución de los filamentos de actina del citoesqueleto.

Se sembraron 3×10^4 células/pocillo en cámaras de cultivo de 8 pocillos, en 200 μ l de medio completo. Tras el tratamiento, se irradiaron los cultivos con dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm^2 y se sustituyó el PBS por medio fresco sin FBS. Después de 48 horas de incubación, se realizaron dos lavados con PBS y se fijaron las células con PFA al 4%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras tres

lavados con PBS se permeabilizaron las membranas con Tritón X-100 al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los cultivos fueron incubados durante 1 hora con *Hoechst* (0.1 $\mu\text{l/ml}$, *Abcam, Cambridge*, Reino Unido) y *Phalloidin-iFluor 488* (1 $\mu\text{l/ml}$) en BSA al 3%.

Las muestras se analizaron mediante el microscopio de fluorescencia *Zeiss Axioskop* (λ_{exc} :493 nm y λ_{em} : 517 nm).



V.1.4.7. Análisis de la expresión génica

La determinación del efecto del tratamiento con PC/CM sobre la expresión génica de proteínas relacionadas con la inflamación (IL-6) y con la remodelación de la MEC (MMP-1 y pro-colágeno tipo I), se realizó mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) a partir del ARNm obtenido de cada tipo celular en las diferentes condiciones de cultivo. Para ello, los HFFs se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos, en 1 ml de medio completo. Tras el tratamiento con PC/CM, se irradiaron los cultivos a 11, 22 y 35 mJ/cm^2 y se sustituyó el PBS por medio completo sin FBS.

Extracción y purificación del ARNm

La extracción del ARNm celular se realizó con el Kit *NucleoSpin® RNA XS* (*Macherey-Nagel, Düren*, Alemania). Para ello, 24 horas después de la irradiación, las células fueron despegadas del soporte de cultivo con Tripsina-EDTA y centrifugadas a 250 g durante 5 minutos. El *pellet* celular resultante fue lisado y homogenizado con el agente reductor TCEP (tris-(2-carboxietil) fosfina

clorhidrato) al 2%. Seguidamente, se añadió el transportador de ARN (polinucleótido-fosforilasa, 0.2 ng/ μ l) para mejorar la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de sílice y evitar la degradación del ARN. Las muestras fueron transferidas a los tubos colectores para su filtrado a 11.000 g durante 30 segundos y se añadió etanol al 70% para homogenizar los lisados. A continuación, se procedió a la extracción del ARN mediante su unión a las membranas de sílice contenidas en las columnas colectoras. Para ello, los lisados fueron transferidos a tubos colectores con membrana de sílice y centrifugados a 11.000 g durante 30 segundos. Para la desalación de la membrana se añadió la solución de guanidina tiocianato + etanol (5-20%) y se centrifugó a 11.000 g durante 30 segundos. A continuación, se eliminó la contaminación con ADN mediante su digestión con rDNasa durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavados con la solución de lavado (guanidina tiocianato 30-60% + etanol 20-35%) y se eluyó el ARN en 20 μ l de H₂O libre de RNasa mediante su centrifugación a 11.000 g durante 30 segundos (figura 39).

La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría. La relación de absorbancia a 260 y 280 nm, medida por el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), se utilizó como parámetro para cuantificar y evaluar la calidad del ARN total extraído (valores que oscilan entre 1.8 y 2).



Figura 39. Esquema del proceso de extracción y purificación del ARNm.

Retrotranscripción

La retrotranscripción del ARN para sintetizar ADN complementario (cDNA) mediante la enzima retrotranscriptasa (RT) se llevó a cabo con el *kit iScript™ cDNA Synthesis* (Bio-Rad, Segrate, MI, Italia), en condiciones de esterilidad y manteniendo los reactivos en hielo. Para ello, se añadieron 4 µl del mix de reacción (oligo d(T) y cebadores aleatorios), 1 µl de RT y 300 ng de ARN, y se ajustó el volumen a 20 µl con H₂O libre de RNasa. El paso de transcripción inversa se realizó en el termociclador (*C1000™ Thermal Cycler*, Bio-Rad, Segrate, MI, Italia) según el siguiente programa: un único ciclo de cebado durante 5 minutos a 25°C, transcripción reversa durante 20 minutos a 46°C e inactivación de la RT durante 1 minuto a 95°C.

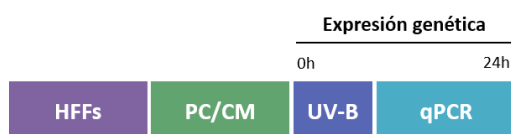
Amplificación del cDNA

El nivel de expresión de IL-6, MMP-1 y pro-colágeno tipo I se determinó mediante PCR en tiempo real. Para ello, se preparó el mix de reacción formado por: 12.5 ng de cDNA, 4 µl del fluoróforo *SYBR Green* (λ_{ex} : 498 y λ_{em} : 522 nm; *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix*, Bio-Rad, Segrate, MI, Italia), 0.5 µM de cebadores (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, IA, EE.UU.; tabla 9) y H₂O hasta ajustar el volumen de la reacción a 10 µl. La amplificación del cDNA se realizó en el termociclador (*CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System*, Bio-Rad, Segrate, MI, Italia) en las siguientes condiciones de ciclo: un ciclo de incubación de 3 min a 93°C, seguido de 39 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C).

La cuantificación de la fluorescencia (λ_{ex} : 498 y λ_{em} : 522 nm) se realizó con el programa CFX Manager y la señal de amplificación se normalizó a los valores de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Tabla 9. Secuencia directa e inversa de los cebadores de los genes MMP-1, COL1A2, IL-6 y GAPDH.

Gen	Secuencia directa del cebador (3'-5')	Secuencia inversa del cebador (5'-3')
IL-6	GCAGATGAGTACAAAAGTCCTGA	CTTCGACGTCCGTGTCTT
MMP-1	GACAGAGATGAAGTCCGTTT	CTGTAGATGTGCGAGGAAACCG
COL1A2	GTGAGAGAGGAGTTGTTGGAC	TACCAGACCTACCTAACTTCC
GAPDH	ACATCGCTCAGACACCATG	GGGAAGTAACTGGAGTTGATGT

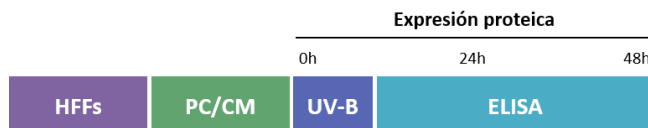


V.1.3.8. Análisis de la síntesis proteica

El análisis del efecto del tratamiento con PC/CM sobre el nivel de síntesis proteica de IL-6, MMP-1 y pro-colágeno tipo I en los HFFs sometidos a radiación UV-B se determinó mediante la técnica ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Este método permite detectar y cuantificar un antígeno específico en la muestra, mediante su unión a un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable mediante un cambio de color. La medida de la absorbancia es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra ²⁰¹.

Para ello, los HFFs se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos, en 100 μ l de medio completo. Tras el tratamiento con PC/CM, los cultivos fueron irradiados con dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm² y se substituyó el PBS por medio fresco sin FBS. A las 24 horas de la irradiación, se recogió el medio y se centrifugó a 250 g durante 5 minutos, para su almacenamiento a -20°C hasta su uso.

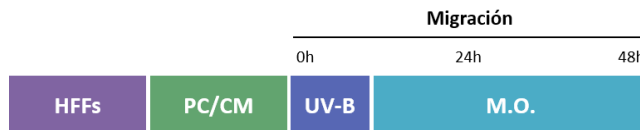
Para la cuantificación proteica se utilizaron los kits *DuoSet® Ancillary Reagent kit 2, Human IL-6, Human Total MMP-1 y Human Pro-Collagen Iα1/COL1A1* (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). En primer lugar, se cubrió la superficie de los pocillos de la microplaca con 100 µl de anticuerpo de captura (2 µg/ml para IL-6, 800 ng/ml para MMP-1 y 4 µg/ml para COL1A1) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de tres lavados con la solución de lavado (0.05% *Tween* en PBS), se bloquearon las uniones inespecíficas con 300 µl de reactivo diluyente (1% BSA en PBS), durante 1 hora. Tras el periodo de incubación, se lavaron los pocillos para eliminar los restos de BSA y se añadieron 100 µl/pocillo de medio de cultivo procedente de las muestras a evaluar diluido en reactivo diluyente (1:64 para IL-6, 1:256 para MMP-1 y 1:512 para COL1A1), durante 2 horas. Se procedió a otra fase de lavado y se incubaron las muestras en 100 µl de anticuerpo de detección (50 ng/ml para IL-6, 250 ng/ml para MMP-1 y 100 ng/ml para COL1A1), durante 2 horas. Después de los lavados, se añadieron 100 µl de estreptavidina-HRP (*Horseradish Peroxidase*, dilución 1:40) y se incubaron las muestras protegidas de la luz durante 20 minutos. A continuación, se lavaron los pocillos y se añadieron 100 µl de la solución sustrato (50% H₂O₂ y 50% tetrametilbencidina) durante 20 minutos en oscuridad. Finalmente, se añadieron 50 µl de 2N H₂SO₄ sobre el sustrato para detener la reacción y se midió la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a 450 y 540 nm. La cantidad de proteína se calculó tomando como referencia la curva estándar de concentración conocida de cada proteína, y relativizada al número de células.



V.1.4.9. Análisis de la migración celular

El efecto del tratamiento con PC/CM sobre la migración de los HFFs sometidos a radiación UV-B se determinó mediante el ensayo de “cierre de la herida” ¹⁹⁵. Para ello, se sembraron 7×10^3 células/pocillo en 70 μ l de medio completo en placas con inserto de silicona de dos pocillos. Tras el tratamiento con PC/CM, los HFFs fueron irradiados con dosis de 5, 11, 22 y 35 mJ/cm^2 , se eliminó el inserto y se sustituyó el PBS por medio completo sin FBS.

Inmediatamente después de la irradiación y cada 24 horas, se tomaron imágenes con el microscopio de contraste de fases. Los datos se representaron expresando el valor promedio del número de células migradas en cada tiempo y para las diferentes intensidades de irradiación, relativizando los datos a los obtenidos en el control no irradiado de los HFFs PC/CM-.



V.1.5. Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron con un mínimo de tres réplicas y, al menos, tres experiencias independientes.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa informático *GraphPad Prism* (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Las pruebas paramétricas utilizadas para determinar la significación fueron la *t-Student* y el análisis de la varianza (ANOVA), dependiendo del caso. Todos los datos están representados como la media \pm DE.

V.2. RESULTADOS

V.2.1. Análisis del efecto del tratamiento con PC/CM en los HFFs

Con el objetivo de determinar si el tratamiento con PC/CM induce modificaciones en parámetros celulares esenciales, los HFFs PC/CM- y PC/CM+ fueron analizados mediante microscopía de contraste de fases para la evaluación de la morfología celular y a través de espectrofotometría de placa con PB para la valoración de la actividad proliferativa.

V.2.1.1. Efecto sobre la morfología

Las imágenes de la figura 40 muestran que tanto los cultivos de HFFs PC/CM+ como los HFFs PC/CM- presentan las mismas características morfológicas y de adhesión al soporte de cultivo. Así, en ambos casos los HFFs adoptan una morfología fusiforme, con finas prolongaciones citoplasmáticas, y crecen adheridas a la superficie del soporte de cultivo formando una monocapa.

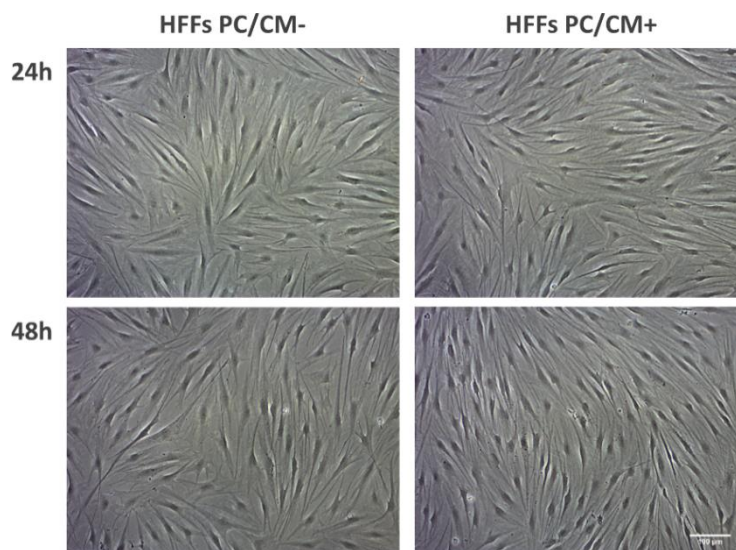


Figura 40. Imágenes de microscopía de contraste de fases representativas de los cultivos de HFFs PC/CM+ y PC/CM- en placas de cultivo de 6 pocillos (barra de escala 100 µm) a las 24 y 48 horas de la siembra.

V.2.1.2. Efecto sobre la proliferación celular

El efecto del tratamiento con PC/CM sobre la proliferación celular se analizó mediante el ensayo de viabilidad celular con PB. Como se muestra en la figura 41, transcurridas 48 horas desde el tratamiento con PC/CM, se produjo un ligero aumento de la proliferación de los HFFs PC/CM+ con respecto a los HFFs PC/CM- (incremento de 1.1 veces a las 48 horas; $p < 0.01$).

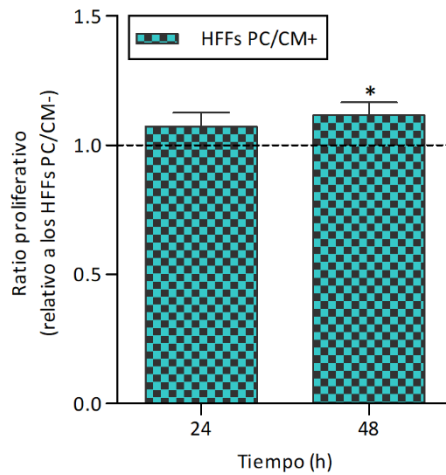


Figura 41. Ratio proliferativo entre los HFFs PC/CM- (valores normalizados en la línea discontinua) y los HFFs PC/CM+ a las 24 y 48 horas tras el tratamiento. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. * $p < 0.01$.

V.2.2. Análisis del efecto del tratamiento con PC/CM en la resistencia de los HFFs a la radiación UV-B

V.2.2.1. Efecto sobre la viabilidad celular

El ensayo de viabilidad de los HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a las dosis establecidas de radiación UV-B se analizó mediante el método colorimétrico del PB. Como se muestra en la figura 42, el tratamiento aumentó significativamente

($p < 0.05$) la viabilidad de los HFFs PC/CM+ con respecto a los HFFs PC/CM- a las 24 y 48 horas tras la irradiación. Así, la viabilidad de los HFFs PC/CM+ fue 1.1, 1.1 y 1.2 veces superior con respecto a los HFFs PC/CM- con las intensidades de 11, 22 y 35 mJ/cm^2 , respectivamente a las 24 horas, y 1.2 y 1.3 veces superior con las intensidades de 22 y 35 mJ/cm^2 , respectivamente, a las 48 horas.

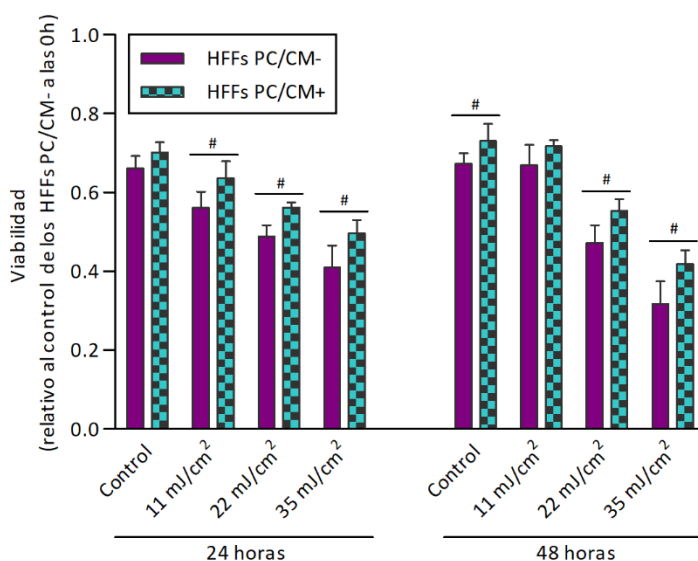


Figura 42. Viabilidad de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B (11, 22 y 35 mJ/cm^2), a las 24 y 48 horas tras su exposición. Valores relativizados a los del control no irradiado de los HFFs PC/CM- a tiempo 0 horas. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$.

V.2.2.2. Efecto sobre el grado de citotoxicidad

Para evaluar el posible efecto citoprotector del tratamiento con PC/CM, se cuantificó la liberación de la enzima LDH 24 horas después de la exposición de los cultivos a la irradiación con UV-B. Como se observa en la figura 43, el tratamiento con PC/CM redujo la cantidad de LDH liberada en los HFFs PC/CM+ en comparación con la liberada por los HFFs PC/CM-. Al igual que en el caso anterior, este efecto también se produjo con todas las dosis de irradiación, si

bien la reducción del porcentaje de citotoxicidad fue significativa con las dosis de 22 y 35 mJ/cm^2 (1.3 y 1.5 veces menor, respectivamente; $p < 0.05$).

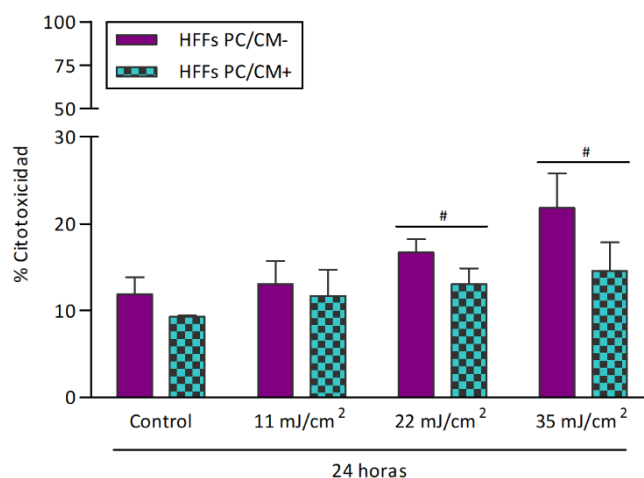


Figura 43. Porcentaje de citotoxicidad en los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, estimada a las 24 horas tras su exposición mediante la cuantificación de la LDH liberada al medio extracelular. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$.

V.2.2.3. Efecto sobre el nivel de apoptosis

El nivel de apoptosis se analizó mediante el marcaje con *Alexa Fluor*[®] 488 y PI, 24 horas después de la exposición de las células a la irradiación. Como se observa en la figura 44.A, el tratamiento con PC/CM disminuyó el porcentaje de apoptosis de los HFFs sometidos a la radiación con UV-B. Si bien con todas las dosis de irradiación se observó un porcentaje menor de células apoptóticas en los HFFs PC/CM+ en comparación con los HFFs PC/CM-, dicha reducción fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$) con las dosis de 22 y 35 mJ/cm^2 (3.0 y 2.3 veces menor, respectivamente; figura 44.B).

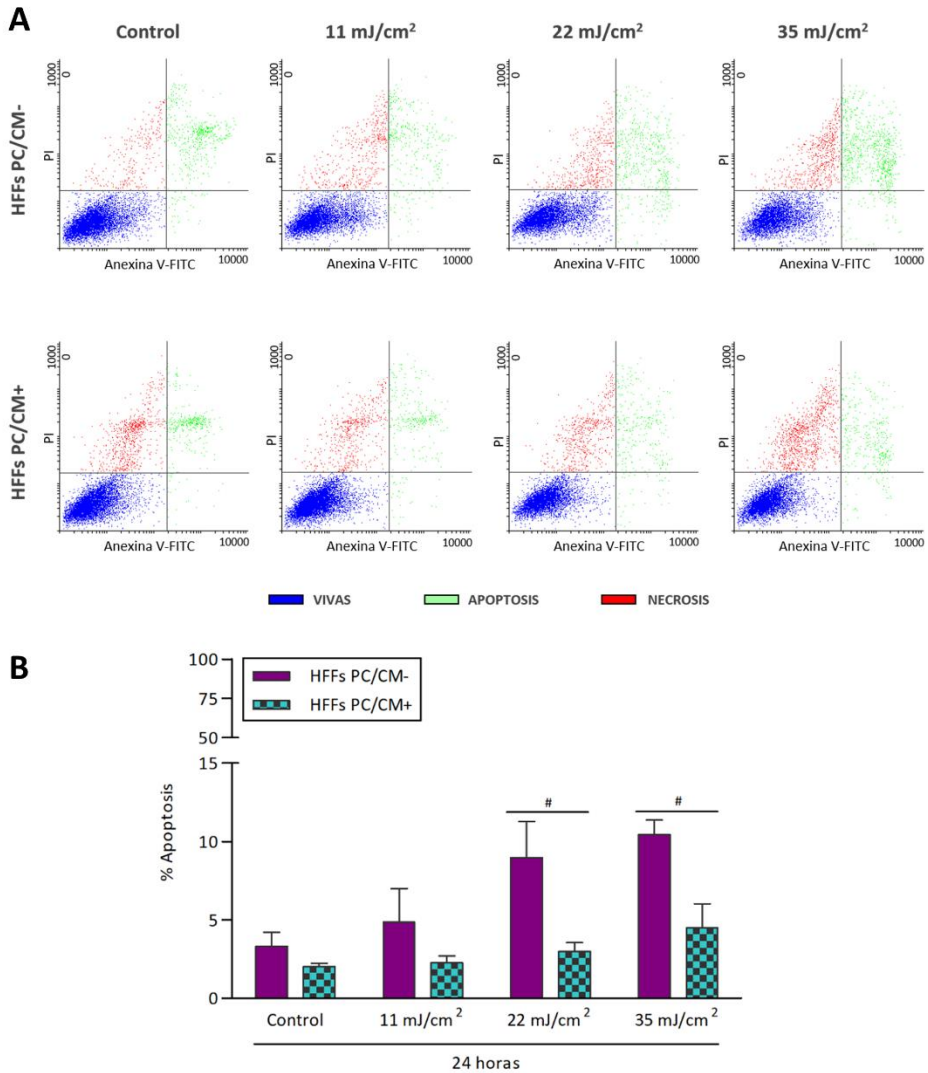


Figura 44. Análisis de la apoptosis temprana y tardía de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 horas tras su exposición. A) Histogramas representativos de los resultados de tres experiencias independientes. Ensayo de anexina V/PI realizado mediante citometría de flujo. Anexina V-/PI- indica células vivas (azul); anexina V+/PI- o anexina V+/PI+ representa la fase de apoptosis temprana o tardía respectivamente (verde); anexina V-/PI+ representa la población de células necróticas (rojo). B) Cuantificación del porcentaje de células que experimentan apoptosis temprana y tardía (media \pm DE representativa de tres experiencias independientes). # $p < 0.01$.

V.2.2.4. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS

Como se observa en la figura 45, en los cultivos no sometidos a irradiación el tratamiento con PC/CM no produjo diferencias significativas en los niveles intracelulares de ROS respecto a los cultivos de HFFs no tratados.

La exposición de los cultivos a la radiación UV-B indujo un aumento dosis-dependiente de los niveles intracelulares de ROS, tanto en los HFFs PC/CM- como en los HFFs tratados. Sin embargo, este aumento fue significativamente mayor en los HFFs PC/CM+ que en los HFFs PC/CM- (1.2, 1.1 y 1.3 veces superior con las dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm^2 , respectivamente, a los 60 minutos post-irradiación; $p < 0.05$).

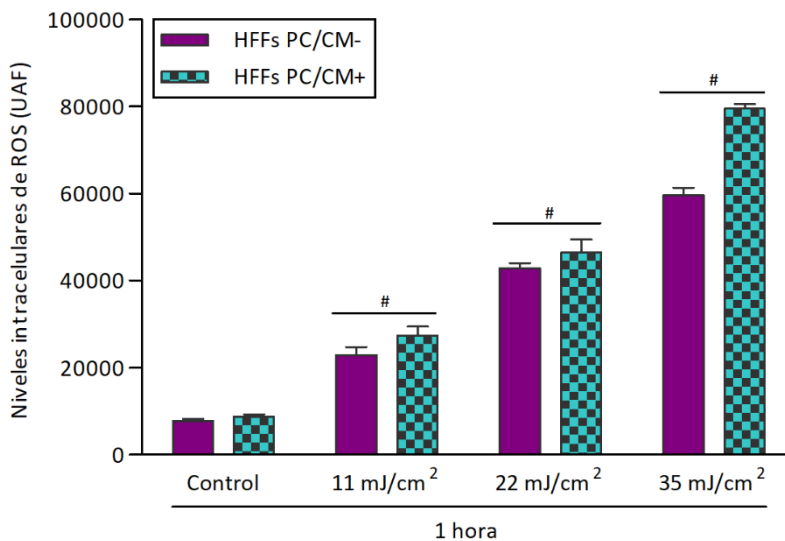
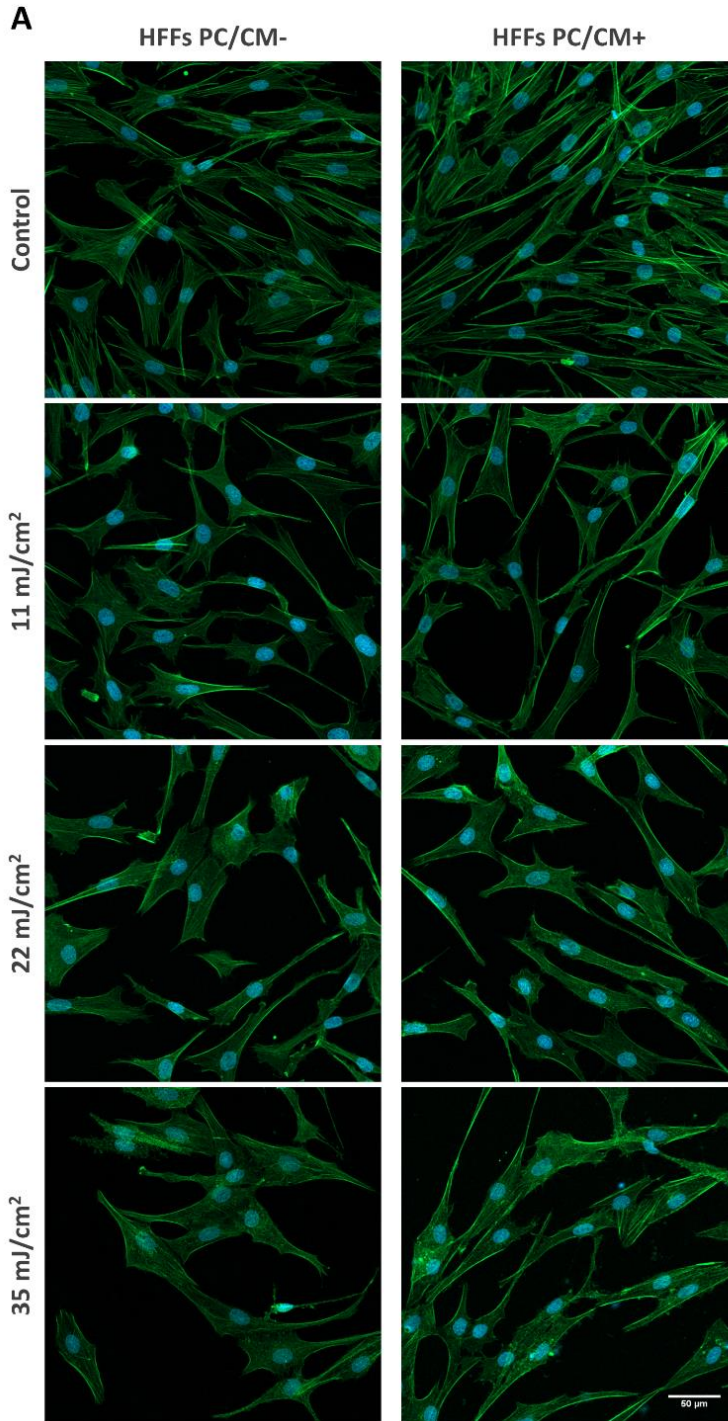


Figura 45. Niveles intracelulares de ROS en cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B. Los valores fueron obtenidos a los 60 minutos desde la irradiación. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$.

V.2.2.5. Efecto sobre el fenotipo senescente

Entre otras alteraciones citadas previamente, el fenotipo senescente está caracterizado por un aumento del tamaño celular y de la actividad de la enzima SA- β -gal. Por tanto, para determinar el efecto del tratamiento en el fenotipo de los HFFs sometidos a radiación UV-B, 48 horas tras su exposición se analizó: *i)* la distribución del citoesqueleto, que determina la morfología celular, mediante el marcaje de los filamentos de F-actina con faloidina y *ii)* el porcentaje de células senescentes mediante la detección histoquímica de la actividad de la enzima SA- β -gal.

En primer lugar, como se observa en la figura 46.A, mientras que la exposición a la radiación de los HFFs tratados con PC/CM no modificó su morfología, en los HFFs PC/CM- se produjo un aumento del tamaño celular de manera dosis-dependiente. Así, la relación entre el área del citoplasma y el número de células de los HFFs PC/CM- fue 1.4 veces superior que en los HFFs PC/CM+ con las dosis de 22 y 35 mJ/cm² ($p < 0.05$; figura 46.B).



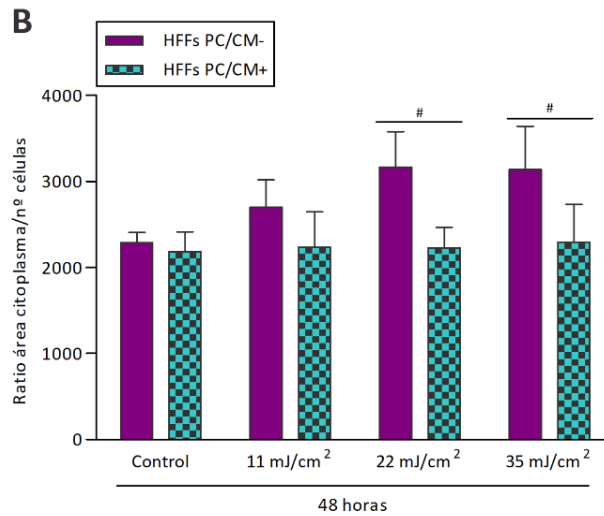


Figura 46. A) Marcaje de los filamentos de actina del citoesqueleto de los HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 48 horas tras su exposición. El color verde corresponde a la distribución de los filamentos de F-actina. En azul, los núcleos marcados con *Hoechst*. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (barra de escala 50 μ m). B) Relación entre el área del citoplasma y el número de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 48 horas tras su exposición. La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$.

En segundo lugar, en relación al análisis de la actividad de la enzima SA- β -gal, como se puede apreciar en la figura 47, la exposición de las células a la radiación UV-B indujo un incremento dosis-dependiente de la actividad de la enzima SA- β -gal. Sin embargo, este incremento fue significativamente menor en los HFFs tratados con PC/CM (figura 47.A). Así, a las 48 horas de la irradiación, el porcentaje de células senescentes en los cultivos de HFFs PC/CM+ fue 1.5 y 1.4 veces menor que en los cultivos de HFFs PC/CM- con las dosis de 22 y 35 mJ/cm², respectivamente ($p < 0.01$). Al igual que lo que ocurría en el análisis de la valoración del porcentaje de apoptosis y del nivel de citotoxicidad, la reducción de la actividad enzimática apreciada en los cultivos HFFs PC/CM+ con la dosis de 11 mJ/cm², no alcanzó significación estadística (figura 47.B).

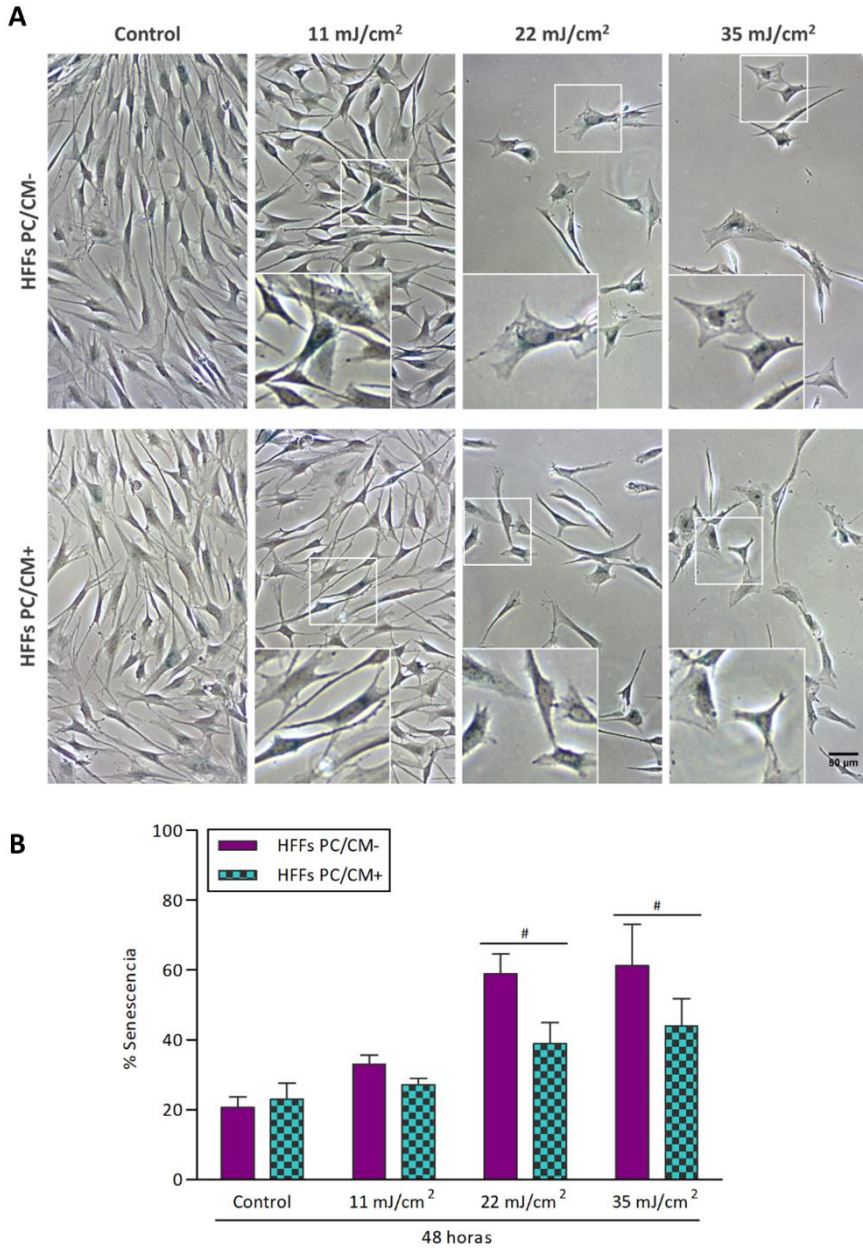


Figura 47. A) Imágenes de microscopía óptica (contraste de fases) de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, 48h tras la irradiación. Las células senescentes se identifican por la coloración azul del citoplasma debido a la actividad de la enzima SA-β-gal (barra de escala 50 µm). B) Porcentaje de células senescentes de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-. La figura muestra la media ± DE representativa de tres experiencias independientes. #p<0.01.

V.2.2.6. Efecto sobre la expresión génica y síntesis de proteínas relacionadas con la inflamación y la remodelación de la MEC

En primer lugar, se analizó la expresión génica y síntesis de la IL-6, una interleucina implicada en los procesos inflamatorios. Como se observa en la figura 48, la exposición de los HFFs a la radiación UV-B indujo un aumento dosis-dependiente tanto de la expresión como de la síntesis de IL-6, siendo este aumento menor en los HFFs tratados con PC/CM. Respecto a la expresión génica de dicha proteína a las 24 horas, aunque no hubo diferencias significativas entre los controles, en los cultivos irradiados con las dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm², dicha expresión génica en los HFFs PC/CM+ fue 1.9, 2.3 y 2.9 veces menor, respectivamente, que en los HFFs PC/CM- ($p < 0.05$; figura 48.A). Por su parte, en relación a la síntesis proteica de IL-6, si bien ésta fue significativamente menor en el control de los HFFs tratados con PC/CM a las 24 horas, a las 48 horas dicha síntesis fue 15.8 veces mayor que en los controles HFFs PC/CM- ($p < 0.001$); sin embargo, en los cultivos irradiados la síntesis de IL-6 en los HFFs PC/CM+ fue significativamente menor que en los HFFs PC/CM-, tanto a las 24 como a las 48 horas (a este último tiempo, fue 2.5, 1.9 y 2.4 veces menor, con las dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm² respectivamente; $p < 0.001$; figuras 48.B y C).

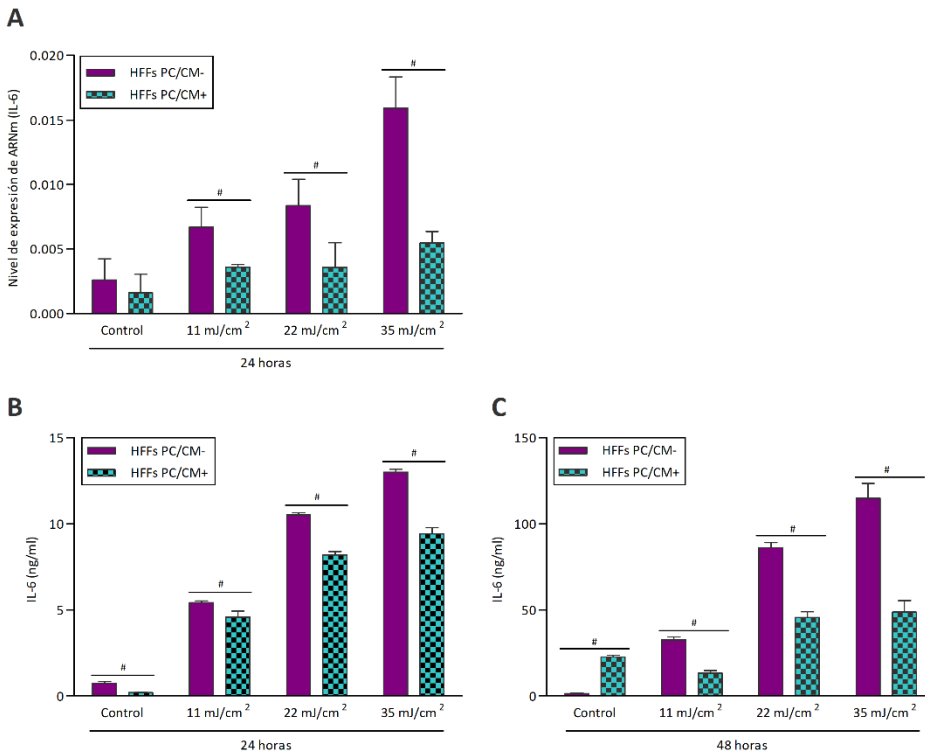


Figura 48. Niveles de expresión génica (A) y síntesis de IL-6 de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 (B) y 48 horas (C). La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$.

En segundo lugar, se analizó la expresión génica y la síntesis proteica de una de las principales enzimas relacionadas con la remodelación de la MEC, la MMP-1. Como se observa en la figura 49.A, en ausencia de irradiación, no hubo diferencias significativas en la expresión entre los controles tratados y no tratados. En cambio, la exposición de los cultivos a la radiación UV-B indujo un aumento de la expresión de MMP-1, efecto que se observó con todas las dosis de irradiación y en ambas poblaciones celulares. Sin embargo, en todos los casos, los niveles de expresión de dicha enzima fueron significativamente

menores en los HFFs PC/CM+ (1.6, 1.9 y 1.9 veces inferior que en los HFFs PC/CM-, con las dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm², respectivamente; $p < 0.001$).

En cuanto a la síntesis de MMP-1, de modo similar a lo descrito con la IL-6, a las 48 horas se observó un incremento de MMP-1 (3.3 veces mayor) en el control de los HFFs tratados con PC/CM respecto a los controles HFFs PC/CM- ($p < 0.001$). Sin embargo, en los cultivos irradiados la inducción de la síntesis de MMP-1 en los HFFs PC/CM+ fue significativamente menor que en los HFFs PC/CM-, tanto a las 24 como a las 48 horas (a este último tiempo, fue 1.7, 1.2 y 1.8 veces menor, con las dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm² respectivamente; $p < 0.001$; figuras 49.B y C).

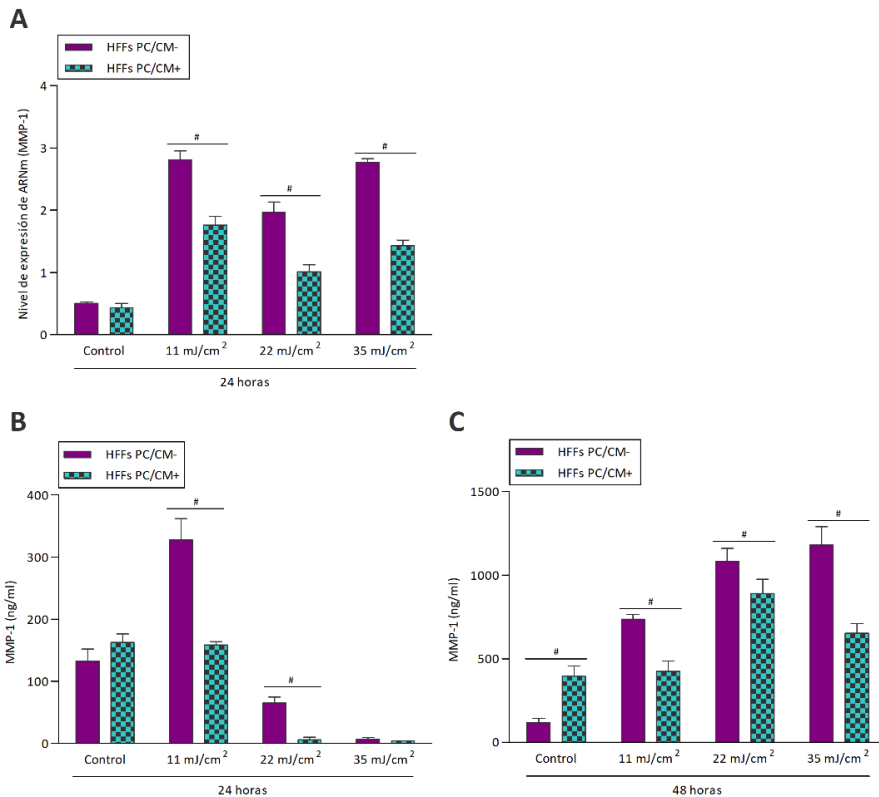


Figura 49. Niveles de expresión génica (A) y síntesis de la proteína MMP-1 de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 (B) y 48 horas (C) tras su exposición. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$.

Por último, se analizó la expresión génica y síntesis proteica de pro-colágeno tipo I, el más abundante en la piel y cuya función es proporcionarle soporte y resistencia. Como se observa en la figura 50, en ausencia de irradiación y en comparación con los HFFs PC/CM-, el tratamiento con PC/CM indujo un incremento de pro-colágeno tipo I, tanto de su expresión génica (1.9 veces superior; $p < 0.001$), como de la síntesis proteica (2.0 y 1.4 veces superior tras 24 y 48 horas de la irradiación, respectivamente; $p < 0.05$).

Tras la exposición de los HFFs a la radiación UV-B, en el caso de los HFFs PC/CM- no se observaron modificaciones en la síntesis de pro-colágeno tipo I, salvo una reducción a las 24 horas (1.8 veces respecto a su control) con la dosis de 11 mJ/cm^2 ($p < 0.01$). En el caso de los HFFs PC/CM+, dicha reducción con respecto a su control se observó con todas las dosis de irradiación a las 24 horas (2.5, 1.6 y 2.2 veces con las dosis de 11, 22 y 35 mJ/cm^2 respectivamente; $p < 0.001$), recuperando los niveles de su control a las 48 horas (figuras 50.B y C). En cualquier caso, los niveles de pro-colágeno tipo I en los HFFs PC/CM+ siempre se mantuvieron igual o por encima de los niveles de los HFFs PC/CM-.

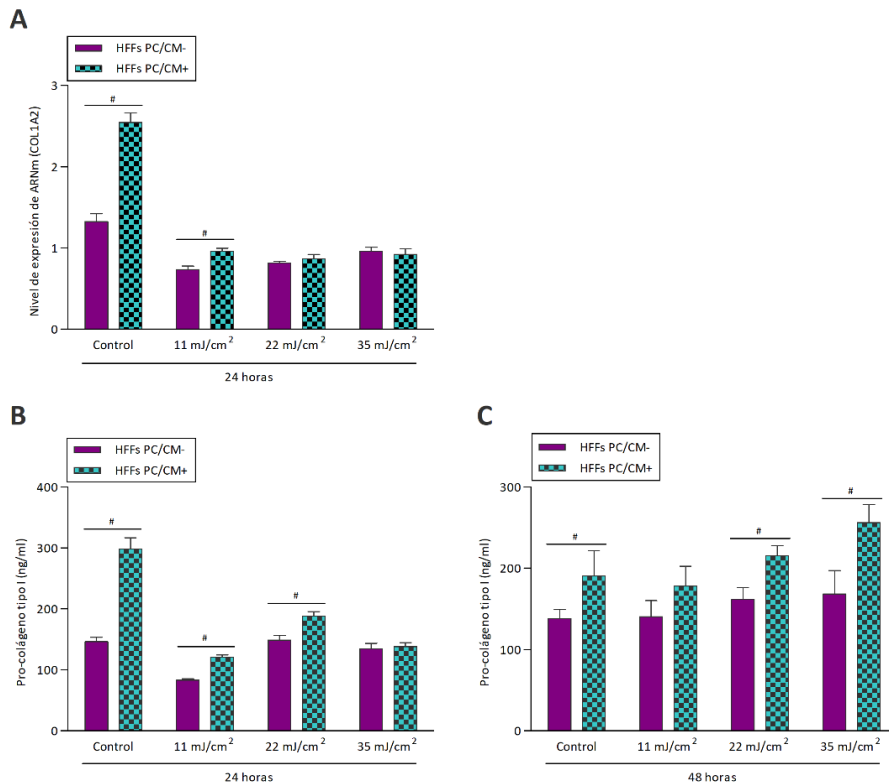


Figura 50. Niveles de expresión génica (A) y síntesis de pro-colágeno tipo I de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 24 (B) y 48 horas (C) tras su exposición. La figura muestra la media \pm DE representativa de tres experiencias independientes. # $p < 0.05$.

V.2.2.7. Efecto sobre la migración celular

Las figuras 51, 52 y 53 ilustran el efecto del tratamiento con PC/CM sobre la migración celular tanto en los cultivos controles como en los sometidos a la irradiación con UV-B. En primer lugar, en los cultivos no sometidos a irradiación, el tratamiento con PC/CM no modificó la capacidad migratoria de los HFFs (figura 53.A). En cambio, en los cultivos irradiados el tratamiento con PC/CM atenuó el efecto inhibitor de la actividad migratoria de los HFFs ejercido por la radiación UV-B cuando dicha exposición se produce a dosis bajas (figura 53.B).

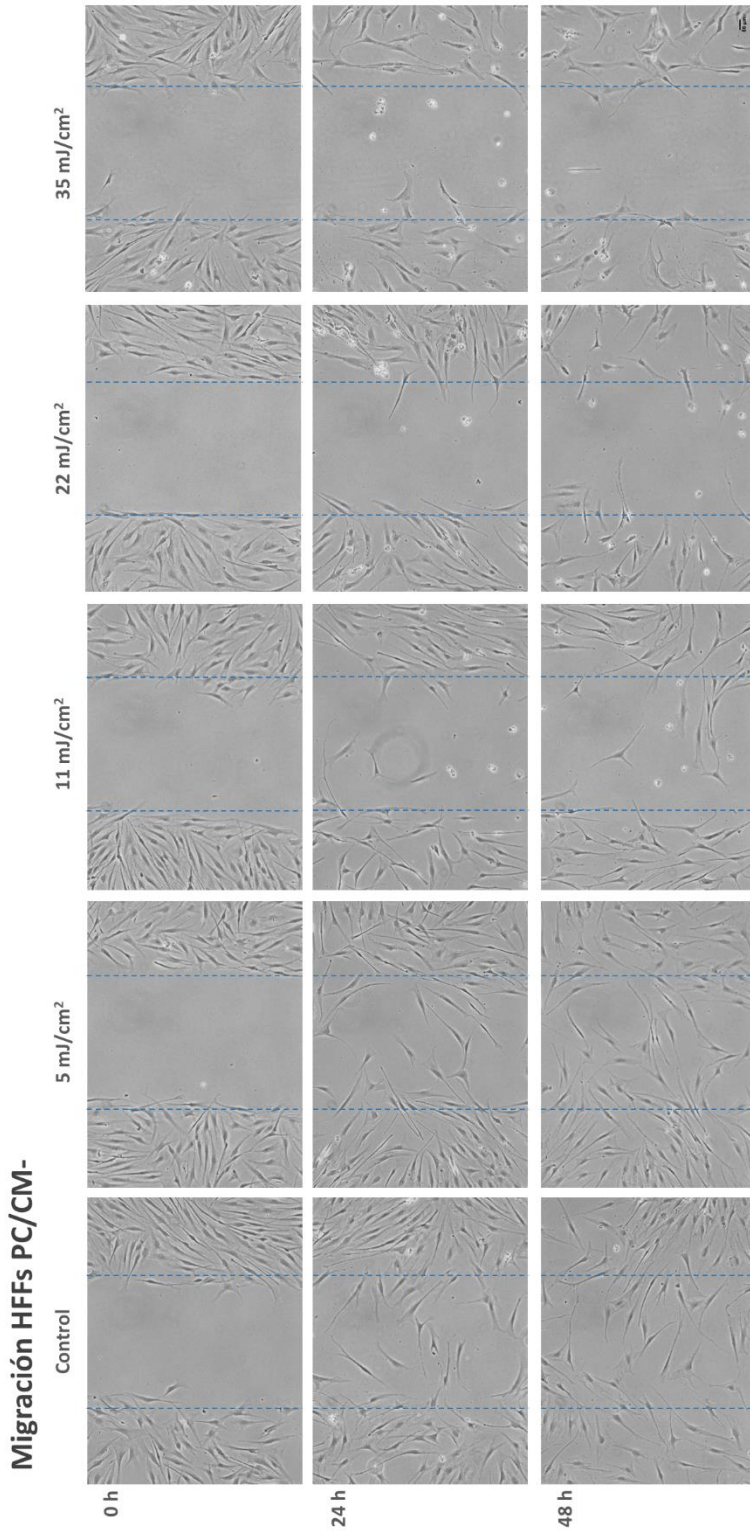


Figura 51. Migración de cultivos de HFFs PC/CM- en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barra de escala 50 μm).

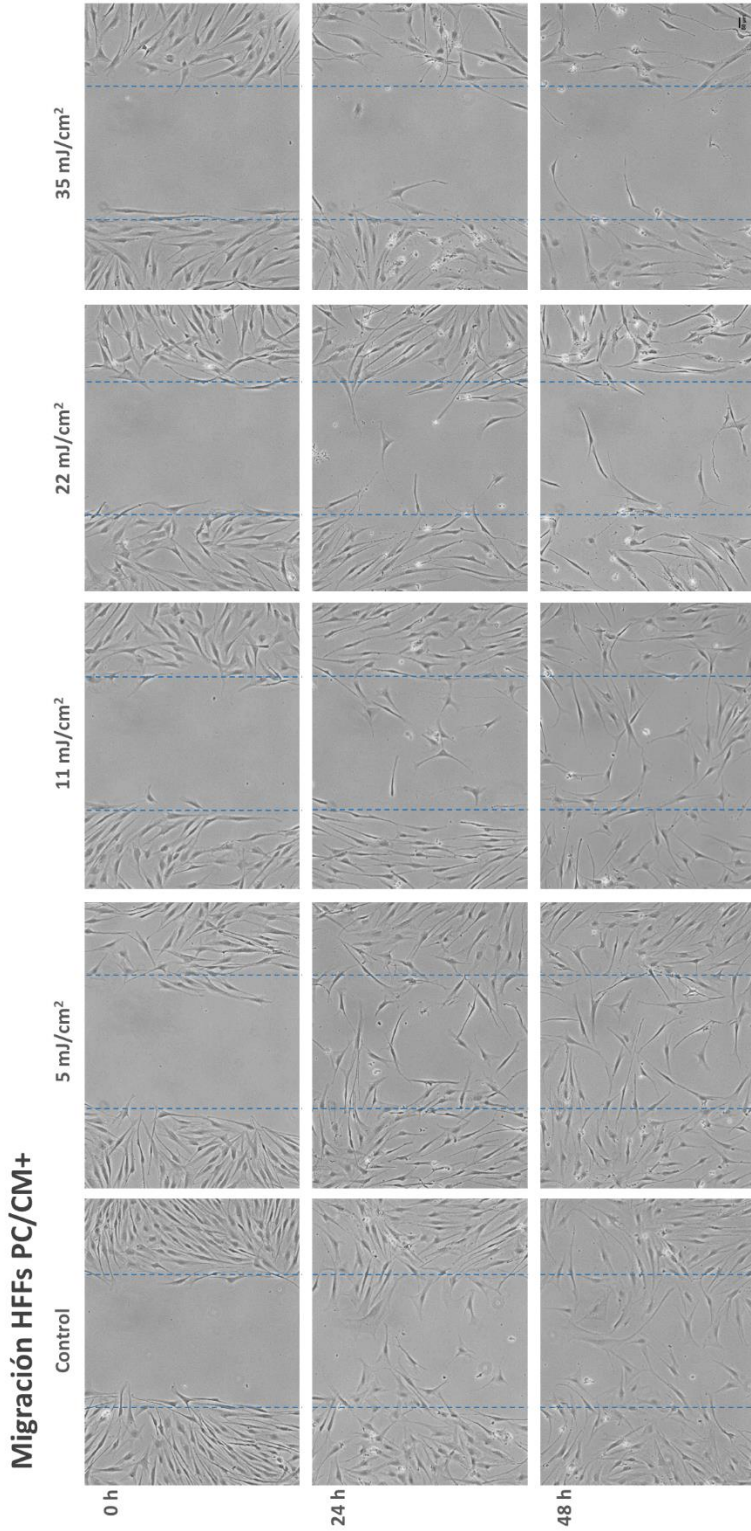


Figura 52. Migración de cultivos de HFFs PC/CM+ en insertos de dos pocillos, sometidos a distintas dosis de radiación UV-B, a las 0, 24 y 48 horas de la irradiación. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases (barras de escala 50 μm).

De este modo, a las 24 horas, a excepción de la dosis de 5 mJ/cm², se apreció una reducción dosis-dependiente de la migración en ambas poblaciones celulares, que si bien fue menor en los HFFs PC/CM+, las diferencias no alcanzaron significación estadística con respecto a los valores de los cultivos HFFs PC/CM-. A las 48 horas post-irradiación, mientras ambas poblaciones celulares irradiadas con dosis altas de 22 y 35 mJ/cm² continuaron con una elevada reducción de su capacidad migratoria (y sin demostrar diferencias significativas entre los HFFs tratados y no tratados), los cultivos irradiados con las dosis inferiores recuperaron parcialmente su actividad migratoria. Sin embargo, en este caso, dicha recuperación fue significativamente superior en los cultivos tratados con PC/CM. Así, la actividad migratoria de los HFFs PC/CM+ fue 1.4 veces superior a la de los HFF PC/CM-, tanto con la dosis de 5 como con la de 11 mJ/cm² (p<0.05). Curiosamente, con la dosis de 5 mJ/cm², los valores de migración de los HFF PC/CM+ llegaron a superar los valores de migración del control no irradiado (p<0.001; figura 53.B).

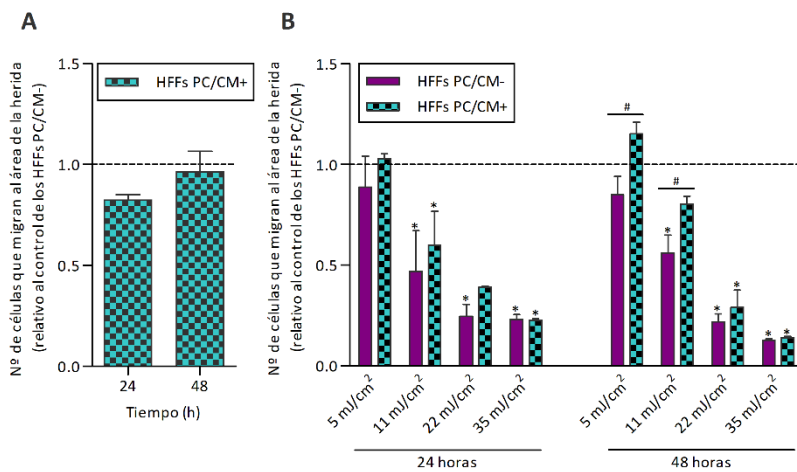


Figura 53. Migración de los cultivos de HFFs PC/CM- y PC/CM+ en condiciones basales (A) y sometidos a distintas dosis de radiación UV-B a las 24 y 48 horas de la irradiación (B). Valores relativizados a los del control no irradiado de los HFFs PC/CM (línea discontinua). La figura muestra la media \pm DE de tres experiencias independientes. *p<0.001 con respecto al control de los HFFs PC/CM-; #p<0.05 entre los HFFs PC/CM- y PC/CM+.

Tras la exposición de los cultivos a radiación UV-B, los HFFs PC/CM+ muestran mayor viabilidad y capacidad de migración, además de un incremento en la expresión y síntesis de pro-colágeno tipo I. Así mismo, los HFFs PC/CM+ muestran un menor porcentaje de citotoxicidad, apoptosis y senescencia, junto con una disminución en la expresión y síntesis de MMP-1 e IL-6.

VI. Discusión

El fotoenvejecimiento constituye uno de los retos terapéuticos de la dermatología moderna. Actualmente, la estrategia más eficaz para hacer frente al fotoenvejecimiento es la prevención primaria, también denominada fotoprotección, fundamentada en el uso tópico de lociones que actúan como filtro solar. Sin embargo, muchos de los compuestos empleados en estas lociones pueden ser absorbidos por la piel causando alergia, fototoxicidad o irritación cutánea⁶¹. Además, pueden reaccionar fotoquímicamente con los ROS reduciendo su eficacia en la protección solar¹⁷.

A pesar de la incorporación de nuevas tecnologías y enfoques innovadores en la fotoprotección tópica, la utilidad de los actuales protectores solares es limitada. En este contexto, la terapia celular con MSCs surge como una alternativa prometedora en la prevención del fotoenvejecimiento. Las MSCs poseen la capacidad de inducir la regeneración de las células dérmicas, a través de su actividad paracrina, estimulando la angiogénesis y protegiendo a dichas células frente al estrés oxidativo¹⁸².

Sin embargo, a pesar de la potencialidad terapéutica de las MSCs, su utilización no está exenta de dificultades, fundamentalmente relacionadas con el mantenimiento de su viabilidad y función antes y después de la implantación *in vivo*. Para hacer frente a estas limitaciones se han desarrollado distintas estrategias de pre-acondicionamiento *in vitro* de las MSCs basadas, principalmente, en la modificación de las condiciones de cultivo y su pre-tratamiento con moléculas bioactivas¹⁶⁶. Estas estrategias han demostrado un incremento de la tasa de supervivencia celular y del potencial de diferenciación de estas células¹⁷⁰. Además, dicho pre-acondicionamiento permite estimular la actividad paracrina induciendo la supresión de factores pro-inflamatorios y limitando el desarrollo de fibrosis¹⁷¹.

Tomando como referencia estos antecedentes, nuestro estudio de investigación ha tenido como finalidad aportar nueva información sobre la utilidad de esta

estrategia terapéutica de pre-acondicionamiento para reducir el daño celular dérmico de la radiación UV-B, y contribuir así a analizar su potencial aplicación en el fotoenvejecimiento. Para ello, evaluamos el efecto del pre-acondicionamiento de las hASCs con dosis bajas de H₂O₂, sobre la capacidad antioxidante y la actividad paracrina de estas células, con el objetivo de proteger a los fibroblastos dérmicos frente a los daños que causa la radiación UV-B. Se eligió esta población celular porque es la encargada de sintetizar el componente fibrilar de la MEC y, por tanto, del mantenimiento de su equilibrio estructural y metabólico¹⁸⁹. La irradiación *in vitro* de fibroblastos con UV-B, con la consecuente inducción de estrés oxidativo en dichas células, se ha establecido como un modelo experimental para el estudio del envejecimiento cutáneo extrínseco²⁰. Asimismo, estimamos preciso caracterizar de forma previa la respuesta de las hASCs frente al estrés oxidativo para poder valorar adecuadamente su potencial terapéutico en este ámbito.

Para llevar a cabo el estudio, establecimos un modelo de irradiación *in vitro* con UV-B. En primer lugar, analizamos el efecto de dosis crecientes de radiación UV-B sobre la viabilidad de los HFFs y las hASCs, con el fin de establecer el rango de dosis adecuado para realizar los ensayos de este estudio. Observamos una correlación directa entre las dosis de irradiación aplicada y la disminución de la viabilidad celular en ambas poblaciones celulares, si bien dicha reducción fue 1.4 veces mayor en el caso de los HFFs (LD₅₀ = 45.67 mJ/cm²) respecto a la de las hASCs (LD₅₀ = 63.21 mJ/cm²). A partir de estos datos, se estableció el rango de dosis de irradiación por encima y por debajo de los valores de LD₅₀ de los HFFs para los ensayos posteriores (11, 22, 35 y 75 mJ/cm²). Las dosis utilizadas son muy similares a las empleadas por otros autores como *Samivel* y cols., los cuales han reportado una LD₅₀ para los HFFs (40 mJ/cm²) muy próxima a la obtenida en nuestro estudio²⁰². Además de reducir la densidad de los cultivos, la radiación UV-B produjo la pérdida de la morfología fusiforme y la reducción de

adhesividad al soporte de cultivo en ambas poblaciones celulares, efectos muy evidentes a partir de la dosis intermedia de 22 mJ/cm^2 en el caso de los HFFs. Dichos cambios morfológicos pueden estar asociados a alteraciones de las vías de señalización intracelular y de la expresión génica, y afectar a la movilidad celular ²⁰³.

En la misma línea, la evaluación de la actividad de la enzima LDH —indicador de muerte celular y, por tanto, de citotoxicidad, cuya presencia en el medio de cultivo es habitual tras la lisis celular ²⁰⁴ —permitió observar también en ambas poblaciones celulares, un aumento dosis-dependiente de dicho marcador en función de la intensidad de irradiación, tanto a las 24 como a las 48 horas. Es importante destacar que dicho aumento de la citotoxicidad fue significativamente menor en el caso de las hASCs irradiadas con las dosis más altas (35 y 75 mJ/cm^2).

El aumento de los niveles de ROS como consecuencia de la exposición a la radiación parece ser uno de los principales agentes implicados en el proceso de envejecimiento de la piel ²⁰². La exposición a la radiación UV-B conduce a las células de la piel a un estado de estrés oxidativo, consecuencia de la limitada capacidad de las células para eliminar el exceso de ROS generado por la radiación. En nuestro estudio, la exposición de los cultivos a la radiación UV-B provocó un aumento dosis-dependiente de los niveles intracelulares de ROS, tanto en los HFFs como en las hASCs, observando diferencias entre ambas líneas celulares únicamente con la dosis más alta de irradiación (75 mJ/cm^2), con la que las hASCs, curiosamente, mostraron mayores niveles de ROS. El incremento de los niveles de ROS produce daño indirecto en el ADN y, en consecuencia, las células detienen la progresión del ciclo celular y aumentan la expresión de genes asociados a la senescencia ²⁰⁵. En este sentido, encontramos que la exposición de los HFFs y las hASCs a la radiación UV-B indujo senescencia prematura en ambas poblaciones celulares, como lo demuestra el aumento del tamaño celular

y de la actividad de la enzima β -gal, características típicas de las células senescentes. Sin embargo, mientras que los HFFs mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a su control no irradiado con todas las dosis de irradiación, en las hASCs únicamente encontramos diferencias con respecto a su control con la dosis más alta de irradiación (75 mJ/cm^2). Además, al comparar ambos tipos celulares tras su irradiación con cualquiera de las dosis empleadas, se observó un mayor porcentaje de células senescentes en los cultivos de los HFFs que en los de las hASCs. Estos datos sugieren que estas células madre son capaces de responder y controlar mejor el exceso de producción de ROS, incluso cuando las dosis de radiación son realmente elevadas, donde parece lógico pensar que sólo las células más resistentes pueden llegar a producir los niveles más altos de ROS. De hecho, diversos autores ²⁰⁶ han puesto de relieve la importancia de dichos ROS como mediadores de diferentes funciones celulares, como se comenta más adelante.

El acúmulo de células senescentes en los tejidos y órganos envejecidos altera los procesos fisiológicos, incluida la regeneración, y contribuye a la progresión de patologías relacionadas con el envejecimiento, como la reducción de la capacidad de cicatrización de las heridas cutáneas ²⁰⁷. Dado que los fibroblastos son las células encargadas de la síntesis de los componentes de la MEC, la contracción de la herida y la remodelación de la nueva MEC en el proceso de cicatrización ^{208,209}, decidimos analizar el efecto de la radiación UV-B sobre la capacidad migratoria de los HFFs, y la comparamos con la de las hASCs. En este caso, incluimos la dosis de 5 mJ/cm^2 con el objetivo de dotar al análisis de una mayor sensibilidad. Al igual que con los parámetros anteriormente analizados, la capacidad migratoria de los HFFs y de las hASCs sometidos a radiación UV-B mostró una disminución dosis-dependiente en ambas poblaciones celulares; sin embargo, de nuevo, dicha disminución fue mayor en el caso de los HFFs, tanto a las 24 como a las 48 horas de la irradiación. Además, sólo en el caso de las

hASCs, tras 48 horas de su exposición a la radiación con la dosis más baja (5 mJ/cm²), apreciamos un aumento de la capacidad migratoria con respecto a su control no irradiado. Este resultado concuerda con los obtenidos por otros autores como *Jeong* y cols., en cuyo estudio demostraron que la exposición de las hASCs a dosis bajas de radiación UV-B estimula su supervivencia, su capacidad de migración, la angiogénesis y los efectos paracrinos *in vitro*, en cuyo mecanismo de acción participa de forma relevante la generación de ROS ²¹⁰.

Todos estos resultados demuestran la mayor resistencia de las hASCs frente al efecto nocivo de la radiación UV-B respecto a la de los HFFs. Los datos obtenidos están en concordancia con los publicados por *López Pérez* y cols., en cuyo estudio proponen que la mayor capacidad proliferativa y viabilidad de las MSCs con respecto a los HFFs *in vitro* podría predecir en parte, la capacidad regenerativa de las MSCs *in vivo* ²¹¹.

En vista de estos resultados, y con el objetivo de mejorar la resistencia de las hASCs frente a la radiación UV-B para su posible uso en terapia celular contra el fotoenvejecimiento, nos planteamos incrementar su eficacia mediante el pre-acondicionamiento con ciclos cortos de oxidación con H₂O₂. Dado que el estrés oxidativo mediado por ROS es una de las principales causas de la apoptosis y muerte celular de las MSCs después del trasplante ¹⁷⁸, varios estudios se han centrado en analizar el efecto beneficioso del pre-acondicionamiento, durante un corto periodo de tiempo, con pequeñas concentraciones de H₂O₂ (1-100 μM). En dichos estudios se ha observado un aumento moderado de los niveles de ROS durante el pre-acondicionamiento, lo cual podría actuar como un estímulo promotor de la supervivencia que posibilite a las células mantener su viabilidad ²¹², y facilitar, de este modo, la adaptación de las células al estrés oxidativo causado por altas concentraciones de ROS en los tejidos lesionados. En trabajos previos, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el pre-acondicionamiento con H₂O₂ mejora la capacidad de recuperación de las hASCs

tras su descongelación, y su capacidad de respuesta al estrés oxidativo y a la privación de nutrientes ¹³². También hemos demostrado que el mecanismo de acción que las hASCs pre-acondicionadas con H₂O₂ utilizan para incrementar su capacidad de respuesta en condiciones de estrés oxidativo, está relacionado con la sobreexpresión de Nrf2 y el incremento de enzimas relacionadas (HO-1, SOD-1, GPx-1 y CAT) ¹⁷⁹. Asimismo, hemos descrito que dicho pre-acondicionamiento con H₂O₂ incrementa también la capacidad de reparación de las hASCs, así como la de su CM, del daño oxidativo sufrido por otras líneas celulares; en concreto, este efecto fue observado en un modelo de oligodendrocitos (HOGd) sometidos a estrés oxidativo, donde la capacidad de reparación estuvo relacionada con una disminución de los niveles de ROS y el aumento de la capacidad antioxidante de las HOGd ¹⁸⁰.

En todos estos estudios previos, la inducción del estrés oxidativo se llevó a cabo mediante el cultivo celular con H₂O₂ (0.25-0.5 mM). Sin embargo, el objetivo del presente trabajo fue analizar la resistencia de las hASCs pre-acondicionadas con H₂O₂ al estrés oxidativo causado por la radiación UV-B. Tomando como referencia los estudios previos realizados, en primer lugar, analizamos el efecto del pre-acondicionamiento con H₂O₂ (10 μM) en condiciones de cultivo estándar, demostrando que dicho pre-acondicionamiento no afecta a parámetros celulares básicos de las hASCs, como la morfología, el ciclo celular o la proliferación, lo que indica que, en condiciones normales, las PC-hASCs no difieren de las hASCs en dichos parámetros.

En segundo lugar, comparamos la respuesta de las hASCs y PC-hASCs a la exposición a radiación UV-B. Observamos que, una hora después de la irradiación (11, 22 y 35 mJ/cm²), los niveles de ROS aumentaron de manera dosis-dependiente en ambas poblaciones celulares; sin embargo, en contra de lo esperado, con la dosis más alta de irradiación (35 mJ/cm²) dichos niveles fueron superiores en las PC-hASCs. Este resultado es coherente con un hallazgo

previo de nuestro grupo de investigación, según el cual las hASCs limitan su actividad mitocondrial en un intento de reducir los niveles de ROS intracelulares, mientras que las PC-hASCs aumentan dicha actividad mitocondrial ya que cuentan con una mayor concentración de antioxidantes que pueden contrarrestar los ROS ¹⁷⁹. Por tanto, este aumento en los niveles de ROS podría ser consecuencia de un aumento transitorio de la fosforilación oxidativa de las PC-hASCs para obtener ATP de manera más rápida y poder sobrevivir en un microambiente hostil ²¹³. En este sentido, se ha de tener presente que, mientras niveles elevados de ROS pueden causar daño en el ADN, las proteínas y los lípidos, niveles moderados son necesarios para activar las vías de señalización esenciales que regulan funciones celulares como la proliferación y la diferenciación ^{214,206}. Así por ejemplo, se ha demostrado que el aumento de los niveles de ROS mitocondrial es necesario para activar las vías de estrés celular que, paradójicamente, protegen del daño oxidativo ²¹⁵.

A continuación, analizamos el efecto del pre-acondicionamiento sobre la viabilidad celular y observamos que, mientras a las 24 horas de la irradiación, tanto las hASCs como las PC-hASCs disminuyeron su viabilidad, a las 48 horas, sólo las PC-hASCs fueron capaces de recuperarla, llegando a alcanzar valores similares a los del control no irradiado de las hASCs, incluso con las dosis más altas de irradiación. Por tanto, en concordancia con nuestros estudios previos, el pre-acondicionamiento con H₂O₂ también incrementa la viabilidad de estas células cuando son sometidas a radiación UV-B. Este aumento de la supervivencia de las PC-hASCs probablemente se deba a la activación de diferentes vías de señalización. Dado que nuestros estudios se basan en un modelo de estrés oxidativo, centramos nuestra atención en la vía de señalización Nrf2-ARE, un importante mecanismo celular para reducir dicho estrés. Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes, anti-inflamatorias y detoxificantes ¹⁵⁶.

Cuando los niveles de ROS son elevados, Nrf2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo, donde se une a ARE, iniciando la expresión de enzimas desintoxicantes y proteínas antioxidantes ^{159,160}. Nuestro análisis de la expresión de Nrf2, tanto de la fracción nuclear como de la citoplasmática, mostró que el pre-acondicionamiento de las hASCs aumentó la relación Nrf2-n/c en las PC-hASCs una hora después de la irradiación. En esta situación de estrés oxidativo, la proteína Nrf2 se localizó en el núcleo en el caso de las PC-hASCs, mientras que permaneció en mayor medida en el citoplasma en las hASCs. Como ya demostramos previamente, la sobreexpresión de Nrf2 produce un incremento de HO-1, SOD-1, GPx-1 y CAT, pudiendo neutralizar el aumento de los ROS y favorecer así la supervivencia de las PC-hASCs ^{179,216}.

Por otro lado, uno de los principales mecanismos en los que se basa el potencial terapéutico de las MSCs es su capacidad de migración al lugar de la lesión. Sin embargo, el microambiente adverso que existe en el tejido dañado, puede limitar esta capacidad migratoria. Por ello, analizamos el efecto del pre-acondicionamiento de las hASCs sobre su capacidad de migración después de la irradiación con UV-B, observando un aumento de dicha capacidad en las PC-hASCs respecto a las hASCs, en las condiciones de mayor dosis de radiación (1.7 veces superior con la dosis de 35 mJ/cm²). En concordancia con estos resultados, varios estudios llevados a cabo por otros autores con distintos protocolos de pre-acondicionamiento con H₂O₂, han demostrado un incremento de la capacidad migratoria de las MSCs en condiciones de estrés oxidativo mediante el aumento de la expresión de SDF-1 y de su receptor CXCR4, ambos implicados en el proceso de activación de la migración y la supervivencia celular en los tejidos dañados ^{217,218}.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la mayor actividad del sistema antioxidante celular inducido por Nrf2 permite a las PC-hASCs responder mejor frente al daño inducido por la radiación UV-B, como lo demuestra el aumento

de su viabilidad y de su capacidad de migración respecto a las hASCs ante dosis elevadas de 35 mJ/cm^2 , y ello a pesar del incremento de los niveles de ROS observado en dichas células pre-acondicionadas. Por tanto, dado que las PC-hASCs poseen una mayor capacidad de respuesta al estrés oxidativo, parece lógico utilizar estas células para proteger a otras poblaciones celulares, como los fibroblastos dérmicos, frente al daño oxidativo.

En la actualidad, existen numerosos estudios que evidencian que el potencial terapéutico de las hASCs no sólo es atribuible a su capacidad de diferenciación o su capacidad de migración al lugar de la lesión, sino también a través de los factores que secretan. Así, por ejemplo, *Park* y cols. han observado en modelos murinos que el CM de las hASCs estimula tanto la síntesis de colágeno como la migración de los fibroblastos dérmicos, lo que acelera la cicatrización de heridas en modelos animales ²¹⁹. Este medio también protege a los fibroblastos dérmicos del estrés oxidativo inducido por la radiación UV-B ¹⁵⁵. Además, *Palomares* y cols. demostraron que la capacidad antioxidante del CM de las hASCs es 1.8 veces superior a la del medio estándar ¹⁵¹. Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en el uso terapéutico de este medio después de la lesión. En nuestro estudio, demostrado que el pre-acondicionamiento de las hASCs con pequeñas dosis de H_2O_2 aumenta su viabilidad, capacidad antioxidante y capacidad migratoria en respuesta al estrés oxidativo causado por la radiación UV-B, decidimos comprobar el efecto del CM de las PC-hASCs como terapia fotoprotectora de las HFFs cuando dicho medio es suministrado de forma previa a la radiación. Para ello, realizamos un tratamiento de los HFFs cultivados durante 24 horas con el CM derivado de las PC-hASCs privadas de suero durante 48 horas. En primer lugar, comprobamos que el tratamiento con dicho medio no modifica la morfología de los HFFs en condiciones estándar. En segundo lugar, observamos que la actividad proliferativa de los HFFs PC/CM+ aumentó ligeramente con respecto a los HFFs PC/CM-. Dicho aumento en

condiciones estándar también ha sido descrito por otros autores como *Wang* y cols.²²⁰.

A continuación, analizamos el efecto del tratamiento con PC/CM en los HFFs sometidos a la radiación UV-B (11, 22 y 35 mJ/cm²). Los resultados mostraron un claro efecto fotoprotector de dicho tratamiento, evidenciado por una mayor viabilidad, una menor actividad de la LDH liberada al medio extracelular y un menor porcentaje de apoptosis en los cultivos de HFFs PC/CM+ con respecto a los de HFFs PC/CM-, hallazgos especialmente más evidentes en el rango de las dosis más altas de irradiación (22 y 35 mJ/cm²). Este efecto citoprotector podría deberse, entre otras razones, a la presencia en dicho medio de diversos factores de crecimiento, que inducen la mitosis en las células quiescentes²²¹, y de proteínas inhibitoras de la apoptosis como Bcl-2, survivina y Akt¹⁰².

Como hemos mencionado previamente, el estrés oxidativo producido por un aumento de los niveles de ROS derivado de la exposición a la radiación UV-B es uno de los principales mecanismos implicados en el proceso del fotoenvejecimiento. Por este motivo, analizamos el efecto del tratamiento con PC/CM en los niveles intracelulares de ROS de los HFFs sometidos a radiación. Observamos que una hora después de la irradiación, dichos niveles aumentaron en ambas poblaciones de HFF tratados como en los no tratados con PC/CM, si bien, en contra de lo esperado, el incremento fue mayor en los primeros. Es preciso tener en cuenta que la presencia de un nivel óptimo del estado redox resulta esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular. Aún más, dicho estado redox varía en función de la actividad metabólica y del compartimento celular en la que se lleva a cabo²¹⁴. De este modo, un aumento moderado de los niveles de ROS puede actuar como señal molecular para activar vías de señalización involucradas en la proliferación y diferenciación celular. Así, por ejemplo, *Liu* y cols. han demostrado que un incremento moderado en los niveles de ROS promueve la proliferación y migración de los preadipocitos murinos

mediante la regulación de NF-kB p65 ²²². Por su parte, *Huo* y cols. evidenciaron que el incremento de los niveles de ROS media la adhesión y migración celular en la cicatrización de las heridas en la córnea ²²³. Por el contrario, un aumento excesivo de los niveles de ROS puede causar un daño oxidativo que induzca la senescencia y la muerte celular ²²⁴. Sin embargo, no sólo han de considerarse los niveles de ROS presentes en la célula, sino también los requerimientos de dichos niveles para las diferentes actividades biológicas que haya de desarrollar en un momento determinado y los mecanismos intracelulares del control *redox* que la misma posea. En este sentido, el aumento de los niveles de ROS observados en los HFFs PC/CM+ sometidos a irradiación podría ser incluso necesario para promover la migración o reducir la senescencia, efectos ambos observados en dicha población celular en comparación con los HFFs PC/CM-.

La senescencia prematura es una de las alteraciones del proceso de fotoenvejecimiento. Las células senescentes muestran un fenotipo definido por características tales como el aumento del tamaño celular y de la actividad de la enzima β -gal, la pérdida del potencial replicativo, el aumento de la biogénesis de lisosomas, la disminución de la velocidad de síntesis y degradación de proteínas, y la alteración en la regulación y expresión de genes específicos ²²⁵. En este sentido, en nuestro estudio analizamos también el efecto del tratamiento con PC/CM sobre el fenotipo senescente de los HFFs sometidos a la radiación. Así, mediante el estudio de la distribución del citoesqueleto de actina comprobamos que los HFFs PC/CM- incrementan el tamaño de su citoplasma, mientras que los HFFs PC/CM+ mantienen la proporción núcleo/citoplasma. Por otro lado, y acorde con estos resultados, el análisis de la enzima β -gal mostró que los HFFs PC/CM+ presentan una disminución de dicha actividad enzimática respecto a los HFFs PC/CM-, efectos que se aprecian, al igual que en el porcentaje de apoptosis y de citotoxicidad, con las dosis más elevadas de irradiación (22 y 35 mJ/cm²).

Por otro lado, se ha descrito que las células senescentes secretan moléculas, que influyen en el microambiente celular y tisular, como las citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 e IL-8, entre otras^{36,226}. En este sentido, la mayoría de las enfermedades asociadas al fotoenvejecimiento comparten características relacionadas con la inflamación, como los niveles elevados de TNF- α e IL-6⁴³. Por esta razón, analizamos en los HFFs irradiados el efecto del tratamiento sobre la expresión y síntesis de la IL-6, una citocina que, aunque esencial en la regulación de la respuesta inmunitaria, su sobreproducción puede actuar como un factor pro-inflamatorio²²⁷. La exposición de los HFFs a la radiación UV-B indujo un aumento dosis-dependiente de la expresión y síntesis de IL-6, tanto en los HFFs PC/CM- como en los HFFs PC/CM+, si bien dicho incremento fue notablemente menor en los HFFs PC/CM+. Sin embargo, el control de estos últimos presentó un mayor nivel de síntesis de esta proteína que la población control de los HFFs no tratados. Este hecho también ha sido descrito por *Nouri* y cols., en cuyo estudio sobre un modelo murino, observaron que el aumento de la secreción de IL-6 en células endoteliales tratadas con el CM de células madre derivadas de la gelatina de Wharton y pre-acondicionadas con H₂O₂, estaba correlacionado con un aumento de su capacidad migratoria²²⁸. Por otro lado, algunos autores han descrito que el aumento en la expresión de IL-6 en fibroblastos dérmicos activa la vía de señalización NF- κ B y, en consecuencia, da lugar a un aumento de la expresión la MMP-1 y a la inhibición de la síntesis de colágeno^{20,229}. Asimismo, se ha observado en los fibroblastos humanos senescentes un incremento en la expresión de colagenasa y estromelisina, y una disminución de la expresión de los inhibidores de las MMPs 1 y 3 (TIMP-1 y -3) que conlleva a una degradación de la MEC³⁹.

Histológicamente, la piel fotoenvejecida muestra marcadas alteraciones de la MEC. La dermis de la piel normal, contiene en su mayor parte colágeno de tipo I (85-95%) y en menor proporción colágeno de tipo III (10-15%). Por su parte, en

la dermis de la piel fotoenvejecida, se reducen los precursores de los colágenos fibrilares tipo I y III. Este hecho es el resultado del efecto combinado de la disminución de la biosíntesis de pro-colágeno por parte de los fibroblastos y el aumento de su degradación enzimática llevada a cabo por las MMPs^{221,230}. Entre los diferentes tipos de MMPs, la MMP-1 es la principal responsable de degradar el colágeno de tipo I sintetizado por los fibroblastos y, de acuerdo con lo descrito en la literatura, la que actúa de manera más eficiente para inducir daño cutáneo. Por estos motivos, analizamos el efecto del tratamiento con PC/CM sobre la expresión génica y la síntesis proteica de MMP-1 y de pro-colágeno tipo I en los HFFs sometidos a radiación UV-B.

Nuestros resultados muestran que la exposición a la radiación UV-B aumentó la expresión y síntesis de MMP-1 en ambas poblaciones celulares, si bien de nuevo dicho incremento fue significativamente menor en los HFFs PC/CM+ respecto a los HFFs no tratados. Este efecto de la irradiación sobre la síntesis proteica de MMP-1 se puso de manifiesto de forma más evidente a las 48 horas. En dicho tiempo, al igual que ocurre con la síntesis de IL-6, también existe una mayor síntesis de dicha proteína en los HFFs PC/CM+ control, efecto que no hemos encontrado descrito en la bibliografía, y que seguramente esté inducido por algún factor presente en el PC/CM.

Por su parte, tanto la expresión como la síntesis de pro-colágeno tipo I fue significativamente superior en el control de los HFFs PC/CM+ con respecto al control de los HFFs PC/CM-, lo que indica que el PC/CM estimula la síntesis de esta proteína en condiciones basales. Otros autores como *Kim* y cols., han descrito este aumento del colágeno tipo I en ausencia de estrés oxidativo en fibroblastos en co-cultivo con hASCs²¹⁹. En cuanto al efecto de la radiación UV-B, observamos una disminución significativa de la expresión y de la síntesis de pro-colágeno tipo I tanto en los HFFs PC/CM- como en los HFFs PC/CM+ en las primeras 24 horas, con una recuperación de dichos niveles de síntesis a las 48

horas. Sin embargo, los HFFs tratados con PC/CM mostraron siempre mayores niveles de esta proteína.

Los procesos de migración, proliferación y remodelación de la MEC a través de la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos, son indispensables en la regeneración de la dermis funcional. Dado que nuestros resultados mostraron que el tratamiento con PC/CM aumentaba la expresión y la síntesis de pro-colágeno tipo I en los HFFs, decidimos analizar el efecto de dicho medio en la capacidad migratoria de estas células. Observamos que el tratamiento con PC/CM atenuó el efecto inhibitor, ejercido por la radiación UV-B, sobre la actividad migratoria de los HFFs. Este hecho está en consonancia con el aumento de la síntesis de colágeno y la disminución de MMP-1 en los HFFs PC/CM+. Además, con la dosis de 5 mJ/cm², los valores de migración de los HFFs PC/CM+ llegaron a superar los valores de migración del control no irradiado. Estos resultados podría estar en relación con la posible presencia en el PC/CM de factores de crecimiento que intervienen en la cicatrización normal de las heridas, como ha sido demostrado por *Chen* y cols. en el CM de MSCs derivadas de médula ósea, el cual contiene el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento queratinocítico (KGF), el IGF-1 y el VEGF ²³¹, todos ellos implicados en dicho proceso de cicatrización.

Si bien en el presente trabajo no se ha analizado el contenido del PC/CM, los estudios existentes en la literatura sobre el análisis proteómico del CM derivado de hASCs, revela que este medio contiene una gran variedad de factores de crecimiento necesarios para la regeneración tisular (EGF, KGF, IGF-1, VEGF, entre otros) y proteínas con efecto antioxidante (por ejemplo, SOD y GPx ^{219,231}), cuyos niveles puede verse incrementados como consecuencia del pre-acondicionamiento. Así, *Linero* y cols. detectaron en el CM de las hASCs cultivadas en hipoxia, 43 factores, 11 de los cuales estaban implicados en la regeneración ósea ²³². *Ahluwalia* y cols. demostraron que dicho pre-

acondicionamiento induce la síntesis de promotores de la vascularización como VEGF y la angiotensina ²³³. Por su parte, *Niu* y cols., mediante la estimulación de las hASCs con astragalósido IV (un compuesto bioactivo), encontraron una mayor secreción de factores pro-angiogénicos y anti-apoptóticos como TGF- β 1, bFGF y PDGF ²³⁴.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con PC/CM ejerce un efecto citoprotector de los HFFs, demostrado por un aumento de la viabilidad y disminución del porcentaje de apoptosis y de senescencia de estas células cuando son sometidas a la radiación UV-B. Además, ante dichas condiciones lesivas, reduce la síntesis de MMP-1 y el efecto deletéreo de dicha radiación sobre la capacidad migratoria y sobre la síntesis de colágeno tipo I de dichas células, fundamentales en el proceso de remodelación de la MEC y de regeneración dérmica.

VII. Conclusiones

1. La radiación UV-B induce estrés oxidativo en los HFFs y en las hASCs, reduce la viabilidad celular y la capacidad de migración, y aumenta el porcentaje de senescencia de dichas poblaciones celulares de manera dosis-dependiente.
2. En comparación con los HFFs, las hASCs muestran mayor resistencia al daño producido por la radiación UV-B, evidenciada por el menor porcentaje de citotoxicidad y de senescencia, así como por la mayor capacidad migratoria de estas células.
3. El pre-acondicionamiento de las hASCs mediante ciclos cortos de oxidación con H₂O₂ no afecta a las propiedades básicas de cultivo (la morfología, el ciclo celular y la proliferación) de estas células.
4. El pre-acondicionamiento de las hASCs con H₂O₂ mejora la respuesta de estas células (PC-hASCs) al estrés oxidativo inducido por la radiación UV-B, evidenciada por una mayor viabilidad y capacidad migratoria. Este efecto está asociado, al menos en parte, con una activación del factor de transcripción Nrf2.
5. El medio acondicionado por las PC-hASCs (PC/CM) no altera las propiedades básicas de cultivo de los HFFs, si bien induce un pequeño aumento, aunque significativo, de su actividad proliferativa.
6. El tratamiento de los HFFs con PC/CM ejerce un efecto citoprotector frente a la radiación UV-B, demostrado por una mayor viabilidad, un menor porcentaje de apoptosis y de senescencia celular, así como una mayor capacidad migratoria.
7. El efecto citoprotector del PC/CM sobre los HFFs irradiados está asociado a una disminución de los niveles de MMP-1 y a un aumento de los niveles de pro-colágeno tipo I, relacionados ambos con los procesos de remodelación de la MEC.

VIII. Bibliografía

1. Thibodeau GA, Patton KT. Estructura y función del cuerpo humano (14ª ed). Elsevier. 2016.
2. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. 2012; 30(3):257-62. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
3. Blume-Peytavi U, Kottner J, Sterry W, Hodin MW, Griffiths TW, Watson RE, et al. Age-associated skin conditions and diseases: Current perspectives and future options. *Gerontologist*. 2016; 56 Suppl 2:S230-42. doi: 10.1093/geront/gnw003.
4. Sadler TW, Langman J, Ecker P, Ecker GM, Mathers LH. Langman : embriología médica : con orientación clínica (10ª ed). Editorial Médica Panamericana. 2007.
5. Gould, J. Superpowered skin. *Nature*. 2018; 563(7732):S84-S85. doi: 10.1038/d41586-018-07429-3.
6. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp. Dermatol*. 2016; 25(2):92-8. doi: 10.1111/exd.12832.
7. Khavkin J, Ellis DA. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011; 19(2):229-34. doi: 10.1016/j.fsc.2011.04.003.
8. Krieg T, Aumailley M. The extracellular matrix of the dermis: Flexible structures with dynamic functions. *Exp Dermatol*. 2011; 20(8):689-95. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01313.x.
9. Wollina U, Wetzker R, Abdel-Naser MB, Kruglikov IL. Role of adipose tissue in facial aging. *Clin Interv Aging*. 2017; 6;12:2069-76. doi: 10.2147/CIA.S151599.
10. Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*. 2018; 27(5):729-38. doi: 10.1177/0963689717725755.
11. Kazanci A, Kurus M, Atasever A. Analyses of changes on skin by aging. *Skin Res Technol*. 2017; 23(1):48-60. doi: 10.1111/srt.12300.
12. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(1):5-10. doi: 10.1089/wound.2011.0356.
13. Egambaram OP, Kesavan Pillai S, Ray SS. Materials Science Challenges in Skin UV Protection: A Review. *Photochem. Photobiol*. 2019; 96(4):779-

97. doi: 10.1111/php.13208.
14. Seth D, Cheldize K, Brown D, Freeman EF. Global Burden of Skin Disease: Inequities and Innovations. *Curr Dermatol Rep*. 2017; 6(3):204-10. doi: 10.1007/s13671-017-0192-7.
 15. Tizek L, Schielein MC, Seifert F, Biedermann T, Böhner A, Zink A. Skin diseases are more common than we think: screening results of an unreferral population at the Munich Oktoberfest. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019; 33(7):1421-28. doi: 10.1111/jdv.15494.
 16. Cabrera-Silva S, Lissi E, Honeyman J. Radiación ultravioleta y salud (1ª ed). Editorial Universitaria. 2005.
 17. Skotarczak K, Osmola-Mańkowska A, Lodyga M, Polańska A, Mazur M, Adamski Z. Photoprotection: Facts and controversies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(1):98-112.
 18. Lorigo M, Mariana M, Cairrao E. Photoprotection of ultraviolet-B filters: Updated review of endocrine disrupting properties. *Steroids*. 2018; 131:46-58. doi: 10.1016/j.steroids.2018.01.006.
 19. Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. Skin ageing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011; 25(8):873-84. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03963.x.
 20. Mao GX, Xing WM, Wen XL, Jia BB, Yang ZX, Wang YZ, *et al*. Solidroside protects against premature senescence induced by ultraviolet B irradiation in human dermal fibroblasts. *Int J Cosmet Sci*. 2015; 37(3):321-8. doi: 10.1111/ics.12202.
 21. Romanhole RC, Ataide JA, Cefali LC, Moriel P, Mazzola PG. Photostability study of commercial sunscreens submitted to artificial UV irradiation and/or fluorescent radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 162:45-49. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.011.
 22. Holick MF. Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and Vitamin D for health. *Anticancer Res*. 2016; 36(3):1345-56.
 23. Kemény L, Varga E, Novak Z. Advances in phototherapy for psoriasis and atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019; 15(11):1205-14. doi: 10.1080/1744666X.2020.1672537.
 24. Morita A. Current developments in phototherapy for psoriasis. *J Dermatol*. 2018; 45(3):287-92. doi: 10.1111/1346-8138.14213.
 25. Pérez-Sánchez A, Barrajon-Catalán E, Herranz-López M, Micol V.

- Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. *Nutrients*. 2018; 24;10(4):403. doi: 10.3390/nu10040403.
26. Panich U, Slominski AT. Editorial: Redox Biology of Skin Aging and Carcinogenesis: the Role of Natural Antioxidants as Potential Protective Agents. *Front Pharmacol*. 2020; 6;11:249. doi: 10.3389/fphar.2020.00249.
 27. Schuch AP, Moraes MC, Yagura T, Menck CF. Highly sensitive biological assay for determining the photoprotective efficacy of sunscreen. *Environ Sci Technol*. 2014; 7;48(19):11584-90. doi: 10.1021/es503721a.
 28. Kim JA, Ahn BN, Kong CS, Kim SK. The chromene sargachromanol e inhibits ultraviolet A-induced ageing of skin in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol*. 2013; 168(5):968-76. doi: 10.1111/bjd.12187.
 29. Zeng Q, Zhou F, Lei L, Chen J, Lu J, Zhou J, *et al*. Ganoderma lucidum polysaccharides protect fibroblasts against UVB-induced photoaging. *Mol Med Rep*. 2017; 15(1):111-16. doi: 10.3892/mmr.2016.6026.
 30. Savic S, Smiljic S, Lestarevic S, Ilic A, Mijovic M, Mandic P, *et al*. The structural characteristics of photoageing in mice caused by the effects of ultraviolet A radiation. *Folia Morphol. (Warsz)*. 2020; 79(3):548-56. doi: 10.5603/FM.a2019.0119.
 31. Riahi RR, Bush AE, Cohen PR. Topical Retinoids: Therapeutic Mechanisms in the Treatment of Photodamaged Skin. *Am J Clin Dermatol*. 2016; 17(3):265-76. doi: 10.1007/s40257-016-0185-5.
 32. Young AR, Claveau J, Rossi AB. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. *J Am Acad Dermatol*. 2017; 6(3S1):S100-S109. doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.038.
 33. Cavinato M, Jansen-Dürr P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp Gerontol*. 2017; 94:78-82. doi: 10.1016/j.exger.2017.01.009.
 34. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*. 2015; 21:16-29. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.001.
 35. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25:585-21. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
 36. outfaire M, Bauwens E, Debacq-Chainiaux F. The impact of cellular senescence in skin ageing: A notion of mosaic and therapeutic strategies.

- Biochem Pharmacol.* 2017; 15;142:1-12. doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.011.
37. Maciel-Barón LÁ, Pérez VI, Torres C, González-Puertos VY, Konigsberg M, López-Diazguerrero NE. La senescencia celular como denominador común de enfermedades asociadas a la edad [Cellular senescence as a common denominator in age-related diseases]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2017; 55(4):490-97.
 38. Mária J, Ingrid Ž. Effects of bioactive compounds on senescence and components of senescence associated secretory phenotypes in vitro. *Food Funct.* 2017; 19;8(7):2394-18. doi: 10.1039/c7fo00161d.
 39. López-Diazguerrero NE, Martínez-Garduño CM, Konigsberg-Fainstein M. La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Mech Ageing Dev.* 2006; 24(2):47-53.
 40. Gruber F, Kreamlehner C, Eckhart L, Tschachler E. Cell aging and cellular senescence in skin aging — Recent advances in fibroblast and keratinocyte biology. *Exp Gerontol.* 2020; 130:110780. doi: 10.1016/j.exger.2019.110780.
 41. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Wheater: Histología funcional: texto y atlas en color (6ª ed). Elsevier. 2014.
 42. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2015; 31(2):65-74. doi: 10.1111/phpp.12145.
 43. Subedi L, Lee TH, Wahedi HM, Baek SH, Kim SY. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:8379539. doi: 10.1155/2017/8379539.
 44. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, *et al.* Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int J Mo. Sci.* 2019; 29;20(9):2126. doi: 10.3390/ijms20092126.
 45. Kim HM, Lee DE, Park SD, Kim YT, Kim YJ, Jeong JW, *et al.* Oral administration of lactobacillus plantarum HY7714 protects hairless mouse against ultraviolet B-induced photoaging. *J Microbiol Biotechnol.* 2014; 28;24(11):1583-91. doi: 10.4014/jmb.1406.06038.
 46. Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci.* 2017; 39(3):241-47. doi: 10.1111/ics.12372.
 47. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, *et al.*

- Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002; 138(11):1462-70. doi: 10.1001/archderm.138.11.1462.
48. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*. 2015; 21;5(2):545-89. doi: 10.3390/biom5020545.
 49. Baker LA, Marchetti B, Karsili TNV, Stavros VG, Ashfold MNR. Photoprotection: Extending lessons learned from studying natural sunscreens to the design of artificial sunscreen constituents. *Chem Soc Rev*. 2017; 19;46(12):3770-91. doi: 10.1039/c7cs00102a.
 50. Bilaç C, Şahin MT, Öztürkcan S. Chronic actinic damage of facial skin. *Clin Dermatol*. 2014; 32(6):752-62. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.02.014.
 51. De Dormael R, Bastien P, Sextius P, Gueniche A, Ye D, Tran C, et al. Vitamin C prevents ultraviolet-induced pigmentation in healthy volunteers: Bayesian meta-analysis results from 31 randomized controlled versus vehicle clinical studies. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2019; 12(2):E53-E59.
 52. Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:860479. doi: 10.1155/2014/860479.
 53. Panich U, Sittithumcharee G, Rathviboon N, Jirawatnotai S. Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:7370642. doi: 10.1155/2016/7370642.
 54. Hernández AR, Vallejo B, Ruzgas T, Björklund S. The effect of UVB irradiation and oxidative stress on the skin barrier—a new method to evaluate sun protection factor based on electrical impedance spectroscopy. *Sensors (Basel)*. 2019; 23;19(10):2376. doi: 10.3390/s19102376.
 55. Korkina L. Metabolic and redox barriers in the skin exposed to drugs and xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016; 12(4):377-88. doi: 10.1517/17425255.2016.1149569.
 56. Slominski AT, Zmijewski MA, Semak I, Kim TK, Janjetovic Z, Slominski RM, et al. Melatonin, mitochondria, and the skin. *Cel Mol Life Sci*. 2017; 74(21):3913-25. doi: 10.1007/s00018-017-2617-7.
 57. Kim TK, Kleszczynski K, Janjetovic Z, Sweatman T, Lin Z, Li W, et al. Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatoninergetic pathway in human skin cells. *FASEB J*. 2013; 27(7):2742-

55. doi: 10.1096/fj.12-224691.
58. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006; 55(1):1-19. doi: 10.1016/j.jaad.2005.05.010.
59. Kostyuk V, Potapovich A, Albuhaydar AR, Mayer W, De Luca C, Korkina L. Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. *Rejuvenation Res*. 2018; 21(2):91-101. doi: 10.1089/rej.2017.1931.
60. Lim HW, Arellano-Mendoza MI, Stengel F. Current challenges in photoprotection. *J Am Acad Dermatol*. 2017; 6(3S1):S91-S99. doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.040.
61. Amin RM, Elfeky SA, Verwanger T, Krammer B. A new biocompatible nanocomposite as a promising constituent of sunscreens. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 63:46-51. doi: 10.1016/j.msec.2016.02.044.
62. Dunaway S, Odin R, Zhou L, Ji L, Zhang Y, Kadekaro AL. Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. *Front Pharmacol*. 2018; 24:9:392. doi: 10.3389/fphar.2018.00392.
63. McDaniel D, Farris P, Valacchi G. Atmospheric skin aging—Contributors and inhibitors. *J Cosmet Dermatol*. 2018; 17(2):124-37. doi: 10.1111/jocd.12518.
64. Yeager DG, Lim HW. W. What's New in Photoprotection: A Review of New Concepts and Controversies. *DermatolClin*.2019; 37(2):149-157 . doi: 10.1016/j.det.2018.11.003.
65. Lee CM. Fifty years of research and development of cosmeceuticals: a contemporary review. *J Cosmet Dermatol*. 2016; 15(4):527-39. doi: 10.1111/jocd.12261.
66. Antoniou C, Kosmadaki MG, Stratigos AJ, Katsambas AD. Photoaging: Prevention and topical treatments. *Am J Clin Dermatol*. 2010; 11(2):95-102. doi: 10.2165/11530210-000000000-00000.
67. Chen J, Li Y, Zhu Q, Li T, Lu H, Wei N, *et al*. Anti-skin-aging effect of epigallocatechin gallate by regulating epidermal growth factor receptor pathway on aging mouse model induced by D-Galactose. *Mech Ageing Dev*. 2017; 164:1-7. doi: 10.1016/j.mad.2017.03.007.
68. Cefali LC, Ataide JA, Moriel P, Foglio MA, Mazzola PG. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *In tJ Cosmet Sci*. 2016; 38(4):346-53. doi: 10.1111/ics.12316.

69. Parrado C, Philips N, Gilaberte Y, Juarraz A, González S. Oral photoprotection: Effective agents and potential candidates. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 26;5:188. doi: 10.3389/fmed.2018.00188.
70. Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaya MS. Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice. *Mol Biol (Mosk)*. 2019; 53(5):741-54. doi: 10.1134/S0026893319050121.
71. Leaker BD, Fuchs C, Tam J. When Wounds Are Good for You: The Regenerative Capacity of Fractional Resurfacing and Potential Utility in Chronic Wound Prevention. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019; 1;8(12):679-91. doi: 10.1089/wound.2019.0945.
72. Borges J, Manela-Azulay M, Cuzzi T. Photoaging and the clinical utility of fractional laser. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2016; 5;9:107-14. doi: 10.2147/CCID.S77996.
73. Liping S, Qiuming L, Jian F, Xiao L, Yongliang Z. Purification and Characterization of Peptides Inhibiting MMP-1 Activity with C Terminate of Gly-Leu from Simulated Gastrointestinal Digestion Hydrolysates of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin Gelatin. *J Agric Food Chem*. 2018; 24;66(3):593-601. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04196.
74. Choi YL, Park EJ, Kim E, Na DH, Shin YH. Dermal Stability and In Vitro Skin Permeation of Collagen Pentapeptides (KTTKS and palmitoyl-KTTKS). *Biomol Ther (Seoul)*. 2014; 22(4):321-7. doi: 10.4062/biomolther.2014.053.
75. Cicero AFG, Fogacci F, Colletti A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(11):1378-94. doi: 10.1111/bph.13608.
76. Szerszunowicz I, Kłobukowski J. Characteristics of Potential Protein Nutraceuticals of Plant Origin with Antioxidant Activity. *Molecules*. 2020; 1;25(7):1621. doi: 10.3390/molecules25071621.
77. A Abu Samah NH, Heard CM. Topically applied KTTKS: a review. *Int J Cosmet Sci*. 2011; 33(6):483-90. doi: 10.1111/j.1468-2494.2011.00657.x.
78. Owolabi JO, Fabiyi OS, Adelakin LA, Ekwerike MC. Effects of Skin Lightening Cream Agents - Hydroquinone and Kojic Acid, on the Skin of Adult Female Experimental Rats. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020; 6;13:283-89. doi: 10.2147/CCID.S233185.
79. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017; 32(1):403-425. doi: 10.1080/14756366.2016.1256882.

80. Sondenheimer K, Krutmann J. Novel Means for Photoprotection. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 29;5:162. doi: 10.3389/fmed.2018.00162.
81. Ciccocioppo R, Cantore A, Chaimov D, Orlando G. Regenerative medicine: the red planet for clinicians. *Intern Emerg Med*. 2019; 14(6):911-21. doi: 10.1007/s11739-019-02126-z.
82. Buzhor E, Leshansky L, Blumenthal J, Barash H, Warshawsky D, Mazor Y, et al. Cell-based therapy approaches: The hope for incurable diseases. *Regen Med*. 2014; 9(5):649-72. doi: 10.2217/rme.14.35.
83. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013; 85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615..
84. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*. 2015; 62(3):329-37. doi: 10.18388/abp.2015_1023..
85. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadani S, et al. Multipotent stem cell and current application. *Acta Med Iran*. 2017; 55(1):6-23.
86. Tewary M, Shakiba N, Zandstra PW. Stem cell bioengineering: building from stem cell biology. *Nat Rev Genet*. 2018; 19(10):595-14. doi: 10.1038/s41576-018-0040-z..
87. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 26;10(1):68. doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
88. Lagarkova MA. Such Various Stem Cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2019; 84(3):187-89. doi: 10.1134/S0006297919030015.
89. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev*. 2009; 30(3):204-13. doi: 10.1210/er.2008-0031.
90. Matesanz R, Lazo-Zbikowski PA, Sánchez-García I. Medicina regenerativa y células madre. Los libros de la Catarata. 2010.
91. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 1962; 10:622-40.
92. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
93. Bozdağ SC, Yüksel MK, Demirer T. Adult Stem Cells and Medicine. *Adv*

- Exp Med Biol.* 2018; 1079:17-36. doi: 10.1007/5584_2018_184.
94. Mirzaei H, Sahebkar A, Sichani LS, Moridikia A, Nazari S, Sadri Nahand J, et al. Therapeutic application of multipotent stem cells. *J Cell Physiol.* 2018; 233(4):2815-23. doi: 10.1002/jcp.25990.
95. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(9):726-36. doi: 10.1038/nri2395.
96. Kusuma GD, Carthew J, Lim R, Frith JE. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev.* 2017; 1;26(9):617-31. doi: 10.1089/scd.2016.0349.
97. Maria AT, Maumus M, Le Quellec A, Jorgensen C, Noël D, Guilpain P. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune Disorders: State of the Art and Perspectives for Systemic Sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017; 52(2):234-59. doi: 10.1007/s12016-016-8552-9.
98. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods.* 2016; 15;99:62-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.016.
99. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother.* 2016; 43(4):268-74. doi: 10.1159/000448180.
100. Mahmoudifar N, Doran PM. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *Methods Mol Biol.* 2015; 1340:53-64. doi: 10.1007/978-1-4939-2938-2_4.
101. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol.* 2018; 4;9:2837. doi: 10.3389/fimmu.2018.02837.
102. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017; 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852.
103. Chen FM, Wu LA, Zhang M, Zhang R, Sun HH. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials.* 2011; 32(12):3189-209. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.032.

104. Kot M, Musiał-Wysocka A, Lasota M, Ulman A, Majka M. Secretion, migration and adhesion as key processes in the therapeutic activity of mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Pol.* 2019; 28;66(4):499-507. doi: 10.18388/abp.2019_2895.
105. Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkkonen J, Deten A, Boltze J. Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells.* 2017; ;35(6):1446-60. doi: 10.1002/stem.2614.
106. Yin Y, Li X, He XT, Wu RX, Sun HH, Chen FM. Leveraging Stem Cell Homing for Therapeutic Regeneration. *J Dent Res.* 2017; 96(6):601-09. doi: 10.1177/0022034517706070.
107. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009; 6;4(3):206-16. doi: 10.1016/j.stem.2009.02.001.
108. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience.* 2019; 31;15:421-38. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.004.
109. Rüter B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006; 1;108(12):3938-44. doi: 10.1182/blood-2006-05-025098.
110. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells.* 2019; 13;8(8):886. doi: 10.3390/cells8080886.
111. Shin TH, Kim HS, Choi SW, Kang KS. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. *Int J Mol Sci.* 2017; 25;18(2):244. doi: 10.3390/ijms18020244.
112. S Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2017; 6(12):2173-85. doi: 10.1002/sctm.17-0129.
113. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A.* 2018; 93(1):19-31. doi: 10.1002/cyto.a.23242.
114. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 2016; 92(1-2):41-51. doi: 10.1016/j.diff.2016.02.005.

115. Mortada I, Mortada R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *Eur J Med Genet.* 2018; 61(2):114-18. doi: 10.1016/j.ejmg.2017.10.015.
116. Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Curr Opin Oncol.* 2007; 19(6):650-5. doi: 10.1097/CCO.0b013e3282f0e116.
117. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(1):204. doi: 10.1186/ar2116.
118. Baez-Jurado E, Hidalgo-Lanussa O, Barrera-Bailón B, Sahebkar A, Ashraf GM, Echeverria V, E. *et al.* Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Protective Effects on Brain Pathologies. *Mol Neurobiol.* 2019; 56(10):6902-27. doi: 10.1007/s12035-019-1570-x.
119. Xia J, Minamino S, Kuwabara K, Arai S. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine. *Biosci Trends.* 2019; 13(4):299-307. doi: 10.5582/bst.2019.01226.
120. Wang J, Liao L, Tan J. Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11(7):893-909. doi: 10.1517/14712598.2011.574119.
121. Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbecks Arch Surg.* 2011; 396(4):489-97. doi: 10.1007/s00423-011-0762-2.
122. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS One.* 2008; 21;3(5):e2213. doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
123. García-Sánchez D, Fernández D, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Enhancing survival, engraftment, and osteogenic potential of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2019; 26;11(10):748-63. doi: 10.4252/wjsc.v11.i10.748.
124. Cable J, Fuchs E, Weissman I, Jasper H, Glass D, Rando TA, *et al.* Adult stem cells and regenerative medicine—a symposium report. *Ann N Y Acad Sci.* 2020; 1462(1):27-36. doi: 10.1111/nyas.14243.
125. Haque N, Kasim NH, Rahman MT. Optimization of pre-transplantation conditions to enhance the efficacy of mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci.* 2015; 5;11(3):324-34. doi: 10.7150/ijbs.10567.

126. Gottipamula S, Sharma A, Krishnamurthy S, Majumdar AS, Seetharam RN. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnol Lett.* 2012; 34(7):1367-74. doi: 10.1007/s10529-012-0893-8. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22476583.
127. Behr L, Hekmati M, Fromont G, Borenstein N, Noel LH, Lelievre-Pegorier M, *et al.* Intra renal arterial injection of autologous mesenchymal stem cells in an ovine model in the postischemic kidney. *Nephron Physiol.* 2007; 107(3):p65-76. doi: 10.1159/000109821.
128. de Vasconcelos Dos Santos A, da Costa Reis J, Diaz Paredes B, Moraes L, Jasmin, Giraldo-Guimarães A, *et al.* Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Res.* 2010; 8;1306:149-58. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.094.
129. Komatsu K, Honmou O, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Res.* 2010; 2;1334:84-92. doi: 10.1016/j.brainres.2010.04.006.
130. Henning RJ, Burgos JD, Vasko M, Alvarado F, Sanberg CD, Sanberg PR, *et al.* Human cord blood cells and myocardial infarction: Effect of dose and route of administration on infarct size. *Cell Transplant.* 2007; 16(9):907-17. doi: 10.3727/096368907783338299.
131. Chacón-Martínez CA, Koester J, Wickström SA. Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development.* 2018; 1;145(15):dev165399. doi: 10.1242/dev.165399.
132. Castro B, Martinez-Redondo D, Gartzia I, Alonso-Varona A, Garrido P, Palomares T. Cryopreserved H2 O2 -preconditioned human adipose-derived stem cells exhibit fast post-thaw recovery and enhanced bioactivity against oxidative stress. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019; 13(2):328-41. doi: 10.1002/term.2797.
133. Seo Y, Shin TH, Kim HS. Current Strategies to Enhance Adipose Stem Cell Function: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019; 5;20(15):3827. doi: 10.3390/ijms20153827.
134. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer.* 2017; 1;16(1):31. doi: 10.1186/s12943-017-0597-8.
135. Cabarcas SM, Mathews LA, Farrar WL. The cancer stem cell niche--there goes the neighborhood? *Int J Cancer.* 2011; 15;129(10):2315-27. doi: 10.1002/ijc.26312.

136. Davis H, Irshad S, Bansal M, Rafferty H, Boitsova T, Bardella C, *et al.* Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat Med.* 2015; 21(1):62-70. doi: 10.1038/nm.3750.
137. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 1996; 166(3):585-92. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<585::AID-JCP13>3.0.CO;2-6.
138. Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *J Clin Med.* 2019; 12;8(7):1025. doi: 10.3390/jcm8071025.
139. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9;9(1):63. doi: 10.1186/s13287-018-0791-7.
140. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* 2014; 15(11):1009-16. doi: 10.1038/ni.3002.
141. W Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol.* 2019; 4;10:1191. doi: 10.3389/fimmu.2019.01191.
142. S Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 31;7(1):125. doi: 10.1186/s13287-016-0363-7.
143. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 2016; 21;7(1):e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327.
144. Mishra VK, Shih HH, Parveen F, Lenzen D, Ito E, Chan TF, *et al.* Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2020; 6;9(5):1145. doi: 10.3390/cells9051145.
145. Shi, Y. *et al.* Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nature Reviews Nephrology* (2018) doi:10.1038/s41581-018-0023-5.
146. Naji A, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Eitoku M, Suganuma N. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 13;10(1):56. doi: 10.1186/s13287-019-1158-4.
147. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. Paracrine mechanisms of

- mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant*. 2014; 23(9):1045-59. doi: 10.3727/096368913X667709.
148. Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011; 24(1):59-64. doi: 10.1016/j.beha.2011.01.004.
149. Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrachi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, et al. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol*. 2008; 65(6):753-61. doi: 10.1001/archneur.65.6.753.
150. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuroregulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol*. 2006; 198(1):54-64. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.10.029.
151. Palomares T, Cordero M, Bruzos-Cidon C, Torrecilla M, Ugedo L, Alonso-Varona A. The Neuroprotective Effect of Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells is Impaired by N-acetyl Cysteine Supplementation. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(1):13-25. doi: 10.1007/s12035-017-0714-0.
152. Murohara T. Therapeutic Angiogenesis with Somatic Stem Cell Transplantation. *Korean Circ J*. 2020; 50(1):12-21. doi: 10.4070/kcj.2019.0288.
153. Lee KH, Tseng WC, Yang CY, Tarng DC. The Anti-Inflammatory, Anti-Oxidative, and Anti-Apoptotic Benefits of Stem Cells in Acute Ischemic Kidney Injury. *Int J Mol Sci*. 2019; 19;20(14):3529. doi: 10.3390/ijms20143529.
154. Stavely R, Nurgali K. The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Transl Med*. 2020; 9(9):985-1006. doi: 10.1002/sctm.19-0446.
155. Kim WS, Park BS, Sung JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch Dermatol Res*. 2009; 301(5):329-36. doi: 10.1007/s00403-009-0951-9.
156. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73(17):3221-47. doi: 10.1007/s00018-016-2223-0.
157. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element

- signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009; 15;284(20):13291-5. doi: 10.1074/jbc.R900010200.
158. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 10;29(17):1727-45. doi: 10.1089/ars.2017.7342.
159. Sun Z, Park SY, Hwang E, Park B, Seo SA, Cho JG, *et al.* Dietary *Foeniculum vulgare* Mill extract attenuated UVB irradiation-induced skin photoaging by activating of Nrf2 and inhibiting MAPK pathways. *Phytomedicine.* 2016; 15;23(12):1273-84. doi: 10.1016/j.phymed.2016.06.008.
160. Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirizadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, *et al.* Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chaperones.* 2012; 17(5):553-65. doi: 10.1007/s12192-012-0331-9.
161. Hong HE, Kim OH, Kwak BJ, Choi HJ, Im KH, Ahn J, E. *et al.* Antioxidant action of hypoxic conditioned media from adipose-derived stem cells in the hepatic injury of expressing higher reactive oxygen species. *Ann Surg Treat Res.* 2019; 97(4):159-167 doi: 10.4174/astr.2019.97.4.159.
162. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2018; 62:44-62. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.008.
163. Kanji S, Das H. Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017:5217967. doi: 10.1155/2017/5217967.
164. Mok PL, Leong CF, Cheong SK. Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells. *Malays J Pathol.* 2013; 35(1):17-32.
165. L PK, Kandoi S, Misra R, S V, K R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019; 46:1-9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.
166. Schäfer R, Spohn G, Baer PC. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Can Preconditioning Strategies Improve Therapeutic Efficacy? *Transfus Med Hemother.* 2016; 43(4):256-67. doi: 10.1159/000447458.
167. Mohammadian M, Abasi E, Akbarzadeh A. Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016; 44(5):1206-11. doi: 10.3109/21691401.2015.1029624.

168. Santos JL, Pandita D, Rodrigues J, Pêgo AP, Granja PL, Tomás H. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr Gene Ther.* 2011; 11(1):46-57. doi: 10.2174/156652311794520102.
169. Calabrese EJ. Hormesis: Path and Progression to Significance. *Int J Mol Sci.* 2018; 21;19(10):2871. doi: 10.3390/ijms19102871.
170. Liu S, Zhou J, Zhang X, Liu Y, Chen J, Hu B, *et al.* Strategies to optimize adult stem cell therapy for tissue regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016; 21;17(6):982. doi: 10.3390/ijms17060982.
171. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med.* 2018; 22(3):1428-42. doi: 10.1111/jcmm.13492.
172. Zhang W, Liu L, Huo Y, Yang Y, Wang Y. Hypoxia-pretreated human MSCs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:462472. doi: 10.1155/2014/462472.
173. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, Moon JH, Lee G, Park G, K. *et al.* Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/AKT pathways. *Int J Mol Sci.* 2014; 6;15(1):605-28. doi: 10.3390/ijms15010605.
174. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:9176357. doi: 10.1155/2016/9176357.
175. Baldari S, Di Rocco G, Piccoli M, Pozzobon M, Muraca M, Toietta G. Challenges and Strategies for Improving the Regenerative Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies. *Int J Mol Sci.* 2017; 2;18(10):2087. doi: 10.3390/ijms18102087.
176. Moya A, Larochette N, Paquet J, Deschepper M, Bensidhoum M, Izzo V, *et al.* Quiescence Preconditioned Human Multipotent Stromal Cells Adopt a Metabolic Profile Favorable for Enhanced Survival under Ischemia. *Stem Cells.* 2017; 35(1):181-96. doi: 10.1002/stem.2493.
177. Silva LHA, Antunes MA, Dos Santos CC, Weiss DJ, Cruz FF, Rocco PRM. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 26;9(1):45. doi: 10.1186/s13287-018-0802-8.
178. Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments : In vitro

- augmentation of mesenchymal stem cells viability. *Cell Stress Chaperones*. 2015; 20(2):237-51. doi: 10.1007/s12192-014-0560-1.
179. Garrido-Pascual P, Alonso-Varona A, Castro B, Burón M, Palomares T. H₂O₂-preconditioned human adipose-derived stem cells (HC016) increase their resistance to oxidative stress by overexpressing Nrf2 and bioenergetic adaptation. *Stem Cell Res Ther*. 2020; 3;11(1):335. doi: 10.1186/s13287-020-01851-z.
180. Garrido-Pascual P, Alonso-Varona A, Castro B, Burón M, Palomares T. Hydrogen Peroxide-Preconditioned Human Adipose-Derived Stem Cells Enhance the Recovery of Oligodendrocyte-Like Cells after Oxidative Stress-Induced Damage. *Int J Mol Sci*. 2020; 14;21(24):9513. doi: 10.3390/ijms21249513.
181. Pendergrass KD, Boopathy AV, Seshadri G, Maiellaro-Rafferty K, Che PL, Brown ME, *et al*. Acute preconditioning of cardiac progenitor cells with hydrogen peroxide enhances angiogenic pathways following ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells Dev*. 2013; 1;22(17):2414-24. doi: 10.1089/scd.2012.0673.
182. Charles-de-Sá L, Gontijo-de-Amorim NF, Rigotti G, Sbarbati A, Bernardi P, Benati D, *et al*. Photoaged Skin Therapy with Adipose-Derived Stem Cells. *Plast Reconstr Surg*. 2020; 145(6):1037e-1049e. doi: 10.1097/PRS.0000000000006867.
183. Zarei F, Abbaszadeh A. Application of Cell Therapy for Anti-Aging Facial Skin. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019; 14(3):244-48. doi: 10.2174/1574888X13666181113113415.
184. Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Int J Mol Sci*. 2019; 22;20(10):2523. doi: 10.3390/ijms20102523.
185. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, *et al*. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2007; 48(1):15-24. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.05.018.
186. Chen S, He Z, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in photoaging: basic science and literature review. *Stem Cell Res Ther*. 2020; 23;11(1):491. doi: 10.1186/s13287-020-01994-z.
187. Jeong JH, Fan Y, You GY, Choi TH, Kim S. Improvement of photoaged skin wrinkles with cultured human fibroblasts and adipose-derived stem cells: a comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015; 68(3):372-81.

- doi: 10.1016/j.bjps.2014.10.045.
188. Choi JS, Cho WL, Choi YJ, Kim JD, Park HA, Kim SY, *et al.* Functional recovery in photo-damaged human dermal fibroblasts by human adipose-derived stem cell extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2019; 20;8(1):1565885. doi: 10.1080/20013078.2019.1565885.
 189. Chen L, Bi B, Zeng J, Zhou Y, Yang P, Guo Y, *et al.* Rosiglitazone ameliorates senescence-like phenotypes in a cellular photoaging model. *J Dermatol Sci*. 2015; 77(3):173-81. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.01.007.
 190. Abengózar-Vela A, Arroyo C, Reinoso R, Enríquez-de-Salamanca A, Corell A, González-García MJ. In Vitro Model for Predicting the Protective Effect of Ultraviolet-Blocking Contact Lens in Human Corneal Epithelial Cells. *Curr Eye Res*. 2015; 40(8):792-9. doi: 10.3109/02713683.2014.958171.
 191. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012; 12(9):12347-60. doi: 10.3390/s120912347.
 192. Fuster E, Gregori Gregori V, Roig Sala B. Álgebra matricial. Editorial de la Universidad politécnica de Valencia. 2017.
 193. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018; 1;2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095497.
 194. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 11;396(4):866-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.011.
 195. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol*. 2005; 294:23-9. doi: 10.1385/1-59259-860-9:023.
 196. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*. 2001; 38(2):179-93. doi: 10.1016/s0037-1963(01)90051-4.
 197. Rosner M, Schipany K, Hengstschläger M. Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle. *Nat Protoc*. 2013; 8(3):602-26. doi: 10.1038/nprot.2013.011.
 198. Karlsson JO, Ostwald K, Kåbjörn C, Andersson M. A method for protein assay in Laemmli buffer. *Anal Biochem*. 1994; 15;219(1):144-6. doi:

- 10.1006/abio.1994.1243.
199. Chen S, He Z, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in photoaging: basic science and literature review. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 23;11(1):491. doi: 10.1186/s13287-020-01994-z.
200. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, *et al.* Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnol Adv.* 2018; 36(4):1111-26. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.
201. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond).* 2016; 77(7):C98-101. doi: 10.12968/hmed.2016.77.7.C98.
202. Samivel R, Nagarajan RP, Subramanian U, Khan AA, Masmali A, Almubrad T, *et al.* Inhibitory Effect of Ursolic Acid on Ultraviolet B Radiation-Induced Oxidative Stress and Proinflammatory Response-Mediated Senescence in Human Skin Dermal Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 15;2020:1246510. doi: 10.1155/2020/1246510.
203. Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de Histología Animal y Vegetal La Célula. *Biología funcional y Ciencias de la Salud.* 2017.
204. Ahn BN, Kim JA, Himaya SW, Bak SS, Kong CS, Kim SK. Chitooligosaccharides attenuate UVB-induced damages in human dermal fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012; 385(1):95-102. doi: 10.1007/s00210-011-0684-0.
205. Yang Y, Li S. Dandelion Extracts Protect Human Skin Fibroblasts from UVB Damage and Cellular Senescence. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:619560. doi: 10.1155/2015/619560.
206. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev.* 2015; 15;24(10):1150-63. doi: 10.1089/scd.2014.0484.
207. Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front Genet.* 2018; 23;9:247. doi: 10.3389/fgene.2018.00247.
208. desJardins-Park HE, Foster DS, Longaker MT. Fibroblasts and wound healing: an update. *Regen Med.* 2018; 1;13(5):491-95. doi: 10.2217/rme-2018-0073.
209. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* 2013; 22(8):407-8, 410-12. doi: 10.12968/jowc.2013.22.8.407.

210. Jeong YM, Sung YK, Kim WK, Kim JH, Kwack MH, Yoon I, *et al.* Ultraviolet B preconditioning enhances the hair growth-promoting effects of adipose-derived stem cells via generation of reactive oxygen species. *Stem Cells Dev.* 2013; 1;22(1):158-68. doi: 10.1089/scd.2012.0167.
211. Lopez Perez R, Brauer J, Rühle A, Trinh T, Sisombath S, Wuchter P, *et al.* Human mesenchymal stem cells are resistant to UV-B irradiation. *Sci Rep.* 2019; 27;9(1):20000. doi: 10.1038/s41598-019-56591-9.
212. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med.* 2013; 60:1-4. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011.
213. Liu Y, Ma T. Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application. *Biotechnol Prog.* 2015; 31(2):468-81. doi: 10.1002/btpr.2034.
214. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014; 19;24(10):R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
215. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
216. Zhang F, Peng W, Zhang J, Dong W, Yuan D, Zheng Y, *et al.* New strategy of bone marrow mesenchymal stem cells against oxidative stress injury via Nrf2 pathway: oxidative stress preconditioning. *J Cell Biochem.* 2019; 120(12):19902-14. doi:10.1002/jcb.29298.
217. Li S, Deng Y, Feng J, Ye W. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biol Int.* 2009; 33(3):411-8. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.01.012.
218. Guo L, Du J, Yuan DF, Zhang Y, Zhang S, Zhang HC, *et al.* Optimal H₂O₂ preconditioning to improve bone marrow mesenchymal stem cells' engraftment in wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 8;11(1):434. doi: 10.1186/s13287-020-01910-5.
219. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, *et al.* Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007; 48(1):15-24. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.05.018.
220. Wang T, Guo S, Liu X, Xu N, Zhang S. Protective effects of adipose-derived stem cells secretome on human dermal fibroblasts from ageing damages. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 1;8(12):15739-48.

221. Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *J Dermatol Sci*. 2009; 53(2):96-102. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.08.007.
222. Liu X, Long X, Liu W, Yao G, Zhao Y, Hayashi T, *et al*. Differential levels of reactive oxygen species in murine preadipocyte 3T3-L1 cells cultured on type I collagen molecule-coated and gel-covered dishes exert opposite effects on NF- κ B-mediated proliferation and migration. *Free Radic Res*. 2018; 52(9):913-28. doi:10.1080/10715762.2018.1478088.
223. Huo Y, Qiu WY, Pan Q, Yao YF, Xing K, Lou MF. Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Exp Eye Res*. 2009; 89(6):876-86. doi: 10.1016/j.exer.2009.07.012.
224. Shimi T, Goldman RD. Nuclear lamins and oxidative stress in cell proliferation and longevity. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 773:415-30. doi: 10.1007/978-1-4899-8032-8_19.
225. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018; 28(6):436-53. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.001.
226. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75:685-705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653.
227. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018; 1;10(2):a028415. doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
228. Zhang J, Chen GH, Wang YW, Zhao J, Duan HF, Liao LM, *et al*. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2012; 125(19):3472-8. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.19.020.
229. Li L, Ngo HT, Hwang E, Wei X, Liu Y, Liu J, *et al*. Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2020; 19;21(1):49. doi: 10.3390/ijms21010049.
230. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, *et al*. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2001; 117(5):1218-24. doi:10.1046/j.0022-202X.2001.01544.x.
231. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, *et al*. Conditioned medium

-
- from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014; 29;9(4):e96161. doi: 10.1371/journal.pone.0096161.
232. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One*. 2014; 8;9(9):e107001. doi: 10.1371/journal.pone.0107001.
233. Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor--HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem*. 2012; 19(1):90-7. doi: 10.2174/092986712803413944.
234. Niu Y, Chen Y, Xu H, Wang Q, Xue C, Zhu R, *et al.* Astragaloside IV Promotes Antiphotoaging by Enhancing the Proliferation and Paracrine Activity of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2020; 1;29(19):1285-93. doi: 10.1089/scd.2020.0092.