

Juan Monte Serrano

Efecto de la metformina y
resveratrol frente a la mortalidad,
senescencia y sobreproducción de
radicales libres inducidos por
radiación UVB en queratinocitos y
fibroblastos humanos

Director/es

Pereboom Maicas, Desirée
Alda Torrubia, José Octavio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

EFFECTO DE LA METFORMINA Y RESVERATROL
FRENTE A LA MORTALIDAD, SENESCENCIA Y
SOBREPRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES
INDUCIDOSPOR RADIACIÓN UVB EN
QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS HUMANOS

Autor

Juan Monte Serrano

Director/es

Pereboom Maicas, Desirée
Alda Torrubia, José Octavio

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2023



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Efecto de la metformina y resveratrol frente a la mortalidad, senescencia y sobreproducción de radicales libres inducidos por radiación UVB en queratinocitos y fibroblastos humanos.

Autor

Juan Monte Serrano

Directores

Dra. Desirée Pereboom Maicas

Dr. José Octavio Alda Torrubia

Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina legal y Forense.

Servicio General de Apoyo a la Investigación de Citómica.

Universidad de Zaragoza. 2022

Agradecimientos

En el día de hoy, quiero agradecer a todas esas personas sin las cuales este trabajo hoy no sería una realidad:

En primer lugar, agradecer a mis directores los profesores Dña. Desirée Pereboom Maicas y D. José Octavio Alda Torrubia por su dedicación, paciencia y cercanía durante estos años de trabajo.

Al Servicio General de Apoyo a la Investigación de Citómica de la Universidad de Zaragoza por disponer de técnicas punteras en investigación para la realización del presente trabajo.

Al Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense de la Universidad de Zaragoza, por haberme considerado como un miembro más desde el primer día.

A todos los integrantes del Servicio de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, donde me formé como dermatólogo y tan buenos momentos he pasado.

A mi familia y amigos por haber estado siempre a mi lado a pesar de la distancia y por todo vuestro cariño y apoyo incondicional. Mención especial a mi madre Teresa Serrano Serrano y a mi padre Juan Bautista Monte Muñoz, de ellos aprendí que merece la pena luchar por tus sueños. Mis hermanas que siempre me han defendido cuando lo he necesitado. El regalo que nos ha dado la vida este año llamado Ona y por todos los que están por venir.

Por los familiares y amigos que ya no están a nuestro lado físicamente, pero cuya presencia nunca desaparecerá de nuestros corazones. Hoy brindo por vosotros.

A la Dra. Joana Cruañes Monferrer, porque sin ella, no me hubiera formado en esta especialidad médica de la que tanto disfruto en mi día a día.

A todos aquellos que nunca se han dado por vencidos.

Índice

A. Introducción.....	21
A.1. Anatomía e histología de la piel humana.....	21
A.1.1. Epidermis	21
A.1.2. Dermis	24
A.2. Muerte celular, senescencia celular y radicales libres.....	26
A.2.1. Muerte celular	26
A.2.2. Senescencia celular	29
A.2.3. Radicales libres.....	35
A.3. Radiación electromagnética.	37
A.3.1. Espectro electromagnético	37
A.3.2. Índice Ultravioleta.....	39
A.4. Efectos patológicos de la radiación UV sobre la piel	40
A.4.1. Efecto patológico de la radiación UV en la piel. Efecto celular	40
A.4.2. Efecto patológico de la radiación UV en la piel. Fotoenvejecimiento	44
A.5. Resveratrol	47
A.5.1. Metabolismo	48
A.5.2. Tratamiento dermatológico	50
A.6. Metformina.....	74
A.6.1. Metabolismo	75
A.6.2. Tratamiento dermatológico.....	77
A.7. Combinación de Resveratrol y Metformina en dermatología.	98
A.8. Citometría y técnica APO-5	101
A.8.1. Citometría	101
A.8.2. Técnica APO 5	103
B. Planteamiento y Objetivos.....	107
B.1. Planteamiento.....	107
B.2. Hipótesis.....	108
B.3. Objetivos	108
B.3.1. Objetivo Principal	108
B.3.2. Objetivos Parciales	108

C. Material y métodos.....	108
C.1. Materiales	109
C.1.1. Material biológico	109
C.1.2. Reactivos para cultivo celular	110
C.1.3. Fluorocromos	112
C.1.4. Equipos.....	115
C.1.5. Material fungible.....	119
C.2. Métodos	121
C.2.1. Búsqueda bibliográfica.....	121
C.2.2. Estudio estadístico	122
C.2.3. Protocolo descongelación de queratinocitos y fibroblastos humanos para cultivo celular.....	123
C.2.4. Protocolo mantenimiento del cultivo celular	124
C.2.5. Protocolo de tripsinización.....	125
C.2.6. Cálculo de disoluciones de metformina.....	127
C.2.7. Cálculo de disoluciones de resveratrol	128
C.2.8. Protocolo del experimento de proliferación celular. Experimento 1.	129
C.2.9. Experimento de irradiación. Experimento 2.	131
C.2.10. Protocolo del experimento de viabilidad, apoptosis, necrosis y senescencia. celular Técnica APO5-Sen. Experimento 3.....	136
C.2.11. Protocolo del experimento de producción del radical superóxido. Experimento 4.	146
C.2.12. Protocolo del experimento de senolisis. Experimento 5.	151
C.3. Aspectos éticos.....	152
D. Resultados.....	153
D.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos	154
D.1.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos	154
D.1.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos.....	159
D.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	164
D.2.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB	164

D.2.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB.....	168
D.3. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	172
D.3.1. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB	172
D.3.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB	189
D.4. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	206
D.4.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB	206
D.4.2. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	210
D.5. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos y fibroblastos humanos.....	214
D.5.1. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos humanos.....	214
D.5.2. Efecto senolítico del resveratrol en fibroblastos humanos.....	217
E. Discusión	221
E.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos	221
E.1.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos	221
E.1.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos.....	222
E.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	225
E.2.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB	225
E.2.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB.....	226
E.3. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	227
E.3.1. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB.....	228
E.3.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB	233

E.4. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	239
E.4.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB	239
E.4.2. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB.....	242
E.5. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos y fibroblastos humanos	246
E.5.1. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos humanos	247
E.5.2. Efecto senolítico del resveratrol en fibroblastos humanos	247
F. Conclusiones.....	249
G. Relevancia y Limitaciones	251
H. Perspectivas de futuro	253
I. Índice de tablas y figuras.....	255
I.1. TABLAS.....	255
I.2. FIGURAS.....	257
J. Bibliografía	263
J.1. Recursos bibliográficos	263
J.2. Referencias bibliográficas	263
K. Anexo.....	285
K.1. Aspectos Éticos.....	285
K.2. Publicación Artículo.....	286
K.3. Certificado Inglés B2.....	287

Resumen

Introducción: La exposición diaria de las células de la piel a dosis subcitotóxicas de radiación ultravioleta es uno de los principales determinantes de senescencia celular y envejecimiento cutáneo secundario. La protección convencional actual frente a estas radiaciones se fundamenta en el uso de barreras externas. Conseguir efectos protectores adicionales a nivel celular incrementaría esta acción protectora.

Objetivos: Dado que la fotosenescencia es uno de los factores más importantes del envejecimiento cutáneo y que la metformina y el resveratrol son dos conocidos compuestos antisenescentes, hemos cuantificado los posibles efectos protectores de los mismos frente a la senescencia inducida por radiación ultravioleta.

Material y métodos: El modelo de nuestro estudio *in vitro* son queratinocitos de la línea HaCaT y fibroblastos humanos obtenidos por cultivo primario. Estas células han sido irradiadas con 1,8 J/cm² de radiación UVB y se ha empleado la citometría de imagen para determinación simultánea de muerte y senescencia celular utilizando los fluorocromos DAPI, AnexinaV-PE y C₁₂FDG en una técnica que hemos denominado APO5-Sen. Se ha irradiado a las células con 5,6 J/cm² de radiación UVB para determinar la sobreproducción de anión superóxido mediante citometría de imagen y el fluorocromo HE. Se ha cuantificado el efecto de la radiación ultravioleta sobre las células y el posible beneficio del pretratamiento con metformina y/o resveratrol sobre estas células irradiadas.

Resultados: El tratamiento preventivo con metformina 5 µM protege frente a la muerte celular inducida por UVB tanto en queratinocitos (-23%) como en fibroblastos humanos (-14,5%). El tratamiento preventivo con resveratrol 25 µM, administrado antes de la exposición a UVB, protege frente a la senescencia celular fotoinducida tanto en queratinocitos (-48,5%) como en fibroblastos humanos (-52%). Además, el resveratrol presentó propiedades senolíticas en células no irradiadas. El tratamiento preventivo combinado con metformina 5 µM y resveratrol 25 µM protege frente al incremento de anión superóxido inducido por UVB, tanto en queratinocitos (-27%) como en fibroblastos humanos (-53,6%). En fibroblastos humanos el efecto de esta combinación fue aditivo. En células no irradiadas, el tratamiento combinado con metformina 5 µM y resveratrol 25 µM mostró eficacia como barredor de radicales libres.

Conclusiones: Los resultados del presente trabajo validan la eficacia de la metformina y del resveratrol a la hora de ofrecer protección celular frente a la radiación ultravioleta. Serán necesarios nuevos estudios *in vivo* para conocer los posibles efectos fotoprotectores de la metformina y resveratrol administrados tópicamente y sistémicamente a bajas concentraciones.

Palabras Clave: metformina, resveratrol, muerte celular, senescencia celular, radicales libres, radiación UVB, queratinocitos, fibroblastos.

Abstract

Introduction: The daily exposure of skin cells to subcytotoxic doses of ultraviolet radiation is one of the main determinants of cellular senescence and secondary skin aging. Current conventional protection against these radiations is based on the use of external barriers. Achieving additional protective effects at the cellular level would increase this protective action.

Objectives: Given that photosenescence is one of the most important factors in skin aging and that metformin and resveratrol are two well-known antisenescent compounds, we have quantified their possible protective effects against senescence induced by ultraviolet radiation.

Material and methods: The model of our *in vitro* study are keratinocytes of the HaCaT line and human fibroblasts obtained by primary culture. These cells have been irradiated with 1.8 J/cm² of UVB radiation and image cytometry has been used for the simultaneous determination of cell death and senescence using the fluorochromes DAPI, AnnexinV-PE and C₁₂FDG, in a technique that we have called APO5-Sen . The cells have been irradiated with 5.6 J/cm² of UVB radiation to determine the overproduction of superoxide anion by image cytometry and HE fluorochrome. The effect of ultraviolet radiation on cells and the possible benefit of pretreatment with metformin and/or resveratrol on these irradiated cells have been quantified.

Results: Preventive treatment with 5 µM metformin protects against UVB-induced cell death in both human keratinocytes (-23%) and fibroblasts (-14.5%). Preventive treatment with 25 µM resveratrol, administered before UVB exposure, protects against photoinduced cellular senescence in both human keratinocytes (-48.5%) and fibroblasts (-52%). In addition, resveratrol has senolytic properties in non-irradiated cells. Combined preventive treatment with 5 µM metformin and 25 µM resveratrol protects against the increase in superoxide anion induced by UVB both in keratinocytes (-27%) and in human fibroblasts (-53.6%). In human fibroblasts, the effect of this combination was additive. In non-irradiated cells, combined treatment with 5 µM metformin and 25 µM resveratrol proved to be effective as a free radical scavenger.

Conclusions: The results of this study validate the efficacy of metformin and resveratrol in offering cell protection against ultraviolet radiation. New *in vivo* studies will be necessary to determine the possible photoprotective effects of metformin and resveratrol administered topically and systemically at low concentrations.

Keywords: metformin, resveratrol, cell death, cellular senescence, free radicals, UVB radiation, keratinocyte, fibroblasts.

Siglas y Abreviaturas

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ALP:** fosfatasa alcalina
- AMPK:** quinasa activada por adenosin monofosfato
- AN:** acantosis nigricans
- ARN:** ácido ribonucleico
- AP-1:** proteína activadora 1
- AP-2:** proteína activadora 2
- ATP:** trifosfato de adenosina
- B-Gal:** B-Galactosidasa
- CCL:** Ligando de quimiocina
- CDK:** quinasa dependiente de ciclinas
- CDKI:** proteína inhibitoria de quinasas dependiente de ciclinas
- C₁₂FDG:** 5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside
- cm²:** centímetros cuadrados
- COX:** ciclooxigenasa
- CXCL:** ligando de quimiocina C-X-C
- DAPI:** 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate
- DCF-DA:** 2',7'-dichlorofluorescein diacetate
- DEM:** dosis eritematosa mínima
- DLQI:** Índice de calidad de vida en dermatología
- DM:** diabetes mellitus
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DNFB:** dinitrofluorobenceno
- DR4:** Death Receptor-4

-DSBs: double-stranded breaks

-DTC: tautomerasa dopacrómica

-EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

-EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

-ER: receptor de estrógenos

-ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares

-FAD: dinucleótido de flavina y adenina

-Fas: Fatty acid synthase

-FasL: Fatty acid synthase Ligand

-FasR: Fatty acid synthase Receptor

-FOXO: Forkhead box O

-g: gramos

-µg: microgramos

-mg: miligramos

-GLP: péptido similar al glucagón tipo

-G6PD: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

-GSH: glutatión reducido

-GSH-Px: glutatión peroxidasa

-GST: glutatión S-transferasa

-HDL: lipoproteína de alta densidad

-HE: hidroetidina

-HGF: hepatocyte growth factor

-HMGB1: high mobility group box 1 proteins

-HSP: proteínas de choque térmico

-HtrA2/Omi: High temperature requirement/Omi

-ICAM: molécula de adhesión intercelular

-IGF: factor de crecimiento insulínico

-IL: interleuquina

-IκB: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor

-IKK: IκB kinase

-J: julios

-mJ: milijulios

-JNK: quinasas c-Jun N-terminal

-KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1

-Ki67: Índice de proliferación celular

-L: litros

-μL: microlitro

-mL: mililitro

-LDL: lipoproteína de baja densidad

-M: molaridad

-μM: micromolar

-mM: milimolar

-MAP: proteína activada por mitógenos

-MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

-MCP: proteína quimiotáctica de monocitos

-MDA: malondialdehido

-MDM: doble minuto murino

-MEC: matriz extracelular

-Met: metformina

-MITF: melanocyte inducing transcription factor

-MMP: metaloproteinasas de la matriz

-MSH: hormona estimulante de melanocitos

-mTOR: diana de rapamicina en mamíferos

-NADH: dinucleótido de nicotinamida adenina

-NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

-nm: nanómetro

-NOS: óxido nítrico sintasa

-NQO1: quinona oxidoreductasa 1

-OCT: transportador de cationes orgánicos

-ODC: ornitina descarboxilasa

-PE: ficoeritrina

-PM: peso molecular

-PARP: poli ADP ribosa polimerasa

-PBS: phosphate buffered saline

-PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

-PGC-1 α : Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) γ Coactivator 1 α

-PGES: prostaglandina E sintasa

-PK: proteína quinasa

-PRB: proteína del retinoblastoma

-PS: fosfatidilserina

-RIP: proteína que interactúa con el receptor

-ROS: especies reactivas del oxígeno

-Resv: resveratrol

-SA- β -Galactosidasa: senescence associated - β -galactosidase

-SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia

-SCID: inmunodeficiencia combinada severa

-SD: standard deviation

-SFB: suero fetal bovino

-SIRT: Silent mating type Information Two

-SMA: actina del músculo liso

-Smac/Diablo: Segundo activador derivado de la mitocondria activador de caspasas/Direct IAP-binding protein with low PI

-SOD: superóxido dismutasa

-SPRR: proteínas pequeñas ricas en prolina

-SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

-STACs: sirtuin-activating compounds

-STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

-STIM: molécula de interacción con el estroma

-TAF: factores asociados a TBP

-TEWL: Trans Epidermal Water Loss

-TGF-B: factor de crecimiento transformante beta

-TIMP: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.

-TNF: factor de necrosis tumoral

-TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

-TRP: proteína relacionada con la tirosina

-TRPA1: receptor transitorio anquirina 1

-UFA: Unidad de Fluorescencia Arbitraria

-UFC: unidad formadora de colonias

-UV: ultravioleta

-VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

-WST-1: reactivo para el estudio de proliferación celular

-W: vatios

-mW: milivatios

A. Introducción

A.1. Anatomía e histología de la piel humana.

La piel es un órgano que recubre toda la superficie del cuerpo y es continua con las membranas mucosas que recubren los orificios del mismo. Representa alrededor del 15% del peso corporal total de un adulto y es el órgano más grande del cuerpo. Ejerce múltiples funciones vitales (protección contra factores físicos, químicos y biológicos externos) que son posibles gracias a una estructura integrada por tejidos de diversos orígenes (epitelial, conectivo, vascular, muscular y nervioso). La piel está organizada en tres capas (figura 1), incluyendo de superficial a profundo: a) la *epidermis* (y sus apéndices asociados, folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas); b) la *dermis*, separada de la epidermis por la unión dermo-epidérmica, y c) la *hipodermis*. La estructura cutánea muestra considerables variaciones regionales, en relación con su espesor (que varía de 1 a 4 mm), la distribución de los apéndices epidérmicos y la densidad de los melanocitos. La piel lampiña (sin pelo) se encuentra en las palmas y las plantas de los pies, mientras que la piel con vello cubre el resto del cuerpo.

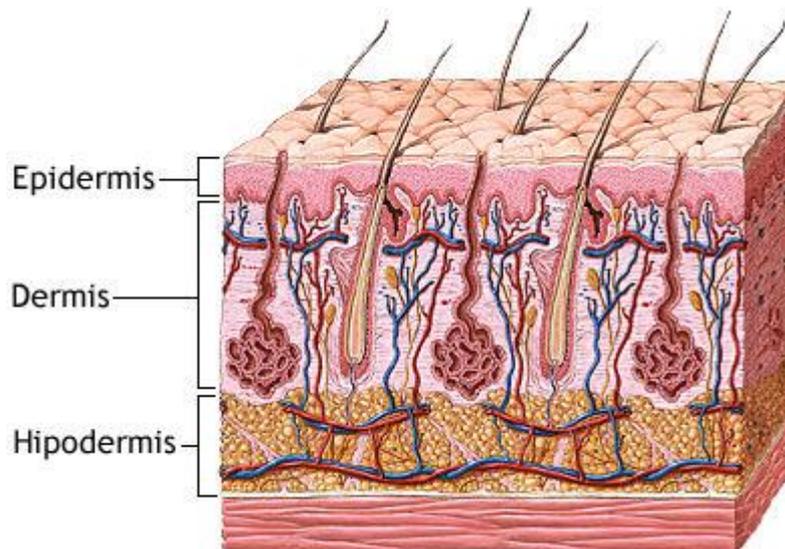


Figura 1. Ilustración de las capas de la piel humana. (1)

Embriológicamente, la epidermis y sus apéndices son de origen ectodérmico, mientras que la dermis y la hipodermis son de origen mesodérmico. (2–4)

A.1.1. Epidermis

A.1.1.1. Estructura de la Epidermis

La epidermis es un epitelio estratificado en continua renovación. Está compuesta de varios tipos de células, la mayoría de las cuales (90-95%) son queratinocitos, que se someten a un proceso de diferenciación, que resulta en la producción de células anucleadas aplanadas (corneocitos) que finalmente se desprenden de la superficie de la

piel. Del 5% al 10% de las células epidérmicas no son queratinocitos, incluyendo principalmente células de Langerhans, melanocitos y las células de Merkel.

Las células epidérmicas están dispuestas en capas continuas, que comprenden de abajo hacia arriba (figura 2): el estrato *basal* (capa única), el estrato de *células espinosas* (5-15 capas), el estrato *granuloso* (1-3 capas) y el *córneo* (5-10 capas), subdividido a su vez en una capa compacta profunda (estrato compacto) y una capa superficial, suelta (estrato disyuntivo). En algunas áreas del cuerpo (como en la región palmoplantar) existe una capa adicional, el estrato *lúcido*, que se puede ver entre los estratos granuloso y córneo.

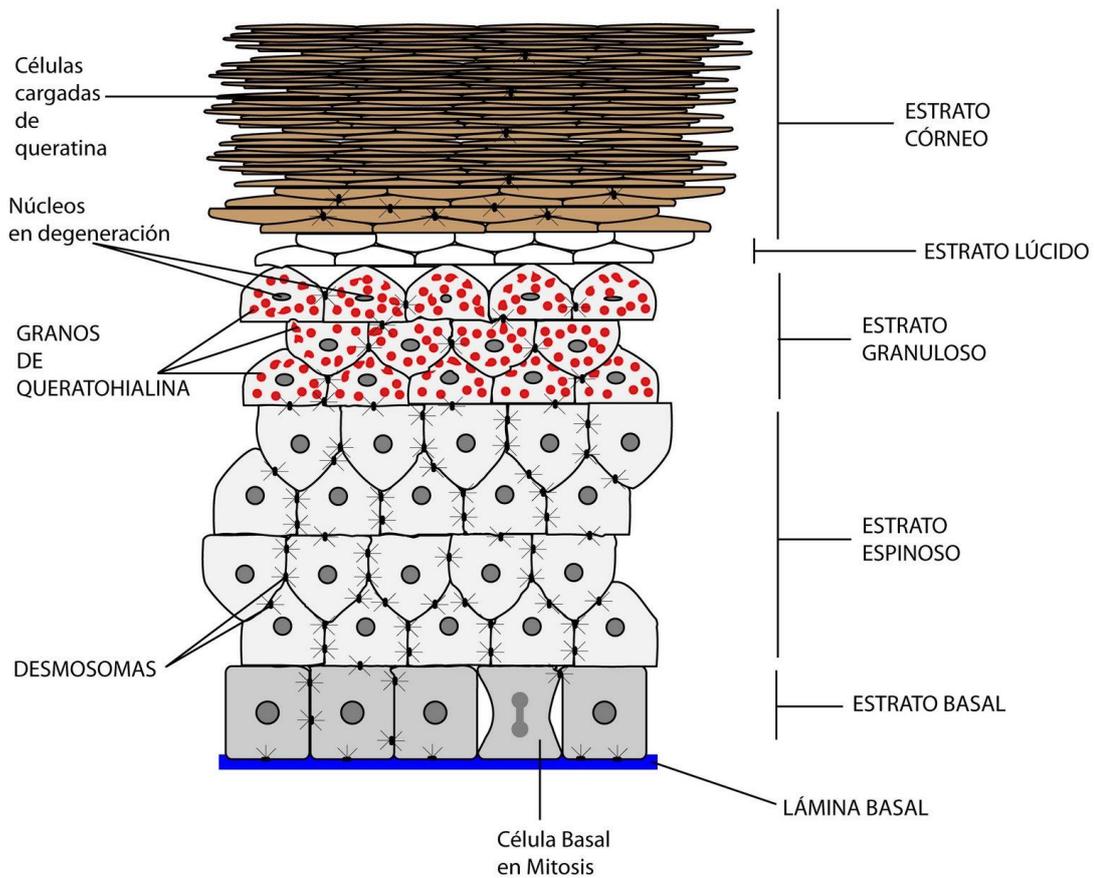


Figura 2. Ilustración de las capas de la epidermis. (5)

El queratinocito epidérmico se origina a partir de divisiones mitóticas de células madre de la capa basal. El queratinocito hijo generado en esta capa profunda, migra hacia la superficie de la piel mientras es sometido a diferenciación morfológica y bioquímica (queratinización), y es eliminado en aproximadamente 30 días.

La epidermis tiene un grosor promedio de 100 micras, pero esto varía considerablemente con el área del cuerpo considerada (desde 50 micras en los párpados a 1 mm sobre las palmas y plantas). (6)

A.1.1.2. Queratinocitos

La morfología de los queratinocitos varía con la capa epidérmica donde se observan (figura 2).

En la *capa basal* adquieren una configuración columnar o cúbica, midiendo 6-10 micras. Poseen un citoplasma basófilo y un núcleo grande. Están alineados perpendicularmente a la membrana basal subyacente a la que están anclados por estructuras de unión especiales, los hemidesmosomas. En microscopía electrónica, el queratinocito basal contiene melanosomas sobre el núcleo y haces sueltos de tonofilamentos, haces citoplasmáticos densos de filamentos intermedios (tonofibrillas) que consisten bioquímicamente en polipéptidos de queratina. Estas se insertan en las placas de unión de los desmosomas y contribuyen a la formación del citoesqueleto, confiriendo resistencia mecánica al queratinocito y la epidermis en su conjunto. Los queratinocitos basales están conectados a las células adyacentes por varios tipos de uniones intercelulares, las más características de las cuales son los desmosomas. La capa de células basales contiene células madre y queratinocitos cíclicos, que expresan antígenos de proliferación (como Ki67 y PCNA), que configuran el compartimento germinativo o proliferativo, que es responsable de la regeneración de la epidermis a través de divisiones mitóticas.

Los queratinocitos de la *capa espinosa* son más grandes (10-15 micras), poligonales, con un citoplasma eosinófilo, un núcleo vesicular con uno o dos nucléolos grandes y haces gruesos de tonofilamentos.

En la *capa granulosa*, los queratinocitos se aplanan, se extienden de forma paralela a la superficie de la piel, con un diámetro de 25 micras. Contienen gránulos poligonales altamente basófilos de queratohialina, compuestos por un conjunto de proteínas ricas en histidina (principalmente profilagrina) y queratina.

Los queratinocitos de las capas espinosa y granulosa superior también contienen cuerpos lamelares (conocidos como cuerpos de Odland), orgánulos redondos de 100-300 nm con una estructura interior laminar característica. Estos están involucrados en el proceso de descamación y la formación de una capa pericelular lipídica que actúa como una barrera de penetración contra sustancias extrañas hidrofílicas.

La *capa córnea* está integrada por corneocitos, altamente aplanados, de color eosinófilo, que se desprenden de la superficie cutánea, contribuyendo así a la función de barrera. Vistos desde arriba, los corneocitos son de forma hexagonal y miden entre 30 micras y 40 micras de diámetro, correspondientes a la superficie ocupada por 5-10 queratinocitos basales. Los corneocitos están desprovistos de núcleo y de organelas citoplasmáticas. Contienen una matriz de queratinas y una gruesa envoltura cornificada profunda a la membrana celular, que consiste en proteínas reticuladas (involucrina, loricrina, SPRRs, elafina y cistatina A). (6)

A.1.2. Dermis

A.1.2.1. Estructura de la Dermis

La dermis es un tejido conjuntivo de apoyo, subyacente a la epidermis y que es atravesado por apéndices, plexos vasculares y nerviosos. Está compuesta fundamentalmente por un gel de glucosaminoglucanos, mantenido por una matriz fibrosa que contiene colágeno y elastina. En cuanto a sus componentes celulares, fibroblastos, macrófagos y células dendríticas dérmicas, completan la lista de células de la dermis. En situaciones patológicas, como una inflamación aguda, las funciones y tipos de células epidérmicas cambian sustancialmente con la llegada de una variedad de leucocitos infiltrando el tejido. De hecho, la composición de los infiltrados cutáneos es diferente en función de la entidad patológica que se trate. La dermis es un tejido conjuntivo de apoyo, compresible y elástico que protege la epidermis, sus apéndices y los plexos vasculares y nerviosos que la atraviesan. El grosor de la dermis varía considerablemente con la ubicación anatómica (más gruesa en la espalda y las plantas que en los párpados), y su estructura microscópica varía según la profundidad (dermis superficial o papilar, dermis reticular o profunda) (figura 3).

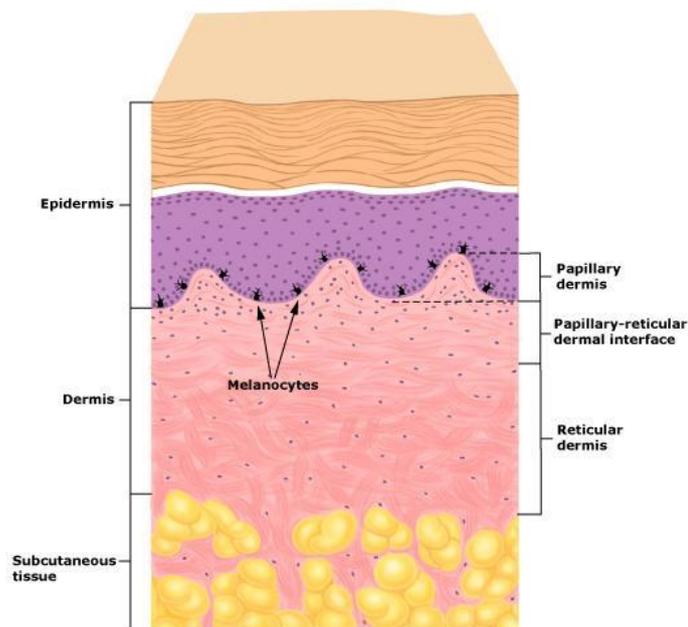


Figura 3. Ilustración de las capas de la dermis. (7)

La *dermis papilar* (superficial) forma proyecciones cónicas hacia arriba (papilas dérmicas) que se alternan con los rebordes epidérmicos, aumentando la superficie de contacto entre la dermis y la epidermis, permitiendo una mejor adherencia entre ambas capas. Contiene varias células (fibroblastos, dendrocitos dérmicos, mastocitos), vasos y terminaciones nerviosas. Está compuesta por fibras de colágeno dispuestas en haces sueltos y por fibras elásticas delgadas que se extienden perpendicularmente a la unión dermo-epidérmica. A nivel de las extremidades (principalmente en los dedos), las papilas

dérmicas contienen corpúsculos táctiles, terminaciones nerviosas especializadas que actúan como mecanorreceptores.

La *dermis reticular* (profunda) está formada por haces de colágeno más gruesos, que tienden a quedar paralelos a la superficie de la piel. La red elástica también es más gruesa. La dermis reticular contiene la parte profunda de los anexos cutáneos, plexos vasculares y nerviosos. (8)

A.1.2.2. Fibroblastos

Los *fibroblastos* son las células fundamentales de la dermis y de todos los tejidos conectivos, sintetizando todo tipo de fibras (colágeno, elásticas, reticulina) y la sustancia fundamental (hialurónico, proteoglicanos, glicosaminglicanos). Aparecen como células en forma de huso o estrelladas, que contienen un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado. (9)

Los fibroblastos juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad estructural de la mayor parte de tejidos. Atendiendo a su localización corporal y órgano de origen, existen diversos subtipos de fibroblastos:

- Los *fibrocitos* son fibroblastos pequeños, inactivos, desprovistos de actividad metabólica, que se encuentran en los tejidos conectivos maduros. (10)
- Los *fibroclastos* son fibroblastos con actividad fagocítica de colágeno. (10)
- Los *miofibroblastos* son células derivadas de fibroblastos, principalmente durante el proceso de curación de heridas que contienen miofilamentos, visibles mediante microscopía electrónica, actina muscular lisa y desmina. (10)

A.2. Muerte celular, senescencia celular y radicales libres

A.2.1. Muerte celular

En 2002 surge el Comité de Nomenclatura en Muerte Celular, unificando criterios para definir la muerte celular y sus diversas manifestaciones morfológicas, publicándose en 2005 la primera clasificación de muerte celular que sería actualizada en 2009 por el mismo grupo de autores. (11)

Galluzzi (12) propone en 2012 una clasificación en la que se describen hasta trece tipos de muerte celular organizadas en tres grupos, aunque cabe destacar que una misma célula puede presentar de forma simultánea diferentes marcadores de muerte celular, lo que indica que más de un programa de muerte celular puede estar actuando a la vez, siendo el más rápido el que cause la muerte celular. (13)

Entre los distintos tipos de muerte celular, destacan dos mecanismos denominados necrosis y apoptosis (tabla I).

<i>Característica</i>	APOPTOSIS	NECROSIS
<i>Número de células</i>	Células individuales o pequeños grupos de células	Generalmente grandes cantidades
<i>Volumen celular</i>	Encogimiento celular	Hinchamiento celular, citólisis
<i>Efecto en la integridad de la membrana plasmática</i>	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
<i>Efecto en el citoplasma</i>	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
<i>Efecto en el núcleo</i>	Condensación de la cromatina (picnosis)	Fragmentación del núcleo y la cromatina (cariólisis)
<i>Procesos de inflamación tisular</i>	No hay presencia de inflamación	Generalmente inflamación presente

Tabla I. Comparación de las características citomorfológicas de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis. (14,15)

En primer lugar, por lo que respecta a la apoptosis, se trata de un proceso ordenado, que depende del consumo activo de energía en forma de ATP. Implica la activación de un conjunto de enzimas proteolíticas denominadas caspasas (cysteine-specific proteases). Este consumo activo de energía viene justificado por múltiples interacciones proteicas (entrecruzamientos, roturas, degradación y síntesis) y un reordenamiento de las estructuras celulares previo a la degradación por otras células.

A nivel del núcleo celular se produce una condensación de la cromatina (pícnosis). Al contrario que las células necróticas, la membrana plasmática mantiene la integridad hasta su eliminación, sin producirse liberación del contenido intracelular al exterior. Como dato característico, se produce una translocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular hacia la externa, secundario a la actividad de proteínas translocasas, ofreciendo un mecanismo de reconocimiento para células fagocíticas. La superficie celular emite protrusiones y se desprenden fragmentos de citoplasma rodeados de membrana celular denominados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados rápidamente por una célula adyacente o macrófagos, sin provocar respuesta inflamatoria tisular (14,15).

Se distinguen dos vías de iniciación apoptótica (14):

- Vía de señalización extrínseca. Se denomina de este modo ya que para su activación requiere de interacciones mediadas por receptores transmembranales tales como: receptor de TNF (*Tumor Necrosis Factor*), DR4 (*Death Receptor-4*) y FasR (*Fatty acid synthase Receptor*). Estos receptores se unen respectivamente a los siguientes ligandos de muerte celular: TNF (*Tumor Necrosis Factor*), TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) y el FasL (*Fatty acid synthase Ligand*). Tras la asociación de estos receptores con sus ligandos se produce un reclutamiento de moléculas adaptadoras, las cuales activan a caspasas iniciadoras, dando como resultado una activación de caspasas ejecutoras de la apoptosis.

- Vía de señalización intrínseca. Cascada de señalización para la activación de la cual se han descrito distintos estímulos intracelulares procedentes de la mitocondria, donde se produce cambios estructurales en la membrana mitocondrial, tras la apertura de poros de transición y alteración en el potencial transmembrana, lo que deriva en una liberación hacia el citosol de sustancias pro apoptóticas: citocromo C, Smac/Diablo (Segundo activador derivado de la mitocondria activador de caspasas/*Direct IAP-binding protein with low PI*) y la serín proteasa HtrA2/Omi (*High temperature requirement/Omi*). Estas sustancias impulsan la cascada apoptótica mediante la activación de las caspasas.

Clásicamente se ha considerado que la apoptosis es un proceso irreversible tras la activación de la vía de las caspasas. Sin embargo, se ha observado que tras inactivación genética de los macrófagos algunas células programadas para morir por apoptosis pudieron revertir el proceso. Por tanto, la acción de los macrófagos es la de garantizar la finalización del proceso de apoptosis una vez que se ha iniciado este tipo de muerte en aquellas células programadas (15).

En cuanto a la necrosis celular, se trata de un proceso desordenado, independiente del consumo activo de energía en forma de ATP. A nivel del núcleo celular implica cambios irreversibles tras disolución completa de la cromatina (cariólisis). A nivel citosólico se produce una disfunción mitocondrial significativa y una pérdida de la estructura citoplásmica con incremento del volumen celular que termina con una ruptura de la membrana celular (citólisis). A consecuencia de estos acontecimientos, se produce una liberación del contenido citoplasmático al exterior de la célula, desencadenando un proceso inflamatorio y necrosis histológicamente evidenciable en el tejido implicado (14,15).

La necroptosis se define como un tipo de muerte celular programada que presenta características híbridas entre la apoptosis (muerte celular programada, receptores activadores transmembrana y translocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular hacia la externa) y la necrosis (permeabilización de la membrana, liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular, inflamación tisular). A diferencia de la apoptosis tardía, en la necroptosis no se produce fragmentación del ADN (11).

A.2.2. Senescencia celular

A.2.2.1. Teorías propuestas

La definición del estado de senescencia celular fue establecida en el año 1961 por el doctor Leonard Hayflick como una pérdida irreversible de la capacidad de proliferación celular, manteniendo un estado metabólico activo para garantizar su supervivencia (16). Desde la aparición de esta primera definición se han propuesto diversas teorías para tratar de justificar los mecanismos que inducen la senescencia celular, destacando entre ellas (figura 4-6):

Partiendo de los resultados de la investigación llevada a cabo por el doctor Hayflick, se ha propuesto que las células disponen de una capacidad replicativa finita, asociado con el envejecimiento de los tejidos vivos, lo que se ha denominado como senescencia replicativa o “fenómeno del límite de Hayflick” (14,17). Como excepción a este fenómeno, pudiendo escapar de la senescencia replicativa, destacan las células neoplásicas (18).

Fenotípicamente, mediante microscopía óptica se observa que las células senescentes presentan una morfología aplanada y alargada, mostrando en su interior depósitos granulares de lipofucsina y focos de heterocromatina (14).

En el año 2008, Vicencio y colaboradores propone dos vías de señalización para el proceso de senescencia celular: vía p53 y vía pRB (19). De esta forma, tras el acontecimiento de distintos estímulos tales como daño en el ADN, acortamiento telomérico, estrés oxidativo o activación de oncogenes, a través de dos vías relacionadas entre sí, se produce el arresto del ciclo celular (figura 4):

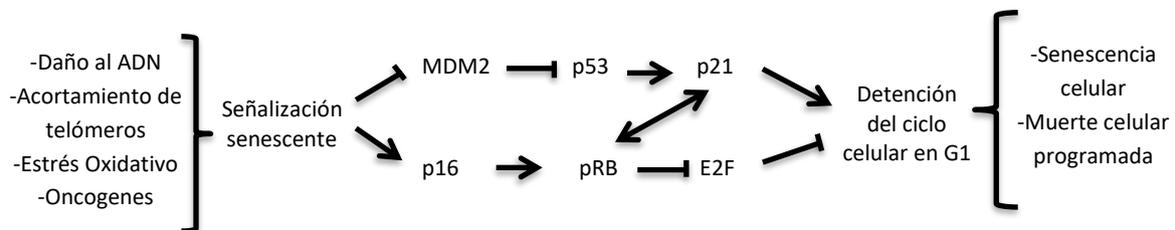


Figura 4. Vías de señalización en el fenómeno de senescencia celular propuestas por Vicencio y colaboradores. (14,19)

-Por lo que respecta a la primera vía, en condiciones fisiológicas la proteína p53 es degradada por el complejo MDM2 (*Mouse Double Minute 2*), pero en caso de daño en el ADN se produce una supresión en la actividad MDM2, haciendo que la proteína p53 active a la proteína p21 (también denominada CDK-N1a, p21Cip1, Waf1 o SDI1) la cual es una proteína inhibitoria de kinasas dependiente de ciclinas (CKI), deteniendo el ciclo celular.

-En cuanto a la segunda vía, la proteína pRB (proteína Retinoblastoma) es activada por la proteína p16 (también denominada como proteína CDKN2a o p16INK4a) después del estrés celular o daño al ADN, uniéndose posteriormente a otras proteínas de la familia de factores E2F, que son reguladoras del ciclo celular.

La senescencia, por tanto, supone un mecanismo de protección celular, pero supone un inconveniente en otras situaciones tales como el agotamiento de la proliferación en células madre o en situaciones de procesos inflamatorios ligados al fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP).(18)

En el año 2014, Van Deusen y colaboradores proponen una teoría de senescencia multi paso (20) (Figura 5):

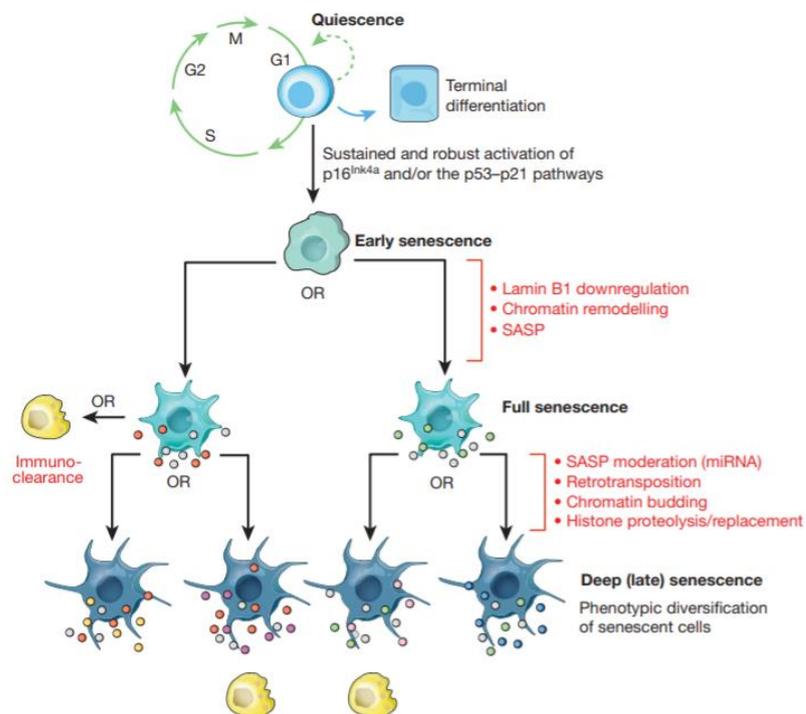


Figura 5. Teoría multi paso en el fenómeno de senescencia celular propuesta por Van Deusen y colaboradores. (20)

-En el primer paso, partiendo de una célula quiescente sin replicación celular (fase G0), esta célula es capaz de volver al ciclo celular mediante la diferenciación terminal, o por el contrario progresar hacia un estadio de senescencia temprana (presenescencia) mediante la activación de las proteínas p16 y/o las vías p53, p21.

-En el segundo paso, la célula es capaz de alcanzar la fase de senescencia completa mediante una disminución en la producción de laminina B1, procesos de remodelado de la cromatina y estímulos activadores del fenotipo SASP.

-En el tercer paso, es posible alcanzar la fase de senescencia tardía. Este paso viene determinado por numerosos factores genéticos y epigenéticos así como una atenuación del SASP, lo que determina la heterogeneidad fenotípica de las células senescentes.

-Finalmente, puede darse un proceso muerte celular mediante autofagia. Con este mecanismo las células eliminan organelas y proteínas degradadas que son autofagocitadas en el lisosoma. Este incremento en la actividad lisosomal supone un aumento de la actividad de la enzima SA- β -Gal localizada en los lisosomas, que es actualmente uno de los marcadores más empleados para la determinación de senescencia celular mediante y que ha sido determinada en la presente tesis mediante citometría de imagen.(21)

En el año 2017, Abbadie y colaboradores describen en estudios *in vitro* con queratinocitos de piel humana y células epiteliales de la mama, un modelo de senescencia en el que se distinguen dos pasos (22) (Figura 6):

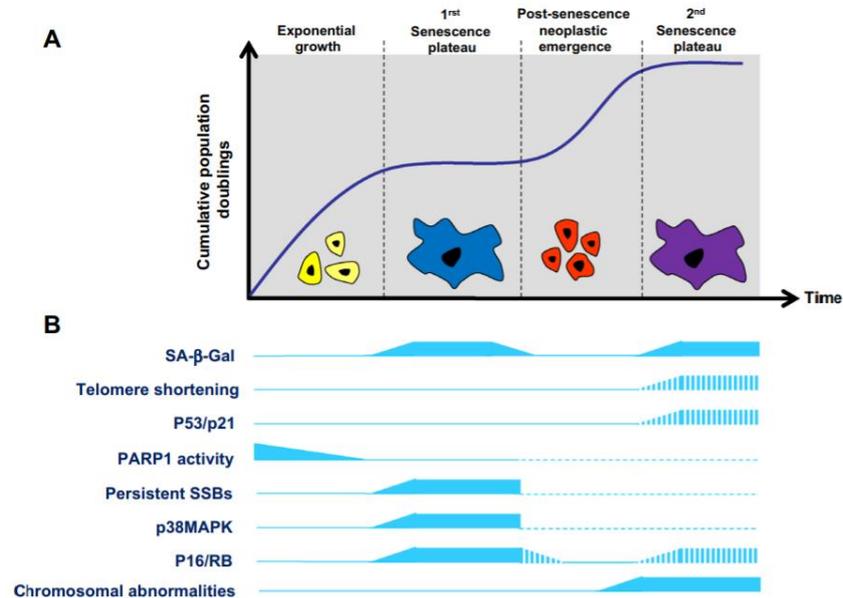


Figura 6. Teoría de dos fases en el fenómeno de senescencia celular propuesta por Abbadie y colaboradores. (22)

-En el primer paso (1º meseta en la figura 6) se objetiva una detención del crecimiento celular tras 10-20 divisiones de la población celular, siendo este fenómeno denominado senescencia temprana independiente de los telómeros. En esta fase se objetivaban cambios morfológicos tales como un incremento del diámetro celular asociado a aplanamiento y también se observó un incremento de la actividad de la enzima SA- β -Galactosidasa, secreción de enzimas proinflamatorias (SASP) y una detención del ciclo celular en la fase G1. Esta detención fue descrita como potencialmente reversible en algunas células, siendo sólo 1 de cada 10.000 células senescentes tempranas capaces de escapar de forma espontánea de esta detención, disminuyendo la actividad de la enzima SA- β -Galactosidasa y reincorporándose al ciclo celular proliferando.

-En el segundo paso (2° meseta en la figura 6) se objetiva una detención del crecimiento celular de las células que se habían reincorporado al ciclo celular tras 5-45 duplicaciones adicionales de su población celular. En esta segunda detención de las células denominada “agosenesencia”, se observa nuevamente un incremento en la actividad de la enzima SA- β -Galactosidasa, la expresión de SASP y un incremento de la muerte celular.

El SASP mediante señalización paracrina influye en células cercanas y en su microambiente, y participa en la senescencia a nivel celular, el envejecimiento a nivel tisular y patologías dependientes de la edad a nivel orgánico. Con la disminución de la expresión de la proteína Sirtuina 1 (SIRT1 o Silent mating type Information Two type 1) se produce un incremento en la expresión de los componentes del SASP, lo que favorece una producción de las interleuquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 que induce la expansión de células senescentes. De forma inversa, con el incremento de la expresión de la proteína Sirtuina 1 es posible suprimir la producción de los componentes del SASP mediante regulación epigenética (23).

Existen sustancias activadoras de la Sirtuina 1 que se conocen como STACs (sirtuin-activating compounds), siendo la metformina y resveratrol dos STACs utilizados en la presente tesis. (24)

La definición de sustancias senolíticas son aquellas que determinan la muerte celular selectiva de células senescentes. Recientemente, en trabajos *in vitro* se ha observado propiedades senolíticas de las mostaza nitrogenada y sulfurada en fibroblastos humanos senescentes (18).

En el envejecimiento del tejido cutáneo se distinguen factores extrínsecos (radiación ultravioleta, tabaquismo, abuso de alcohol, deficiencias nutricionales) y factores intrínsecos (determinantes genéticos, epigenéticos y el paso del tiempo). Los factores extrínsecos determinan el envejecimiento de la piel en mayor proporción que los factores intrínsecos, siendo la radiación ultravioleta el principal factor determinante (fotoenvejecimiento) induciendo a nivel celular daños en el ADN y activando distintos oncogenes. Para defenderse frente al fotodaño, las células cutáneas disponen de mecanismos integrados tales como: paradas en distintas fases del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis o senescencia prematura. (25)

A.2.2.2. Marcadores de senescencia celular

Existen distintos marcadores que son utilizados en el estudio de senescencia celular tales como:

-Tamaño Celular: Una de las primeras características descritas, asociadas a la senescencia celular, es el incremento del *tamaño celular* de las células senescentes, de hasta dos veces respecto el tamaño de células proliferantes. (14,26)

-Longitud de telómeros: Por lo que respecta a los *telómeros*, están constituidos por ADN repetitivo en los segmentos terminales de los cromosomas. Por cada división celular se ha observado una disminución del tamaño cromosómico de 20-300 pares de bases, además de una reducción importante de la expresión de la enzima telomerasa, la cual se encarga de adicionar ADN telomérico para disminuir ésta pérdida continua. (14,26)

-Proteínas relacionadas con el ciclo celular: Se ha publicado la cuantificación de los niveles de p16, p21, histona macroH2A, P38 MAPK fosforilada y DSBs. (18)

-Determinación de SASP: Las células senescentes se comunican con su entorno mediante un conjunto de factores solubles liberados, que se conocen como el fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP, compuesto desde por citoquinas proinflamatorias hasta factores de crecimiento. (14,26,27)

-Determinación de sirtuinas: Algunas enzimas como la *sirtuina 1* presentan propiedades antisenescentes mediante la reducción de la expresión del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) por las células senescentes a través de regulación epigenética. Presentan también propiedades antienvjecimiento mediante la conservación de la matriz colágena dérmica a través de la inhibición de metaloproteinasas de tipo 9. (23,24,26)

- Proliferación celular: Para algunos autores, la determinación de la proliferación celular puede usarse como un parámetro inversamente proporcional a la senescencia celular. Para ello se ha descrito el uso del reactivo WST-1 que determina la proliferación celular mediante lector de placas. Esta técnica ha sido utilizada en la presente tesis doctoral. (25)

-Actividad de la enzima SA-β-galactosidasa: En las células humanas senescentes existe un aumento significativo de los niveles de enzima SA-β-galactosidasa lisosomal.

Esta enzima en células senescentes cataliza la hidrólisis de la galactosa en monosacáridos, siendo activa a un pH de 6 (28). No obstante esta actividad dentro de los lisosomas puede detectarse en células proliferantes a un pH de 4 (29). Es por ello que para determinar selectivamente la actividad SA- β -galactosidasa en células senescentes se ha descrito la alcalinización de los lisosomas con carbonato amónico y tinción con fluorocromo C₁₂-FDG, el cual atraviesa la membrana celular y lisosomal, siendo hidrolizado por la enzima SA- β -galactosidasa en el interior del lisosoma de las células senescentes y emitiendo fluorescencia verde (525 nm) que es detectada mediante citometría de imagen. Esta técnica se ha empleado para la presente tesis doctoral. (30)

La histoquímica es otra técnica para detectar la actividad de la enzima SA- β -galactosidasa aunque no es tan específica como la citometría de imagen. Mediante histoquímica la falta de selectividad e la tinción no permite distinguir las células senescentes de las proliferantes. Además, con histoquímica pueden darse falsos positivos de la muestra en caso de alta confluencia celular.(18)

También es posible determinar la actividad de la enzima SA- β -galactosidasa utilizando fluorímetro para detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo FDG. (31)

A.2.3. Radicales libres

Durante el metabolismo aerobio, aproximadamente entre el 1-5% del oxígeno que consumen las células se reduce parcialmente, obteniéndose moléculas intermediarias o especies reactivas del oxígeno entre las que destacan el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (figura 7).

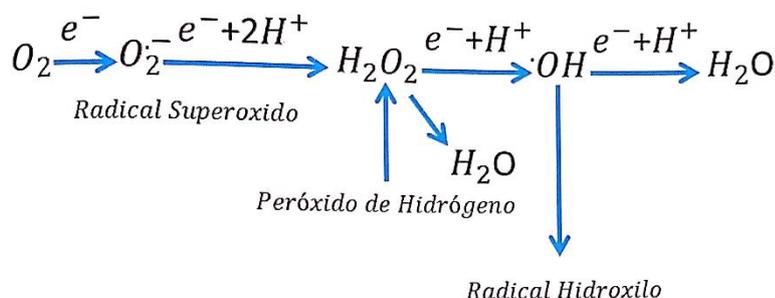


Figura 7. Reducción monovalente del oxígeno molecular (32)

Estas moléculas se generan mediante distintos procesos metabólicos. En la tabla II se muestran algunos de los radicales libres que se producen con mayor frecuencia y las reacciones más habituales con las que se originan.

Radical libre	Reacción mas común que lo origina
$\bullet O_2^-$	Radical superóxido $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADPH^+ + H^+ + 2\bullet O_2^-$
$\bullet OH^-$	Radical hidroxilo $\bullet UQ + H_2O_2 \rightarrow UQ + \bullet OH + \bullet OH^-$
$RO_2\bullet$	Radical peroxilo $LH + RO_2\bullet \rightarrow L\bullet + H_2O$
$RO\bullet$	Radical alcóxido o fenóxido $R\bullet + O_2 \rightarrow RO\bullet$
$L\bullet$	Radical peróxido lípido $LO_2\bullet + LH \rightarrow LOOH + L\bullet$
$\bullet NO_2$	Radical óxido nítrico $\bullet OH + NO_2^- + LH \rightarrow OH^- + \bullet NO_2$

Tabla II. Producción de radicales libres (32)

En la presente tesis doctoral se han realizado determinaciones para cuantificar el anión superóxido tanto en estado basal como post irradiación con ultravioleta. El anión superóxido es un mediador en los efectos citotóxicos inducidos por la radiación UV, activando el factor de transcripción AP-2, lo que determina una activación de la cascada de señales que involucra otros factores tales como JNK, p38-MAPK y NF-κB. Estos factores participan en el sistema de transducción que conlleva a la apoptosis o a la recuperación de la célula dependiendo del estado previo a la irradiación de la misma.

Entre los efectos nocivos que puede ejercer el anión superóxido sobre distintas macromoléculas encontramos el daño al ADN, debido a la oxidación de residuos guanina a 8-oxo-Gu, responsable de provocar mutaciones que pueden derivar en muerte celular.

Entre las proteínas cuya traducción se ha descrito que es inducida por el anión superóxido encontramos a la hemoxygenasa 1, la metaloproteinasa 1 de la matriz extracelular, las interleuquinas IL-1 a/b e IL-6, la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 y el ligando Fas.

Tanto el anión superóxido como el peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo reaccionan frecuentemente con distintas macromoléculas que son clave para la homeostasis celular, tales como ácidos grasos de las estructuras fosfolipídicas, las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos. (32)

A.3. Radiación electromagnética.

A.3.1. Espectro electromagnético

La radiación electromagnética es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro. A diferencia de otros tipos de onda, como el sonido, que necesitan un medio material para propagarse, la radiación electromagnética se puede propagar en el vacío.

El espectro electromagnético es la distribución energética del conjunto de las ondas electromagnéticas. Se extiende desde la radiación de menor longitud de onda, como los rayos cósmicos, gamma y los rayos X, pasando por la luz ultravioleta, la luz visible y los rayos infrarrojos, hasta las ondas electromagnéticas de mayor longitud de onda, como son las ondas de radio (figura 8).

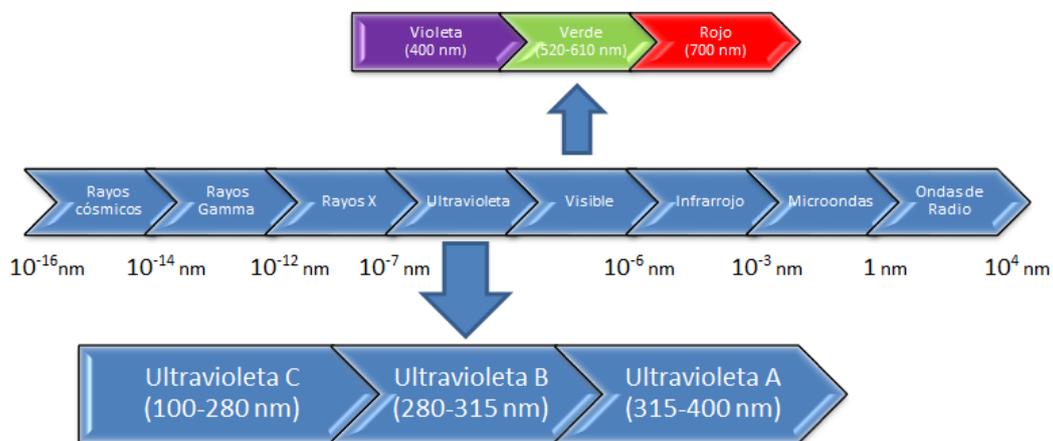


Figura 8. Ilustración del espectro electromagnético. (Figura del autor)

La radiación solar es emitida como radiación electromagnética. Podemos percibir fácilmente la luz visible pero otras frecuencias no visibles son filtradas por la atmósfera. La descomposición de esta radiación origina el espectro solar, que está formado por tres bandas de longitud de onda: Ultravioleta, Visible e Infrarroja.

Las ondas electromagnéticas se describen típicamente por cualquiera de las siguientes tres propiedades físicas: *frecuencia* f , *longitud de onda* λ o *energía de fotones* E . La longitud de onda es inversamente proporcional a la energía, por eso los rayos ultravioleta que tienen longitud de onda muy baja, son los más energéticos y por tanto los que más dañan a la piel, llegando a producir quemaduras solares. Con respecto a la frecuencia de la onda, es directamente proporcional a su energía (figura 9).

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad \text{ó} \quad f = \frac{E}{h} \quad \text{ó} \quad E = \frac{h \times c}{\lambda}$$

f= frecuencia
 c = velocidad de la luz
 λ= longitud de onda
 E= Energía
 h= constante de Planck

Figura 9. Ecuación de las relaciones entre frecuencia (f), longitud de onda (λ) y energía de los fotones (E). (33)

El sol emite tres tipos de radiación ultravioleta. Los más peligrosos son los rayos UV-C, pero son absorbidos totalmente por la capa de ozono. Los dos tipos restantes, que sí que alcanzan la superficie terrestre, los rayos UV-A (95%) y UV-B (5%), tienen un efecto diferente en la piel humana: (34)

- UV-A:** La radiación UV-A no causa quemaduras solares. Penetra más profundamente en la piel, donde producen un bronceado intenso, pero también causan daños en el tejido conjuntivo de la dermis, provocando un envejecimiento prematuro, la aparición de arrugas y una pérdida del tono de la piel.

- UV-B:** La mayor parte de la radiación UV-B que llega a la atmósfera terrestre es interceptada por la capa de ozono. Las ondas más cortas de los rayos UV-B penetran menos y afectan a las capas más superficiales de la piel donde provocan daños en el ADN y hacen que la piel se broncee como mecanismo natural de protección. Si la dosis de UV-B es demasiado alta, la piel sufre quemaduras solares, iniciándose entonces un proceso de autoreparación para arreglar los daños causados. Cuanto mayor es la frecuencia y la intensidad con la que la piel sufre quemaduras solares, mayor es la frecuencia con la que tiene lugar este proceso, lo que lleva a reparaciones insuficientes y al daño genético (mutaciones) que finalmente puede derivar en la aparición de lesiones precancerosas y cáncer cutáneo.

- UV-C:** tienen más energía que otros tipos de rayos UV, pero no penetran la capa de ozono.

A.3.2. Índice Ultravioleta

La radiación solar UV se puede medir de dos formas:

- Como una **irradiancia**, teniendo en cuenta la potencia incidente sobre una superficie de una unidad de área (W/m^2).
- Como una **exposición radiante** o **dosis**, teniendo en cuenta la energía incidente sobre una superficie de una unidad de área (J/m^2).

El Índice UV de la Organización Mundial de la Salud (figura 10) es un indicador internacional de la intensidad de la radiación ultravioleta procedente del sol. Se utiliza para describir la intensidad del sol en un lugar y hora determinados. Tiene un rango de 1 a 11 representando el nivel más alto (11), el mayor riesgo de sufrir lesiones cutáneas. En este índice, 1 UVI corresponde a una irradiancia de $1/40 \text{ W}/\text{m}^2 = 25 \text{ W}/\text{m}^2$ de radiación UVB efectiva.



Figura 10. Índice ultravioleta según la Organización Mundial de la Salud. (34)

Los factores que influyen en el índice UV son: (35)

- **Latitud:** en el punto donde el sol se encuentra sobre la vertical, el índice es máximo y esto se da entre los trópicos.
- **Altitud:** de 10% a 12% más de intensidad de radiación cada 1000 m ascendidos.
- **Nubosidad:** las nubes reducen considerablemente los rayos infrarrojos que llegan a la superficie terrestre y, escasamente (solo un 10%), la radiación ultravioleta queda retenida por las nubes.
- **Cantidad de ozono** en las capas altas de la atmósfera.
- **Índice de reflexión del suelo:** en general no afecta mucho, pero la arena, la hierba y sobre todo el agua (sólida como nieve, y líquida en mares y lagos), reflejan muchos rayos UV. El índice UV puede ser 2 - 3 veces mayor en una zona nevada.

A.4. Efectos patológicos de la radiación UV sobre la piel

A.4.1. Efecto patológico de la radiación UV en la piel. Efecto celular

A.4.1.1. Muerte celular

Después de la exposición a radiación UV, la piel absorberá la mayoría de la radiación. Esto conduce a una serie de eventos celulares cruciales tales como el daño en el ADN (directo o indirecto), el estrés oxidativo (desarrollado en el punto A.4.1.3) y la inflamación.

La radiación UV puede inducir en las células de la piel un aumento de las citocinas inflamatorias tales como interleucina-1alfa (IL-1 α), interleucina-1beta (IL-1 β), IL-6 y Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), lo que contribuye a la inflamación de la piel fotoinducida. IL-1 β es una citocina altamente inflamatoria, y se activa a partir de su precursor pro-IL-1 β . Después de la exposición a la radiación UV, la caspasa-1 activada puede procesar la transformación de pro-IL-1 β a su forma madura, IL-1 β . IL-1 β puede unirse y activar al receptor de interleucina-1 Tipo I (IL-1R1). Posteriormente, IL-1R1 activa otras vías proinflamatorias tales como MAPK, p38 y JNK. Sin control, la respuesta inflamatoria fotoinducida en la piel puede conducir a una disminución de la viabilidad celular. (36)

Este descenso de la viabilidad celular se justifica por un incremento en la mortalidad celular, tras irradiación con UV, observándose un incremento en el porcentaje de células necróticas y apoptóticas (figura 11). (37)

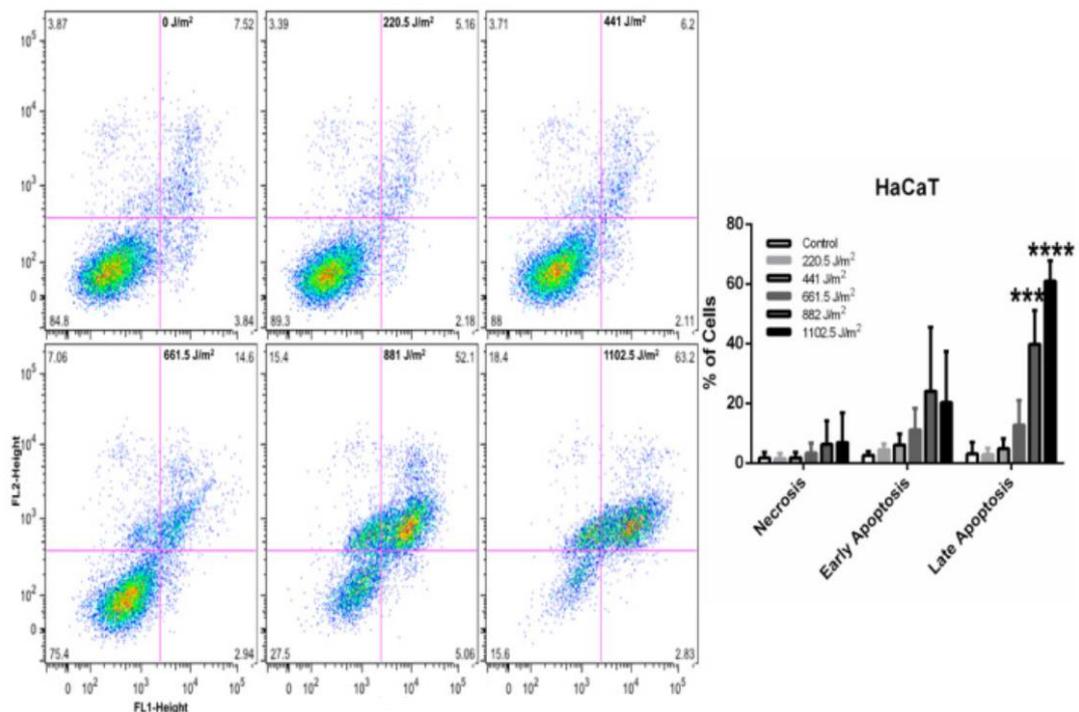


Figura 11. Efecto de dosis crecientes de radiación UVB sobre la mortalidad celular en queratinocitos HaCaT, 72 horas post irradiación, determinados mediante citometría de flujo. Histograma biparamétrico representando en eje de abscisas a las células fluorescentes con Anexina-V y en el eje de abscisas las

células fluorescentes con el fluorocromo IP. Las células en el cuadrante inferior izquierdo son negativas para Anexina-V e IP (células vivas). Las células en el cuadrante superior izquierdo son positivas para IP (células necróticas). Las células del cuadrante inferior derecho son positivas para la anexina-V y, por lo tanto, son células apoptóticas tempranas. Las células en el cuadrante superior derecho son positivas para Anexina-V e IP y son clasificadas como células apoptóticas tardías. En la presente tesis doctoral, utilizando simultáneamente el fluorocromo C12FDG se ha subdividido el cuadrante inferior izquierdo en células vivas proliferantes y células vivas senescentes. Con la citometría de imagen, según la integridad nuclear se ha subdividido el cuadrante superior derecho en células apoptóticas tardías y células necroptóticas. Figura extraída de (37,38)

A.4.1.2. Senescencia celular

Las células senescentes se acumulan en los tejidos con el fotoenvejecimiento y constituyen una respuesta al mismo que comprende la detención de la proliferación celular.

La epidermis, en tejidos no envejecidos, está formada por un epitelio escamoso estratificado altamente proliferativo.

Las células madre en la capa de queratinocitos basales expresan la enzima telomerasa, lo que les permite conservar la longitud de sus telómeros durante el fotoenvejecimiento.

Las células madre producen células progenitoras amplificadoras transitorias que se desprenden de la membrana basal. Su progenie migra hacia la superficie epitelial y se diferencia terminalmente hacia los corneocitos, teniendo lugar todo el proceso durante 3 a 6 semanas. Por lo tanto, la epidermis puede eliminar el daño macromolecular extrínseco a través de la descamación de los queratinocitos diferenciados terminalmente, impidiendo así la acumulación de daño y haciendo que el compartimento tisular sea comparativamente resistente al fotodaño.

Bajo altos niveles de estrés oxidativo inducido por UVB, los queratinocitos, en contraste con los fibroblastos, pueden sufrir apoptosis como respuesta al daño del ADN mostrando poca proporción de senescencia celular durante el fotoenvejecimiento. (39)

En la epidermis humana, con el fotoenvejecimiento las células expresan marcadores de senescencia tales como: SA- β -Gal, p16INK4A, p21WAF1/CIP1, TAF, H2A.J, pérdida de Lamin B1 y de HMGB1. (40,41)

A diferencia de la epidermis, la dermis no puede eliminar el daño extrínseco por desprendimiento de células, y los fibroblastos proliferan muy lentamente *in vivo*. Los fibroblastos resultan más propensos a la acumulación de daño en el ADN (y a la senescencia celular) que los queratinocitos, porque son menos eficientes en la reparación de nucleótidos y tienen menor capacidad antioxidante.

En la dermis humana, el número de células positivas para p16 es dos veces superior en la vejez (por encima de los 70 años) con respecto a la juventud (42). Usando la morfología nuclear como marcador de la senescencia, se observó un aumento de células senescentes de alrededor del 25 a casi el 60 % en la dermis papilar protegida del sol en una comparación entre piel de adultos jóvenes y voluntarios ancianos (43). Una fuente importante de la variación entre estudios es el uso de diferentes marcadores de senescencia que a menudo no están validados o no son sensibles. Por lo tanto, aún no está

claro cuántas células senescentes se acumulan en la piel envejecida y en qué medida las especies o las diferencias de localización anatómica podrían tener un impacto en la tasa de acumulación de células senescentes.

Los fibroblastos en la región papilar de la dermis en pacientes jóvenes son más pequeños, tienen mayor proliferación celular, secretan menos citocinas y metaloproteinasas de matriz y favorecen la diferenciación de queratinocitos mejor que los fibroblastos reticulares. Sin embargo, durante el envejecimiento, los fibroblastos en el compartimento papilar se vuelven más similares a los reticulares, mientras que las propiedades de la población reticular permanecen sin cambios. Estos resultados pueden interpretarse de manera diferente. Por ejemplo, los fibroblastos papilares y reticulares pueden pertenecer a diferentes linajes, y los fibroblastos papilares pueden diferenciarse en reticulares durante el envejecimiento. Otra posibilidad podría ser que los fibroblastos reticulares de pacientes jóvenes ya contengan una mayor proporción de células senescentes, y que los fibroblastos papilares alcancen proporciones de senescencia similares solo en la piel envejecida. (40)

Aunque la senescencia celular se ha asociado clásicamente al fotoenvejecimiento como un mecanismo celular secundario a la fotoexposición crónica de las células de la piel, recientemente Nayeri Rad y colaboradores en fibroblastos humanos *in vitro* han descrito un modelo de senescencia celular fotoinducida con dosis única de radiación UVB (17.78 ± 0.19 W/m²) a los 15 días post irradiación. (44)

A.4.1.3. Radicales libres

La radiación ultravioleta es responsable de distintos efectos patológicos en la piel a nivel celular, secundario a la producción de especies reactivas del oxígeno, las cuales pueden generarse directa o indirectamente mediante reacciones fotoquímicas.

A nivel intracelular existen cromóforos tales como el ácido urocánico, porfirinas, carotenoides, esteroides, NADPH y flavinas. Estas moléculas actúan como fotosensibilizadores celulares, absorbiendo la radiación UV, lo que provoca una excitación del fotosensibilizador que puede reaccionar con el O₂, transformándolo en distintas especies reactivas del oxígeno. Entre las especies reactivas del oxígeno generadas en este proceso se distinguen el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singlete. Estas sustancias reaccionan con lípidos (produciendo daño en membrana celular), aminoácidos y ADN, por lo que son responsables de la inducción de fotoenvejecimiento y cáncer cutáneo (32):

- Daño en membrana celular. La fotooxidación de los lípidos de membrana es uno de los principales factores determinantes del daño inducido por radiación ultravioleta.

La peroxidación lipídica puede alterar la fluidez de las membranas celulares. (45)

- Daño en proteínas. La radiación ultravioleta tiene la capacidad de inducir transformaciones químicas en aminoácidos, lo que afecta a los enlaces químicos presentes entre ellos, alterando la estructura de las moléculas que los contienen.

En el año 2006, Hakala y colaboradores describieron que la absorción de la radiación ultravioleta B por aminoácidos cíclicos inducía la oxidación de los mismos, alterando su conformación tridimensional y la funcionalidad de las proteínas. Con todo ello, estos cambios estructurales pueden tener un impacto significativo en la biología celular en caso de que los mecanismos de reparación (dependientes de la capacidad de síntesis y de la reposición proteica) sean superados por el efecto deletéreo de la radiación ultravioleta B. (46)

- Daño en ADN. El ADN es un cromóforo sensible a la radiación ultravioleta B, puesto que UVB es capaz de producir transformaciones en las bases nitrogenadas que integran los nucleótidos, alterando de forma directa los enlaces químicos existentes entre ellas.

Esta transformación inducida por la radiación ultravioleta afecta fundamentalmente a las bases de timina adyacentes, formando estructuras cíclicas denominadas dímeros de ciclobutano de pirimidina. También se han descrito que la radiación ultravioleta induce la formación de otras estructuras distintas denominadas dímeros de pirimidina pirimidona (entre bases de timina y citosina adyacentes) o dímeros de uracilo en el ARN (47). Estos dímeros producen una alteración en la transcripción genética y en la duplicación del ADN y ARN, ya que la ADN polimerasa y la ARN polimerasa no pueden leer las hebras como consecuencia de la presencia de estos productos fotoinducidos.

Los peróxidos e hidroperóxidos generados por radiación ultravioleta pueden interaccionar con cualquiera de las bases nucleotídicas, frecuentemente con la guanina, produciendo el producto 8-oxo-desoxiguanosina. Esta base modificada cuando se encuentra presente en el ADN induce a errores en la incorporación de bases nucleotídicas durante la replicación por la enzima ADN polimerasa, permitiendo el establecimiento de puentes de hidrógeno entre bases nucleotídicas no complementarias. (48)

Se han descrito dos mecanismos de reparación del daño producido en el ADN por la radiación ultravioleta. El primero de ellos es la fotoreactivación, en el cual la ADN-Fotoliasa interacciona con el cofactor FAD reconociendo las áreas dañadas restaurando el ADN. El segundo mecanismo es la reparación del ADN por escisión de bases o nucleótidos. (49)

En la práctica diaria en el laboratorio de Citómica, el daño inducido por la radiación ultravioleta tipo C sobre el ADN o ARN de distintos microorganismos es utilizado en las campanas de cultivo celular para mantener la esterilidad en el interior de las mismas.

A.4.2. Efecto patológico de la radiación UV en la piel. Fotoenvejecimiento

El proceso de envejecimiento tisular implica un deterioro fisiológico y funcional que progresa a lo largo la vida de un organismo. En este proceso, la homeostasis puede interrumpirse, aumentando la susceptibilidad a la enfermedad o incluso la muerte. (50)

El envejecimiento de la piel depende de factores tanto intrínsecos como de factores ambientales extrínsecos (figura 12).

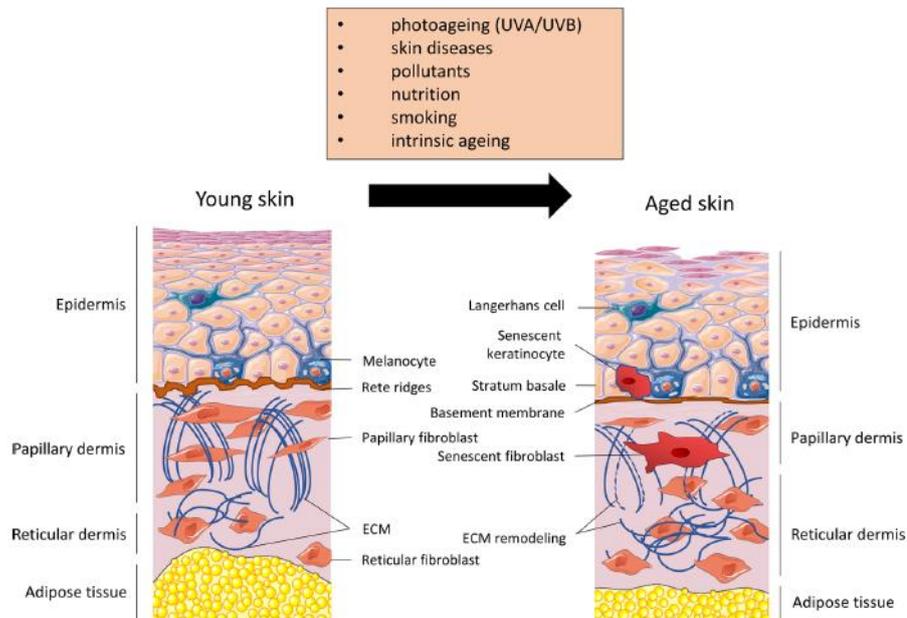


Figura 12. Senescencia celular y envejecimiento de la piel. Factores intrínsecos y extrínsecos determinantes y cambios histológicos observados con el envejecimiento de la piel. (51)

Los factores ambientales del envejecimiento de la piel se pueden clasificar en radiación solar (radiación ultravioleta, luz visible e infrarroja), contaminación del aire, humo de tabaco, nutrición y productos cosméticos entre otros. (52)

Entre los factores extrínsecos, la radiación UV es uno de los principales aceleradores del envejecimiento de la piel, a través de un proceso denominado fotoenvejecimiento. Mientras que los rayos UVC son filtrados por la capa de ozono, las radiaciones UVB y UVA son las principales longitudes de onda responsables del fotoenvejecimiento. La piel está expuesta a la radiación UV solar que comprende aproximadamente un 5 % de UVB y un 95 % de UVA, pero se espera que el porcentaje de exposición a los rayos UVB aumente con el daño en la capa de ozono. La radiación UVB en general induce daño en el ADN (lo que resulta en la aparición de tumores cutáneos), un exceso de producción de melanina y quemaduras solares a dosis altas. Los rayos UVA causan poco daño en el ADN pero generan un estrés oxidativo significativo, que media el daño oxidativo en el ADN y otras moléculas. (53–55)

En los humanos, el fotoenvejecimiento se superpone al envejecimiento intrínseco. Sin embargo, clínicamente, la diferencia entre el envejecimiento intrínseco y el fotoenvejecimiento se puede evaluar comparando las características de las áreas de piel

fotoexpuesta (cara, escote y dorso de antebrazos) con áreas no expuestas (glúteos). A nivel microscópico, mientras que la pérdida de matriz extracelular (MEC) es una característica clásica de la piel intrínsecamente envejecida, la piel fotoenvejecida contiene abundantes fibras de elastina y colágeno, que se encuentran fragmentadas y desorganizadas. (56,57)

A.4.2.1. Fotoenvejecimiento. Cambios epidérmicos

Los queratinocitos proliferan y se diferencian lentamente migrando hacia la superficie reemplazando células viejas. Durante el proceso de diferenciación terminal, los queratinocitos se vuelven más aplanados e impermeables al agua.

La envoltura cornificada de la epidermis en sí misma tiene capacidades antioxidantes basadas en las proteínas pequeñas ricas en prolina (SPRR) que neutralizan los radicales libres formando enlaces disulfuro. La importancia del sobrecornificado como barrera antioxidante de radiación UV destaca por el hecho de que los rayos UV pueden agotar completamente los antioxidantes del estrato córneo, y en esta circunstancia solo las proteínas SPRR restantes podrían ejercer sus propiedades antioxidantes y proteger las células epidérmicas. Con el envejecimiento celular, la pérdida de loricrina en los queratinocitos se compensa con el aumento de los niveles de SPRR. (58)

Los cambios en el grosor de la epidermis con la edad son variados, pero la mayoría de casos se observa un mantenimiento o disminución del espesor (59,60). No obstante, en un trabajo con piel animal, la piel fotoenvejecida aparecía hipertrófica, atrófica o inalterada, e histológicamente, el estrato córneo mostró hiperqueratosis. Clínicamente se observan lentigos seniles, queratosis actínicas o carcinomas espinocelulares. (53)

A.4.2.1. Fotoenvejecimiento. Cambios dérmicos

Los fibroblastos producen y secretan proteínas de la matriz extracelular. El colágeno es una proteína de la matriz extracelular esencial que se encuentra en la dermis, siendo el colágeno tipo I y tipo III particularmente abundantes. Otros componentes dérmicos de la matriz extracelular (MEC) incluyen las fibras de elastina, proteoglicanos y el ácido hialurónico que proporciona fuerza, soporte y flexibilidad.

Estructuralmente, la dermis en humanos y ratones se vuelve más delgada y pierde elasticidad con la edad (60,61). La elastosis solar es un hallazgo distintivo del fotoenvejecimiento humano, caracterizado por una acumulación de fibras de elastina degradadas en la dermis superior. Aunque esta alteración no se observa típicamente en el envejecimiento intrínseco de la piel, también se detecta una red anormal de elastina con la edad en la piel protegida del sol. (62)

En piel fotoenvejecida se ha objetivado deposición masiva de otros componentes de la MEC, tales como glicosaminoglicanos y colágeno en el intersticio. El número de fibroblastos dérmicos y su capacidad para producir MEC son menores en la piel intrínsecamente envejecida. El colágeno fibrilar se degrada notablemente con la edad, así como por radiación UV. Clínicamente se observan arrugas. (63)

Las metaloproteinasas de matriz (MMP), son una clase de enzimas proteolíticas, consideradas la principal causa fisiológica de la degradación de las proteínas de la MEC

dérmica. La expresión y las actividades de las MMP aumenta en la piel envejecida y los fibroblastos senescentes, mientras que la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMPs) se reduce. La radiación UVB también contribuye a la activación de las MMP.

Los fibroblastos dérmicos superiores envejecidos adquieren gradualmente las características de la dermis inferior, con reducción en la síntesis de proteínas de la MEC y rasgos adipogénicos.

Se ha observado que las posiciones de los fibroblastos se mantienen estables con el tiempo, pero la densidad de fibroblastos disminuye. La membrana celular de los mismos se extiende para llenar el espacio de los fibroblastos vecinos perdidos en la piel envejecida. Estos hallazgos proporcionan un mecanismo de respuesta frente a la pérdida de celularidad en la dermis envejecida. (64)

En cuanto a la etiopatogenia, la radiación UV, especialmente los rayos UVA y UVB, da como resultado la producción de ROS y la activación de los receptores de la superficie celular, lo que conduce a la activación de la MAP-quinasa p38, JNK (quinasa amino terminal c-Jun) y ERK (quinasa regulada por señal extracelular) y el reclutamiento de c-Fos y c-Jun. Esto conduce a la expresión de la proteína activadora del factor de transcripción 1 (AP-1) que resulta en la expresión de MMP1, 3 y 9 en fibroblastos y queratinocitos. AP-1 también inhibe el TGF- β , que es responsable de la producción de colágeno. La expresión de MMP mediada por AP-1 conduce a una mayor degradación de la MEC. Este proceso se ve reforzado por la producción de ROS que también resulta en la activación de las MAP quinastas y además conduce a la expresión de NF- κ B. (figura 13). (65)

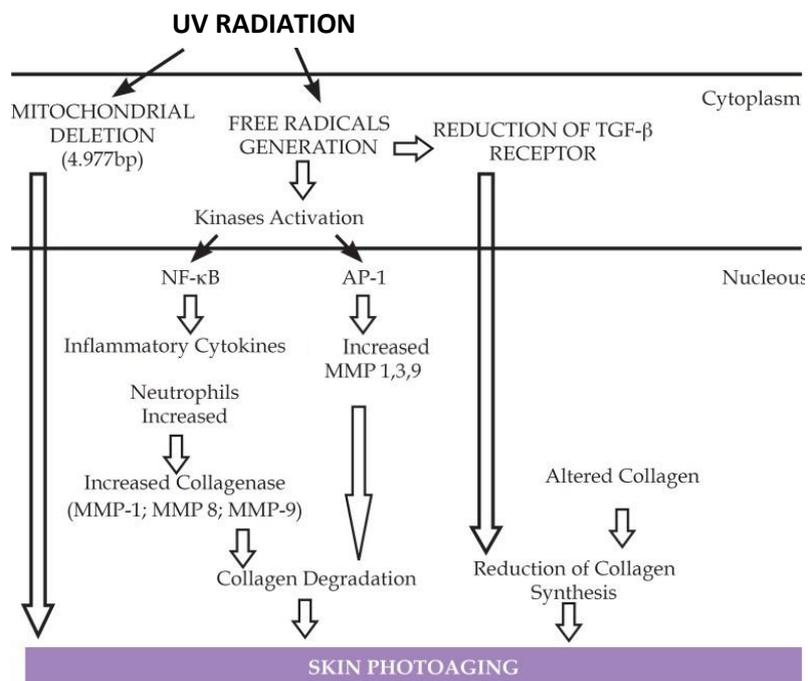


Figura 13. Ilustración de la fisiopatogenia del fotoenvejecimiento. Extraído y modificado de (66)

A.5. Resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) es un estilbenoide, perteneciente al grupo de las fitoalexinas, identificado por primera vez en 1939.

La biosíntesis del resveratrol en las plantas puede comenzar con la acetil-CoA, tirosina o fenilalanina en respuesta a factores estresantes externos (agresiones de insectos, patógenos microbianos, animales o condiciones climáticas adversas) que estimulan a la enzima estilbeno sintasa (figura 14). El resveratrol existe en las plantas como isómeros *trans* y *cis*. El transresveratrol puede ser isomerizado a la forma *cis* tras irradiación UV. (67)

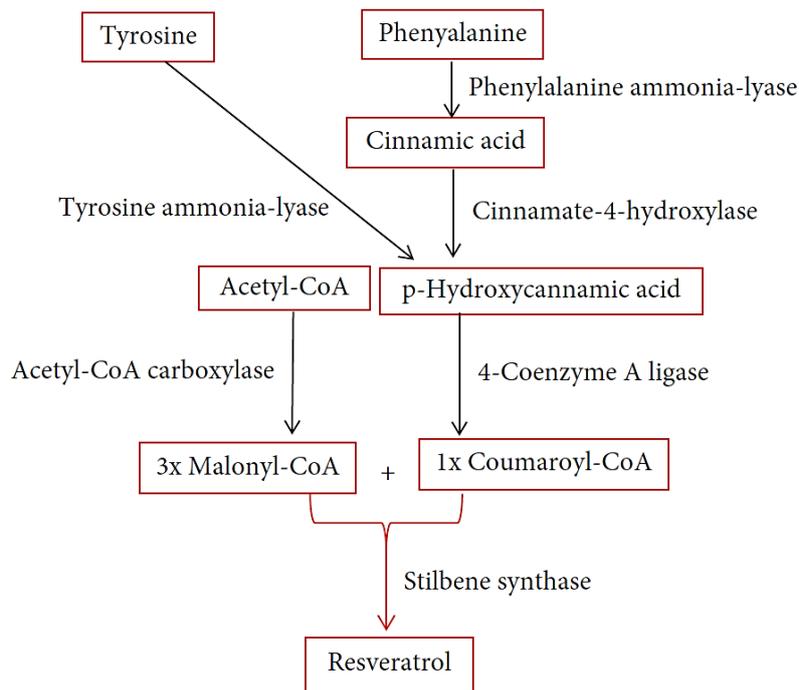


Figura 14. Biosíntesis de resveratrol en las plantas(67)

La estilbeno sintasa es una enzima clave en la síntesis de resveratrol en las plantas. Las hojas contienen las concentraciones más altas de esta enzima, mientras que las puntas de los brotes tienen concentraciones relativamente bajas.

Entre las plantas, el resveratrol es más abundante en la piel de las uvas rojas. Algunos otros alimentos y bebidas derivadas de la uva también contienen cantidades significativas de resveratrol. Además, parece que la edad de la bebida determina su contenido en resveratrol. Por ejemplo, vino champán de 15 años solo contiene 1 mg/L de trans-resveratrol mientras que el mismo vino, envejecido durante 8 años, contiene 45 mg/L de trans-resveratrol. (67)

La presencia de resveratrol también se ha detectado en otras plantas como el cacao, cacahuets, pistachos y bayas. (68)

A.5.1. Metabolismo

A.5.1.1. Solubilidad

El resveratrol es poco soluble en agua (<0,05 mg/ml), motivo que afecta a su absorción. Para incrementar dicha solubilidad existen distintas opciones: a) Utilizar etanol o solventes orgánicos como el DMSO, aunque no es aplicable a su uso en humanos, b) Utilizar vectores para formar complejos solubles con el resveratrol, como puede ser el uso de ciclodextrinas, c) Esterificación de grupos hidroxilo con moléculas alifáticas para incrementar su absorción intestinal y permeabilidad celular sin pérdida de actividad. (69)

A.5.1.2. Absorción y transporte

El resveratrol presente en la luz intestinal puede absorberse por difusión pasiva o formando complejos con transportadores de membranas, a través de los cuales pasa al torrente sanguíneo.

Una vez en la sangre, el resveratrol puede presentarse de 3 formas distintas: como glucurónido, sulfatado y libre, pudiendo ser esta última forma transportada unida a la albúmina y a lipoproteínas como la LDL (lipoproteínas de baja densidad). Estos complejos, a su vez, pueden ser disociados en aquellas membranas celulares que dispongan en su superficie de receptores para la albúmina y el LDL, dejando libre el resveratrol y permitiendo que éste penetre en las células.

Los ácidos grasos permiten un ambiente hidrófobo que favorece la unión del resveratrol. Son utilizados como *carriers* por su alta afinidad por el hígado y por su eficiente captación celular, resultante de interacciones específicas con transportadores transmembrana. (69)

A.5.1.3. Receptores celulares

La absorción del resveratrol en hepatocitos se produce principalmente mediante la difusión pasiva, y de forma menos frecuente por la unión a receptores de membrana celular.

El resveratrol puede unirse a receptores de estradiol alfa y beta (ER-alfa y ER-beta) con afinidades parecidas, pero esta interacción es 7.000 veces menos potente que la correspondiente al estradiol. (69)

A.5.1.4. Metabolitos del resveratrol

Los metabolitos del resveratrol presentes en la sangre pueden ser sometidos a la fase II del metabolismo con las conversiones que se producen en el hígado. Por otro lado, el resveratrol es capaz de inducir su propio metabolismo, incrementando la actividad de las enzimas hepáticas detoxificantes de la fase II.

El resveratrol posee una alta actividad metabólica que conduce a la producción de sulfatos, glucurónidos y hasta 5 metabolitos distintos presentes en la orina: monosulfato de resveratrol, 2 formas isoméricas de monoglucurónido de resveratrol, dihidroresveratrol monosulfato y dihidroresveratrol monoglucurónido. (69)

A.5.1.5. Biodisponibilidad

El resveratrol posee una baja biodisponibilidad, pero presenta eficacia *in vivo*, lo cual se explica por: a) la conversión de los sulfatos y glucurónidos de nuevo a resveratrol en órganos diana como el hígado, b) la recirculación enterohepática de los metabolitos del resveratrol, c) las actividades de sus metabolitos. La menor biodisponibilidad de la forma *cis* es explicable debido a que la glucuronidación de esta forma es más rápida (5-10 veces) que la de la forma *trans*.

La presencia de grupos hidroxilo permite a los polifenoles asociarse con proteínas e hidratos de carbono, reduciendo su biodisponibilidad. Los complejos formados entre estos macronutrientes y polifenoles que resulten ser solubles, tendrán la capacidad de ser absorbidos en el intestino delgado, mientras que los complejos insolubles serán eliminados con las heces. (69)

A.5.2. Tratamiento dermatológico

Se han demostrado los beneficios del resveratrol para la salud de múltiples sistemas o en el control de patologías, tales como el sistema cardiovascular, la diabetes, el sistema inmunitario y el sistema nervioso (70–75). En los últimos años se ha comenzado a describir los beneficios del resveratrol para la salud de la piel y tratamiento de distintas dermatosis. (67,76–78)

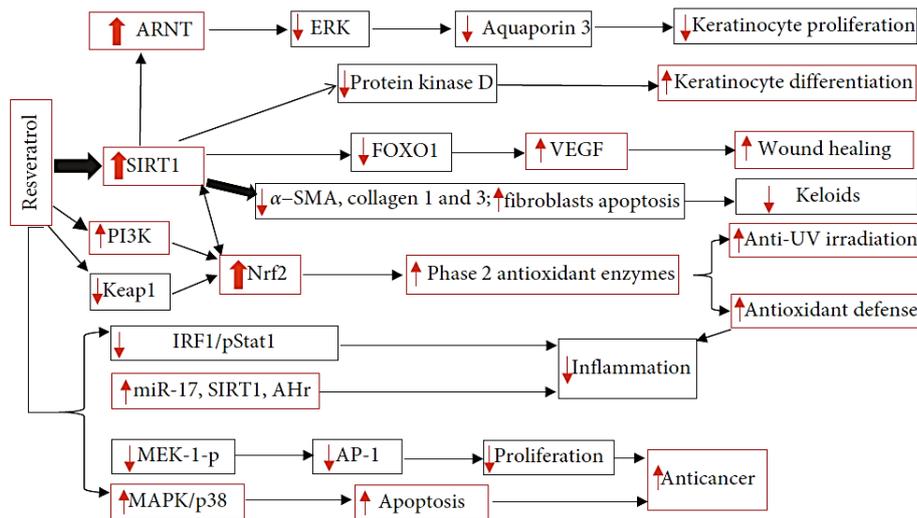


Figura 15. Esquema de los mecanismos por los cuales el resveratrol presenta propiedades terapéuticas en dermatología. (67)

La evidencia de la utilidad del resveratrol para múltiples funciones cutáneas ha sido demostrado, pero los mecanismos subyacentes por lo que los actúa siguen sin estar claros. Se ha descrito que los efectos terapéuticos del resveratrol podrían mediarse a través de múltiples mecanismos como la regulación al alza de Nrf2, activación de SIRT1 y la vía de señalización MAPK, dependiendo de qué función se regula (figura 15). (67)

A.5.2.1. Estrés oxidativo

En los últimos años se ha descrito una serie de factores, incluyendo el estrés psicológico, el humo de tabaco, la contaminación del aire y la radiación UV, que pueden causar estrés oxidativo, contribuyendo al desarrollo de dermatosis o envejecimiento cutáneo.

Se han estudiado la utilización de sustancias con propiedades antioxidantes para prevenir y tratar ciertas dermatosis. Entre ellas, los beneficios de resveratrol se han analizado tanto *in vitro* (tabla III y IV) e *in vivo* (tabla V y VI). Las enzimas de fase II son responsables de la antioxidación en los organismos vivos. Entre ellas están incluidas: GSH-Px, quinona deshidrogenasa (NQO), GST, SOD y GSH. (67)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Krajka-Kuźniak et al. (2014) (79)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resv 20 μ M o 60 μ M durante 24h	↑Actividad GST	↑Expresión de NRF2 ↑Activación de NRF2
Soeur et al. (2015) (80)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resv 10 μ M o 20 μ M durante 16h	↑mRNA de GSH-Px y NQO1 ↑Síntesis de GSH	↑Activación de NRF2
Bastianetto et al. (2010) (81)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con nitroprusiato sódico (0,3-3mM) y resveratrol 1-30 μ M durante 24h	↑Viabilidad celular ↓Actividad de caspasas 3 y 9	↓IL-8, NOS3 y ARNm de NADPH deshidrogenasa ↑mRNA de GSH-Px
Vitale et al. (2013) (82)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Pretratamiento con resveratrol 25 μ M o 100 μ M 24 horas. Adición de H ₂ O ₂ (200-800 μ M) e incubación 48h.	↓ROS	NE
Berselli et al. (2010) (83)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Pretratamiento con resveratrol 140 μ M durante 1 hora. Adición de H ₂ O ₂ (500 μ M) e incubación 2-16h.	↓Daño en ADN ↓Expresión de HSP70	NE
Fasano et al. (2014) (84)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Pretratamiento con resveratrol 10 μ M durante 24 horas. Adición de H ₂ O ₂ (100 μ M) e incubación 30 min.	↓ROS ↓MDA	NE
Sticozzi et al. (2014) (85)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Pretratamiento con resveratrol 0,5-10 μ M durante 24 horas. Recambio de medio. Exposición al humo de tabaco durante 50 min.	↑Receptor scavenger clase B tipo 1 ↓Aductos de 4-hidroxinonal	NE
Sticozzi et al. (2014) (86)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Pretratamiento con resveratrol 10 μ M durante 24 horas. Recambio de medio. Exposición al humo de tabaco durante 50 min.	↓ROS ↓Grupos carbonilo	↑ARNm de metionina sulfóxido reductasa A ↓TRPA1

Herbert et al. (2012) (87)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Pretratamiento con resveratrol 0,5 μ M durante 3 horas. Adición de arsénico (0,1-20 μ M) e incubación durante 20 horas	↓Actividad metabólica inducida por arsénico y expresión de ADN polimerasa beta ↑Reducción inducida por arsénico en la fosforilación de Y419 y proteína Src	NE
----------------------------	------------------------------------	--	---	----

Tabla III. Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Soeur et al. (2015) (80)	Piel humana reconstruida (tópica)	Pretratamiento con resveratrol 20 o 100 μ M durante 16 horas. Recambio de medio. Exposición a hidroperóxido de cumeno arsénico (800 μ M) durante 8h.	↑Expresión de GSH ↓Apoptosis	↑Activación de NRF2

Tabla IV. Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos *in vitro* con piel humana reconstruida. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Krajka-Kuźniak et al. (2014) (79)	Ratones (tópica)	Tratamiento tópico con resveratrol 16 μ M durante 4 horas. Biopsia cutánea.	↑Actividad GST	↑Activación de NRF2
Szaefer et al. (2004) (88)	Ratones (tópica)	Tratamiento tópico con resveratrol 8 o 16 μ M durante 24 horas. Biopsia cutánea.	↑Actividad de glucuronosiltransferasa ↑Actividad de NADPH: quinona oxidoreductasa	NE

Tabla V. Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos *in vivo* con ratones. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Alonso et al. (2017) (89)	Humanos (tópica)	Estudio de estrato córneo 24 horas después de una sola aplicación de resveratrol a una dosis de 537 μ g/cm ²	↓Producción de radicales libres	NE

Tabla VI. Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos *in vivo* con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

A.5.2.2. Cáncer cutáneo

Estudios tanto *in vitro* (tabla VII) como *in vivo* (tabla VIII) han demostrado que el resveratrol sobre células tumorales inhibe la proliferación y estimula la apoptosis a través de varios mecanismos. (67)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Fuggetta et al. (2004) (90)	Melanoma línea celular (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resveratrol 20–40 µg/ml hasta 5 días	↓Apoptosis y necrosis ↓Proliferación	↑Células detenidas en fase S ↓Células en fase G1 y G2/M
Zhao et al (2020) (91)	Melanoma A375 y SK-MEL-28 (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resveratrol 0–160 µM durante 48h	↑Apoptosis	↑miR-492 ↓CD147
Zhang et al. (2018) (92)	Carcinoma Espinocelular A431 (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resveratrol 20–100 mg/L durante 24h y/o terapia fotodinámica con ALA	↑Apoptosis ↓Proliferación ↑Efecto de terapia fotodinámica	↑Activación de la vía MAPK
Kim et al. (2006) (93)	Carcinoma Espinocelular A431 (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resveratrol 20, 50 y 100 µM hasta 3 días	↓Síntesis de ADN ↓Proliferación ↓Células en G2/M ↓Proteínas reguladoras del ciclo celular	↓Actividad de unión al ADN de AP-1 ↓Vía de señalización ERK1/2
Tomikoshi et al. (2016) (94)	Carcinoma Espinocelular HSC2 (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resveratrol y benzoxazinotropona a varias concentraciones durante 2 días	↓Proliferación sinérgica	NE
Tyagi et al. (2011) (95)	Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resveratrol 15 y 50 µM hasta 3 días	↑Apoptosis ↓Proliferación	↑Fosforilación H2AX ser-139
Nihal et al. (2022) (96)	Células Sezary (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con resveratrol 5 µM hasta 3 días	↑Apoptosis	Antioxidante ↓Acetilación postraduccional de STAT3

Tabla VII. Efecto del resveratrol sobre el cáncer cutáneo. NE: No estudiado. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Tyagi et al. (2011) (95)	Ratones con Carcinoma Espinocelular (oral)	Ratones alimentados con resveratrol (10 o 50 mg/kg/día) durante 30 días	↓Peso y volumen del tumor por ratón	↑Fosforilación H2AX ser-139

Tabla VIII. Efecto del resveratrol sobre el cáncer cutáneo. Modelos *in vivo* con ratones. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

En ratones con melanoma tratados con resveratrol se observa una disminución del volumen tumoral tumor, secundario a un efecto inhibitor de la viabilidad de las células de melanoma de forma dosis dependiente (97,98).

En pacientes con cáncer cutáneo, la combinación en gel de 5-fluorurailo con resveratrol ha mostrado efectos beneficiosos antitumorales debido a los efectos pro apoptóticos y anti proliferativos sobre las células tumorales (99) .

A.5.2.3. Fotoprotección

Mientras que las dosis suberitematógenas de radiación UVB mejoran la función epidérmica, incluyendo efectos beneficiosos en la permeabilidad epidérmica, estimulación de la síntesis de lípidos epidérmicos, diferenciación de queratinocitos y defensa antimicrobiana, la exposición excesiva a la radiación ultravioleta puede dañar la piel, causando quemaduras solares, cáncer de piel y fotoenvejecimiento. Mediante estudios *in vitro* y estudios *in vivo* se ha demostrado que el resveratrol protege la piel de la radiación UV. (67)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Shi et al. (2020) (100)	Espectroscopia de absorción (<i>in vitro</i>)	Estudio del espectro de absorción UVA y UVB del resveratrol en estado estacionario	Absorción de UVA y UVB	Trans-cis fotoisomerización
Chen et al. (2006) (101)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Inmediatamente después de la irradiación con UVA (5 J/cm ²), las células se trataron con resveratrol 0,01–0,1 mM durante 24 horas	↑Viabilidad celular ↓Malondialdehído	↑Expresión de SOD y GSH-Px
Liu et al. (2011) (102)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Antes o después de irradiación con UVA (2.796 J/cm ²), las células fueron tratadas con 2,5 y 5,0 mg/l de resveratrol, respectivamente	↑Viabilidad celular ↑SOD y GST	↑Translocación nuclear de NRF2 ↓KEAP1
Cao et al. (2009) (103)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con resveratrol 10 μM durante 1 hora, seguido de irradiación UVB (30 mJ/cm ²)	↑Viabilidad celular ↓Apoptosis	↑Activación de SIRT1
Juškaitė et al. (2017) (104)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con resveratrol 2% durante 2 h, seguido de irradiación UVB (5–100 mJ/cm ²)	↑Viabilidad celular	NE
Adhami et al. (2003) (105)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con resveratrol 5–25 μM durante 24 horas, seguido de irradiación con UVB (40 mJ/cm ²)	↓Contenido y actividad de NF-κB	↑IκBα ↓IKKα
Li et al. (2017) (106)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con pterostilbeno (análogo del resveratrol) 5–10 μM durante 24 horas, seguido de irradiación con UVB (30 mJ/cm ²).	↑Viabilidad celular ↓ROS ↓Daño al ADN	↑Nrf2
Potapovich et al. (2011) (107)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con 50 μM de resveratrol 30 min antes de la irradiación con 1 J/cm ² UVA + 0,1 J/cm ² UVB	↓ARNm de IL-6, MCP-1 y TNF-α	↑ARH

Vitale et al. (2013) (82)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con resveratrol 25 o 100 μ M durante 2 o 24 horas, seguido de irradiación con UVB (10, 20, 40 o 100 mJ/cm ²)	↓ROS ↓Autofagia	↑Activación de ERK ↑Ratio Bax/Bcl2
Potapovich et al. (2013) (108)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células primero irradiadas con 1 J/cm ² UVA + 0,1 J/cm ² UVB, seguido de tratamiento con resveratrol 10 μ M.	↓CYP1A1, CYP1B1, IL-1 β , IL-6 y ARNm de COX2	↓Peróxido
Cui et al. (2022) (109)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 0-100 μ M durante 24 horas. Posteriormente irradiación con UVB 50 mJ/cm ²	↓Inflamación ↓ROS	↓IL-6, TNF- α ↑SOD y GSSH
Zhou et al. (2018) (110)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 0-10 μ M durante 24 horas. Posteriormente irradiación con UVB 30 mJ/cm ² . Incubación y lectura a las 72 horas post irradiación.	↓Apoptosis	↑HSP27
Subedi et al. (2017) (111)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Inmediatamente después de la radiación UVB (144 mJ/cm ²), los fibroblastos fueron tratados con resveratrol 10 o 100 μ g/mL durante 24–72 horas	↑Viabilidad celular ↓ROS ↓MMP1, p53, Bax, TNF- α , IL-6, iNOS y COX2 ↑PIP1 y TGF- β	NE
Davies et al. (2020) (112)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Pretratamiento con resveratrol nanoencapsulado 200 μ g/mL durante 24 horas. Posteriormente irradiación con UVA	↓ROS	NE

Tabla IX. Efecto fotoprotector del resveratrol. NE: No estudiado. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Subedi et al. (2017) (111)	Piel humana reconstruida (tópica)	La piel humana reconstruida fue tratada con resveratrol 1% de durante 24 horas, seguido de irradiación con UVB (100 mJ/cm ²)	↓MMP1 ↑PIP1, procolágeno tipo I y fibras de colágeno	NE

Tabla X. Efecto fotoprotector del resveratrol. Modelos *in vitro* con piel humana reconstruida. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Afaq et al. (2003) (113)	Ratones (tópica)	Los ratones fueron tratados tópicamente con resveratrol 25 μ M en 200 μ l de acetona 30 min antes de la irradiación con 180 mJ/cm ² UVB	↓Peso y edema cutáneo ↓Infiltrado inflamatorio ↓Actividad ODC y actividad COX2 ↓Peroxidación lipídica	NE
Aziz et al. (2005) (114)	Ratones (tópica)	Los ratones fueron tratados tópicamente con resveratrol 10 μ M en 200 μ l de acetona 30 min antes de la irradiación con 180 mJ/cm ² UVB	↑Proliferación celular ↓Expresión de COX2 y ODC	↓Survivina
Sirerol et al (2015) (115)	Ratones (tópica)	Los ratones fueron tratados tópicamente con resveratrol 0,48%, 20 min antes de la irradiación con 360 mJ/cm ² UVB	↓Edema cutáneo en ratones tratados con resveratrol ya sea antes o después irradiación UVB ↓Grosor epidérmico en ratones tratados con resveratrol antes de UVB irradiación	↑NRF2
Sirerol et al (2015) (115)	Ratones (tópica)	Los ratones fueron tratados tópicamente con resveratrol 0,48%, 20 min antes de la irradiación con 180 mJ/cm ² UVB, 3 irradiaciones/ semana durante 30 semanas	↓Peroxidación de lípidos, ADN y proteínas ↑Actividad y expresión de enzimas antioxidantes	↑NRF2

Tabla XI. Efecto fotoprotector del resveratrol. Modelos *in vivo* con ratones. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

La vehiculización del resveratrol mediante microvesículas lipídicas favorece una mayor fotoestabilidad del reactivo minimizando la fotodegradación del mismo tras la irradiación. Estas propiedades beneficiosas de la vehiculización del resveratrol tópico en micropartículas lipídicas también se ha observado en el tratamiento de úlceras crónicas para favorecer la permeación cutánea del resveratrol. (116)

El efecto fotoprotector preventivo del resveratrol en humanos ha sido evaluado mediante trabajos *in vivo* en voluntarios que recibieron uva en polvo por vía oral (75 g diarios) durante 14 días, objetivándose una reducción en la Dosis Eritematosa Mínima (DEM) y en los marcadores de daño al ADN, inflamación y apoptosis mediados por radiación UV. (117,118)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Wu et al. (2013) (119)	Humanos (tópica)	<p>Ensayo clínico en 15 voluntarias entre 45-58 años.</p> <p>Irradiación durante 4 días consecutivos con radiación UV (1,5 veces la Dosis Eritematosa Mínima).</p> <p>Inmediatamente después de cada irradiación se aplicó resveratrato 1% sobre la piel irradiada (resveratrol trifosfato).</p> <p>Se tomaron fotografías y biopsia de las zonas estudiadas 24 horas después de la última irradiación.</p>	<p>↓Eritema</p> <p>↓Quemadura solar</p> <p>↓Síntesis de melanina</p>	NE

Tabla XII. Efecto fotoprotector del resveratrol. Modelos in vivo con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

A.5.2.4. Dermatitis inflamatorias e infecciosas

Las dermatosis inflamatorias constituyen la mayor parte de patología en consultas de dermatología. Debido a los efectos secundarios de los inmunomoduladores, tales como los glucocorticoides y el tacrólimus, son necesarias alternativas seguras y eficaces.

El efecto antiinflamatorio del resveratrol se ha demostrado en varios en modelos *in vivo* (tabla XIII y XIV) e *in vitro* (tabla XV y XVI), pero los mecanismos de acción del resveratrol como antiinflamatorio a menudo no está establecido, dependiendo del modelo empleado en los estudios.

El resveratrol puede inhibir la inflamación cutánea a través de una variedad de mecanismos, incluida la inhibición de NF- κ B, MAPK/p38, fosfolipasa Cc y p-mTOR, incremento de miR-17 y activación de SIRT1. (67)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Fasano et al. (2014) (84)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células tratadas con 20 ng/ml de TNF- α durante 6 h 10 μ M, seguido de incubación con resveratrol durante 16 horas adicionales	↓IL-6 y MCP-1	↓Fosforilación de I κ B α
Wang et al. (2018) (120)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células tratadas con 7,5 μ g/mL de lipopolisacárido durante 12 horas, seguido de incubación con 10–50 μ M de resveratrol durante 12 horas adicionales	↑Proliferación ↑Apoptosis ↓IL-6, IL-8 y TNF- α	↑Expresión de miR-17
Potapovich et al. (2011) (107)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células tratadas con 50 μ M de resveratrol 1 hora antes de la adición de 2,5 μ g/mL de lipopolisacárido	↓IL-6, IL-8, MCP-1 y COX2	↓Señalización de vía EGFR-ERK
Carbone et al. (2018) (121)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con 25 y 50 μ M de resveratrol durante 30 min, seguido de incubación con 25 μ g/ml de cetuximab o gefitinib 2 μ M durante 3 horas adicionales	↓CCL2 y CXCL10	↓Factor regulador de interferón 1 y STAT1 fosforilado
Kang et al. (2019) (122)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con 50 μ M De resveratrol durante 1 hora, seguido de incubación con 10 ng/ml de IFN-c y TNF- α 24 h	↓IL-6	NE
Ravagnan et al. (2013) (123)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células pretratadas con 44 μ M de resveratrol durante 24 horas, seguido de exposición al estrés por calor durante 40 min	↓IL-6, IL-8 y TNF- α	NE

Han et al. (2015) (124)	Mastocitos (<i>in vitro</i>)	Se pretrataron mastocitos RBL-2H3 con 1–25 μ M de resveratrol durante 2 horas, seguido de exposición a 200 ng/ml dinitrofenil-albúmina sérica humana	↓IL-3, IL-4, IL-13 y TNF- α ↓Expresión del receptor Fc épsilon I	↓P38-MAPK, ERK1/2, JNK
-------------------------	--------------------------------	--	--	------------------------

Tabla XIII. Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Kang et al. (2019) (122)	Piel humana reconstruída (tópica)	La piel 3D se trató con 10 ng/ml de IFN-c y TNF- α dos veces por semana, seguido de tratamiento con resveratrol al 1% tres veces a la semana durante 2 semanas	↓IL-6	NE

Tabla XIV. Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos *in vitro* con piel humana reconstruída. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Carbone et al. (2013) (121)	Ratones (tópica)	Se trataron orejas de ratón BALB/c tópicamente con 10 mM de resveratrol 2 h antes de aplicar DNFB	↓ Grosor oreja ↓Células positivas para CD3 ↓ICAM-1, CCL2 y CXCL10	↓Factor regulador de interferón 1 y STAT1 fosforilado
Kang et al. (2019) (122)	Ratones (tópica)	Después de la inducción de dermatitis de contacto alérgica, los ratones NC/Nga fueron tratados tópicamente con 2,5% de resveratrol o extracto de arroz enriquecido con resveratrol dos veces por semana durante 5 semanas	↓Grosor epidérmico ↓Score de dermatitis ↓IgE sérica ↓TEWL ↑Hidratación de la piel	NE
Han et al. (2015) (124)	Ratones (oral)	Los ratones BALB/c fueron tratados oralmente con resveratrol a una dosis de 10 mg/kg 1 h antes de administración intravenosa de 200 μ g de DNP-albúmina	↓IL-4 y TNF- α ↓Células positivas para CD11b	↓Activación de Tyk2-STAT1

Caglayan et al. (2016) (125)	Ratones (oral)	Inducción de lesiones similares a dermatitis atópica mediante aplicaciones tópicas de DNFB en el dorso de los ratones BALB/c durante 5 semanas, seguido de administración oral de resveratrol a una dosis diaria de 30 mg/kg peso corporal durante 1 semana	↓Score de dermatitis ↓Grosor epidérmico ↓ARNm de citoquinas inflamatorias	NE
Karuppagounde et al. (2014) (126)	Ratones (oral)	Inducción de lesiones similares a dermatitis atópica mediante aplicaciones tópicas de <i>dermatophagoides farinae</i> en el dorso de ratones NC/Nga durante 2 semanas, seguido de administración de resveratrol vía oral a diario a dosis de 20 mg/kg durante 2 semanas	↓Score de dermatitis ↓Citoquinas inflamatorias	↓HMGB1
Kjær et al. (2015) (127)	Ratones (oral)	Inducción de lesiones similares a psoriasis mediante aplicaciones tópicas de imiquimod en el dorso de ratones BALB/c. Administración por vía oral de resveratrol a una dosis diaria de 400 mg/kg de peso corporal, durante 7 días.	↓Eritema y descamación ↓Grosor de piel ↓ARNm de citoquinas	NE

Tabla XV. Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos in vivo con ratones. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Fabbrocini et al. (2011) (128)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 20 voluntarios entre 18-23 años. Resveratrol gel 0,01% una vez al día. 60 días de tratamiento	↓Lesiones ↓Grado de severidad ↓Microcomedones No efectos secundarios	NE
Bavetta et al. (2021) (129)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 40 voluntarios oncológicos en tratamiento con EGFRi entre 18-23 años. Polidatina (precursor del resveratrol) crema 0,8% - 1,5% dos veces al día. 6 meses de tratamiento	Prevención y tratamiento de las lesiones papulopustulosas asociadas EGFRi Mejoría de DLQI	↓IL-6, IL-8 y TNF-alfa

Tabla XVI. Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos in vivo con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

En los últimos años, el resveratrol ha sido ampliamente estudiado por sus efectos sobre distintos patógenos humanos. Muchos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana del resveratrol contra una amplia gama de bacterias, virus y hongos (130).

En cuanto al efecto antiviral, se han reportado efectos beneficiosos del tratamiento tópico con resveratrol en piel de ratones con infección activa por Virus Herpes Simple (VHS), objetivándose una mejoría clínica, mediada por una disminución de la replicación viral, tras el tratamiento tópico de las vesículas con resveratrol en comparación con el grupo control (131–133). Además de un efecto inhibitorio en la replicación de los VHS (107) se ha observado el mismo efecto en virus de la influenza (108) y virus de Epstein-Barr (109,110).

Se ha observado también efectos beneficiosos al utilizar el resveratrol como tratamiento en infecciones por los coronavirus MERS-CoV y SARS-CoV-2, prolongando la supervivencia tras la infección por estos virus (134,135).

Otros efectos antibacterianos (136) y anti leishmania (137,138) también han sido descritos.

A.5.2.5. Cicatrización

La cicatrización de heridas cutáneas es un complejo proceso que puede ser acelerado por el resveratrol a través de la estimulación de neovascularización, diferenciación de queratinocitos y actividad antimicrobiana entre otros.

Esta estimulación inducida por el resveratrol en la cicatrización de heridas cutáneas puede atribuirse a la activación de SIRT1 y señalización de AMPK, efecto antioxidante y optimización de la permeabilidad epidérmica. (67)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Pang et al. (2020) (139)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 1-100 $\mu\text{mol/l}$ durante 24-72 horas	↓ Viabilidad celular	↑ Autofagia ↑ Vía miR-4654/Rheb
Kaleci et al. (2020) (140)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Inducción de estrés oxidativo con H_2O_2 . Posteriormente adición de resveratrol 1-100 μM en las células durante un máximo de 48 horas.	Favorece cicatrización	↑ Proliferación ↓ ROS

Tabla XVII. Efecto del resveratrol sobre la cicatrización. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Yaman et al. (2013) (141)	Ratas (oral)	Las ratas fueron alimentadas con resveratrol a una dosis diaria de resveratrol de 0,5 mg/kg 7 días antes de la herida y se continuó durante todo el periodo experimental	↑ Deposición de colágeno ↑ Neovascularización ↑ Maduración de fibroblastos	NE
Zhao et al. (2017) (142)	Ratas (tópica)	Después de la inducción de herida de espesor completo en la piel, tratamiento tópico con 225 μL de resveratrol 50 μM una vez al día durante 17 días	↑ Epitelización ↓ Tamaño de la herida ↑ Deposito de colágeno ↑ Vascularización	↑ Vía AMPK y SIRT1
Berce et al. (2018) (143)	Ratones (tópica)	Inmediatamente después de la herida, aplicación de vendaje que contiene resveratrol 0,04% sobre la herida durante 10 días	↓ Tamaño de la herida ↑ Fibras de colágeno ↓ Inflamación	NE
Lakshmanan et al. (2019) (144)	Ratones (tópica)	Colocación de matriz con un 5% de resveratrol en la herida durante 7 días	↓ Tamaño de la herida	↑ Expresión de tioredoxina-1, hemo oxigenasa-1, y VEGF

Alasmari et al. (2018) (145)	Ratas (oral)	Se aplicó pomada de resveratrol al 0,5% en herida de ratas diabéticas una vez al día durante 21 días	↓Tamaño de la herida	↑Actividad de enzimas antioxidantes
Huang et al. (2019) (146)	Ratones (tópica)	Se aplicó resveratrol 10 µM en herida cutánea de ratones diabéticos y se evaluó la cicatrización de heridas 7 días después	↓Tamaño de la herida ↑Proliferación de células endoteliales	Activación Sirt1
Gokce et al. (2017) (147)	Ratas (tópica)	Catorce días después de la aplicación tópica de resveratrol (0,1 mg/ml) en herida de ratas diabéticas se evaluó la curación	No beneficio	Activación Sirt1

Tabla XVIII. Efecto del resveratrol sobre la cicatrización. Modelos in vivo con roedores. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Mediante apósito biodegradable sintetizado a partir de hialuronato de sodio con resveratrol se ha observado aceleración en la formación de tejido de granulación, facilitando la cicatrización de heridas (143). Utilizando biopolímeros de celulosa con resveratrol se ha descrito efecto favorecedor de la regeneración de la epidermis y reepitelización de heridas en piel de rata (148).

A.5.2.6. Envejecimiento cutáneo

Para la correcta formación del estrato córneo de la piel se requiere proliferación y diferenciación de queratinocitos. Varios estudios han demostrado que el resveratrol inhibe la proliferación de queratinocitos mientras que estimula su diferenciación, resultando en una aceleración de la maduración epidérmica. Entre los mecanismos por los que el resveratrol induce la apoptosis y la inhibición en la proliferación de fibroblastos se incluyen la inhibición del factor inducible por hipoxia tipo 1 (cuya activación estimula la proliferación de fibroblastos mientras que inhibe la apoptosis), regulación a la baja del factor de crecimiento transformante $\beta 1$, miR-17, así como los niveles de expresión de mRNA para colágeno 1 y procolágeno 3. (67)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Holian et al. (2001) (149)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 0,25-100 μM durante 24-72 horas	↑Proliferación	NE
Wu et al. (2014) (150)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 20-40 μM durante 24 horas	↓Proliferación	↑SIRT1
Pastore et al. (2013) (151)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 50 μM durante 12 horas	↓Proliferación	NE
Redondo et al. (2000) (152) Zhang et al. (2018) (92)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 25–100 μM durante 24 horas	↓Proliferación	NE
Elmore et al. (2005) (153)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células tratadas con resveratrol 0,197 μM durante 2 semanas	↓Proliferación	NE
Blander et al. (2009) (154)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 3 μM hasta 3 días post confluencia	↓Diferenciación	↑SIRT1
Arun et al. (2010) (155)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 100 μM durante 24 horas	↓Proliferación ↓Diferenciación	↓Proteína quinasa D

<p>Birar et al. (2020) (156)</p>	<p>Fibroblastos (<i>in vitro</i>)</p>	<p>Fibroblastos cultivados con resveratrol y análogos del resveratrol 0-100 μM durante 24 h</p>	<p>Efecto dependiente de dosis: \uparrowProliferación con resveratrol a concentraciones inferiores de 10 μM \downarrowProliferación con resveratrol a concentraciones superiores de 25 μM</p> <p>Este efecto se ha reportado también en modelos <i>in vitro</i> con células normales (157–160) y cáncer de mama (161) .</p>	<p>\uparrowSIRT1 \uparrowKi67 \downarrowSA-B-galactosidasa</p>
--	---	---	---	---

Tabla XIX. Efecto del resveratrol sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

No obstante, el resveratrol tiene efectos en la cinética de las células de animales de mamíferos de forma dosis dependiente. Así pues, en cultivos celulares primarios *in vitro* se ha observado que concentraciones superiores a 25–50 μM de resveratrol típicamente desencadenan una detención del crecimiento, senescencia y / o apoptosis en múltiples tipos de células animales diferentes. Por el contrario, las concentraciones de resveratrol inferiores a 10 μM mejoran la proliferación celular y pueden rescatar de la senescencia celular en fibroblastos humanos. Este efecto también se ha observado con distintos compuestos sintéticos similares al resveratrol que han sido denominados “resveralogos”. (123,124)

En el trabajo de Moreira-Pinto y colaboradores, después de 72 h de tratamiento, con resveratrol 0.001–0.01 μM se observó un aumento significativo en la viabilidad de las células de la línea COV434. Por el contrario, cuando se aumentó la concentración de resveratrol a 5 μM , se produjo una reducción significativa de la viabilidad celular. En células de la línea hCG, el resveratrol produce un aumento significativo en la viabilidad celular sin objetivarse una disminución de la viabilidad celular a concentraciones superiores a las 72 h de tratamiento. (162)

Zhang y colaboradores estudiaron los efectos del resveratrol sobre la senescencia celular en modelo de células madre mesenquimales de la médula ósea cultivadas *in vitro*. Mediante técnicas de citometría de flujo se observó que, en comparación con el grupo de control, el número de células senescentes (positivas para SA- β -gal) en los grupos tratados con resveratrol disminuyó significativamente así como la expresión de p53, p16, γ -H2AX y los niveles de ROS totales y mitocondriales. (146)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Arora et al. (2020) (163)	Ratones (tópica)	Se irradió la piel de ratón con UV, 1 vez al día, 5 veces en semana durante 4 semanas consecutivas. Posteriormente tratamiento tópico con resveratrol en hidrogel.	↓ Arrugas ↓ ROS	↑SIRT1 ↑SOD, Catalasa, GSH
Cui et al. (2022) (109)	Ratones (oral)	Tratamiento con resveratrol 2 mg/kg 3 veces a la semana durante 2 semanas. Posteriormente los ratones fueron irradiados a diario con UVB a 40-120 mJ/cm ² a partir de la cuarta semana y se les administró 2 mg/kg de resveratrol 30 minutos antes de cada irradiación	↓ Arrugas ↓ ROS	↓MMPs ↑Nrf2, HO-1, NQO1, SOD1, and GPX-4

Tabla XX. Efecto del resveratrol sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vivo con animales. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

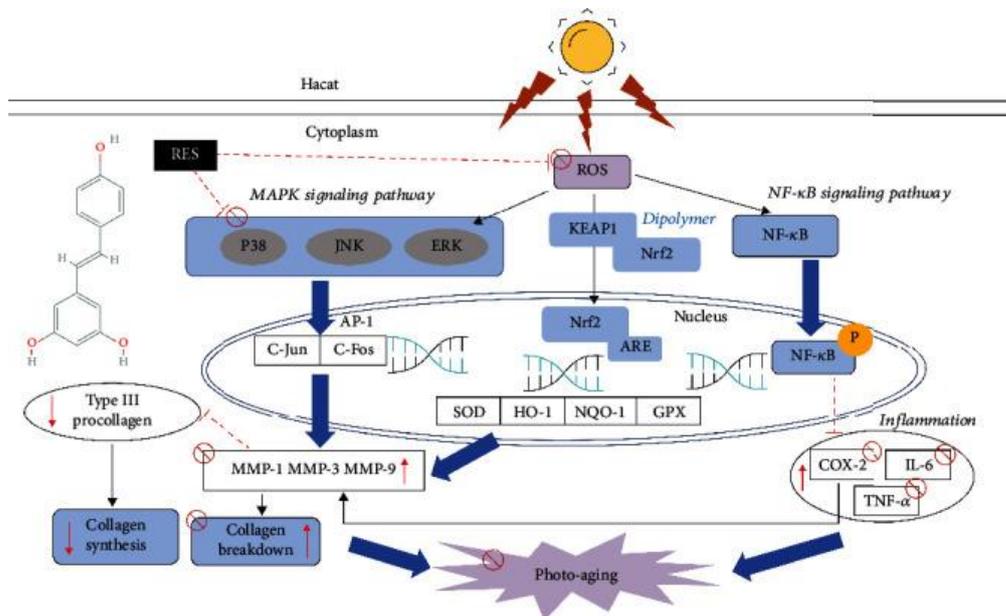


Figura 16. Efecto del resveratrol sobre el fotoenvejecimiento inducido por UVB. Extraído de (109)

Subedi y colaboradores describen que la radiación UVB que penetra en la piel, induce la producción de ROS que activa tres cascadas principales de envejecimiento cutáneo: a) Vía de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), b) Vía de las citoquinas inflamatorias, c) Vía del p53. En este estudio en ratones, se investiga la eficacia del arroz comestible genéticamente modificado que produce resveratrol como tratamiento para el envejecimiento de la piel. Este arroz enriquecido con resveratrol aumenta su potencial anti-envejecimiento al controlar las 3 vías principales mencionadas anteriormente del envejecimiento de la piel. (164)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Deloche et al. (2014) (165)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 40 voluntarios entre 45-65 años. Resveratrol 0.25% cada 12h sobre piel envejecida. 3 meses de tratamiento	↓Arrugas cutáneas	NE
Deloche et al. (2014) (165)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 40 voluntarios entre 45-65 años. Resveratrol 0,25% y oligósido 4% sobre piel envejecida. 2 meses de tratamiento	↑Firmeza cutánea	NE
Deloche et al. (2014) (165)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 60 voluntarios entre 45-65 años. Resveratrol 0,25% y oligósido 4% sobre piel envejecida. 2 meses de tratamiento	↓Arrugas cutáneas	NE
Moyano-Mendez et al. (2014) (166)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 60 voluntarias entre 45-70 años. Transresveratrol 0,1 % p/v cada 12 horas sobre piel fotoenvejecida. Crema w/o. 30 días de tratamiento.	↑Hidratación cutánea ↑Luminosidad cutánea ↑Elasticidad cutánea, No efectos secundarios	NE

Tabla XXI. Efecto del resveratrol sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vivo con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

En cultivos de queratinocitos humanos, el resveratrol redujo en un 90 % los niveles de expresión del biomarcador de senescencia celular beta-galactosidasa, en un modelo de envejecimiento celular inducido por el estrés oxidativo. (167,168)

Mediante ensayos clínicos también se ha demostrado las propiedades antienvjecimiento del resveratrol oral. En un estudio realizado en 50 humanos voluntarios con signos de envejecimiento cutáneo se observó que aquellos que recibieron por vía oral extractos de frutas que contienen resveratrol mejoraron múltiples parámetros asociados con el envejecimiento cutáneo, incluyendo el aumento de la hidratación del estrato córneo y la elasticidad cutánea, disminución de la aspereza de la piel y profundidad de las arrugas, además de disminución del número de léntigos solares. (169)

Además, las aplicaciones tópicas de productos que contienen resveratrol han demostrado mejorar los signos asociados con el envejecimiento en piel de humanos de edad avanzada, tales como arrugas cutáneas, beneficiar la hidratación del estrato córneo y reducir hiperpigmentaciones. (170)

Pese a todo lo dicho anteriormente, en un ensayo clínico en 30 humanos, el tratamiento con suplementos orales que contienen transresveratrol no mejoró significativamente el envejecimiento cutáneo, a pesar reducciones en el contenido cutáneo de MDA y elevaciones en el contenido de SOD. Los autores concluyen que estos resultados discrepantes sugieren que todavía se necesitan ensayos adicionales para determinar si el resveratrol beneficia el envejecimiento de la piel. (67,171)

A.5.2.7. Hiperpigmentaciones cutáneas

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), la proteína quinasa C (PKC), y las vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) inducen la activación de factores de transcripción para varios genes relacionados con la melanogénesis y conducen a la proliferación de melanocitos y síntesis de melanina. El resveratrol no solo inhibe estas vías de señalización, sino que también directamente inhibe la tirosinasa (figura 17).

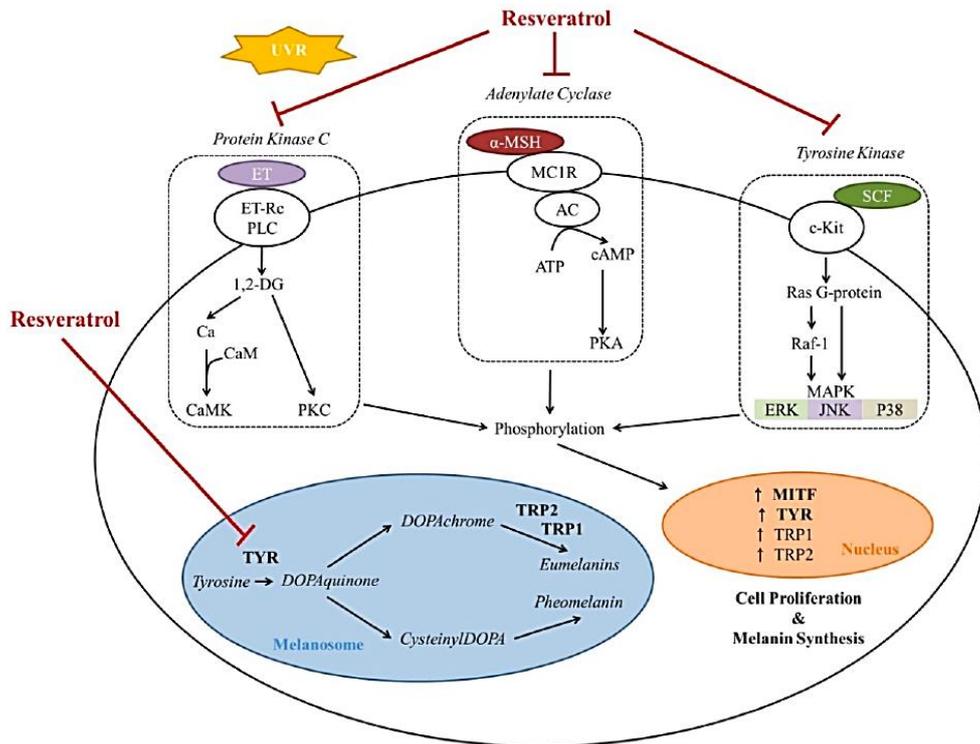


Figura 17. Esquema del efecto del resveratrol sobre la melanogénesis y sus vías de señalización en los melanocitos. Extraído y modificado de (77)

El resveratrol regula indirectamente la actividad melanocitaria mediante acción sobre los queratinocitos. El daño inflamatorio y oxidativo sobre queratinocitos son fuertes estímulos melanogénicos. El resveratrol regula los procesos inflamatorios en los queratinocitos y los protege del daño oxidativo. Mediante este efecto, se previene la estimulación de melanocitos inducida por queratinocitos. Se cree que la ruptura de la membrana basal es la causa de la pigmentación irregular observada en el melasma. Se ha observado que el resveratrol favorece la restauración de la integridad de la membrana basal. (66)

Con todo lo dicho anteriormente, el resveratrol tópico se usa cada vez más en dermatología puesto que ha demostrado efecto hipopigmentante en modelos *in vivo* con animales y ensayos clínicos.

En cuanto a la seguridad del tratamiento, aunque se ha descrito un caso de dermatitis de contacto en paciente con tratamiento tópico con resveratrol, se ha observado que el resveratrol tópico no induce irritación de la piel en la mayoría de los estudios. Además, el resveratrol aplicado tópicamente ha mostrado propiedades beneficiosas en el tratamiento de dermatitis de contacto irritativa y alérgica en estudios con animales. (77)

Los principales trabajos en los que se ha estudiado el efecto del resveratrol en el tratamiento de hiperpigmentaciones cutáneas han sido resumidos en las tablas XXII-XXV. Se han agrupado según fuesen trabajos *in vitro* con cultivos celulares (tabla XXII), trabajos *in vitro* con piel humana reconstruída (tabla XXIII), trabajos *in vivo* con piel de animales (tabla XXIV) o trabajos *in vivo* con piel humana mediante ensayos clínicos (tabla XXV):

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Satooka et al. (2012) (172) Park et al. (2014) (173) Chen et al. (2013) (174)	Melanoma línea celular (<i>in vitro</i>)	Incubación de células de melanoma murino B16 con resveratrol	↓Producción de melanina	Inhibe la tirosinasa
Park et al. (2014) (173)	Melanocitos (<i>in vitro</i>)	Incubación de melanocitos humanos con resveratrol	↓Producción de melanina	Inhibe la tirosinasa
Chen et al. (2013) (174) Lee et al. (2014) (175)	Melanoma línea celular (<i>in vitro</i>)	Incubación de células de melanoma murino B16 con resveratrol	↓Producción de melanina	↓MITF ↓Tirosinasa
Lin et al. (2002) (176) Kwon et al. (2017) (177)	Melanocitos (<i>in vitro</i>)	Incubación de melanocitos humanos con resveratrol	↓Producción de melanina	↓MITF ↓Tirosinasa
Kolbe et al. (2013) (178)	Melanocitos (<i>in vitro</i>)	Incubación de melanocitos humanos con resveratrol	↓Producción de melanina	↑Autofagia ↓Melanogénesis inducida por α -MSH

Kwon et al. (2017) (177)	Melanocitos (<i>in vitro</i>)	Incubación de melanocitos humanos con resveratrol	↓Producción de melanina	↑Fosforilación de ERK
Newton et al. (2007) (179)	Melanocitos (<i>in vitro</i>)	Incubación de melanocitos humanos con resveratrol	↓Producción de melanina	↓Proceso post-transcripcional de la tirosinasa

Tabla XXII. Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Park et al. (2014) (173)	Piel humana reconstruída (tópica)	Los tejidos fueron tratados tópicamente con resveratrol a distintas concentraciones en días alternos durante 3 semanas.	↓Producción de melanina	Inhibe la tirosinasa humana

Tabla XXIII. Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos *in vitro* con piel humana reconstruída. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Lin et al. (2002) (176)	Cerdo de Yucatán (tópico)	Resveratrol 1% tópico durante 8 semanas	↓Pigmentación cutánea	Inhibe la tirosinasa
Lee et al. (2014) (175)	Cobaya (tópico)	Inducción de pigmentación cutánea por UVB en cobayas. Aplicación tópica de resveratrol 1 % durante 2 semanas	↓Pigmentación cutánea	Inhibe la tirosinasa
Lee et al. (2016) (180)	Cobaya (tópico)	Inducción de pigmentación cutánea por UVB en cobayas. Aplicación tópica de resveratrol (0.5404 - 1.8069) µg/g durante 15 días	↓Pigmentación cutánea	Inhibe la tirosinasa

Tabla XXIV. Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos *in vivo* con animales. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Jo et al. (2018) (181)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 22 voluntarios entre 25-49 años. Inducción de bronceado mediante radiación UV y aplicación tópica de triglicolato de resveratrol al 0,4 % dos veces al día durante 8 semanas	↓Pigmentación cutánea	↓Producción de melanina
Ryu et al. (2015) (182)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 21 voluntarios. Inducción de bronceado mediante radiación UV y aplicación tópica de triacetato de resveratrol al 0,4 % dos veces al día durante 8 semanas	↓Pigmentación cutánea	↓Producción de melanina
Liyanage et al. (2022) (183)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 26 voluntarias con fototipos altos (Fitzpatrick IV/V). Aplicación tópica de resveratrol al 1 % dos veces al día durante 6 semanas	↓Pigmentación cutánea	Inhibe la tirosinasa

Tabla XXV. Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vivo con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

A.5.2.8. Tricología

La aplicación tópica de resveratrol ha demostrado favorecer significativamente el crecimiento del cabello y estimular la transición del ciclo del cabello de la fase telógena a la fase anágena en ratones C57BL/6 afeitados. Mediante experimentos *ex vivo* se ha observado que el resveratrol en estos ratones aumentó la longitud del tallo piloso y retrasó la entrada en fase catágena. Los experimentos *in vitro* indicaron que el resveratrol favoreció la proliferación de las células de la papila dérmica y evitaba que estas sufrieran daño oxidativo causado por H₂O₂. (184)

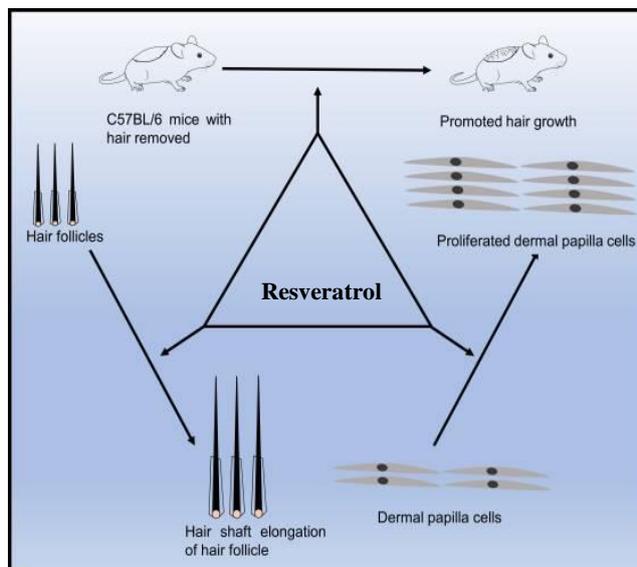


Figura 18. Efecto del resveratrol en tricología. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (184)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Zhang et al. (2021) (184)	Folículos de cabello humano (<i>in vitro</i>)	Folículos cultivados con resveratrol 50 µM durante 6 días	↑Crecimiento pelo	↑Anágeno ↓Catágeno
Zhang et al. (2021) (184)	Células de la papila dérmica humana (<i>in vitro</i>)	Células cultivadas con resveratrol 30-250 µM durante 35 horas	↑Crecimiento pelo	↓ROS

Tabla XXVI. Efecto del resveratrol en tricología. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Zhang et al. (2021) (184)	Ratones C57BL/6 (tópico)	En ratones afeitados se aplicó resveratrol tópico durante 18 días	↑Crecimiento pelo	↑Anágeno ↓Catágeno

Tabla XXVII. Efecto del resveratrol en tricología. Modelos *in vivo* con animales. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (67,76–78)

A.6. Metformina

La metformina es un derivado de la galegina, un producto natural de la planta *Galega officinalis*.

En la figura 19 se observa que en la síntesis química de la metformina (molécula 3) es necesaria la reacción de clorhidrato de dimetilamina (molécula 1) con la 2-cianoguanidina (molécula 2).

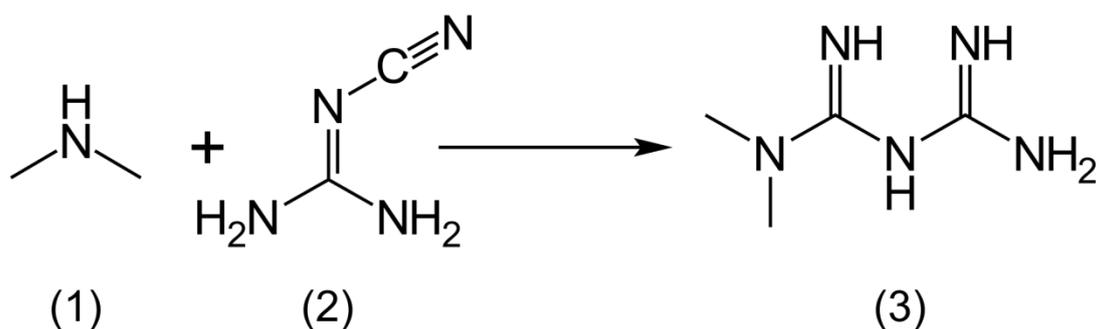


Figura 19. Síntesis química de la metformina. (185)

Ya en el año 1959, Shapiro y colaboradores publicaron la utilización de metformina como antidiabético oral, siendo también hoy en día una de las primeras líneas de tratamiento de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 y casos puntuales de Diabetes Mellitus tipo 1. (185)

A.6.1. Metabolismo

A.6.1.1. Solubilidad

Fácilmente soluble en agua, con una solubilidad de 0,285 mg/ml. Es prácticamente insoluble en acetona, éter y cloroformo. (186)

A.6.1.2. Absorción y transporte

Se absorbe lenta e incompletamente en el tracto gastrointestinal, especialmente en el intestino delgado.

En la membrana de los enterocitos se expresa el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1), responsable del transporte de metformina al líquido intersticial. Este mismo transportador facilita la captación hepática de metformina (OCT-1 y OCT-3) (figura 20), mientras que OCT2 juega un papel fundamental durante la absorción de metformina en células epiteliales renales. La excreción de metformina ocurre por secreción tubular activa a través de los riñones. (187)

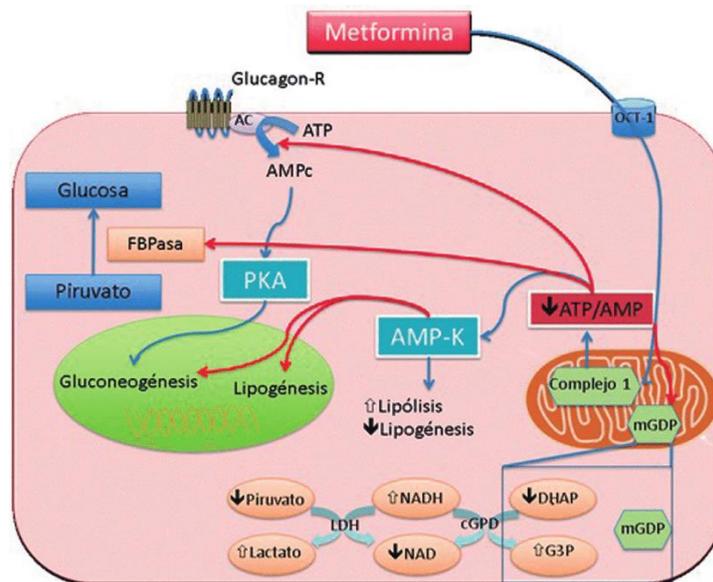


Figura 20. Diagrama esquemático del efecto anti-hiperglicémico de la metformina en el hepatocito. (45)

En el torrente sanguíneo la metformina se une de manera insignificante a las proteínas plasmáticas. (188)

A.6.1.3. Receptores celulares

Los transportadores de cationes orgánicos juegan un papel fundamental en la absorción y señalización de la insulina a nivel intestinal, hepático y renal.

La metformina actúa como antidiabético mediante: a) la disminución de la producción hepática de glucosa por disminución de la gluconeogénesis y b) sensibilización de los tejidos periféricos a la insulina.

La *inhibición de la gluconeogénesis* ocurre en la mitocondria, donde la metformina inhibe la isoforma mitocondrial de la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa, que deriva en una disminución de la producción hepática de glucosa y una liberación al plasma de los excesos de glicerol y lactato.

Otro mecanismo es la inactivación del complejo I mitocondrial de la cadena de electrones, lo cual disminuye la oxidación del NADH y la producción del Adenosín Trifosfato (ATP) mitocondrial. Para compensar la poca producción de energía, la célula inhibe procesos que requieran uso de ATP, entre ellos la gluconeogénesis (figura 20).

Por otro lado, la metformina se comporta como un *sensibilizador de la insulina*, a través de varios mecanismos, destacando su efecto positivo en la expresión del receptor celular de insulina.

Además, aumenta los niveles séricos de la incretina Péptido Similar al Glucagón (GLP1), proteína producida en las células L intestinales bajo el estímulo de los alimentos, cuya función es estimular la secreción de insulina, pero a su vez, mejorar la sensibilidad de los tejidos periféricos a ésta. El GLP1 se une a su receptor específico en tejidos periféricos y es rápidamente degradado en plasma por la enzima dipeptidilpeptidasa-4, la cual disminuye su concentración sérica con la administración de metformina, aumentando así la vida media del GLP1, con el efecto final de menor resistencia periférica a la insulina. (188)

A.6.1.4. Metabolitos de la metformina

La metformina circula sin unirse a las proteínas plasmáticas, posee una solubilidad baja en lípidos y no sufre biotransformación, por lo que es eliminada casi por completo en la orina en su forma activa. No se ha identificado ningún metabolito en humanos hasta la fecha. (189)

A.6.1.5. Biodisponibilidad

En sujetos sanos la biodisponibilidad absoluta vía oral de metformina clorhidrato es aproximadamente del 50% al 60%. La ingesta con alimentos disminuye las concentraciones máximas a un 40% y retrasa ligeramente su absorción. (189)

A.6.2. Tratamiento dermatológico

La metformina es un agente hipoglucemiante oral que disminuye la liberación de glucosa hepática y actúa como un insulinosensibilizante, incrementando la utilización de la glucosa por los músculos y adipocitos. Es la primera línea de tratamiento en pacientes diabéticos tipo 2 con sobrepeso y obesos, ya que se ha demostrado que mejora el resultado clínico y la calidad de vida en estos pacientes, así como la disminución de sus complicaciones microvasculares y macrovasculares. Como resultado de la mejora en el control glucémico, las concentraciones de insulina sérica disminuyen ligeramente, mejorando así la hiperinsulinemia y sus signos. (190)

La metformina también presenta una actividad hipolipemiante vinculada a una mejoría del hígado graso, lo que resulta en una disminución de las concentraciones séricas de triglicéridos y ácidos grasos libres, una pequeña disminución en las concentraciones séricas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y un aumento moderado en las concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL). (188)

Aunque principalmente la metformina desempeña un papel en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, el fármaco ha demostrado un potencial terapéutico para varios trastornos dermatológicos, especialmente aquellos relacionados con hiperinsulinemia e hiperandrogenismo. Recientemente, se han publicado trabajos en el que se ha objetivado resultados terapéuticos óptimos utilizando la metformina como herramienta para el manejo de neoplasias cutáneas, fotoprotección, dermatosis inflamatorias e infecciosas, cicatrización de heridas, trastornos hiperpigmentarios, tricología y dermatosis relacionadas con endocrinopatías. Por tanto, la metformina puede tener utilidad tanto sistémica como tópica en Dermatología. (178,196,197)

A.6.2.1. Estrés oxidativo

Más allá de su acción sobre el control glucémico en la diabetes tipo 2, la metformina presenta otros efectos intrínsecos. Se ha visto en algunos estudios una mejora en el estado antioxidante en pacientes tratados con metformina. Esto podría estar relacionado en parte con su propiedad para limitar la formación de productos finales de la glicación avanzada y para disminuir la sobreproducción de radicales libres en sujetos diabéticos. En estos trabajos *in vitro*, se sugiere que la metformina podría presentar un efecto barredor de radicales hidroxilo. (188,191,192)

Una vez descritas las propiedades protectoras de la metformina frente a los radical libre generados en las células endoteliales en estados de hiperglucemia (193–196), algunos autores han estudiado las propiedades anti radical libre de la metformina en células de la piel envejecida o tras radiación ultravioleta.

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Ribeiro et al. (2020) (197)	Queratinocitos (in vitro)	Inmediatamente después de la irradiación con UVB (40 mJ/cm ²), las células se trataron con metformina 1–500 µM durante 1 hora	↓Anión superóxido en células irradiadas respecto a su control sin metformina = Anión superóxido en células no irradiadas respecto a su control sin metformina	↓NADPH oxidasa en células irradiadas respecto a su control sin metformina No actividad barridora de radicales libres en células no irradiadas

Tabla XXVIII. Efecto de la metformina sobre el estrés oxidativo en la piel. NE: No estudiado. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. Extraído y modificado de (187,198,199)

La exposición constante de la piel a la radiación ultravioleta provoca daño a los componentes celulares de la piel, principalmente debido a la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. Ribeiro y colaboradores, en su trabajo evalúan el potencial antioxidante de la metformina en queratinocitos humanos irradiados con UVB, observando que la metformina es capaz de reducir la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno inducidas por UVB y la producción de anión superóxido dependiente de NADPH oxidasa. El postratamiento con metformina de las células redujo la fosforilación de ERK 1/2, la actividad de NADPH oxidasa y la muerte celular por apoptosis. (197)

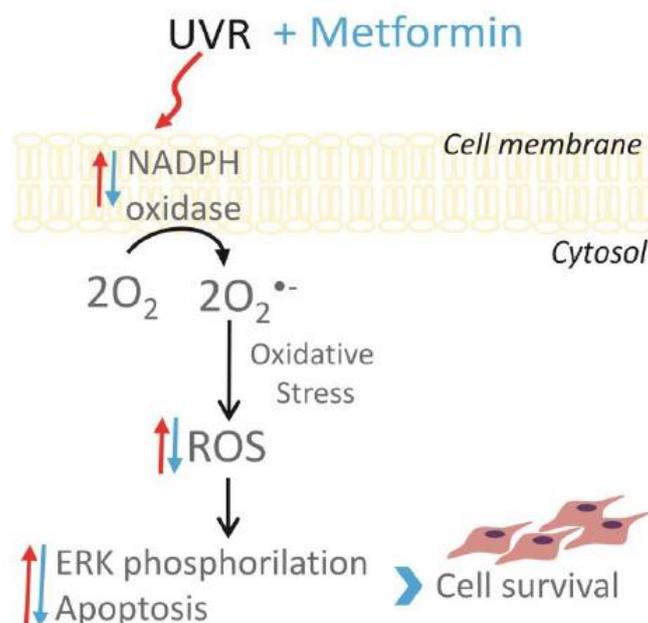


Figura 21. Mecanismo fotoprotector de la metformina (flechas azules) contra la formación de ROS inducida por UVB en queratinocitos humanos (flechas rojas). (197)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Kremslehner et al. (2020) (200)	Epidermis humana reconstruida (tópica)	La piel humana reconstruida fue tratada con metformina 5 mM durante 48h	<p>Los queratinocitos reaccionan a la radiación UVB con activación inmediata de G6PD como respuesta reparadora del ADN dañado.</p> <p>La metformina induce la actividad epidérmica de G6PD incluso en ausencia de radiación UVB.</p>	<p>↑Actividad G6PD epidérmica. Se trata de una enzima que produce NADPH, el cual sirve como sustrato para la enzima glutatión reductasa, ejerciendo un efecto antioxidante en la epidermis.</p>

Tabla XXIX. Efecto de la metformina sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vitro con piel humana reconstruida. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Souza-Neto et al. (2020) (201)	Ratones (oral)	Los ratones fueron tratados con metformina intraperitoneal (90 mg/kg) durante 11 días consecutivos seguidos de una dosis única de radiación UVB (400 mJ/cm ²)	Anti radical libre	↓ROS ↓Peroxidación lipídica ↑Catalasa ↑Tioles
Park et al. (2017) (202)	Ratones (oral)	Ratones con piel envejecida (más de 18 meses de edad) tratados con metformina (100 mg/kg/día) durante 30 días.	Anti radical libre	↑Superóxido dismutasa 2 ↓ROS

Tabla XXX. Efecto de la metformina sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vivo con ratones.
NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

A.6.2.2. Cáncer cutáneo

La metformina presenta propiedades antitumorales para múltiples neoplasias, entre las que destacan el carcinoma basocelular, el carcinoma epidermoide cutáneo y el melanoma. Estos datos han sido estudiados en trabajos tanto *in vitro* (tabla XXXI) como *in vivo* (tabla XXXII y XXXIII)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Vitale-Cross et al. (2012) (203)	Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con metformina 0-20 mM durante 24-96 horas	↓Viabilidad celular	↓mTORC1
Sikka et al. (2012) (204)	Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con metformina 5-25 mM durante 24-72 horas	↓Proliferación	↓Ciclina, CDK y CDKI
Tomic et al. (2011) (205)	Melanoma línea celular (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con metformina 0-10 mM durante 0-96 horas	↓Viabilidad celular	↑Autofagia
Cerezo et al. (2013) (206)	Melanoma línea celular (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con metformina 5-10 mM durante 24 horas	↓Invasión celular ↓Metástasis	↓Slug, Snail, SPARC, Fibronectina y N-cadherina ↓MMP-2 y MMP-9
Martin et al. (2012) (207)	Melanoma BRAF mutado línea celular (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con metformina 2-5 mM durante 24 horas	↑Proliferación	↑RSK
Byekova et al. (2011) (208)	Queratinocitos Humanos y Carcinoma Espinocelular (<i>in vitro</i>)	Tratamiento con metformina 0-5 mM durante 24 horas	↑ LKB1 en queratinocitos humanos	LKB1 es un supresor de tumores que está mutado en el Síndrome de Peutz-Jeghers La metformina mejora la señalización de la vía LKB1/AMPK en queratinocitos humanos pero no en células de carcinoma epidermoide

Tabla XXXI. Efecto de la metformina sobre el cáncer cutáneo. NE: No estudiado. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Chaudhary et al. (2012) (209)	Ratones con Carcinoma Espinocelular (oral)	Ratones alimentados con metformina (5 mg/día) 5 veces a la semana, durante 3 semanas	↓ Volumen del tumor ↑ Apoptosis ↓ Proliferación	↓ Ciclina D1, ciclina B1, cdc2 ↑ Ratio Bax:Bcl2 ↓ MAP quinasa, proteínas ERK1/2 y p38
Man'cheva et al. (2011) (210)	Ratones con Carcinoma Espinocelular (oral)	Ratones alimentados con metformina (200 mg/litro) y/o melatonina (2 mg/litro), durante 26 semanas.	↓ Volumen del tumor	Sinergismo entre metformina y melatonina ↓ ROS
Vitale-Cross et al. (2012) (203)	Ratones con Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello (intra peritoneal)	Ratones tratados con metformina (50 mg/kg/día) durante 22 semanas.	↓ Volumen del tumor	↓ mTORC1
Martin et al. (2012) (207)	Ratones con Melanoma (oral)	Ratones alimentados con metformina (300 mg/kg/día) 5 veces a la semana y bevacizumab (1 mg/kg cada 14 días) durante 60 días	↓ Volumen del tumor	Sinergismo entre tratamientos anti VEGF y metformina
Tomic et al. (2011) (205)	Ratones con Melanoma (oral)	Ratones alimentados con metformina (2 mg/día) durante 3 semanas	↓ Volumen del tumor	↑ Apoptosis ↑ Autofagia

Tabla XXXII. Efecto de la metformina sobre el cáncer cutáneo. Modelos in vivo con ratones. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

En ratones con sobrepeso y obesos tratados con metformina oral se observó una inhibición en el desarrollo de papilomas y carcinoma espinocelular de forma dosis dependiente. (211)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Ravishankar et al. (2018). (212)	Humanos (oral)	Diseño Cohortes retrospectivo. 174 pacientes.	Pacientes tratados con metformina presentaban menor riesgo de desarrollar cáncer cutáneo no melanoma (HR: 0.496).	NE
Adalsteinsson et al. (2021) (213)	Humanos (oral)	Diseño Casos y Controles. 6880 pacientes diagnosticados de CEC o CBC. 69620 controles.	Pacientes tratados con metformina presentaban menor riesgo de desarrollar carcinoma basocelular (OR: 0.71).	↓ mTOR ↓ Vía Hedgehog

Misitzis et al. (2021) (214)	Humanos (oral)	Diseño Cohortes. 932 pacientes con alto riesgo de desarrollar CEC.	Pacientes tratados con metformina presentaban menor riesgo de desarrollar carcinoma basocelular (HR: 0.7) y carcinoma epidermoide (HR: 0.62).	NE
------------------------------------	-------------------	--	---	----

Tabla XXXIII. Efecto de la metformina sobre el cáncer cutáneo. Modelos in vivo con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

La metformina también ha demostrado utilidad como tratamiento adyuvante en pacientes que reciben terapia fotodinámica para carcinoma basocelular. Los autores demostraron que la adición de metformina a la terapia fotodinámica con metil aminolevulinato mejoraba la capacidad citotóxica sobre las células tumorales resistentes a terapia fotodinámica como tratamiento aislado. (215)

A.6.2.3. Fotoprotección

Aunque la metformina es un tratamiento oral clásico en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2, en la última década mediante estudios *in vitro* (tabla XXXIV) y estudios *in vivo* (tabla XXXV) se han publicado distintos trabajos en los que se ha estudiado las propiedades fotoprotectoras que ejerce la metformina sobre la piel, ya sea administrada sistémicamente o por vía tópica.

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Wu et al. (2012) (216)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Las células se trataron con metformina 2 mM la noche de antes de la irradiación y post irradiación (3 días) Irradiación con UVB (5 mJ/cm ²)	↓Proliferación	↑AMPK suprime la proliferación celular mediante la inhibición de la vía mitogénica EGFR/ERK
Wu et al. (2012) (216)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Las células se trataron con metformina 2 mM la noche de antes de la irradiación y post irradiación (3 días) Irradiación con UVB (20 mJ/cm ²)	↓Proliferación	↑AMPK suprime la proliferación celular mediante la inhibición de la vía mitogénica EGFR/ERK
Ribeiro et al. (2020) (197)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Inmediatamente después de la irradiación con UVB (40 mJ/cm ²), las células se trataron con metformina 1–500 μM durante 1 hora	↓ROS	↓NADPH oxidasa
Ribeiro et al. (2020) (197)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Inmediatamente después de la irradiación con UVB (40 mJ/cm ²), las células se trataron con metformina 1–500 μM durante 24 horas	↑Viabilidad celular ↓Apoptosis	↓ERK 1/2 fosforilado
Xiao et al. (2021) (36)	Queratinocitos (<i>in vitro</i>)	Inmediatamente después de la irradiación con UVB (50 mJ/cm ²), las células se trataron con metformina 10–40 mM durante 12-48 horas	↓Mortalidad celular ↓ IL-1β, TNF-α y FGF-2	NE

Figura XXXIV. Efecto fotoprotector de la metformina. NE: No estudiado. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. Extraído y modificado de (187,198,199)

Aunque la metformina es considerada un activador farmacológico de AMPK, se ha observado que es capaz de inhibir la proliferación celular de forma independiente a AMPK. (216–218)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Wu et al. (2012) (216)	Ratones (tópica)	Los ratones fueron irradiados con 100 mJ/cm ² UVB 3 veces a la semana durante 23 semanas. 1h antes de cada irradiación los ratones eran tratados tópicamente con metformina crema 2 μmol.	↓Grosor epidérmico ↓Proliferación celular	↑AMPK suprime la proliferación celular mediante la inhibición de la vía mitogénica EGFR/ERK
Xiao et al. (2021) (36)	Ratones (tópica)	Los ratones fueron irradiados con 430 mJ/cm ² UVB e inmediatamente después tratados tópicamente con metformina crema al 0,6%, 1 vez al día durante 3 días.	↓Grosor epidérmico ↓Inflamación epidérmica ↓Necrosis epidérmica ↓Mortalidad celular ↓IL-1β y TNF-α	NE
Souza-Neto et al. (2020) (201)	Ratones (oral)	Los ratones fueron tratados con metformina intraperitoneal (90 mg/kg) durante 11 días consecutivos seguidos de una dosis única de radiación UVB (400 mJ/cm ²)	Anti radical libre Antiinflamatorio Antitumoral	↓ROS ↓IL-6 ↓Infiltrado inflamatorio ↑Células de Langerhans ↑4-hidroxi-2-nonenal ↑Nitrotirosina ↑p53

Tabla XXXV. Efecto fotoprotector de la metformina. Modelos *in vivo* con ratones. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

La inflamación excesiva y la muerte celular inducidas por los rayos ultravioleta (UV) provocan fotodaño en la piel. La metformina posee efectos antiinflamatorios y citoprotectores. Xiao y colaboradores estudiaron los efectos fotoprotectores de la metformina tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. La aplicación tópica de crema de metformina al 0,6% redujo el fotodaño cutáneo en ratones expuestos a radiación UVB. La metformina inhibió la secreción de IL-1β y la muerte celular en queratinocitos *in vitro* expuestos a UVB. El tratamiento con metformina inhibió el aumento de la expresión y la translocación nuclear de C / EBPβ en queratinocitos irradiados con UVB, un factor de transcripción importante de la interleucina-1beta. (36)

El láser de colorante pulsado es el tratamiento de primera línea para la mancha en vino de Oporto, aunque solo un pequeño porcentaje de las lesiones suele eliminarse por completo con éste tratamiento, lo que podría estar relacionado con la regeneración de las estructuras vasculares después de la irradiación con láser. En modelos *in vivo* con animales se ha observado que la aplicación tópica de metformina suprime eficazmente la angiogénesis inducida por láser de colorante pulsado a través de la inhibición de la vía AKT/mTOR/P70S6K. (219)

La fibrosis cutánea inducida por radiación es un efecto secundario común de la radioterapia. La administración oral de metformina en ratones sometidos a radioterapia redujo significativamente el engrosamiento cutáneo y la acumulación de colágeno dérmico inducido por la irradiación, debido a una sobreexpresión inducida por la metformina de PIK3r1, que produce una reducción de la expresión de FOXO3 y deriva finalmente en una disminución de los niveles de TGFβ. (220,221)

A.6.2.4. Dermatitis inflamatorias e infecciosas

El efecto antiinflamatorio de la metformina se ha estudiado en distintos trabajos sobre modelos *in vivo* (tabla XXXVI):

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Sung et al. (2020) (198)	Humanos con Hidrosadenitis Supurativa (oral)	Revisión sistemática (1 estudio cohortes prospectivo + 2 case report)	↑Efectividad ↑Seguridad	NE
Theut et al. (2018) (222)	Humanos con Hidrosadenitis Supurativa (oral)	Revisión narrativa + Opinión de expertos	↑Efectividad ↑Seguridad	La metformina reduce la puntuación en la escala de gravedad Sartorius y la calidad de vida en pacientes con hidradenitis supurativa.
Chang et al. (2020) (223)	Humanos con Hidrosadenitis Supurativa (oral)	Revisión narrativa	↑Efectividad ↑Seguridad	↓Andrógenos ↓Hiperglucemia
Sung et al. (2020) (198)	Humanos con Psoriasis (oral)	Revisión sistemática (1 estudio cohortes retrospectivo + 3 ensayos clínicos)	↑Efectividad ↑Seguridad	NE
Chang et al. (2020) (223)	Humanos con Psoriasis (oral)	Revisión narrativa	↑Efectividad ↑Seguridad	↑AMPK ↓Hiperglucemia
Sung et al. (2020) (198)	Humanos con Acné (oral)	Revisión sistemática (9 estudio cohortes + 11 ensayos clínicos)	↑Efectividad ↑Seguridad	NE
Robinson et al. (2019) (224)	Humanos con Acné (oral)	Ensayo clínico	↑Efectividad ↑Seguridad	La metformina mejora el control del acné al utilizarse como adyuvante con peróxido de benzoilo tópico y doxiciclina oral.
Chang et al. (2020) (223)	Humanos con Acné (oral)	Revisión narrativa	↑Efectividad ↑Seguridad	↓IGF-1 ↓Andrógenos
Chang et al. (2020) (223)	Humanos con Dermatitis de Contacto Alérgica (oral)	Revisión narrativa	↑Efectividad ↑Seguridad	↑AMPK ↓Citocinas inflamatorias

Tabla XXXVI. Efecto de la metformina sobre dermatosis inflamatorias. Modelos *in vivo* con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Recientemente mediante investigación *in vivo* e *in vitro* se ha objetivado efectos beneficiosos del tratamiento con metformina para el manejo de la rosácea debido a sus propiedades antiangiogénicas y antiinflamatorias. (225)

En bacterias multirresistentes tales como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente la metformina ha demostrado ser eficaz como terapia adyuvante para reducir la resistencia a los antimicrobianos. (226)

También se ha observado que el tratamiento con metformina se asocia con un menor riesgo de infecciones después post quirúrgicas, un menor riesgo de septicemia, mejor pronóstico después de la septicemia y con un efecto beneficioso en la prevención y el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio debido a *Staphylococcus aureus*. (227)

A.6.2.5. Cicatrización

El efecto de la metformina como agente favorecedor de la cicatrización de heridas cutáneas se ha estudiado en distintos trabajos sobre modelos *in vivo* (tabla XXXVII) e *in vitro* (tabla XXXVIII y XXXIX).

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Lei et al (2019) (228)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Cultivo primario de fibroblastos humanos obtenidos de biopsia de queloide. Adición de metformina 1mM en las células durante 12h.	↑Apoptosis ↓Proliferación celular	↑Parkina ↓TGF-β/Smad

Tabla XXXVII Efecto de la metformina sobre la cicatrización. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Qing et al. (2019) (229)	Ratas (tópica)	Se aplicó metformina 2 mM en herida cutánea de ratas desde el día 3 post herida hasta el día 10. Se evaluó la cicatrización de heridas a los 7 días de tratamiento.	↓Tamaño de la herida ↑Vascularización	↑Vía AMPK ↓Inflamasoma NLRP3 (229,230) ↓Macrófagos M1 ↑Macrófagos M2
Chogan et al. (2020) (231)	Ratas (tópica)	Herida en ratas tratadas con apósitos hidrocoloides con metformina. 15 de tratamiento.	↓Tamaño de la herida	↓TGF-β1 ↓Col-I y Col-III ↓Fibronectina ↓α-SMA
Asghari et al. (2017) (232)	Ratas (oral)	7 días después de la administración intra peritoneal de metformina (50 mg/kg/día)+fotobiomodulación con láser (890 nm, 80 Hz, 0.324 J/cm ²) en herida de ratas diabéticas se evaluó la curación	↓Tamaño de la herida ↓UFC bacterianas	NE
Bagheri et al. (2020) (233)	Ratas (oral)	7 días después de la administración intra peritoneal de metformina (50 mg/kg/día)+fotobiomodulación con láser (890 nm, 80 Hz, 0.324 J/cm ²) en herida de ratas diabéticas se evaluó la curación	↓Tamaño de la herida	↑Macrófagos M2 ↑Proliferación fibroblastos
Shawky et al. (2019) (234)	Ratas (oral)	21 días después de la administración oral de metformina (250 mg/kg/día) + células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, administradas por vía intradérmica en herida de ratas diabéticas, se evaluó la curación	↓Tamaño de la herida	Efecto sinérgico entre el tratamiento con metformina y las inyecciones de células madre mesenquimales

Tabla XXXVIII. Efecto de la metformina sobre la cicatrización. Modelos *in vivo* con roedores. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Tawfeek et al. (2020) (235)	Humanos (tópica)	Úlceras traumáticas en 2 pacientes tratadas con apósitos hidrocoloides con metformina. 21 y 30 días de tratamiento.	Cicatrización completa No efectos adversos	↑TGF-β1

Tabla XXXIX. Efecto de la metformina sobre la cicatrización. Modelos in vivo con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Se ha descrito que la vehiculización de la metformina tópica en nanovesículas es beneficioso a la hora de incrementar la efectividad en el tratamiento de heridas de la superficie cutánea. (236)

A.6.2.6. Envejecimiento cutáneo

La metformina se dirige a las principales vías del envejecimiento. Extracelularmente, la metformina disminuye los niveles de insulina, disminuye la señalización IGF-1 e influye en múltiples citocinas que participan en procesos anti-envejecimiento. Intracelularmente, la metformina reduce la producción de ROS (mediante la inhibición del complejo I mitocondrial en la cadena de transporte electrónico y la activación de AMPK) y favorece el incremento de la esperanza de vida con el incremento en la inhibición de la señalización de mTOR y la activación de SIRT1, de forma simultánea. Además, la metformina afecta a las respuestas inflamatorias, estrés oxidativo y la autofagia entre otras (figura 22). (26)

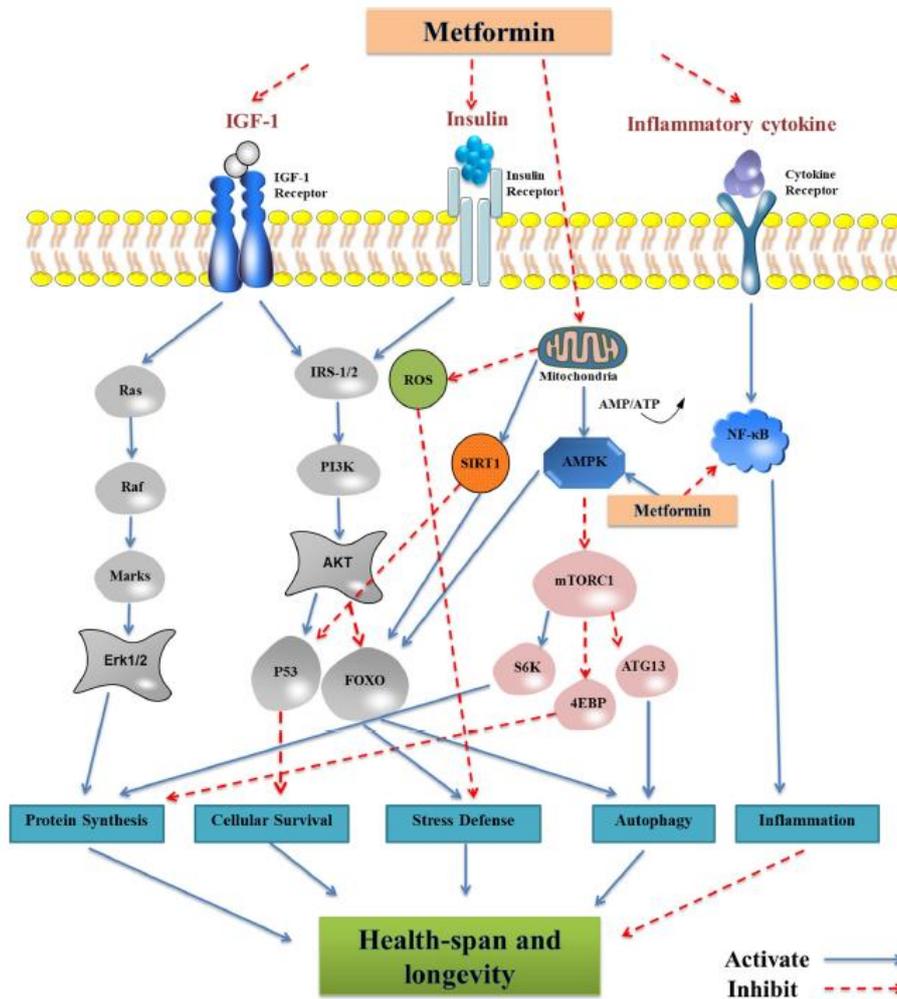


Figura 22. Vías de acción del metformina sobre la esperanza de vida. (26)

En estudios con modelos animales *in vivo* se ha observado que el tratamiento con metformina mejora la salud y longevidad de distintas especies (tabla XL). (190)

Especie	Modelo	Resultados
Gusano	<i>C. elegans</i> (237)	Metformina (25,50,100 mM) incrementó la esperanza de vida media (18%, 36%, 3%)
	<i>C. elegans</i> (238)	Metformina 50 mM incrementó la media de supervivencia un 40%
Ratón	Hembra ratón SHR (239)	Incrementó esperanza de vida media un 14% y la esperanza de vida máxima 1 mes
	Hembra ratón SHR (240)	Incrementó esperanza de vida media un 37,8% y la esperanza de vida máxima 2,8 meses (+10,3%)
	Ratón HER2/neu (241)	Incrementó la esperanza de vida media un 8% y el tiempo de latencia medio en la aparición de adenocarcinoma mamario en un 13,2%
	Ratón 129/Sv (242)	Disminuyó la esperanza de vida media en un 13,4% (macho) y un 4,4% (hembra)
	Macho ratón adulto C57BL/6 (243)	Incrementó la esperanza de vida media un 5,83%
	Macho ratón enfermedad Huntington (244)	Prolongó el tiempo de supervivencia, incrementó la esperanza de vida un 20,1%
Humano	Paciente diabético (245)	Reducción de la mortalidad del 42%
	Paciente diabético/paciente no diabético (246)	Metformina en monoterapia incrementa el tiempo medio de supervivencia
	Paciente con enfermedad de Parkinson (247)	Revierte la disfunción mitocondrial

Tabla XL. La metformina mejora la salud y la longevidad de distintas especies. (190)

El envejecimiento cutáneo es un proceso que está regulado por un conjunto de mecanismos que señalizan la viabilidad / muerte celular, proliferación / senescencia celular, así como la producción de radicales libres.

En las siguientes tablas (tabla XLI-XLIII) se resumen los principales trabajos *in vivo* e *in vitro* en los que se evalúa las propiedades de la metformina frente al envejecimiento celular y tisular de la piel.

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Park et al. (2017) (202)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Fibroblastos humanos senescentes de pacientes con síndrome de Hutchinson-Gilford. Tratamiento con metformina 2 mM durante 14 días	↓Senescencia celular ↓Anión superóxido mitocondrial (secundario a una mejoría de la función mitocondrial)	↓SA-β-galactosidasa ↓H2AX fosforilado ↓Progerina
Fang et al. (2018) (248)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Fibroblastos humanos cultivados con metformina 100 μM durante 4-24h	↓Senescencia celular	↑GPX7 ↑Nrf2 ↓SA-β-galactosidasa ↑KI67
Gillespie et al. (2019) (249)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Fibroblastos humanos cultivados con metformina 0,5-1 mM durante 5 días	↓Proliferación celular	↑AP-1
Nayeri Rad et al. (2020) (44)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Inducción de senescencia celular con dosis única de irradiación UVB (17.78 ± 0.19 W/m ²). Fibroblastos humanos cultivados con metformina 500 μM durante 10 días (recambio de medio y metformina cada 3 días). Análisis de datos el día 15	↓Senescencia celular	↓SA-β-galactosidasa ↓p16, p21, p53
Soydas et al. (2018) (191)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Inducción de senescencia celular con dosis única de glucosa 5,5-50 mM. Posteriormente los fibroblastos humanos son cultivados con metformina 50-500 μM durante 24h.	↑Proliferación celular ↓Apoptosis	↓NF-κB (p65)
Soydas et al. (2021) (250)	Fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Fibroblastos humanos cultivados con metformina 50-500 μM durante 24h. Posteriormente, inducción de senescencia celular con dosis única de glucosa 5,5-50 mM	↑Proliferación celular ↓Apoptosis (temprana y tardía)	↑COL1A1, COL3A1 ↑RELA/p65
Lee et al. (2016) (251)	Cáncer de pulmón A549 (<i>in vitro</i>)	Células cultivados con metformina 5 mM durante 48h Posteriormente irradiación con UVC (20 J/m ²) A las 4h post irradiación análisis de datos.	↓Senescencia celular	↓H2AX fosforilado ↓p53

Tabla XLI. Efecto de la metformina sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

En estudios *in vitro* realizados por Park y colaboradores, utilizando fibroblastos de pacientes con síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (enfermedad caracterizada por

un envejecimiento celular prematuro) se ha visto que la metformina podría ejercer un efecto beneficioso sobre las anomalías nucleares y retrasar la senescencia celular (202).

Nayeri Rad y colaboradores en su trabajo observaron que la administración de nanopartículas lipídicas de metformina disminuyó los marcadores de senescencia tales como la expresión de p16 y la actividad SA-β-gal en cultivos celulares de fibroblastos dérmicos humanos senescentes tras exposición a radiación UVB. (44)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Kremslehner et al. (2020) (200)	Epidermis humana reconstruida (tópica)	Irradiación de la piel humana reconstruida con UVB (150 mJ/cm ²). Tratamiento de piel humana reconstruida con metformina 5 mM durante 48h.	Los queratinocitos reaccionan a la radiación UVB con activación inmediata de G6PD como respuesta reparadora del ADN dañado. La metformina induce la actividad epidérmica de G6PD incluso en ausencia de radiación UVB.	↑Actividad G6PD epidérmica

Tabla XLII. Efecto de la metformina sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos *in vitro* con piel humana reconstruida. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Park et al. (2017) (202)	Ratones (oral)	Ratones con piel envejecida (más de 18 meses de edad) tratados con metformina (100 mg/kg/día) durante 30 días.	↓Senescencia celular	↑Proliferación celular ↓ROS
Arkad'eva et al. (2011) (252)	Ratones (oral)	Ratones tratados con metformina (100 mg/kg/día) durante 8-20 meses	↓Senescencia celular	↓SA-β-galactosidasa ↓H2AX fosforilado
Gunin et al. (2018) (253)	Ratones (oral)	Ratones tratados con metformina (100 mg/kg/día) durante 8-20 meses	↓Proliferación celular	↓KI67

Tabla XLIII. Efecto de la metformina sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos *in vivo* con animales. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

La investigación de las últimas dos décadas ha definido un papel crucial de la senescencia celular en el envejecimiento de los tejidos humanos. Con ello se ha objetivado un creciente interés en la investigación de sustancias con propiedades protectoras preventivas frente a sustancias que inducen la senescencia celular (tales como la radiación solar en la piel). Más recientemente, buscando estudiar el efecto protector o curativo, una vez inducida la senescencia celular, se ha descrito el concepto de senolisis como la propiedad de algunas sustancias de eliminar selectivamente las células senescentes conservando las células no senescentes (proliferantes). Entre estas sustancias se ha incluido a la metformina como agente senolítico. (51)

Los principales efectos anti envejecimiento de la metformina en animales se han logrado utilizando dosis superiores a las dosis terapéuticas administradas en pacientes diabéticos, cuyas concentraciones plasmáticas de metformina suele ser $< 50 \mu\text{M}$. (254)

En trabajos *in vitro* con fibroblastos humanos se observaron que el tratamiento con dosis inferiores a $100 \mu\text{M}$ presentó mayores propiedades antisenescentes, con un incremento de la proliferación celular, cuantificado con un descenso en la actividad de la enzima SA- β -galactosidasa. Por el contrario, con dosis superiores de metformina (10 mM) se observó un descenso de la proliferación celular (incremento de actividad SA- β -galactosidasa). (248,255)

En trabajos *in vivo* con ratones se ha observado también que mientras aquellos con bajas dosis de metformina (0,1% w/w) a diario incrementaban su esperanza de vida, en aquellos que recibían dosis altas de metformina (1% w/w) se observaron efectos tóxicos. (243)

A.6.2.7. Hiperpigmentaciones cutáneas

El efecto de la metformina como agente eficaz aplicado tópicamente sobre hiperpigmentaciones cutáneas se ha estudiado en distintos trabajos sobre modelos *in vivo* (tabla XLIV y XLV) e *in vitro* (tabla XLVI y XLVII).

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Lehraiki et al. (2014) (256)	Melanoma línea celular (<i>in vitro</i>)	Incubación de células de melanoma B16 con metformina (5-10 mM) durante 12-72 horas.	↓Producción de melanina	↓MITF ↓Tirosinasa ↓TRP1 ↓DCT

Tabla XLIV. Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Lehraiki et al. (2014) (256)	Piel humana reconstruída (tópica)	Inducción de pigmentación cutánea con forskolina. Aplicación tópica diaria de metformina 10 mM durante 15 días	↓Producción de melanina	↓MITF ↓Tirosinasa

Tabla XLV. Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos *in vitro* con piel humana reconstruída. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Lehraiki et al. (2014) (256)	Ratón (tópico)	Aplicación tópica diaria de metformina 10 mM durante 8 semanas	↓Producción de melanina	↓MITF ↓Tirosinasa

Tabla XLVI. Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos *in vivo* con animales. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Banavase et al. (2020) (257)	Humanos (tópica)	Ensayo clínico en 40 voluntarios con melasma. Aplicación tópica de metformina 30% en loción una vez al día por las noches durante 8 semanas	↓Pigmentación cutánea Tratamiento seguro	NE

Tabla XLVII. Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos *in vivo* con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

A.6.2.8. Tricología

Se ha evaluado el efecto de la metformina sobre el crecimiento del pelo, mediante modelo de reconstitución de folículos pilosos, utilizando agregados tridimensionales autoensamblados *in vitro* de células epidérmicas y dérmicas. (258)

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Sun et al. (2021) (258)	Queratinocitos y fibroblastos (<i>in vitro</i>)	Tratamiento de las células con metformina 10 mM	↑Actividad inductora de la formación de cabello	↑HGF, CD133, ALP, β-catenina y SOX2

Tabla XLVIII. Efecto de la metformina en tricología. Modelos *in vitro* con cultivos celulares. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

La metformina estimula directamente la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de los agregados 3D cultivados, aumenta los niveles de expresión de proteínas y ARNm de los marcadores moleculares (HGF, CD133, ALP, β-catenina y SOX2) y mejora la tasa de supervivencia de los folículos pilosos reconstituidos. Además, también se ha observado que la metformina aumenta la expresión de CD133 en las células dérmicas, manteniendo así su capacidad tricogénica que normalmente se perdería con los subcultivos en serie. (258)

A.6.2.9. Dermatosis relacionadas con endocrinopatías

La metformina presenta propiedades antiandrogénicas y de mejoría en la hiperinsulinemia que tienen un impacto positivo en diversas dermatosis como la acantosis nigricans, xantomas, y el hirsutismo (tabla XLIX).

Autor (año) (referencia)	Modelo (vía)	Tratamiento	Efecto	Mecanismo
Sung et al. (2020) (198)	Humanos con Acantosis Nigricans (oral)	Revisión sistemática (2 estudio cohortes prospectivo+ 1 cohorte retrospectivo + 1 ensayos clínicos+ 1 serie de casos+ 5 case report)	Metformina es eficaz para la AN, en el 72,2% de los pacientes empleando dosis entre 500 y 2000 mg al día. La metformina oral también fue eficaz en la AN junto con isotretinoína a dosis de 40-80 mg/día.	El uso de metformina demostró mejoría clínica en el aspecto de las lesiones de AN en diversos tipos de estudio incluido ensayos clínicos de forma aislada y combinada. Aunque se requieren más estudios.
Sung et al. (2020) (198)	Humanos con Hirsutismo (oral)	Revisión sistemática (5 estudio cohortes + 34 ensayos clínicos)	30 ensayos clínicos con resultados de eficacia variables. No presentaron mejoría en 4 ensayos clínicos y cinco estudios de cohortes.	La eficacia del tratamiento del hirsutismo con metformina no es clara y se requiere de mayor evidencia.
Patel et al. (2018) (259)	Humanos con Acantosis Nigricans (oral)	Revisión narrativa (3 ensayos clínicos + 1 serie de casos + 1 case report)	Uso de forma aislada de metformina a dosis de 500 mg al día tres veces al día ha mostrado eficacia significativa en reducir las lesiones de AN. La combinación de metformina con rosiglitazona mostró una mejoría mínima de las lesiones de AN.	La metformina puede ser eficaz en el tratamiento de la AN de forma aislada o en combinación con otros tratamientos.
Chang et al. (2020) (223)	Humanos con Acantosis Nigricans (oral)	Revisión narrativa	↑Efectividad ↑Seguridad	↑Translocación de GLUT4
Streit et al. (2009) (260)	Humano con Xantomas Eruptivos (oral)	Hombre 65 años, con diagnóstico hiperlipidemia secundaria y de DM tipo II.	Resolución de xantomas eruptivos con hiperpigmentación post-inflamatoria tras 6 meses de tratamiento con metformina y bezafibrato.	La metformina, gracias a la oxidación de los ácidos grasos y a la reducción de enzimas lipogénicas tiene efectos positivos en el tratamiento de los xantomas.

Tabla XLIX. Efecto de la metformina sobre dermatosis relacionadas con endocrinopatías. Modelos in vivo con piel humana. NE: No estudiado. Extraído y modificado de (187,198,199)

A.7. Combinación de Resveratrol y Metformina en dermatología.

Al realizar una revisión bibliográfica cruzando ambos términos, nos encontramos que la mayoría de trabajos coinciden en dos temas: el envejecimiento de la piel y la senescencia celular.

Lee JS y colaboradores en su trabajo en modelo de cultivo de fibroblastos describen la Sirt-1 como una enzima anti envejecimiento, ya que reduce la expresión transcripcional de la metaloproteasa de tipo 9 (MMP-9). De esta forma, presentan al resveratrol y a la metformina como agonistas de la Sirt-1. En su trabajo concluyen que la administración de estos agonistas protege el colágeno dérmico de la degradación tras exposición a radiación UV. (261)

Zhang y colaboradores utilizan la hiperglucemia como método de generación de ROS en un modelo de cultivo celular de células endoteliales. De forma similar al trabajo de Lee y colaboradores, concluyen diciendo que tanto el resveratrol como la metformina podrían prevenir frente a la senescencia transitoria inducida por la hiperglicemia mediante dos vías distintas: en primer lugar, la activación de la Sirt-1, tras la activación de la AMPK, y en segundo lugar, la reducción de los niveles de ROS, tras la activación de la AMPK. Ambas vías confluyen en la deacetilación del p53, que evita la expresión de p21, disminuyendo la senescencia endotelial. (24)

Lee YS y colaboradores estudian el efecto sinérgico del resveratrol (2,5 μ M o 25 μ M) y la metformina (5 mM) para contrarrestar las respuestas celulares provocadas por UVC en cultivos celulares con células pulmonares tumorales de la línea A549. Observan que tanto el resveratrol como la metformina de forma individual son eficaces a la hora de conferir protección contra el daño al ADN inducido por radiación UV (siendo más efectiva la metformina que el resveratrol cuando se administra de forma individual). No obstante, cuando se administran ambos de forma combinada, se aprecia sinergismo, observándose una expresión a la baja de p53 / γ H2AX / p-chk2. (251)

Zhao y colaboradores describen que la aplicación tópica crónica de metformina y resveratrol acelera el depósito de colágeno y la cicatrización de heridas en roedores, mostrando la metformina mayor efecto. En la piel envejecida, la vía de AMPK se encuentra inhibida, lo que se traduce en el deterioro de la vascularización y la reducción de la capacidad de curación de las heridas. Estos autores observaron que los tratamientos locales con metformina y resveratrol evitaron la supresión de AMPK relacionada con la edad así como la inhibición angiogénica en lechos de heridas. (142)

Lin y colaboradores describen que la degradación de la histona H4 promueve la descomposición del nucleosoma, lo que resulta en un aumento de la transcripción de genes asociados con la senescencia. Los niveles de histona H4 pueden reestablecerse por 3 medicamentos (metformina, rapamicina y resveratrol) en células senescentes inducidas por H₂O₂. (262)

Choi y colaboradores, en un trabajo de revisión analizaron los efectos de la restricción calórica y sobre el envejecimiento de la piel, tanto los cambios relacionados con la edad como los fotoinducidos. Observaron que la restricción calórica confiere propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y de mantenimiento de células madre. Observaron también que algunos miméticos de la restricción calórica incluidos el resveratrol, la metformina, la rapamicina y los agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas, muestran un efecto similar al de la restricción calórica frente el envejecimiento de la piel (figura 23). (64)

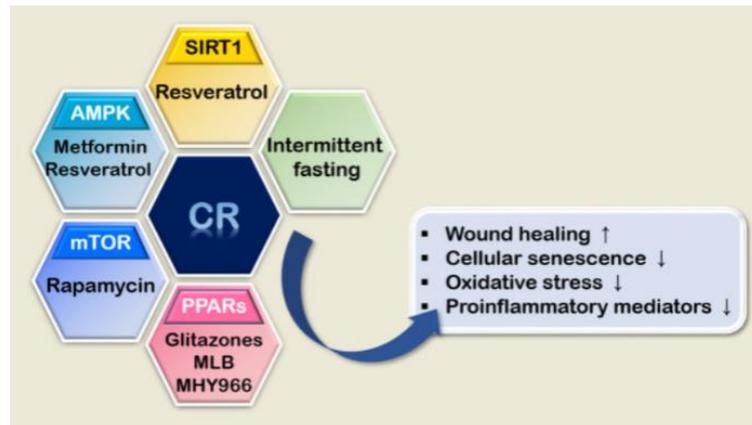


Figura 23. Efecto de los miméticos de la restricción calórica sobre el envejecimiento de la piel. AMPK: proteína quinasa activada por AMP. CR: restricción calórica. MLB: litospermato de magnesio B. mTOR: diana en mamíferos de la rapamicina. SIRT1: el homólogo mamífero de SIR2. PPAR: receptores activados por proliferadores de peroxisomas.. Extraído y modificado de (64)

A.8. Citometría y técnica APO-5

A.8.1. Citometría

La citometría de flujo es una tecnología que analiza células o partículas individuales, suspendidas en una solución salina tamponada, a medida que fluyen de forma alineada, focalizándose por el haz de uno o varios láseres dentro de un compartimento de detección (cámara de flujo). Cada partícula se analiza para determinar la dispersión de la luz visible y uno o varios parámetros de fluorescencia (263,264). Permite la obtención simultánea de datos morfométricos (cantidad de células y su fenotipo), cuantificación de la división celular y detección de la expresión de gran número de proteínas utilizando tinciones celulares específicas. (18)

La determinación de múltiples parámetros biológicos hace que los citómetros de flujo sean una herramienta básica en los hospitales para algunas técnicas de rutina tales como el conteo celular en los laboratorios de hematología, determinación de anticuerpos en los laboratorios de inmunología, estudio de marcadores tumorales en oncología, estudio del ADN en biología celular además de otros ámbitos científicos como la microbiología, biotecnología o toxicología (18,265,266)

En la citometría de imagen se combinan las características de la citometría de imagen convencional con la microscopía confocal, registrando una imagen digital de cada una de las células detectadas, con lo que es posible obtener un gran volumen de imágenes digitales y parámetros estadísticos, proporcionando información morfológica muy precisa a través de las fotografías de las células. (267)



Figura 24. De izquierda a derecha, detalle de los objetivos de las ópticas de 40x, 60x y 20x integrados en el citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X del SAI Citómica (Fotografía del autor).

Para los experimentos de la presente tesis doctoral se han empleado los laboratorios del Servicio General de Apoyo a la investigación (SAI) de Citómica de la Universidad de Zaragoza, y se han realizado determinaciones con el citómetro de imagen AMNIS® modelo ImageStream X (figura 24).

El dispositivo cuenta con dos cámaras de alta resolución integradas en distintos niveles para poder realizar hasta 12 capturas fotográficas simultáneamente para cada una de las células, cada una registrada en un canal distinto según la longitud de onda de emisión del fluorocromo empleado: canal 1 (430-480 nm), canal 2 (480-560 nm), canal 3 (560-595 nm), canal 4 (595-640 nm), canal 5 (640-745 nm), canal 6 (745-800 nm), canal 7 (430-505), canal 8 (505-570 nm), canal 9 (570-595 nm), canal 10 (595-640 nm), canal 11 (640-745) y canal 12 (745-800 nm). También dispone de tres objetivos de microscopía óptica de 20, 40 y 60 aumentos. Para el registro de los datos se utilizan histogramas monoparamétricos y biparamétricos, teniendo en cuenta tanto las características morfológicas de la célula como las características tintoriales según los fluorocromos empleados. El citómetro cuenta con 5 láseres en estado sólido: ultravioleta (375 nm), azul (488 nm), naranja (658 nm), infrarrojo (785 nm) y luz blanca (830 nm) (figura 25).

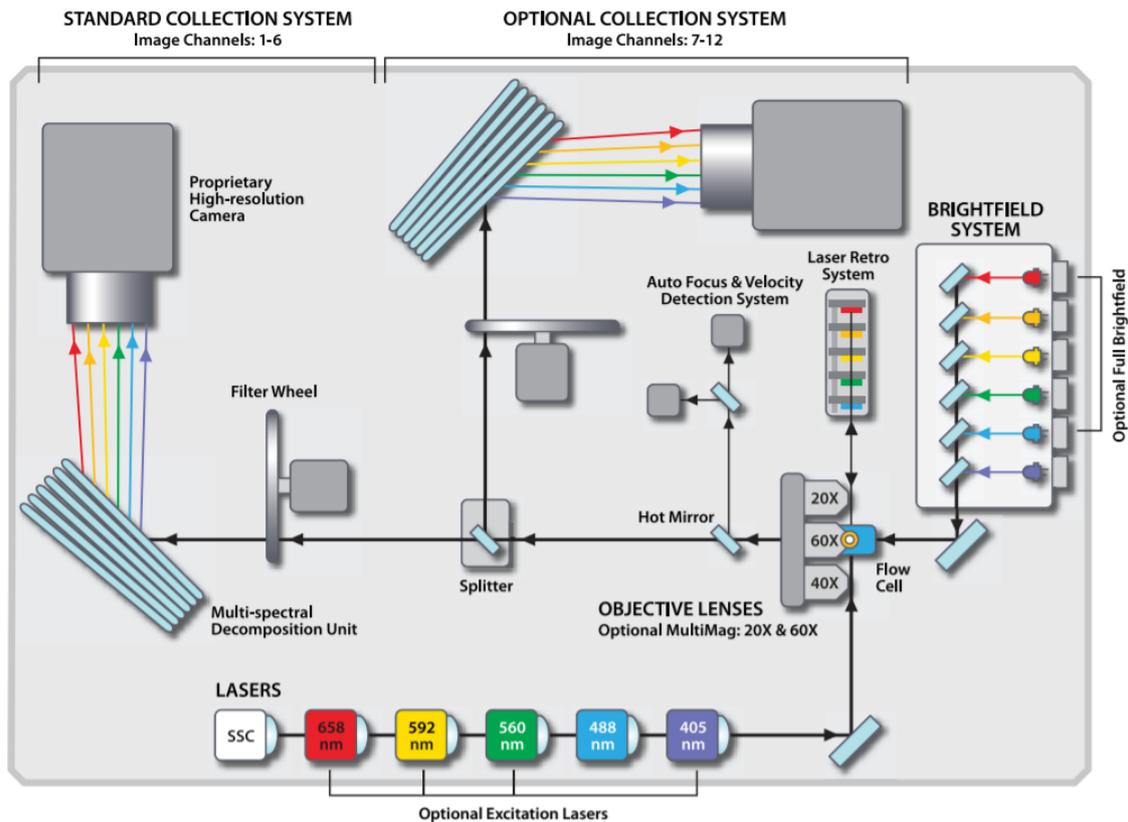


Figura 25. Representación esquemática de la configuración de citómetro de imagen AMNIS®

A.8.2. Técnica APO 5

Desde el Servicio General de Apoyo a la Investigación de Citómica de la Universidad de Zaragoza se ha diseñado la técnica APO 5 para determinar de forma simultánea mediante citometría de imagen y los fluorocromos DAPI y Anexina V-PE las siguientes 5 subpoblaciones celulares (figura 26):

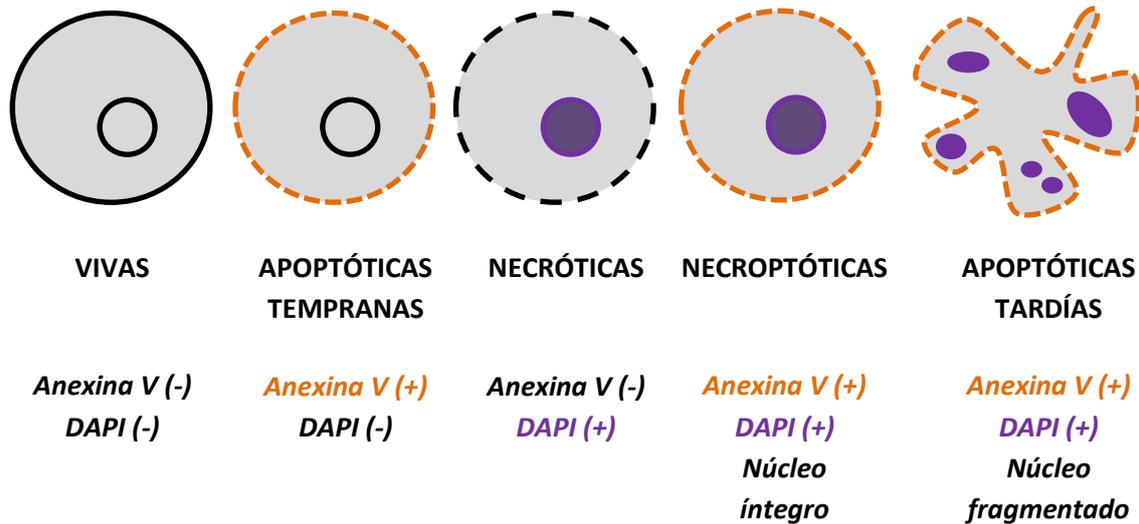


Figura 26. Esquema de las 5 poblaciones celulares obtenidas con citometría de imagen y fluorocromos DAPI y Anexina V-PE mediante la técnica APO 5. (Figura del autor)

1) Doble negativo (Células vivas): Membrana celular intacta. Fluorescencia para Anexina V negativa. Fluorescencia para DAPI negativa. Núcleo íntegro.

2) Anexina V-PE positivo (Células apoptóticas tempranas): translocación de fosfatidilserina desde la región interna a la externa (lado extracelular) de la membrana plasmática, donde se une con Anexina V con PE para emitir fluorescencia amarillo anaranjada. Fluorescencia para DAPI negativa. Núcleo íntegro.

3) DAPI positivo (Células necróticas): ruptura de membrana celular que permite el paso del fluorocromo DAPI a través de la misma y el marcaje del núcleo celular con fluorescencia azul-violeta. Fluorescencia para Anexina V negativa. Núcleo íntegro.

4) Doble negativo (Células necroptóticas y Células apoptóticas tardías): translocación de fosfatidilserina desde la región interna a la externa (lado extracelular) de la membrana plasmática, donde se une con Anexina V con PE para emitir fluorescencia amarillo anaranjada. Ruptura de membrana celular que permite el paso del fluorocromo DAPI a través de la misma y el marcaje del núcleo celular con fluorescencia azul-violeta. Mediante la óptica del citómetro de imagen podemos subdividir esta población según la morfología nuclear:

4.1) Núcleo íntegro (Células necroptóticas): Proceso combinado de apoptosis y necrosis. Se produce una liberación del contenido citoplásmico al espacio extracelular acompañado de inflamación del tejido.

4.2) Núcleo fragmentado (Células apoptóticas tardías)

Con la combinación de los fluorocromos Anexina V-Pe y DAPI, mediante el software del citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X obtenemos un histograma biparamétrico. En el eje de abscisas se representa la intensidad de fluorescencia amarillo anaranjada del fluorocromo Anexina V-PE y en el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia azul violeta del fluorocromo DAPI. En el cuadrante inferior izquierdo se representan las células vivas, en el superior izquierdo las necróticas, en el inferior derecho las apoptóticas tempranas y en el superior derecho las necroptóticas y apoptóticas tardías (figura 27).

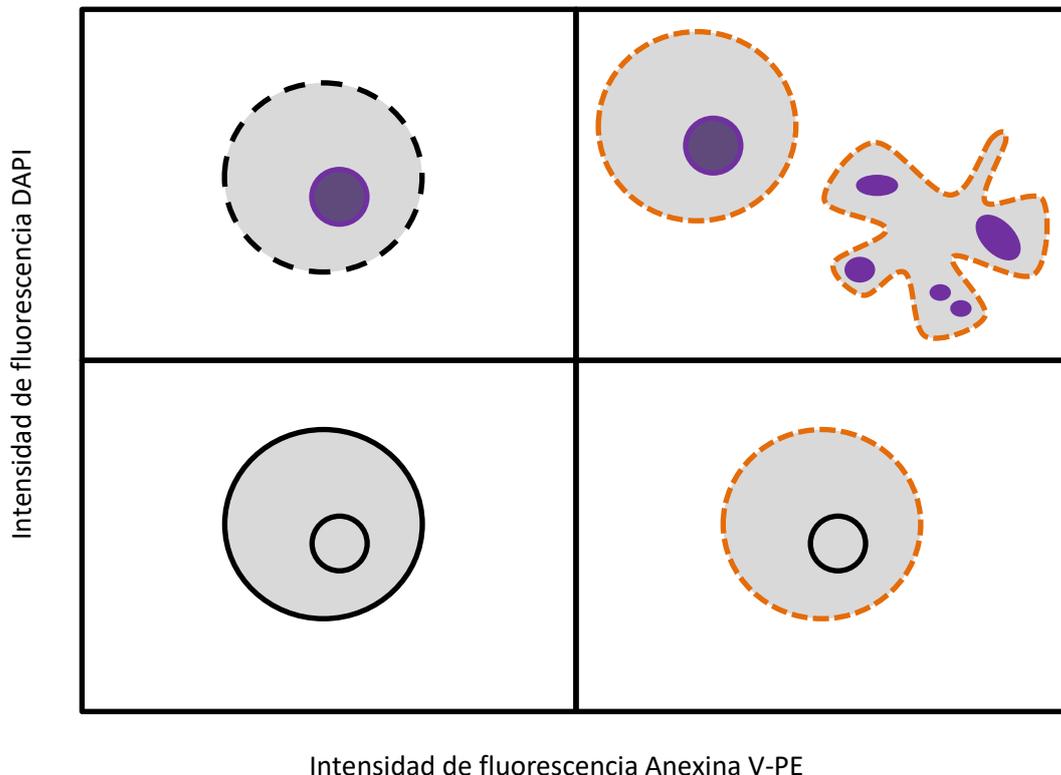


Figura 27. Histograma biparamétrico obtenido con citometría de imagen y fluorocromos DAPI y Anexina V-PE mediante la técnica APO 5. (Figura del autor)

Mediante la óptica del citómetro de imagen AMNIS[®], ImageStream X podemos subclasificar la población obtenida en el cuadrante superior derecho del histograma anterior según la integridad de su núcleo celular (Figura 28).

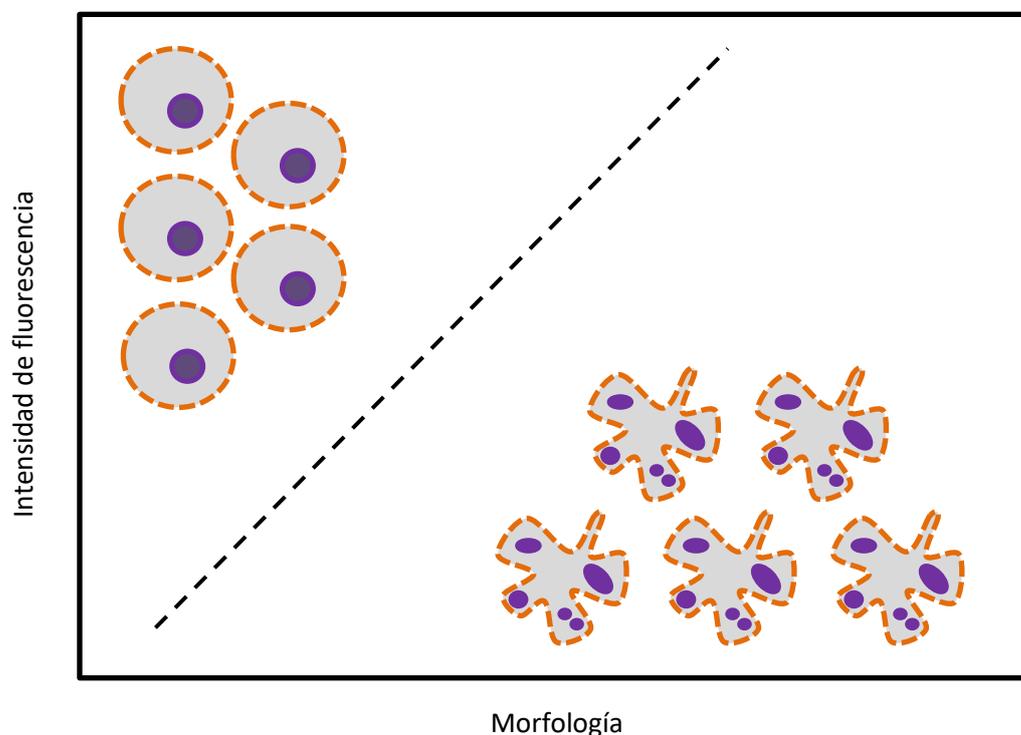


Figura 28. Histograma biparamétrico obtenido con citometría de imagen y fluorocromos DAPI y Anexina V-PE mediante la técnica APO 5. Subanálisis de células AnexinaV positivo y DAPI positivo según morfología nuclear mediante óptica del citómetro. Células necroptóticas: doble tinción y núcleo integro. Células apoptóticas tardías: doble tinción y núcleo fragmentado. (Figura del autor)

La determinación simultánea de apoptosis y necrosis fue descrita en el año 2015 mediante citometría de flujo utilizando los fluorocromos Anexina V-FITC (apoptosis) y yoduro de propidio (necrosis). En los histogramas biparamétricos de los experimentos con citometría de flujo se representó con puntos verdes la apoptosis (FITC) y con puntos rojos la necrosis (IP) (268). Mediante citómetro de imagen AMNIS[®], con la técnica es posible obtener imágenes de cada célula, distinguiendo la localización celular de la tinción de cada fluorocromo (AnexinaV-FITC= membrana, IP= nuclear). De forma adicional, mediante óptica del citómetro de imagen AMNIS[®], se puede subclasificar la población con doble tinción en necroptóticas y apoptóticas tardías (técnica APO5) (32).

En el año 2009, se utilizó la citometría de flujo y el fluorocromo C₁₂-FDG para la determinación de senescencia celular mediante la cuantificación de la actividad SA-β-Gal en fibroblastos humanos (269). Mediante citómetro de imagen AMNIS[®] y combinando los fluorocromos AnexinaV-PE, DAPI y C₁₂-FDG, para la presente tesis doctoral se han analizado simultáneamente 6 subpoblaciones celulares: vivas proliferantes, vivas senescentes, apoptóticas tempranas, necróticas, necroptóticas y apoptóticas tardías (técnica APO5-Sen) (18).

B. Planteamiento y Objetivos

B.1. Planteamiento

La radiación UV que incide sobre la piel humana estimula la producción de vitamina D y favorece el control de dermatosis crónicas tales como la psoriasis. Esta radiación también produce efectos nocivos sobre las células de dicho tejido que determina la muerte celular o senescencia celular.

Buscando una protección cutánea frente a estos efectos nocivos, sin impedir los favorables; se han analizado los posibles efectos fotoprotectores preventivos de la metformina y el resveratrol.

Para realizar nuestro trabajo se han empleado cultivos celulares de queratinocitos y fibroblastos humanos. Este planteamiento se fundamenta en que siendo las células fundamentales en epidermis y dermis humana, estas 2 capas superficiales de la piel son las que absorberán la mayor parte de la radiación UV solar que incide en nuestro cuerpo.

Aunque en la mayoría de trabajos con queratinocitos o fibroblastos humanos *in vitro* en las que se ha evaluado el efecto fotoprotector de la metformina se han empleado dosis a concentraciones de milimolares, en nuestros experimentos se ha evaluado el efecto fotoprotector de la metformina a dosis **micromolar**, buscando aproximarnos a las concentraciones con efecto farmacológico habituales empleadas para otros fármacos en cultivos celulares. De forma similar a otros autores, también se ha evaluado el efecto fotoprotector del resveratrol a distintas dosis micromolar en células de la piel para el estudio de dosis óptima. Según nuestros criterios de búsqueda bibliográfica, se ha estudiado por primera vez el efecto fotoprotector de la metformina **combinada** con el resveratrol sobre la muerte y senescencia celular en queratinocitos y fibroblastos humanos.

En queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* se han descrito propiedades protectoras frente a la muerte y senescencia celular de la metformina y el resveratrol administradas tras la irradiación de las células con UV. En nuestro trabajo nos planteamos si estas propiedades también se observan cuando son administradas previamente a la irradiación, buscando estudiar un posible efecto fotoprotector **preventivo**.

En la presente tesis doctoral se han utilizado **nuevos protocolos** relacionados con la citometría de imagen, dada la trayectoria investigadora de nuestro departamento y del Servicio de Citómica con esta técnica y las ventajas que supone su empleo a la hora de determinar simultáneamente la senescencia y distintos tipos de muerte celular. También se han empleado técnicas para cuantificación de radicales libres, puesto que son moléculas que al acumularse en queratinocitos y fibroblastos favorecen la muerte y senescencia celular inducidas por radiación ultravioleta.

Con nuestros resultados buscamos ampliar el espectro de compuestos protectores con efecto intracelular para la piel humana frente a la radiación solar.

B.2. Hipótesis

Se propone como hipótesis, que la metformina y el resveratrol incrementan sus efectos fotoprotectores cuando son administrados antes de la irradiación con UVB, disminuyendo la mortalidad celular, la sobreproducción de radicales libres y la senescencia celular fotoinducida.

B.3. Objetivos

B.3.1. Objetivo Principal

Cuantificar los efectos fotoprotectores preventivos de la metformina y el resveratrol sobre la toxicidad aguda inducida por radiación UVB a nivel celular, empleando queratinocitos y fibroblastos *in vitro*.

B.3.2. Objetivos Parciales

- Estudiar el efecto de la metformina, resveratrol y la combinación de ambos sobre la proliferación celular en queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro*.
- Evaluar y medir el efecto nocivo de la radiación UVB sobre la proliferación celular en queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro*.
- Analizar posibles efectos fotoprotectores preventivos de la metformina, resveratrol y la combinación de ambos sobre la proliferación celular de queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* sometidos a radiación UVB.
- Puesta en marcha de un nuevo modelo de inducción de senescencia celular en queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro*, utilizando una única sesión de radiación UVB.
- Validar un nuevo protocolo para el estudio de senescencia celular, mediante citometría de imagen, utilizando el fluorocromo C12-FDG para cuantificar la actividad de la enzima SA-B-Gal en células vivas.
- Cuantificar posibles efectos fotoprotectores preventivos de la metformina en la mortalidad, senescencia y producción de radicales libres en queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* sometidos a radiación UVB.
- Determinar posibles efectos fotoprotectores preventivos del resveratrol en la mortalidad, senescencia y producción de radicales libres en queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* sometidos a radiación UVB.
- Evaluar posibles efectos fotoprotectores preventivos sinérgicos, combinando metformina y resveratrol, para medir la mortalidad, senescencia y producción de radicales libres en queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* sometidos a radiación UVB.

C. Material y métodos

C.1. Materiales

C.1.1. Material biológico

El uso de cultivos *in vitro* de células animales y humanas constituye un modelo experimental eficaz cuando se realiza bajo estándares de calidad y manteniendo la rigurosidad del método científico. La puesta en marcha del cultivo se hace a partir de **fibroblastos dérmicos** procedentes de cultivos primarios de piel humana que se conservan congelados a -80°C en nitrógeno líquido dentro de criotubos con un 90% de suero fetal bovino (SFB) como nutriente y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) como crioconservante de las membranas celulares. Los fibroblastos son las células fundamentales de la dermis y tejidos conectivos. Sintetizan diferentes tipos de fibras (colágeno, elastina y reticulina) y producen sustancia fundamental (proteínas donde se fijan las sales minerales dando lugar a un gel de ácido hialurónico, proteoglicanos y glicoproteínas) permitiendo de este modo el mantenimiento de la matriz extracelular. Los fibroblastos son células muy activas con morfología heterogénea de huso o estrellada, dotados de un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado encargado de sintetizar las moléculas precursoras de las fibras conectivas (9). Además, se pueden encontrar fibrocitos de tamaño más pequeño, con una capacidad de secreción relativamente baja, desprovistos de actividad metabólica y localizados en los tejidos conectivos maduros. Los fibroclastos en cambios tienen la capacidad de fagocitar colágeno. Los miofibroblastos actúan en la cicatrización y mediante microscopía electrónica se pueden visualizar en su interior miofilamentos, actina muscular lisa y desmina (10).

El otro sustrato celular utilizado es una línea continua de **queratinocitos humanos HaCaT** que se transforma espontáneamente en línea celular de queratinocitos inmortales aneuploides (número de cromosomas anormal). Los queratinocitos constituyen el 90-95% de las células de la epidermis y se distribuyen en diferentes estratos que varían según la zona del cuerpo. Se forman a partir de células madre de la capa basal y durante su migración hacia capas más superficiales se va diferenciando hasta su eliminación a los 30 días (6). Su morfología varía dependiendo de la capa epidérmica en la que se encuentra. En la capa basal tienen forma cúbica o columnar, citoplasma basófilo y núcleo grande, alineándose de forma perpendicular a la membrana basal a la que se anclan a través de hemidesmosomas. Cuando se encuentran en la capa espinosa son más grandes, poligonales, con citoplasma eosinofílico y núcleo vesicular. En la capa granulosa se aplanan disponiéndose paralelamente a la piel y alargándose, presentando gránulos policonales basófilos de queratohialina y queratina. En cambio, en la capa córnea se aplanan todavía más con forma hexagonal, adquieren tonalidad eosinófila, se desprenden de núcleo y organelas citoplasmáticas para cumplir su función de barrera pasando a llamarse corneocitos.

C.1.2. Reactivos para cultivo celular

- **Anfotericina B:** 250 µg/mL. Fungizone[®], Gibco BRL[®], n° ref. 043-05290D, 20 mL. Antibiótico y antifúngico utilizado para preservar el medio de cultivo celular.
- **DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*):** 4,5 g bajo en glucosa (1000 mg/L *Glucose*, 4 mM *L-Glutamine*, 110 mg/L *Sodium Pyruvate*), Cultek[®], n° ref. H3BE12-604F, 500 mL. Medio de cultivo que permite el mantenimiento de las células promoviendo su desarrollo y actuando también como sistema tampón que permite el control del pH gracias a la fenoltaleína de color rosa (pH = 7,4) que en condiciones de pH ácido (pH = 6) vira hacia color amarillo y en pH alcalino (pH = 8) se torna azul o violeta. En los experimentos se utilizó el DMEM enriquecido.
- **DMSO (Dimetilsulfóxido):** Merck[®], n° ref. 200-664-3, 100 mL. Líquido orgánico incoloro utilizado para disolver el reactivo resveratrol y como conservante para las células congeladas en nitrógeno líquido.
- **Metformina (*1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride*):** $\text{NH}_2\text{C}(=\text{NH})\text{NHC}(=\text{NH})\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{HCl}$. PM 165,62 g/mol. Sigma-Aldrich[®], n° ref. PHR1084-500MG, 500 mg.
- **PBS (*Phosphate Buffered Saline*):** Tampón fosfato salino estéril para cultivo celular. En este estudio se ha adquirido específicamente sin calcio ni magnesio. Lonza BioWhittaker[®], n° ref. BE17-516Q, 1L. Su acción tampón permite regular el pH y al tener una osmolaridad similar al líquido extracelular de los mamíferos y ser isotónico es inocuo para las células.
- **Penicilina con estreptomina:** Penicilina 5000 Unidades/mL, Estreptomina 5000 µg/mL. Gibco BRL[®], n° ref. 15070-063, 100mL. Asociación antibiótica sinérgica de amplio espectro bactericida utilizada para la conservación del medio de cultivo celular.
- **Resveratrol (*3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene*):** $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$. Obtenido a través de su compra en Sigma-Aldrich[®]. PM 228,24 g/mol. Sigma-Aldrich[®], n° ref. R5010-100MG, 100 mg.
- **RPMI 1640:** D-Glucosa 2000 mg/L, Glutation 1 mg/L, Rouge de Phénol 5 mg/L. Biological industries[®], n° ref. 01-100-1A, 500 mL. Medio de cultivo con gran cantidad de fosfatos, diseñado para ser utilizado en una atmósfera con 5% de CO_2 .
- **Sal soluble de tetrazolio (*Cell Proliferation Reagent WST-1*)** Roche[®], n° ref. 05015944001, 800 tests. También se ha utilizado WST-1, Sigma Aldrich[®], n° ref. 11644807001, 25 mL. Este reactivo es transformado en formazán (rojo oscuro) a través de la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial de las células viables. Cuanto mayor es la proliferación, mayor actividad mitocondrial, lo que se traduce en mayor hidrólisis del reactivo. La determinación colorimétrica de la

actividad metabólica y la proliferación celular se mide en un espectrofotómetro de placas a las longitudes de onda de 450 nm y 630 nm (figura 29). (270)

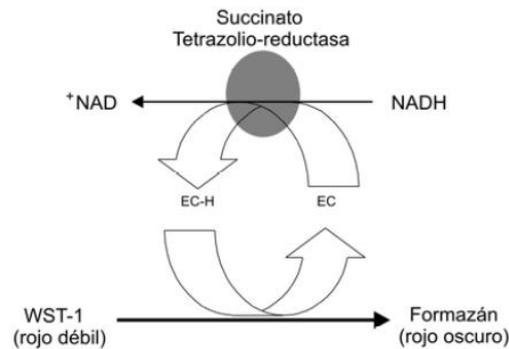


Figura 29. Acción de la Succinato Tetrazolio-reductasa. (53)

- **SFB (Suero Fetal Bobino):** Cultek[®], n° ref. 91S1810-500, 500 mL. Complemento para medios de cultivo que aporta bajo nivel de anticuerpos y contiene factores de crecimiento.
- **Tripsina con EDTA:** EDTA 200 mg/L, tripsina 170.000 U/L. Lonza BioWhittaker[®], n° ref. BE17-161E, 100 mL. La tripsina es una enzima de origen porcino que se emplea para despegar las células adheridas y rompe las uniones intercelulares, mientras que el EDTA es una sal sódica del ácido etilendiaminotetracético que sirve para quelar los iones calcio y magnesio.

C.1.3. Fluorocromos

Los fluorocromos utilizados deben conservarse refrigerados entre 2 °C y 8 °C, protegidos de la luz.

- **Anexina V con PE (Ficoeritrina) + 7-AAD:** *Annexin V and PE, Apoptosis Detection Kit with 7-AAD*, Biolegend®, n° ref. 640934, 100 tests (figura 30). Fluorescencia naranja. La anexina V se une a ficoeritrina y permite diferenciar células apoptóticas con fluorescencia amarilla a 590 nm y el 7-AAD identifica las células necróticas con fluorescencia roja a 650 nm (el colorante se acumula en el citoplasma). En abscisas se representa la longitud de onda (nm), en ordenadas las intensidades relativas (%), la línea discontinua es la curva de excitación, la línea continua es la curva de emisión, los picos de excitación de la Ficoeritrina (amarillo) se sitúan a 496 nm y 566 nm y el pico de emisión a 575 nm (amarillo), el pico de excitación del 7-ADD (rojo) se sitúan a 550 nm y el pico de emisión a 650 nm (rojo) (figura 31). Inicialmente se realizaron experimentos con este fluorocromo, pero los resultados fueron más reproducibles con el DAPI, por lo que se descartó el uso del 7-ADD (figura 31).

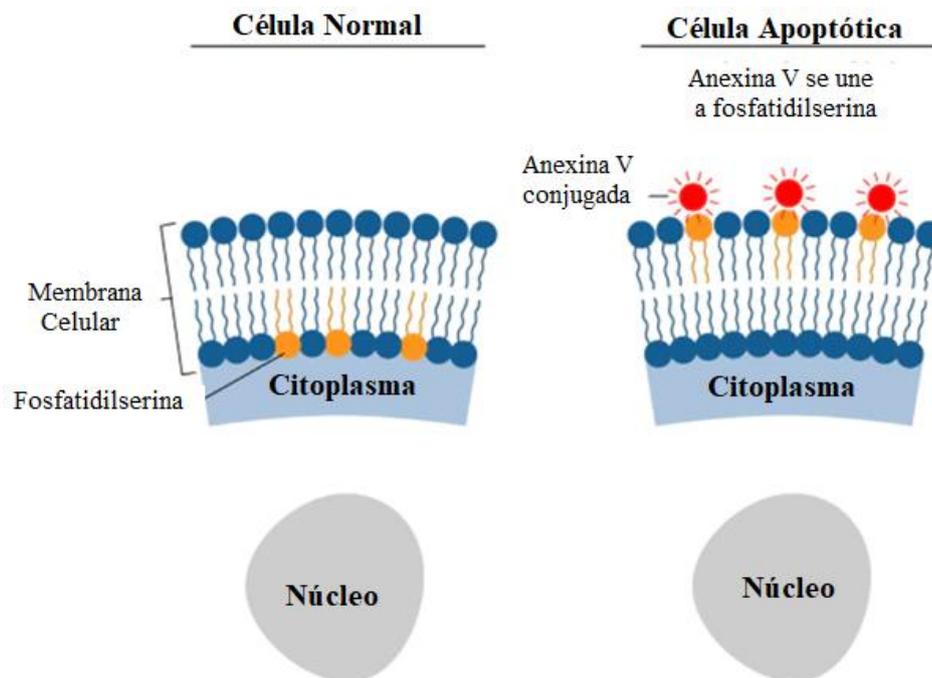


Figura 30. Mecanismo de la Anexina V para la detección de apoptosis

Los conjugados fluorescentes de anexina V se usan comúnmente para identificar células apoptóticas (figura 30). El anticoagulante vascular humano anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} , de 35 a 36 kDa, que tiene una alta afinidad por el fosfolípido aniónico fosfatidilserina (PS). En las células sanas normales, la PS se encuentra en la superficie citoplasmática de la membrana celular. Sin embargo, durante la apoptosis, la membrana celular sufre cambios estructurales que incluyen la translocación de PS desde la región interna

a la externa (lado extracelular) de la membrana plasmática. Se ha descrito que la fosfatidilserina translocada en la superficie externa de la célula marca a la célula para el reconocimiento y fagocitosis por macrófagos (271) (figura 30).

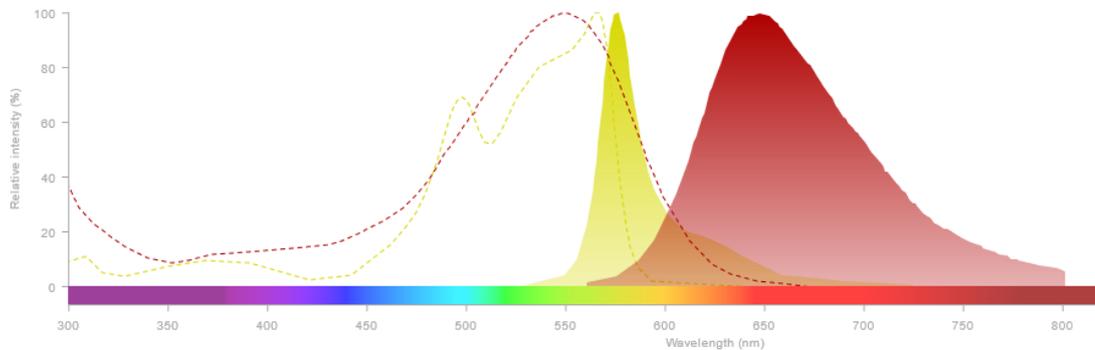


Figura 31. Espectro de excitación y emisión de los fluorocromos ficoeritrina (PE) y 7-ADD. En línea discontinua espectros de excitación. En línea continua espectros de emisión. En amarillo datos del fluorocromo PE. En rojo datos del fluorocromo 7-ADD

- **C₁₂-FDG (5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside):** Biosynth Carbosynth[®], n° ref. ED03235, 5mg (figura 32). C₄₄H₅₅NO₁₆. PM 853,9 g/mol. Reactivo en polvo. Fluorescencia verde. Pico de excitación a 488 nm (láser azul), pico de emisión a 520 nm (verde).

Molécula permeable a la membrana e hidrolizable por acción de la SA- β-Gal, enzima lisosomal que se encuentra en mayor concentración en las células senescentes. Al hidrolizarse y excitarse con el láser azul emite fluorescencia verde, directamente proporcional a la actividad enzimática, que es detectable por el citómetro de imagen (figura 32).

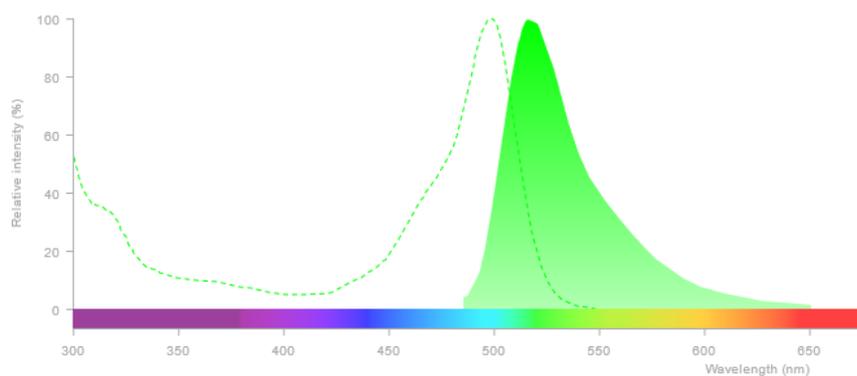


Figura 32. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo C₁₂-FDG. En línea discontinua espectro de excitación. En línea continua espectro de emisión.

- **DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate):** Biolegend®, n° ref. 422801, liofilizado (en polvo) (figura 33). $C_{16}H_{15}N_5$. PM 277,324 g/mol. En abscisas se representa la longitud de onda (nm), en ordenadas la intensidad relativa (%), la línea discontinua representa la curva de excitación, la línea continua la curva de emisión, el pico de excitación del DAPI se sitúa a 355 nm (láser ultravioleta) y el pico de emisión a 360 nm (violeta-azul) (figura 33).

Es una tinción fluorescente que se une con gran afinidad a las regiones ricas en AT en el ADN. El DAPI cruza ineficazmente a través de una membrana celular intacta y, por lo tanto, tiñe preferentemente el núcleo de las células muertas. (272)

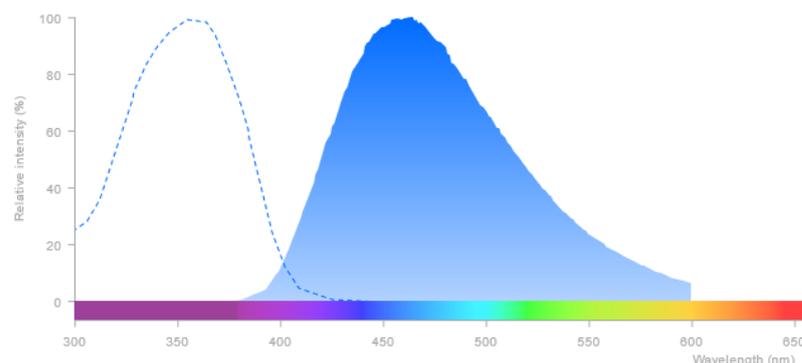


Figura 33. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo DAPI. En línea discontinua espectro de excitación. En línea continua espectro de emisión.

- **HE (Hidroetidina):** Invitrogen-ThermoFisher Scientific®, n° ref. D11347 (figura 34). $C_{21}H_{21}N_3$. PM 315,42 g/mol. Pico de excitación a 518 nm, pico de emisión a 606 nm (figura 34).

Compuesto permeable a la membrana celular que muestra fluorescencia azul en el citosol hasta que se oxida tras transferir dos electrones al anión superóxido pasando a emitir fluorescencia rojo brillante. La reacción es relativamente específica el anión superóxido, por lo que es quizá el reactivo más usado en la medida del anión superóxido por citometría de flujo. En algunas ocasiones puede tener una mínima oxidación del compuesto inducida por la presencia de agua oxigenada o ácido hipocloroso. (32)

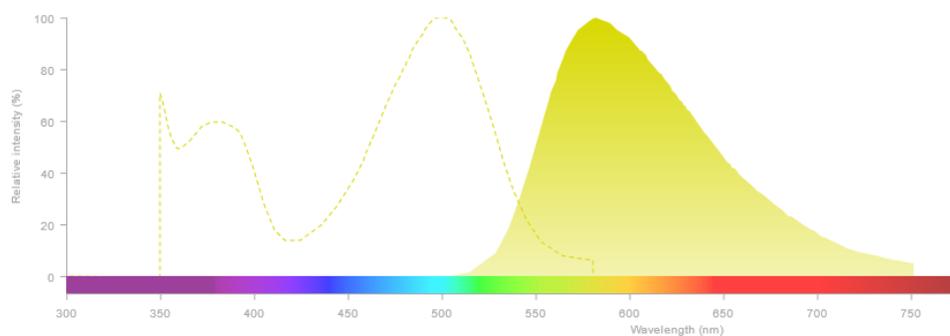


Figura 34. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo HE. En línea discontinua espectro de excitación. En línea continua espectro de emisión.

C.1.4. Equipos

- **Agitador de mezclas Vortex, Heidolph[®], Reax top:** permite agitar tubos de ensayo evitando el deslizamiento (figura 35.A).
- **Agitador orbital, Lab-Line[®], 4625 Titer Plate Shaker:** permite un mezclado de las placas estable y continuo (figura 35.B).
- **Balanza electrónica, AND[®], HR-120:** permite pesar hasta 120 g con una resolución de 0,0001 g (figura 35.C).

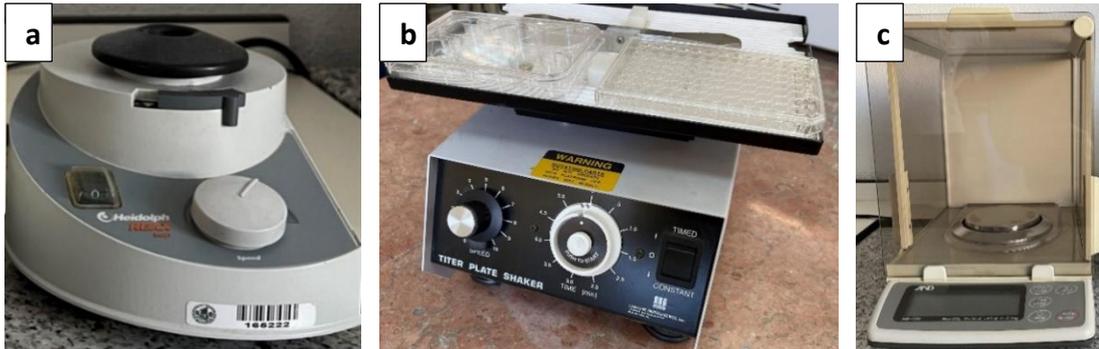


Figura 35. Equipos de laboratorio. (a) Agitador de mezclas Vortex, Heidolph[®], Reax top. (b) Agitador orbital, Lab-Line[®], 4625 Titer Plate Shaker. (c) Balanza electrónica, AND[®], HR-120. (Fotografías del autor)

- **Baño termostático, JP Selecta[®], Unitronic Or:** permite descongelar reactivos para cultivo celular a una temperatura constante (figura 36.A).
- **Cabina de seguridad microbiológica clase II, Telstar[®], Bio-II-A:** en cumplimiento con la norma europea EN 12469 sobre cabinas de seguridad microbiológica, garantiza trabajar con tóxicos de forma segura (figura 36.B).
- **Centrífuga, Eppendorf[®], 5810R:** (figura 36.C).

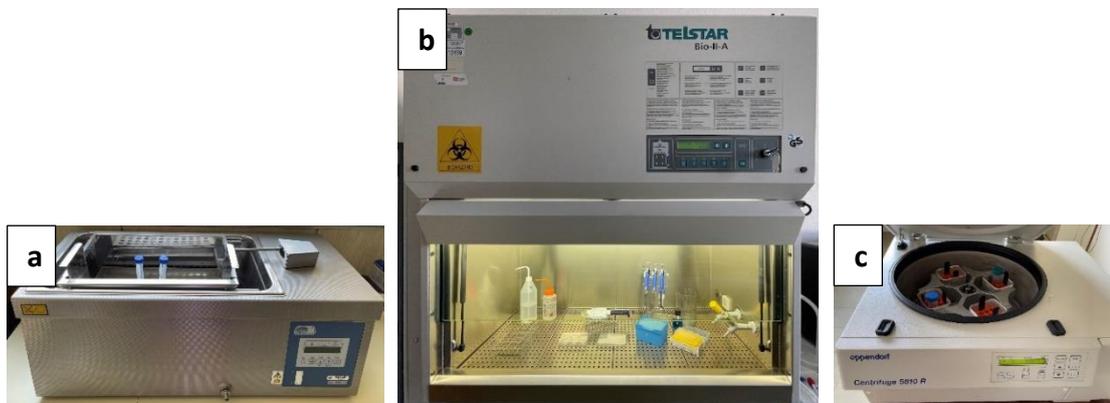


Figura 36. Equipos de laboratorio. (a) Baño termostático, JP Selecta[®], Unitronic Or. (b) Cabina de seguridad microbiológica clase II, Telstar[®], Bio-II-A. (c) Centrífuga, Eppendorf[®], 5810R. (Fotografía del autor)

- **Citómetro de imagen, AMNIS[®], ImageStream X:** este equipo combina un método de seguimiento electrónico de células en movimiento (citometría de flujo) con un sistema de imagen de alta resolución basado en microscopía confocal con lentes de 20, 40 y 60 aumentos. De esta forma permite adquirir múltiples imágenes de cada célula: una de dispersión lateral (campo oscuro), una de luz transmitida (campo claro) y hasta doce canales de fluorescencia (figura 37).



Figura 37. Citómetro de imagen, AMNIS[®], ImageStream X, SAI Citómica, Universidad de Zaragoza. (Fotografía del autor)

- **Espectrofotómetro de microplacas termostaticado, BioTeK[®], EonTM:** Microplacas de 6, 12 ó 96 pocillos según la necesidad del experimento. Permite medir la absorbancia con longitud de onda comprendida entre 200 nm y 900 nm (en los trabajos realizados se han utilizado preferentemente longitudes de onda a 450 nm y 630 nm). Permite variaciones de 1 nm, agitación y control de temperatura (figura 38).



Figura 38. Espectrofotómetro de microplacas termostaticado, BioTeK[®], EonTM. (Fotografía del autor)

- **Estufa de cultivo, Binder®:** para mantenimiento de cultivos celulares a temperatura estable de 37 °C y con un aporte de CO₂ al 5% (figura 39).



Figura 39. Estufa de cultivo, Binder®. (Fotografía del autor)

- **Microscopio de contraste de fases y fluorescencia, Nikon®, Eclipse TE2000-S:** permite visualizar los frascos de cultivo con mayor comodidad mediante objetivos de 10 x, 20 x, 40 x, 100 x (figura 40.A).
- **Microscopio óptico de fluorescencia, Nikon®, Eclipse E800 con cámara Nikon®, Digital Eclipse DXM1200:** permite visualizar y fotografiar los frascos de cultivo con mayor comodidad mediante objetivos de 10 x, 20 x, 40 x, 100 x (figura 40.B).



Figura 40. Microscopia. (a) Microscopio Invertido de Fluorescencia, Nikon®, Eclipse TE2000-S. (b) Microscopio Óptico de Fluorescencia, Nikon®, Eclipse E800. (Fotografía del autor)

- **pHmetro, Crison®, micropH 2002:** permite la medición del pH de las disoluciones con una resolución de 0,01 pH (figura 41).



Figura 41. pHmetro, Crison®, micropH 2002 (Fotografía del autor)

- **Lámpara UVB, Philips®, PL-L 36 W/01/4P:** presenta una banda de onda muy estrecha entre 305 nm y 315 nm, con un pico a los 311 nm. Con ella realizaremos la irradiación de las placas de cultivo celular. Es una lámpara de 36 W (figura 42).

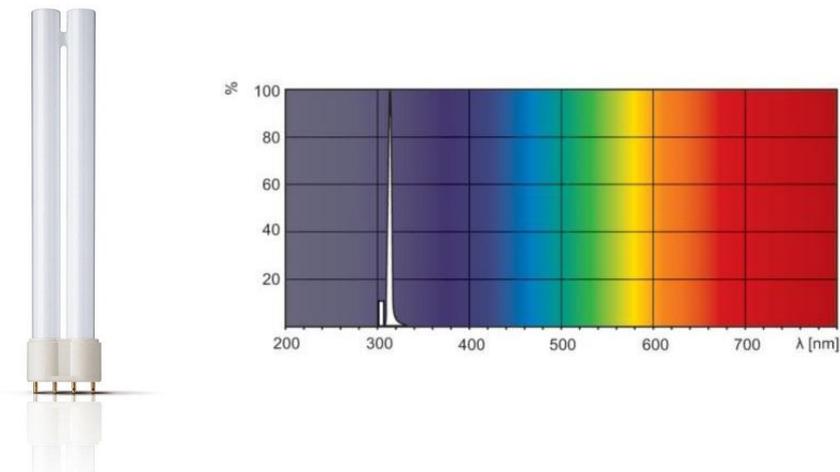


Figura 42. Lámpara UVB, Philips®, PL-L 36 W/01/4P y espectro de emisión de la misma, con pico en 311 nm.

C.1.5. Material fungible

- **Frascos para conservación de cultivos celulares, Falcon® y Nunc®:** Capacidad de 25 cm² (50 mL) y 75 cm² (250 mL) (figura 43.A).
- **Tubos de ensayo, Eppendorf®, Falcon®:** diferentes tipos y capacidades (figura 43.B).
- **Placas de cultivo celular, Corning Incorporated®, Falcon® y Thermo Scientific®:** de 6, 12 y 96 pocillos (figura 43.C).

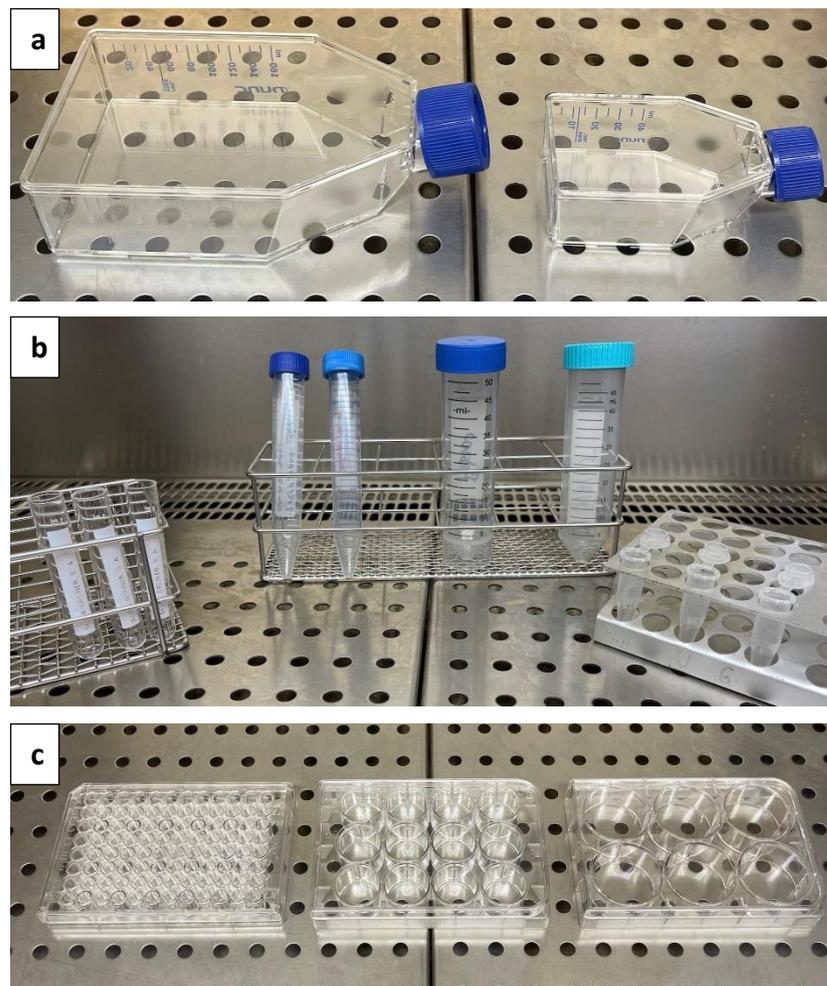


Figura 43. Fungibles. (a) Frascos de cultivo. (b) Tubos de ensayo. (c) Placas de cultivo. (Fotografía del autor)

- **Pipeteador motorizado, Fisherbrand™:** (figura 44.A).
- **Micropipetas automáticas, Labnet® y Gilson®:** 2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL (figura 44.B).
- **Pipetas multicanal, Rainin®, Pipet-Lite™ XLS+:** pipetas de 8 canales de 1-10 µL y de 20-200 µL (figura 44.C).

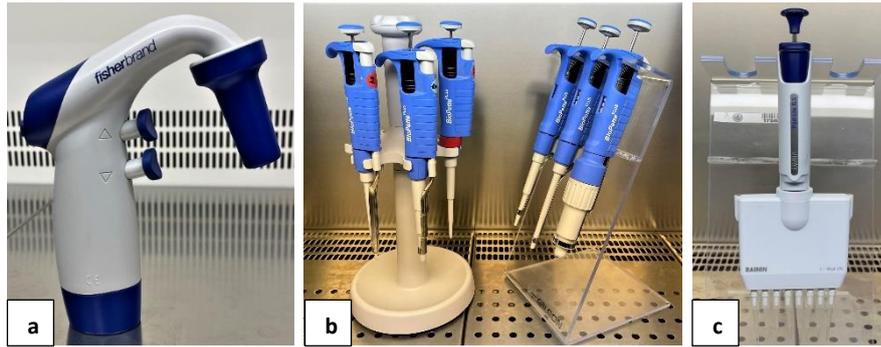


Figura 44. Pipetas. (a) Pipeteador motorizado. (b) Micropipetas automáticas. (c) Pipetas multicanal. (Fotografía del autor)

- **Puntas de pipetas de precisión desechables, Gilson® (micropipetas) y Rainin® (multicanal):** para micropipetas automáticas puntas de 5 mL, 10 mL, 25 mL. Para pipetas multicanal puntas LTS BioCleanUltra™ de 1-10 µL y de 20-200 µL (figura 45).



Figura 45. Puntas de precisión desechables. (Fotografía del autor)

C.2. Métodos

C.2.1. Búsqueda bibliográfica

Se ha realizado una revisión bibliográfica sistemática empleando las bases de datos bibliográficas PUBMED y EMBASE.

Los tesauros (MESH o EMTREE) utilizados en ambas bases de datos han sido "metformin, resveratrol, keratinocyte, fibroblast, skin, dermatology, radiation, ultraviolet, aging, viability, cell death, proliferation, senescence, free radical, reactive oxygen species, flow cytometry, image cytometry".

La fecha de la última búsqueda fue el 8 de mayo del año 2022. Todos los artículos desde el inicio de la base de datos fueron incluidos en la búsqueda.

Sólo se analizaron los estudios con resumen disponible que proporcionasen información relacionada con los objetivos de nuestro trabajo. Se incluyeron tanto trabajos *in vivo* como *in vitro*.

A partir de los trabajos seleccionados y de sus referencias bibliográficas, se ha obtenido la bibliografía para desarrollar la presente tesis doctoral. También se ha obtenido información de otras fuentes bibliográficas tales como capítulos de libro, tesis doctorales y entradas web.

C.2.2. Estudio estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se ha empleado el software IBM® SPSS Statistics 27. Los gráficos han sido diseñados mediante el software Microsoft® Office Excel 2019.

En cada apartado se ha realizado un análisis descriptivo de los resultados obteniendo la media/mediana y desviación estándar de cada grupo en caso de variables cuantitativas y representando la cifra en forma de porcentaje en caso de variables cualitativas. Posteriormente, en variables cuantitativas se ha aplicado la prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar si las variables seguían o no una distribución normal. Seguidamente se ha realizado un análisis univariante para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Dependiendo de la normalidad o no de la muestra, se han utilizado diferentes pruebas estadísticas.

Si los datos seguían una distribución normal se ha empleado el test T de Student, el cual valora las diferencias estadísticas significativas entre dos muestras cuantitativas con distribución paramétrica. En caso de que existieran más de dos grupos se ha utilizado ANOVA y Bonferroni.

Si los datos no se ajustaban a este tipo de distribución, para el análisis estadístico diferencial se ha escogido la prueba U de Mann-Whitney, la cual valora las diferencias estadísticas significativas entre dos muestras cuantitativas con distribución no paramétrica. Cuando el análisis ha implicado tres o más muestras se ha aplicado la prueba de Kruskal-Wallis para comprobar si algún grupo de datos provenía de la misma población y, a continuación, la U de Mann-Whitney para cada pareja de muestras.

Para el análisis estadístico de variables cualitativas se ha empleado test Chi cuadrado y residuos tipificados.

En todos los contrastes de hipótesis se ha fijado el nivel de significación estadística (p) en $<0,05$.

Todos los experimentos han sido repetidos tres o más veces.

C.2.3. Protocolo descongelación de queratinocitos y fibroblastos humanos para cultivo celular.

1. Colocar los criotubos al baño María a 37 °C. Tras 2 ó 3 minutos se logra que pasen a fase líquida.
2. Centrifugar a 800 rpm durante 3 minutos
3. Eliminar el sobrenadante que contiene DMSO (tóxico para el crecimiento celular)
4. Recoger el *pellet* celular con pipeta automática e introducir en un frasco de cultivo con medio DMEM enriquecido (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 4,5 g bajo en glucosa, el bote del fabricante contiene 500 mL)

-DMEM enriquecido: añadirle al DMEM un 10 % de SFB (50 mL) + 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (5 mL) + 1% de antifúngico anfotericina B (5 mL).

C.2.4. Protocolo mantenimiento del cultivo celular

Las células provienen de un cultivo primario de fibroblastos (células indiferenciadas con cariotipo original no modificado, supervivencia aproximada de varios meses) y una línea celular de queratinocitos HaCaT que se preservan en frascos de cultivo celular con superficie de 25 cm² y 75 cm².

Los fibroblastos se pueden mantener con medio celular DMEM enriquecido o RPMI y los queratinocitos HaCaT se mantienen mejor con medio RPMI. Se han mantenido en una estufa de cultivo Binder[®] a 37 °C con gas carbógeno (5 % de CO₂ + 95 % de O₂).

Tras alcanzar una confluencia celular del 90-95 %, se procede a tripsinizar para subcultivar según la necesidad de muestras: nuevos frascos de cultivo, placas de 6 pocillos (2 mL/pocillo), placas de 12 pocillos (1 mL/pocillo) ó 96 pocillos (100 µL/pocillo). En caso de tiempos prolongados entre experimentos las células se congelan a -80 °C o en nitrógeno líquido, en un medio para congelación con 90 % de SFB y 10 % de DMSO (figura 46).

El trabajo con las células se ha realizado en todo momento bajo condiciones de esterilidad en la cabina de seguridad biológica.

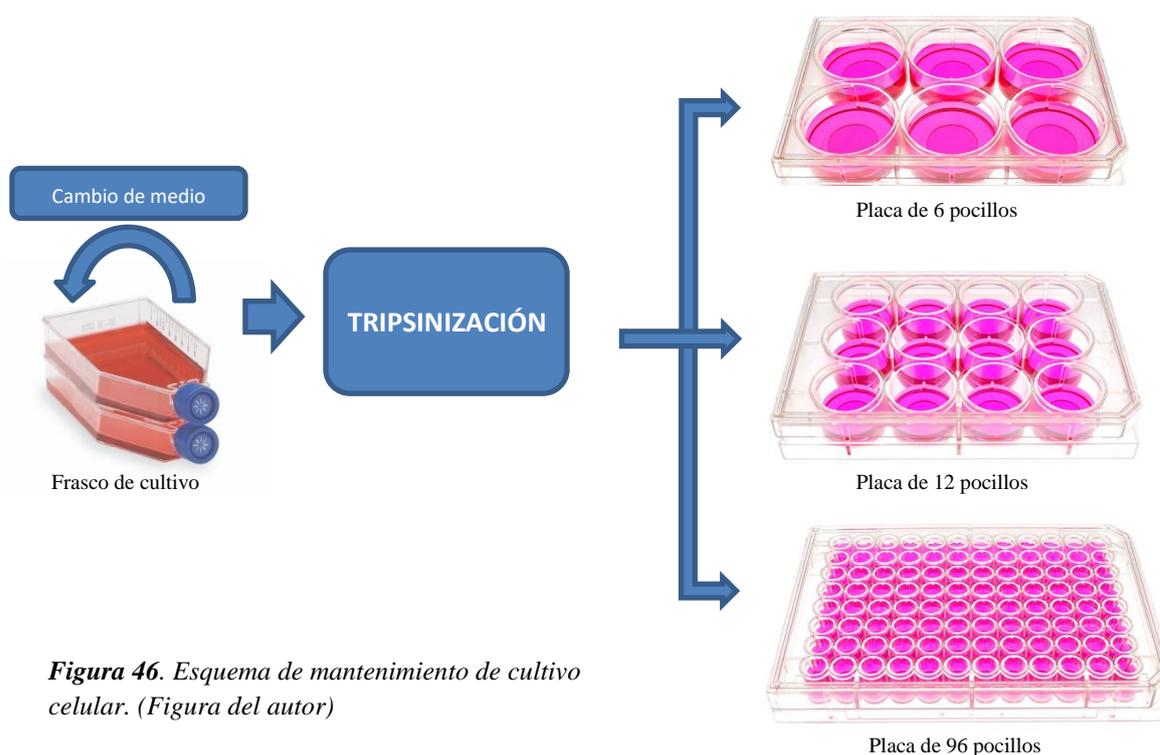


Figura 46. Esquema de mantenimiento de cultivo celular. (Figura del autor)

C.2.5. Protocolo de tripsinización

Mediante el proceso de tripsinización se procede a la separación celular.

- Retirar con la pipeta estéril el medio de cultivo para evitar que sus proteínas bloqueen la tripsina
- Lavar las células con PBS (2 minutos). Eliminar el PBS. Repetir el proceso por segunda vez.
- En placas de 12 pocillos, para cultivos de fibroblastos añadir en cada pocillo 0,5 mL de tripsina + EDTA (200 mg/L) precalentada a 37 °C, mientras que en caso de queratinocitos HaCaT añadir 1 mL (los queratinocitos se disponen en mosaico con una capa de queratina superficial que dificulta la separación celular). Incubar los fibroblastos y queratinocitos durante 5 y 10 minutos respectivamente. Observar el despegamiento celular en microscopio, moviendo suavemente el frasco para favorecer separación (figura 47).

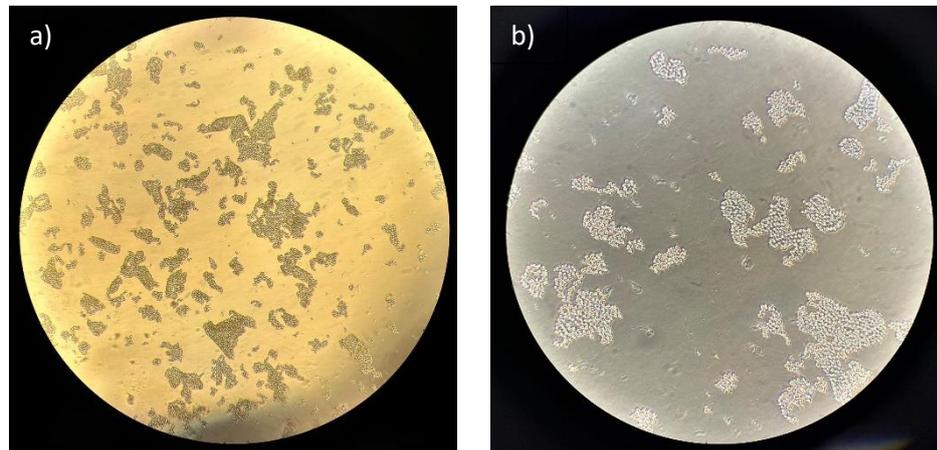


Figura 47. Despegamiento celular de la placa de cultivo tras tratamiento con tripsina de queratinocitos HaCaT. Microscopía óptica. (a) 4 aumentos. (b) 10 aumentos. (Fotografías del autor).

- Para bloquear la tripsinización añadir SFB frío, colocando el frasco o placa de cultivo sobre hielo picado.
- Retirar las células con pipeta y depositarlas en tubos estériles Falcon® de 5 mL ó 50 mL según el volumen obtenido. Agitar levemente en *vortex*
- Centrifugar a 850 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante con pipeta y al pellet añadirle medio de cultivo DMEM enriquecido.
- Agitar manualmente y centrifugar de nuevo las células. Desechar el sobrenadante.

- En caso de querer conservar las células en la estufa, añadir al *pellet* medio de cultivo (DMEM enriquecido o RPMI) y sembrar las células en placas o frascos. En caso de placas de 6 pocillos añadiremos 12 mL de medio de cultivo al tubo, agitar brevemente y distribuir 2 mL en cada pocillo. En caso de placas de 12 pocillos añadiremos 12 mL de medio de cultivo al tubo, agitar brevemente y distribuir 1 mL en cada pocillo. Para las placas de 96 pocillos añadir 10 mL de medio al tubo, agitar brevemente y distribuir 0,1 mL por pocillo.

- Si se desea realizar algún experimento se procederá a realizar el protocolo correspondiente. Si se va a trabajar con fluorocromos habrá que alicuotar la suspensión de células en tubos Eppendorf[®] de 1,5 mL aptos para el citómetro AMNIS[®] (el citómetro requiere 200 μ L/tubo).

C.2.6. Cálculo de disoluciones de metformina

La metformina se suministra como reactivo en polvo, por lo que para su manejo requiere conversión a soluciones líquidas a distintas concentraciones. En cada experimento debe realizarse nuevamente la disolución para garantizar la conservación de los reactivos. El PM de la metformina es 165,62 g/mol. Para evitar la contaminación de los reactivos, se ha trabajado bajo condiciones de esterilidad en la cabina de seguridad biológica.

1. Para calcular los gramos por experimento, aplicaremos la siguiente fórmula:

a.
$$M = \frac{\frac{g}{PM}}{L}$$

M: Molaridad (M)

g: Gramos de sustancia (g)

PM: Peso molecular (g/mol)

L: Litros (L)

- b. Por lo que de la fórmula anterior se deduce que:

$$g = M \times PM \times L$$

2. Revisando la bibliografía se decide trabajar con una solución *stock* 50 mM (0,05 M), fabricando cada vez 4 mL (0,004 L) de solución. Aplicando la fórmula previa deducimos que:

$$g = 0,05 \times 165,62 \times 0,004 = 0,033124 \text{ g}$$

3. Disolver 0,033124 g de metformina en 4 mL de PBS para obtener la solución *stock* 50 mM.
4. A partir de esta solución *stock* de metformina 50 mM se fabricaron las concentraciones celulares finales de metformina: 1 mM, 2,5 mM y 5 mM.
5. Dado que metformina 50 mM es una solución muy concentrada, para conseguir la concentración final celular de metformina 5 μ M se procedió a hacer una solución *stock* diluida de metformina 5 mM (0,005 M).

Para fabricar 10 mL de solución de metformina a concentración 5 mM se partió de la solución original de metformina 50 mM diluyéndola 10 veces, por lo que se mezclaron 1 mL de metformina 50 mM con 9 mL de PBS.

C.2.7. Cálculo de disoluciones de resveratrol

El resveratrol se suministra como reactivo en polvo, por lo que para su manejo requiere conversión a soluciones líquidas a distintas concentraciones. En cada experimento debe realizarse nuevamente la disolución para garantizar la conservación de los reactivos. El PM del resveratrol es 228,24 g/mol. Para evitar la contaminación de los reactivos, se ha trabajado bajo condiciones de esterilidad en la cabina de seguridad biológica.

1. Para calcular los gramos por experimento, aplicaremos la siguiente fórmula:

a.
$$M = \frac{\frac{g}{PM}}{L}$$

M: Molaridad (M)

g: Gramos de sustancia (g)

PM: Peso molecular (g/mol)

L: Litros (L)

- b. Por lo que de la fórmula anterior se deduce que:

$$g = M \times PM \times L$$

2. Revisando la bibliografía se decide trabajar con una solución *stock* 5 mM (0,005 M), fabricando cada vez 10 mL (0,01 L) de solución. Aplicando la fórmula previa deducimos que:

$$g = 0,005 \times 228,24 \times 0,01 = 0,011412 \text{ g}$$

3. Disolver 0,011412 g de resveratrol en 10 mL de DMSO para obtener la solución *stock* 5 mM.
4. Dado que resveratrol 5 mM es una solución muy concentrada, para conseguir la concentración final celular de resveratrol a dosis micromolar, se procedió a hacer una solución *stock* diluida de resveratrol 0,25 mM (0,00025 M).

Para fabricar 10 mL de solución de resveratrol a concentración 0,25 mM se partió de la solución original de resveratrol 5 mM y dilución de 20 veces, por lo que se mezclaron 0,5 mL de resveratrol 5 mM con 9,5 mL de PBS.

5. A partir de esta solución *stock* de resveratrol 0,25 mM se fabricaron las concentraciones celulares finales de resveratrol: 2,5 μ M, 10 μ M y 25 μ M.

C.2.8. Protocolo del experimento de proliferación celular. Experimento 1.

Para llevar a cabo el estudio de proliferación celular se ha utilizado la medición colorimétrica del reactivo WST-1 tanto en queratinocitos humanos como en fibroblastos humanos. Partimos de un cultivo celular en placas de 96 pocillos con medio de DMEM enriquecido obtenido mediante los procedimientos previos descritos y trabajamos según el siguiente protocolo (figura 48):

- Utilizando la pipeta multicanal de 8 canales de 1-10 μL añadir a las células el reactivo metformina para llegar a concentraciones celulares finales de 5 μM , 1 mM, 2,5 mM y 5 mM. Del mismo modo, añadir al resto de células el reactivo resveratrol hasta llegar a concentraciones celulares finales de 2,5 μM , 10 μM y 25 μM . Se reservan 3 columnas centrales de pocillos como control con células sin reactivos. Las columnas de los extremos se mantienen sin células y sin reactivos.
- Tras 24 h en la estufa, añadir a cada pocillo con ayuda de las pipetas multicanal 10 μL del reactivo WST-1, previamente diluido (1 ml de WST-1 en 9 ml de PBS, siguiendo el protocolo de la casa comercial) y volver a introducir la placa en la estufa durante 3 horas.
- 1ª Lectura: transcurridas 3 h se procede a la lectura de la absorbancia del reactivo a 450 nm y 630 nm. Los resultados se expresan como % de proliferación celular (actividad de la deshidrogenasa mitocondrial) respecto a las células no tratadas con metformina ni resveratrol (control). Una vez realizada la 1ª lectura de la placa volver a dejar en la estufa.
- 2ª Lectura: transcurridas 72 h desde la adición de la metformina y el resveratrol, y de nuevo con ayuda de las pipetas multicanal, recoger y desechar el medio, lavar los pocillos con PBS, y volver a añadir 100 μL de DMEM completo y 10 μL de WST-1 por pocillo. Incubar de nuevo en la estufa durante 3 h tras las cuales se realiza la segunda lectura a las mismas longitudes de onda con el Lector EON® (figura 38).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V
B	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V
C	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V
D	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V
E	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V
F	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V
G	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V
H	V	5 μM	1 mM	2,5 mM	5 mM	C	C	C	2,5 μM	10 μM	25 μM	V

Figura 48. Plantilla 1º del estudio de proliferación celular. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control. (Figura del autor)

Tras examinar los resultados del experimento comentado previamente, siguiendo el mismo protocolo experimental, se ha completado el análisis utilizando la combinación de las dosis individuales óptimas de los reactivos metformina (5 μ M) y resveratrol (25 μ M) (figura 49).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V
B	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V
C	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V
D	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V
E	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V
F	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V
G	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V
H	V	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	C	C	C	C	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	5 μ M + 25 μ M	V

Figura 49. Plantilla 2º del estudio de proliferación celular. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control. (Figura del autor)

C.2.9. Experimento de irradiación. Experimento 2.

Para estudiar los efectos protectores de la metformina y el resveratrol frente a la radiación UV en células humanas, se utilizó la radiación ultravioleta B.

C.2.5.1. Medida de la dosis de irradiación

Se utilizó una lámpara UVB, Philips[®], PL-L 36 W/01/4P de banda de onda muy estrecha entre 305 nm y 315 nm, con un pico a los 311 nm (figura 42) para someter a las muestras a una dosis fija de irradiación en función de la potencia de la lámpara (W), la distancia de las células a la fuente de iluminación y del tiempo de irradiación. Dado que la distancia se mantiene fija, con las tapas de las placas retiradas, la variable que modificaremos para conseguir la dosis deseada será el tiempo de irradiación, según las calibraciones llevadas a cabo previamente por este equipo en otros trabajos ya publicados (32) a través del instrumento GENTEC[®] SOLO 2 y su detector UP[®]-K19 según las cuales:

Tiempo (segundos)	Dosis de irradiación (J/cm ²)
300 (5 min)	1,8
900 (15 min)	5,6
1800 (30 min)	11,8
2700 (45 min)	16,8

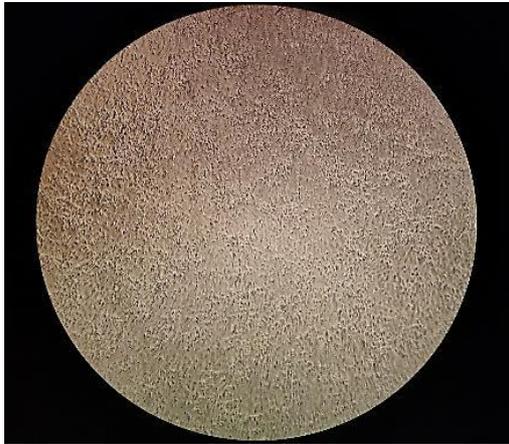
Tabla L. Equivalencias tiempo-irradiación para una distancia fija. (55)

En cultivo celular primario de fibroblastos humanos *in vitro*, utilizando la dosis de irradiación de 1,8 J/cm² se observó que se trataba de la mínima dosis de radiación UVB necesaria para producir la muerte celular en el 25% de células irradiadas pasadas 24h (Dosis Letal 25). Con la dosis de irradiación de 5,6 J/cm² se observó que se trataba de la mínima dosis de radiación UVB necesaria para producir la muerte celular en el 50% de células irradiadas (Dosis Letal 50). Para la dosis de irradiación de 11,8 J/cm² se observó que se trataba de la mínima dosis de radiación UVB necesaria para producir la muerte celular en el 70% de células irradiadas pasadas 24 h (Dosis Letal 70). Empleando la dosis de irradiación de 16,8 J/cm² se observó que se trataba de la mínima dosis de radiación UVB necesaria para producir la muerte celular en el 75% de células irradiadas (Dosis Letal 75) (32).

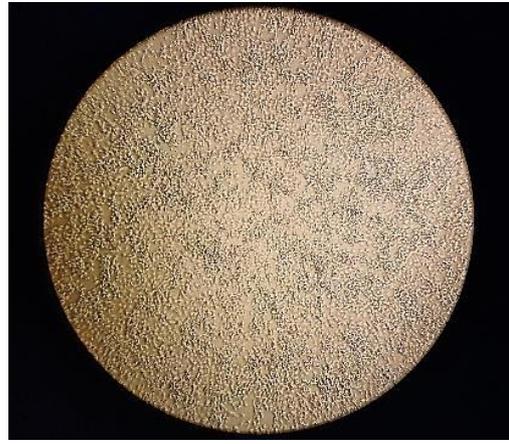
C.2.5.2. Pre-análisis en cultivo de queratinocitos y fibroblastos

Con objeto de ajustar todavía más la dosis óptima para esta línea de cultivo celular se realizó un pre-análisis en placas de 6 pocillos analizando la viabilidad celular de forma cualitativa a través del microscopio invertido de fluorescencia utilizando queratinocitos y fibroblastos. Tras cultivarse 48 h en placas de 6 pocillos con 1 ml de DMEM enriquecido se sometieron las células a 1,8 dosis cm² (5 minutos), 5,6 J/cm² (15 minutos) y 11,8 J/cm² (30 minutos) de radiación UVB. A las 24 h de la irradiación se analizaron las células con el microscopio hallándose la mayor tasa de viabilidad con 5 minutos y encontrando una gran mortalidad con 15 y 30 minutos, tanto en queratinocitos (figura 50) como en fibroblastos (figura 51):

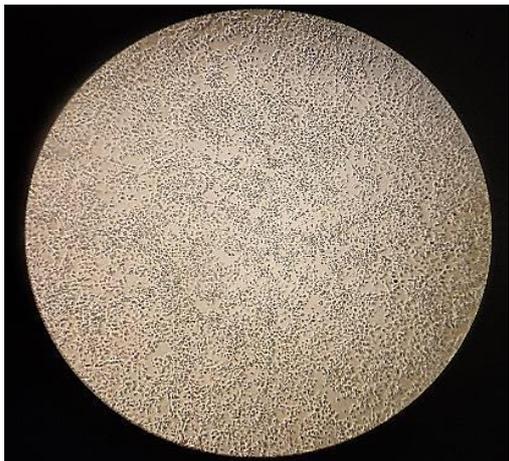
Queratinocitos HaCaT:



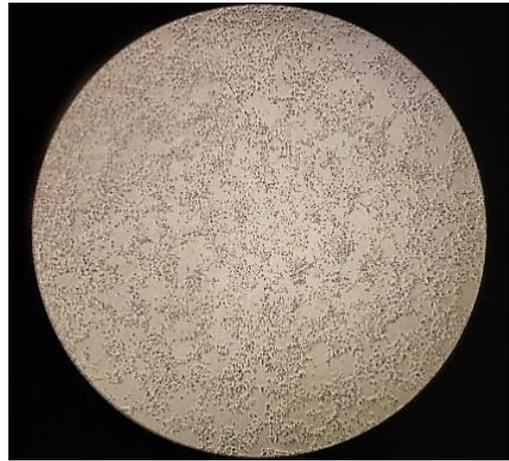
Control no irradiado 1,8 J/cm²



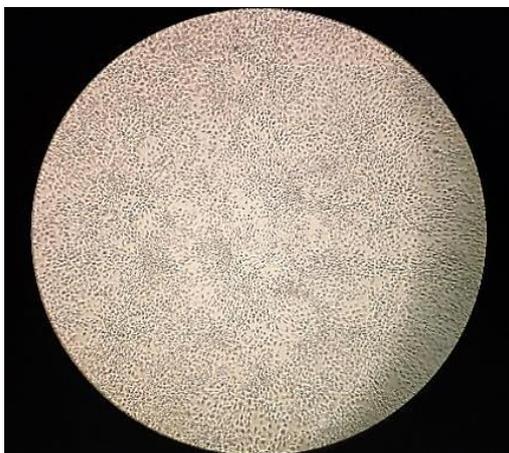
Irradiación 1,8 J/cm²



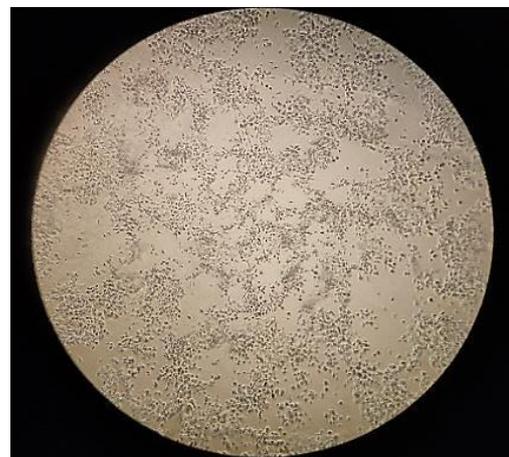
Control no irradiado 5,6 J/cm²



Irradiación 5,6 J/cm²



Control no irradiado 11,8 J/cm²



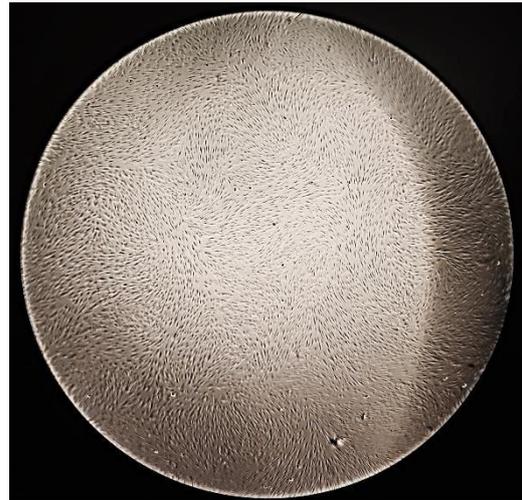
Irradiación 11,8 J/cm²

Figura 50. Efecto de la radiación UVB sobre la mortalidad celular en queratinocitos HaCaT.
Microscopio óptico a 4x (Fotografías del autor)

Fibroblastos Humanos:



Control no irradiado 1,8 J/cm²



Irradiación 1,8 J/cm²



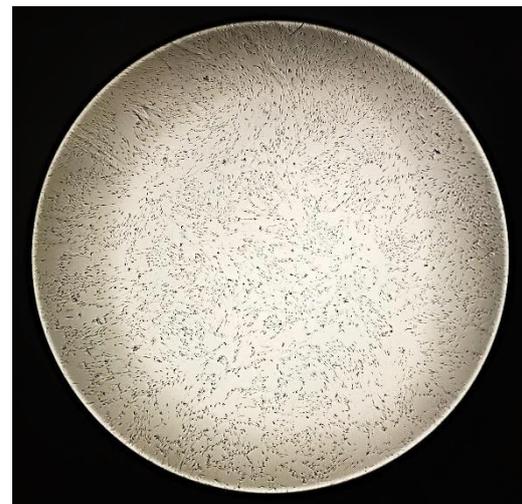
Control no irradiado 5,6 J/cm²



Irradiación 5,6 J/cm²



Control no irradiado 11,8 J/cm²



Irradiación 11,8 J/cm²

Figura 51. Efecto de la radiación UVB sobre la mortalidad celular en fibroblastos humanos. Microscopio óptico a 4x (Fotografías del autor)

C.2.5.3. Protocolo del experimento de irradiación. Experimento 2.

Partiendo de placas de 96 pocillos con queratinocitos humanos y fibroblastos humanos se ha realizado el experimento de irradiación según el siguiente protocolo (figura 52):

- Utilizando la mitad de columnas de la placa, y con ayuda de la pipeta multicanal de 8 canales de 1-10 μL , se añade a una columna de células el reactivo metformina a 5 μM y en otra a 5 mM. Del mismo modo, se añade en dos columnas distintas el reactivo resveratrol a concentraciones de 2,5 μM y 25 μM respectivamente. Se reserva 1 columna de pocillos como control con células sin reactivos. La columna externa se mantiene sin células y sin reactivos. Este proceso se reproduce de forma paralela en la otra mitad de la placa.
- Tras incubación con metformina o resveratrol durante 24 h las células, tras cubrir con papel de aluminio media placa (células control) y dejar descubierta la otra mitad paralela (células irradiadas), son expuestas a la lámpara UVB durante 300 seg ($1,8 \text{ J/cm}^2$), siendo una dosis de radiación cercana a DL25. (32)
- A las 24 h de la irradiación se procede a su análisis. Se añade 10 μL de WST-1 en cada pocillo, previamente diluido (1 ml de WST-1 en 9 ml de PBS, siguiendo el protocolo de la casa comercial) y se deja la placa incubar en la estufa durante 3 horas.
- 1ª Lectura: transcurridas 3 h en la estufa se procede a la lectura de la absorbancia del reactivo a 450 nm y 630 nm. Los resultados se expresan como % de proliferación celular (actividad de la deshidrogenasa mitocondrial) respecto a las células no tratadas con metformina o resveratrol (control) que no han sido irradiadas. Una vez realizada la 1ª lectura la placa vuelve a dejarse en la estufa.
- 2ª Lectura: transcurridas 72 h desde la irradiación, y de nuevo con ayuda de las pipetas multicanal, se recoge y se desecha el medio, se lavan los pocillos con PBS, y se vuelve a añadir 100 μL de DMEM completo y 10 μL de WST-1 por pocillo. Se incuba de nuevo en la estufa durante 3 h tras las cuales se realiza la segunda lectura a las mismas longitudes de onda.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V
B	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V
C	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V
D	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V
E	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V
F	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V
G	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V
H	V	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	C	5 μM	5 mM	2,5 μM	25 μM	V

Figura 52. Plantilla 1º del estudio de irradiación. En amarillo: Irradiación con 300". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control. (Figura del autor)

Tras examinar los resultados del experimento comentado previamente, siguiendo el mismo protocolo experimental, se ha completado el análisis utilizando la combinación de las dosis individuales óptimas de los reactivos metformina (5 μ M) y resveratrol (25 μ M) (figura 53).

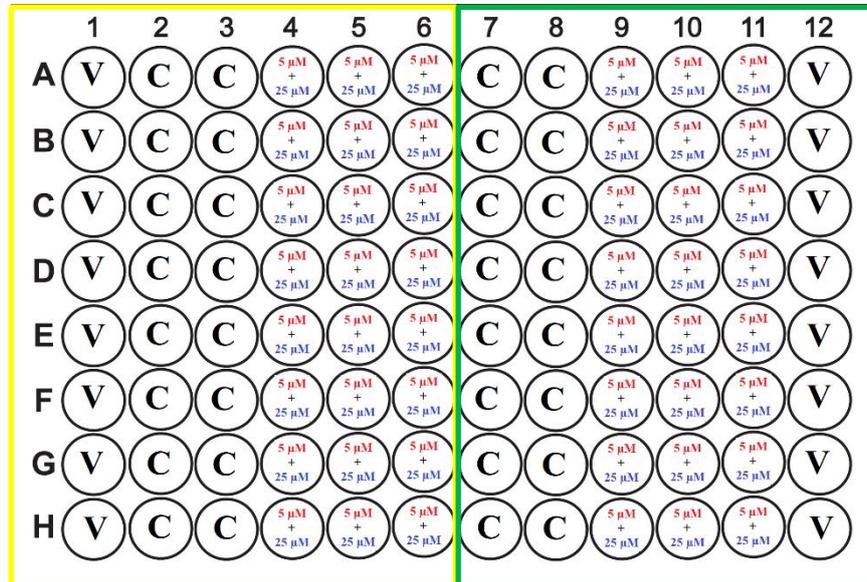


Figura 53. Plantilla 2º del estudio de irradiación. En amarillo: Irradiación con 300". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control. (Figura del autor)

C.2.10. Protocolo del experimento de viabilidad, apoptosis, necrosis y senescencia. Técnica APO5-Sen. Experimento 3.

Tras realizar y analizar los resultados del experimento 2, se procedió a la selección de las dosis óptimas de metformina y resveratrol para los estudios de citometría de imagen. Así pues, se seleccionaron concentraciones celulares finales de metformina 5 μM , resveratrol 25 μM , metformina 5 μM + resveratrol 25 μM . También se seleccionó metformina 5 mM, ya que la mayoría de trabajos en los que se había utilizado la metformina como antisenescente hasta la fecha se habían planteado con dosis milimolar. Por último, al igual que en el resto de trabajos también se reservaron pocillos con células, pero sin reactivo (control).

Los queratinocitos y fibroblastos en condiciones fisiológicas mantienen el citoplasma a pH de 7,2 y sus lisosomas a un pH alrededor de 4. La actividad beta galactosidasa asociada a senescencia (SA β -gal), la cual es objeto de estudio en la determinación de células senescentes, es posible detectarla gracias a una mayor actividad enzimática a un pH sub óptimo de 6 según Kurz y colaboradores, por ello procedemos a la alcalinización del pH lisosomal con carbonato de amonio (28) .

Para llevar a cabo los estudios de senescencia sobre células humanas y partiendo de placas de 12 pocillos se ha realizado el experimento según el siguiente protocolo (figura 54):

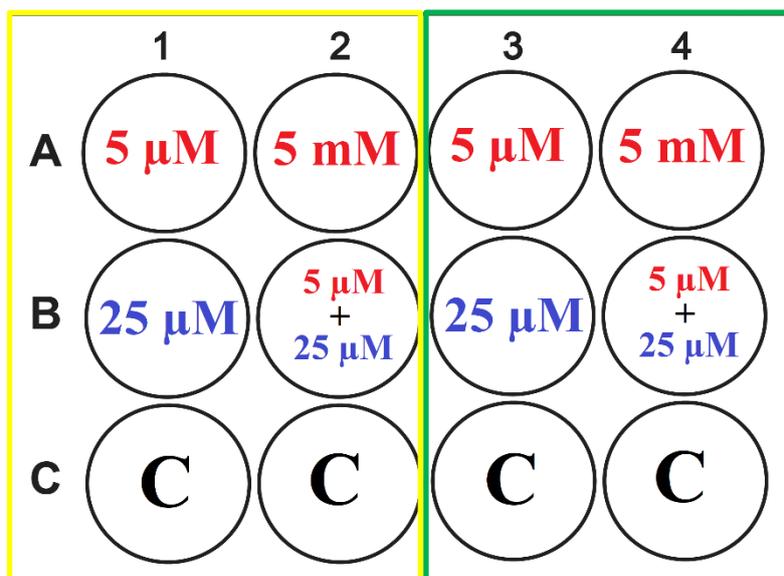


Figura 54. Plantilla del estudio de senescencia. En amarillo: Irradiación con 300". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. C: Control. (Figura del autor)

- Utilizando la mitad de columnas de la placa y con micropipetas de 2 μL y 200 μL se añade a la primera fila de células el reactivo metformina a concentraciones de 5 μM y 5 mM. Del mismo modo, se añade en la segunda fila el reactivo resveratrol a concentración de 25 μM así como la mezcla de ambos reactivos a concentraciones de metformina 5 μM en combinación con resveratrol 25 μM . Reservamos la tercera fila de pocillos como control sin reactivo. Este proceso se reproduce de forma paralela en la otra mitad de la placa.

- Tras incubación en la estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 96 h, cubrimos media placa con papel de aluminio (células control negativo) y dejamos descubierta la otra mitad (células irradiadas). Posteriormente irradiamos las células con la lámpara UVB durante 300 seg (1,8 J/cm²). (32)
- Transcurridas 72 h desde la irradiación y de acuerdo con lo publicado previamente en la literatura (269,273) diseñamos la segunda mitad del protocolo, para la determinación de la actividad β-Galactosidasa mediante citometría de imagen. Este protocolo queda dividido en tres pasos:

1. Alcalinización pH lisosomal

- Alcalinizar el pH lisosomal de las células con sal de carbonato de amonio NH₄CO₃ (P.M. = 79,06 g/mol) a una concentración *stock* 1 M (7,9 g de sal de carbonato de amonio en 100 mL de agua destilada). Para conseguir una concentración 20 mM en cada tubo (2 mL) habrá que añadir 40 µL de la concentración *stock* de sal [1 M]. Otros autores en lugar de carbonato de amonio han utilizado bafilomicina A1 (30) o cloruro de amonio (274) en lugar de carbonato de amonio.
- Incubar en la estufa durante 30 min a 37°C, bajando el CO₂ al 1% (en lugar del 5%) para conseguir un pH de 7.

2. Determinación de la actividad β-Galactosidasa asociada a senescencia (SA β-gal) mediante el reactivo C₁₂FDG capaz de atravesar la membrana celular.

- Preparar el reactivo C₁₂FDG en polvo para su uso en solución celular 2mM: disolver 2 mg de C₁₂FDG en 117 µL de DMSO, obteniendo una solución stock a concentración 20 mM. A continuación, habrá que diluir 100 µL de la solución en 900 µL de PBS para obtener la solución de trabajo 2 mM.

3. Ensayo (figura 55)

- Añadir a cada tubo 20 µL de C₁₂FDG a concentración 2 mM.
- Incubar en la estufa durante 1 hora y 15 minutos a 37°C.
- Añadir a cada tubo 5 µL de Anexina V con PE e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad
- Añadir a cada tubo 5 µL de DAPI 10 µM, agitar suavemente en el *vortex* e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Analizar los resultados con el citómetro de imagen AMNIS[®]. Se obtienen 5 tipos de poblaciones según la técnica APO 5: células vivas, células necróticas, células apoptóticas tempranas, células apoptóticas tardías, células necroptóticas. De entre las vivas se seleccionan la subpoblación de células senescentes (técnica APO5-Sen) (figura 64).

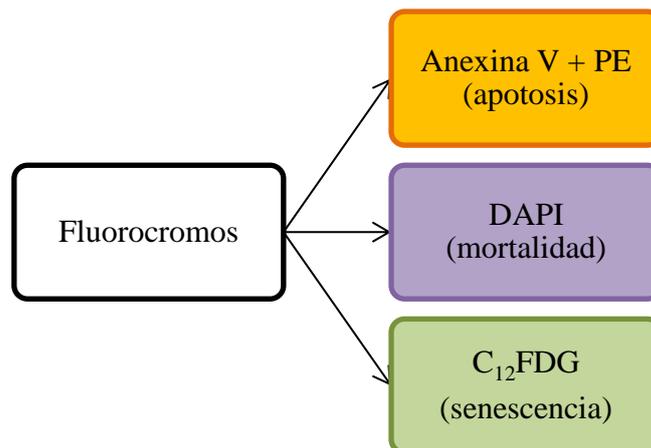


Figura 55. Fluorocromos para medir viabilidad, necrosis, apoptosis temprana, apoptosis tardía, necroptosis y senescencia. (Figura del autor)

4. Lectura con el citómetro de imagen AMNIS®

- Las longitudes de onda de excitación de los láseres son (figura 55):
 - Láser 375 nm a 10 mW: para excitar el DAPI.
 - Láser 488 nm a 50 mW: para excitar PE y C₁₂FDG.
 - Láser 785 nm a 5 mW: para medir complejidad celular (SSC).

- Para la determinación, deberemos configurar el equipo para capturar imágenes en los siguientes canales:
 - Canales 1 (430 nm - 440 nm) y 9 (570 nm - 595 nm): para medir el BF.
 - Canal 2 (480 nm - 560 nm): para recoger la señal del C₁₂FDG.
 - Canal 4 (595 nm - 660 nm): para recoger la señal de la PE.
 - Canal 6 (745nm - 800 nm): para medir complejidad celular: rugosidad celular, granulosis celular etc. (SSC).
 - Canal 7 (430 nm - 505 nm): para recoger la señal del DAPI.

- Secuencia de interpretación de diagramas obtenidos para el experimento 4 con el software IDEAS del citómetro de imagen AMNIS®, en la técnica APO 5-Sen:
 1. Selección de las células enfocadas de entre todos los cuerpos detectados por el citómetro de imagen durante la lectura de la muestra (figura 56)

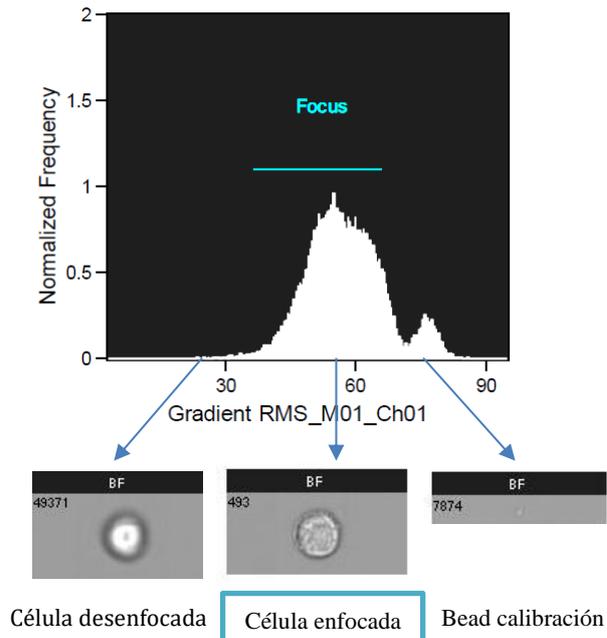


Figura 56. Histograma monoparamétrico de células enfocadas en queratinocitos HaCaT no irradiados. (Figura del autor)

2. De entre las células que previamente hemos acotado como enfocadas, seleccionamos las células individuales (figura 57)

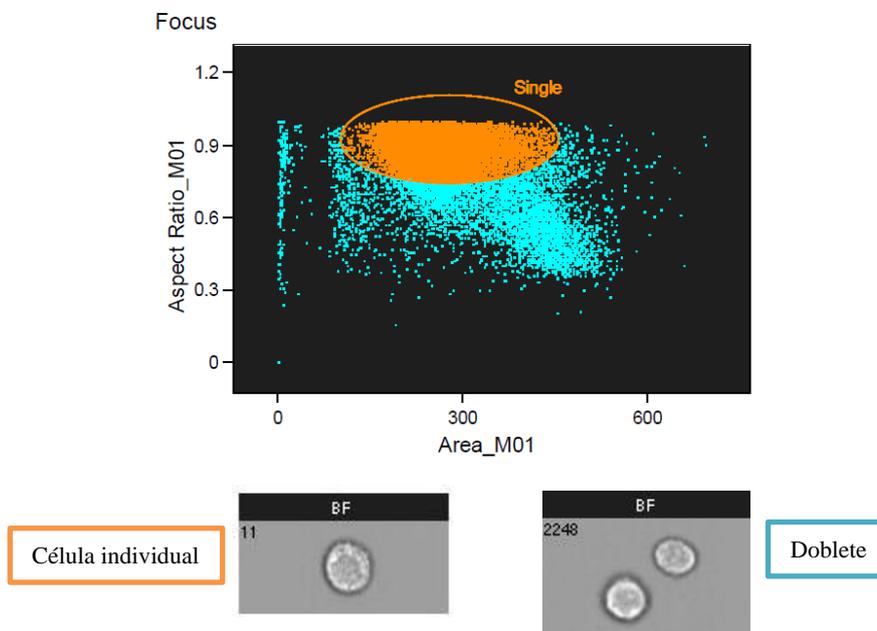


Figura 57. Histograma monoparamétrico de células individuales en queratinocitos HaCaT no irradiados. (Figura del autor)

- De entre las células enfocadas e individuales, seleccionamos las células íntegras (figura 58)

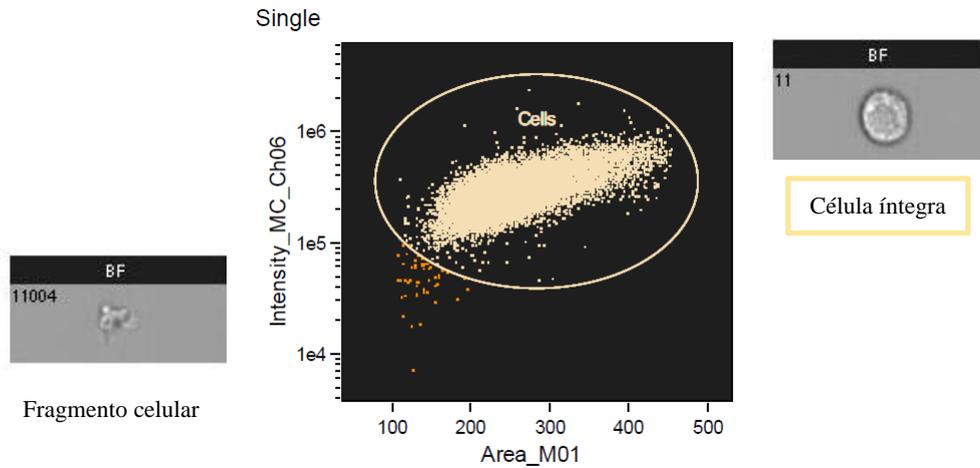


Figura 58. Histograma monoparamétrico de células redondas en queratinocitos HaCaT no irradiados. (Figura del autor)

- De entre las células enfocadas, individuales y redondas, diferenciamos las células que emiten fluorescencia nuclear con el fluorocromo DAPI de las que no emiten fluorescencia (figuras 55 y 59)

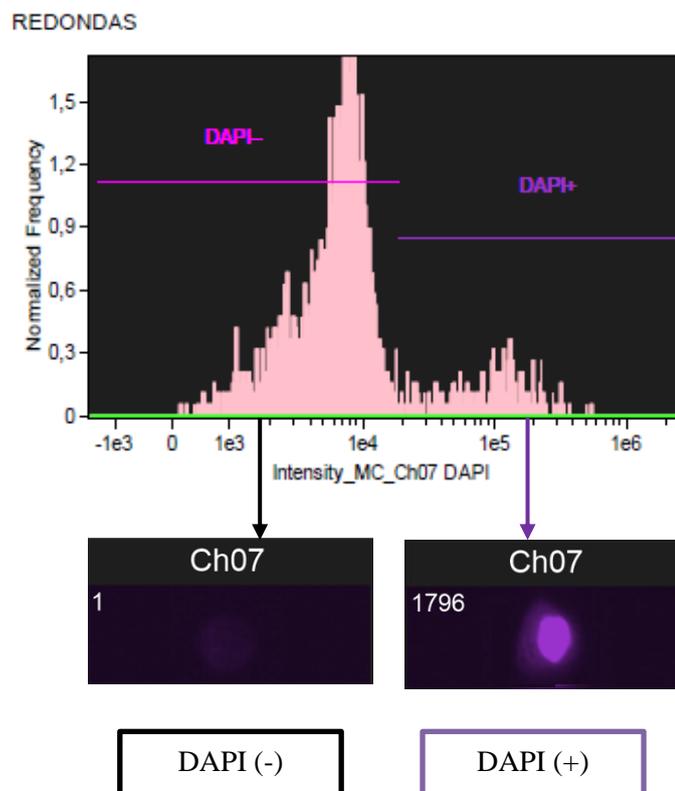


Figura 59. Histograma monoparamétrico de células muertas con DAPI en queratinocitos HaCaT no irradiados. (Figura del autor)

- De entre las células DAPI negativas diferenciamos aquellas que emiten fluorescencia con el fluorocromo PE de las que no lo hacen (figuras 55 y 60)

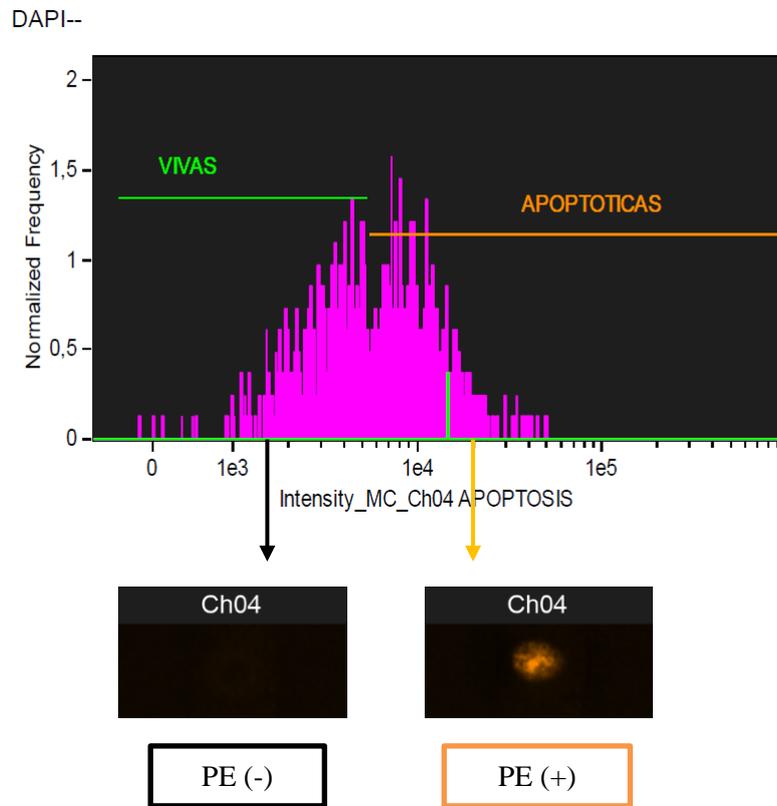


Figura 60. Histograma monoparamétrico de células apoptóticas con PE en queratinocitos HaCaT irradiados. (Figura del autor)

- Combinando los datos de ambos fluorocromos (DAPI y PE) en un histograma biparamétrico obtenemos 4 subpoblaciones: vivas, necróticas, apoptóticas tempranas y APO 5.

En la figura 61 se observa un histograma del citómetro de imagen AMNIS[®], de queratinocitos HaCaT irradiados, con doble tinción APO 5 utilizando anexina V con PE (apoptosis) + DAPI (células muertas). En el cuadrante inferior izquierdo se observan las células vivas (sin tinción). En el cuadrante inferior derecho las apoptóticas tempranas (anexina V con PE). En el cuadrante superior izquierdo se aprecian las necróticas (DAPI). En el cuadrante superior derecho las células que presentan doble tinción (anexina V con PE + DAPI).

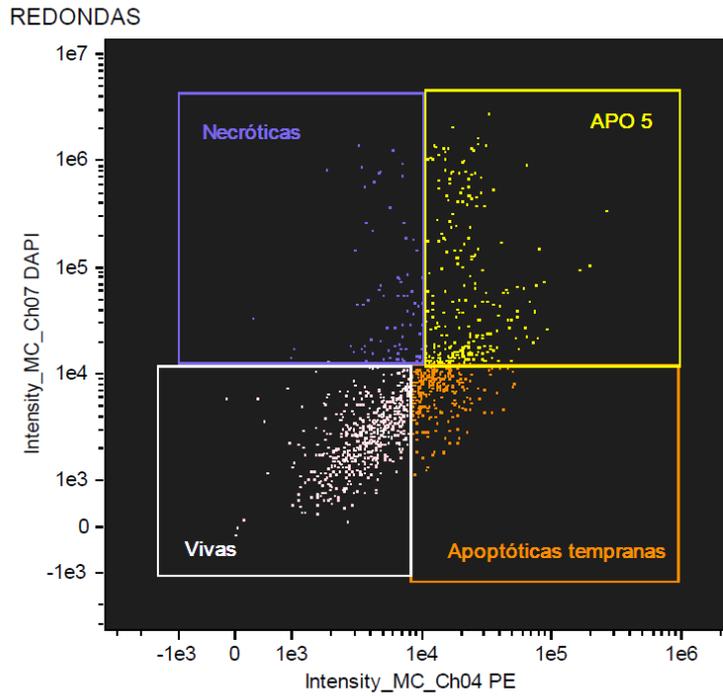


Figura 61. Histograma biparamétrico de queratinocitos irradiados con técnica APO 5. (Figura del autor)

7. A partir del histograma previo se analiza posteriormente el cuadrante superior derecho (APO 5= doble tinción PE+DAPI) en la figura 62 para diferenciar las células necroptóticas de las apoptóticas tardías según su morfología. Las necroptóticas tienen el núcleo entero y la membrana celular algo desestructurada, mientras que las apoptóticas tardías tienen el núcleo fragmentado y la membrana muy rota.

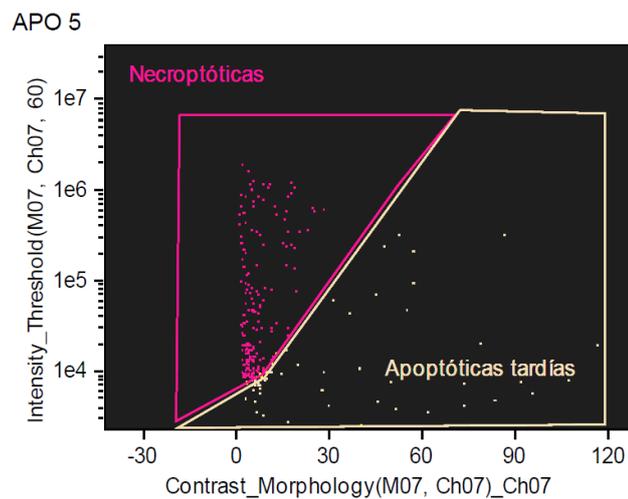


Figura 62. Histograma biparamétrico de queratinocitos irradiados para diferenciación de células apoptóticas tardías y necroptóticas según su morfología. (Figura del autor)

8. De entre las células vivas, selección de la subpoblación de células senescentes (fluorescencia verde con el fluorocromo C12-FDG) (figura 63)

VIVAS

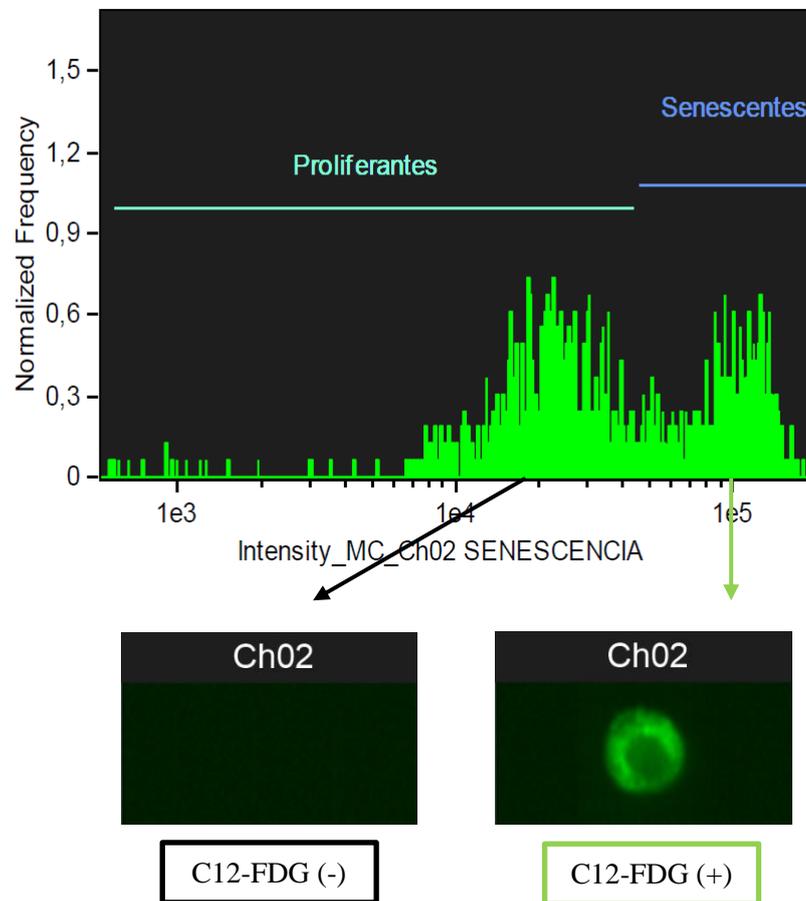


Figura 63. Histograma monoparamétrico de células senescentes con C12-FDG en queratinocitos HaCaT irradiados. (Figura del autor)

9. Caracterización de las subpoblaciones celulares combinando C12-FDG, DAPI y PE. En la figura 64 se observan fotografías de queratinocitos HaCaT y fibroblastos humanos analizados mediante citómetro de imagen AMNIS[®], utilizando la óptica con el objetivo de 40 aumentos. Para realizar el enfoque y fotografía de las células se han seleccionado en el citómetro los canales 1 (*brightfield* o campo claro), 2 (525 nm), 4 (560 nm) y 7 (360 nm):

Descripción de las subpoblaciones celulares combinando DAPI, PE y C12-FDG (APO 5-Sen)

- a. **Células vivas proliferantes:** presentan membrana celular y membrana nuclear integras. Se distingue la granulosidad celular. No muestran tinción con ningún fluorocromo.
- b. **Células apoptóticas tempranas:** la membrana celular comienza a dañarse mientras que la membrana nuclear permanece integra. La membrana celular muestra tinción positiva con anexina V + ficoeritrina (fluorescencia naranja en el canal 4). Tinción DAPI negativa (canal 7).
- c. **Células necroptóticas:** presentan doble tinción positiva, puesto que la membrana celular perforada se tiñe con anexina V + ficoeritrina (fluorescencia naranja en el canal 4) y aunque no presenta desestructuración nuclear, sí que presentan tinción del ADN con DAPI (fluorescencia azul-violeta en el canal 7).
- d. **Células apoptóticas tardías:** perforación de la membrana celular. Núcleo desestructurado. Presentan doble tinción porque la membrana celular perforada se tiñe con anexina V + ficoeritrina (fluorescencia naranja en el canal 4) y el núcleo desestructurado se tiñe con DAPI (fluorescencia azul-violeta en el canal 7).
- e. **Células necróticas:** membrana celular perforada, pero sin translocación de la fosfatidilserina desde la región interna a la externa (lado extracelular) de la membrana plasmática y por eso no presenta tinción con el fluorocromo anexina V + ficoeritrina. Tinción del ADN con DAPI (fluorescencia azul-violeta en el canal 7).
- f. **Células vivas senescentes:** Se determina la actividad de la enzima SA- β -Gal de los lisosomas teñida por el fluorocromo C₁₂-FDG (fluorescencia verde en el canal 2). Para el estudio de la senescencia en esta tesis doctoral se han seleccionado células vivas senescentes descartando aquellas que hubiesen iniciado procesos de apoptosis o necrosis (fluorescencia negativa en los canales 4 y 7 respectivamente).

Fotografías de las subpoblaciones celulares combinando DAPI, PE y C12-FDG (APO 5-Sen)

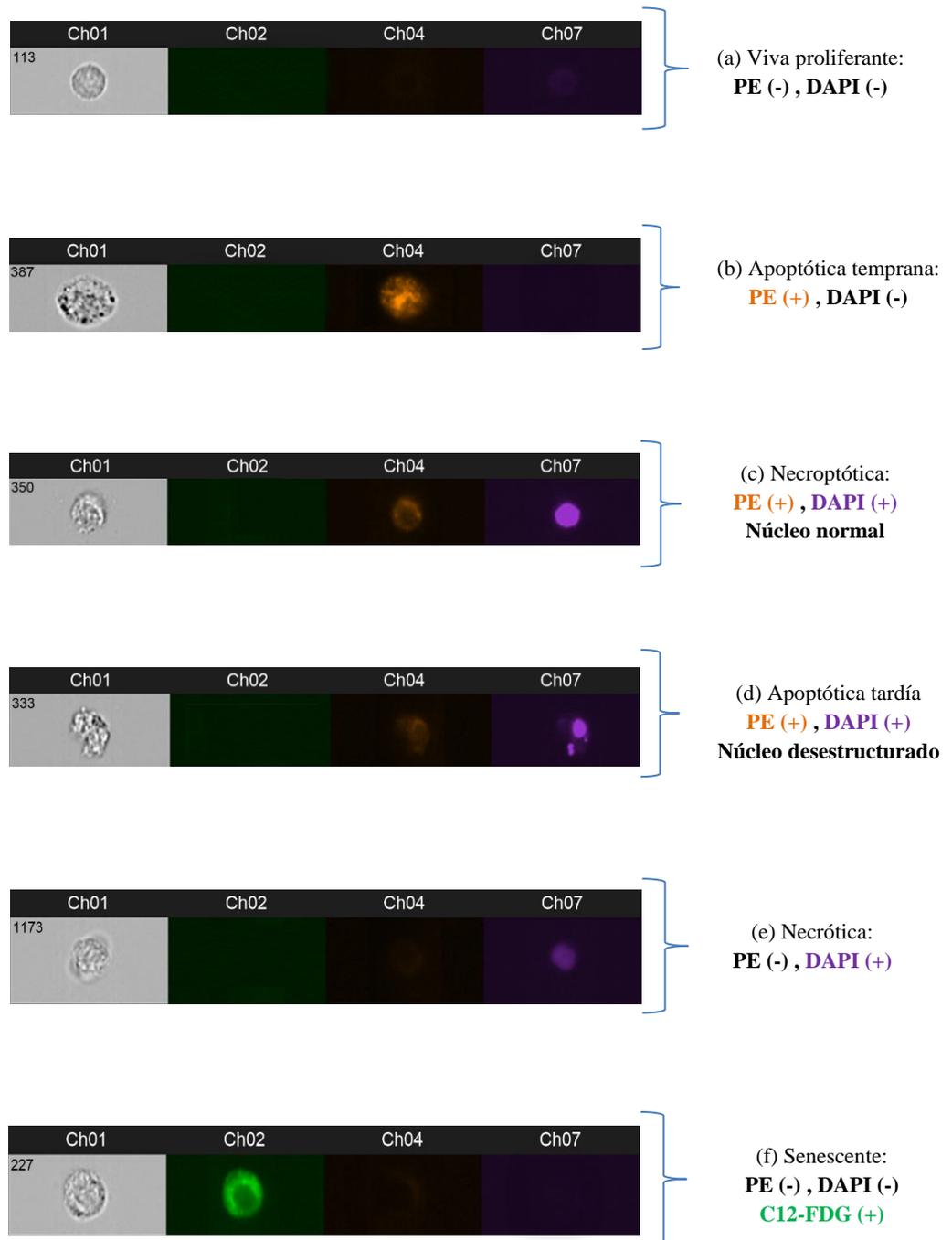


Figura 64. Células fotografiadas con el citómetro AMNIS®. Queratinocitos HaCaT. (a) Células vivas proliferantes. (b) Apoptóticas tempranas. (c) Necroptóticas. (d) Apoptóticas tardías. (e) Necróticas. (f) Senescentes. (Figura del autor)

C.2.11. Protocolo del experimento de producción del radical superóxido. Experimento 4.

El anión superóxido es uno de los principales indicadores del daño por estrés oxidativo. Para determinarlo usaremos HE, un fluorocromo que permite su medida mediante citometría de imagen.

Para llevar a cabo los estudios de producción de radicales libres sobre células humanas y partiendo de placas de 12 pocillos se ha realizado el experimento según el siguiente protocolo (figura 65):

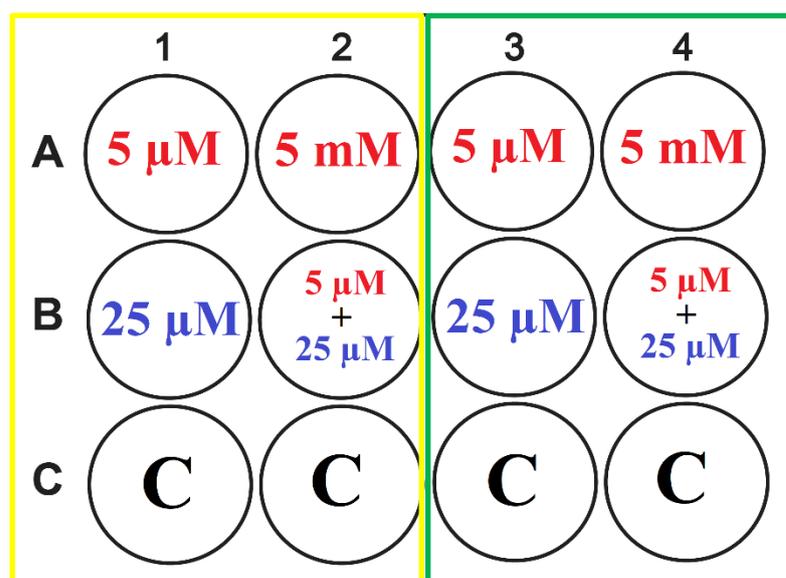


Figura 65. Plantilla del estudio de radicales libres. En amarillo: Irradiación con 900". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. C: Control. (Figura del autor)

- Utilizando la mitad de columnas de la placa y con micropipetas de 2 µL y 200 µL se añade a la primera fila de células el reactivo metformina a concentraciones de 5 µM y 5 mM. Del mismo modo, se añade en la segunda fila el reactivo resveratrol a concentración de 25 µM así como la mezcla de ambos reactivos a concentraciones de metformina 5 µM en combinación con resveratrol 25 µM. Reservamos la tercera fila de pocillos como control sin reactivo. Este proceso se reproduce de forma paralela en la otra mitad de la placa.
- Incubación de las células en la estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h.
- Las células aisladas del cultivo son resuspendidas en tubos *eppendorf* enrasando a un volumen de 200 µL.
- Partiendo de una dilución stock 1 mg/mL de HE en el disolvente DMSO, a cada tubo *Eppendorf* se añade el fluorocromo HE para llegar a una concentración final de 20 µM. Una vez incorporado en cada tubo, de forma individual, cada tubo *Eppendorf* es procesado de distinta forma en función si va a ser irradiado con UVB o no:

- Células no irradiadas: se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz visible, para proceder seguidamente a su lectura en el citómetro.
- Células irradiadas: se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz visible, en una cabina cerrada, con la lámpara UVB durante 900 seg ($5,6 \text{ J/cm}^2$), para proceder seguidamente a su lectura en el citómetro. Esta es una dosis de radiación cercana a DL50 (32). En este experimento no se estudió los subtipos de mortalidad ni la senescencia celular. Para disponer de una mayor diferencia en la sobreproducción de anión superóxido entre el grupo irradiado y no irradiado, que permitiese realizar una aproximación más precisa al estudio del efecto anti radical preventivo de la metformina y el resveratrol, las dosis de radiación UVB utilizadas en el presente experimento fueron superiores a las del experimento 3.
- Añadir a cada tubo $6 \mu\text{L}$ de DAPI $10 \mu\text{M}$
- Inmediatamente después, de acuerdo con lo publicado previamente en la literatura (275,276), se procede a la lectura mediante citometría de imagen. Las lecturas se realizaron durante un tiempo mínimo de 10 minutos para estudiar la evolución temporal en la producción celular del anión superóxido en células humanas. El fluorocromo HE emite en rojo (anión superóxido) y el DAPI en azul (mortalidad) (Figura 66).

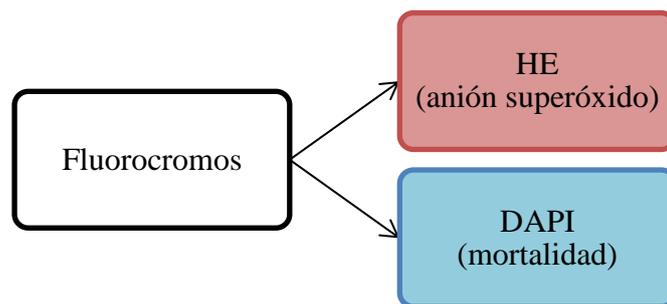


Figura 66. Fluorocromos para medir anión superóxido y mortalidad. (Figura del autor)

- Las longitudes de onda de excitación de los láseres son (figura 66):
 - Láser 375 nm a 10 mW: para excitar el DAPI.
 - Láser 488 nm a 50 mW: para excitar HE.
 - Láser 785 nm a 5 mW: para medir complejidad celular (SSC).
- Para la determinación, deberemos configurar el equipo para capturar imágenes en los siguientes canales:
 - Canales 1 (430 nm - 440 nm) y 9 (570 nm - 595 nm): para medir el BF.
 - Canal 5 (660 nm - 745 nm): para recoger la señal de la HE.
 - Canal 6 (745nm - 800 nm): para medir complejidad celular: rugosidad celular, granulosidad celular etc (SSC).
 - Canal 7 (430 nm - 505 nm): para recoger la señal del DAPI en cámara 2.

- Secuencia de interpretación de diagramas obtenidos para el experimento 4 con el software IDEAS del citómetro de imagen AMNIS®:
 1. Selección de las células enfocadas de entre todos los cuerpos detectados por el citómetro de imagen durante la lectura de la muestra (figura 56).
 2. De entre las células que previamente hemos acotado como enfocadas, seleccionamos las células individuales (figura 57).
 3. De entre las células enfocadas e individuales, seleccionamos las células íntegras (figura 58).
 4. Seleccionamos de células positivas para el fluorocromo HE de entre las células enfocadas, individuales y redondas (Figura 67)

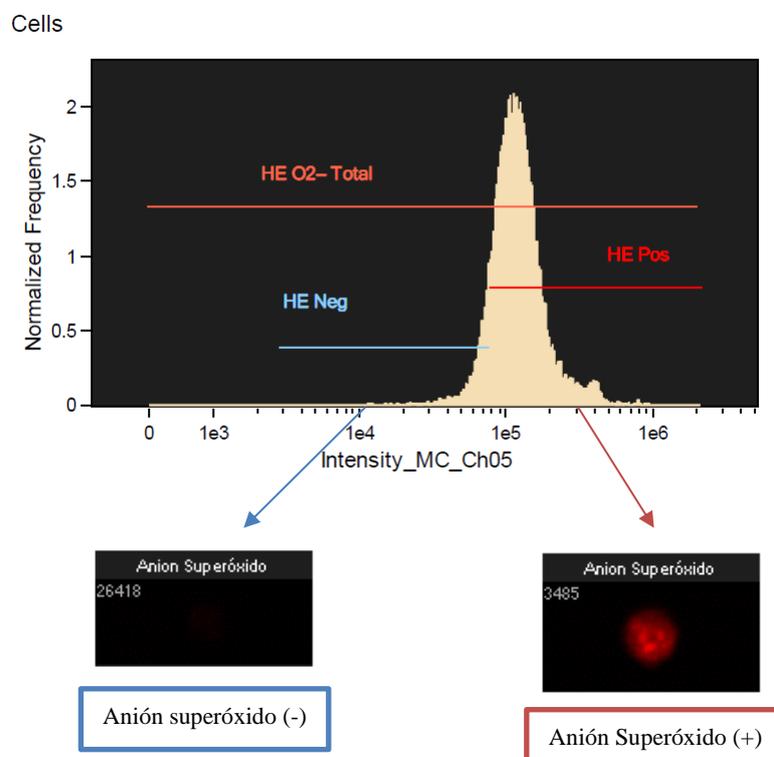


Figura 67. Histograma monoparamétrico de anión superóxido con HE en queratinocitos HaCaT irradiados. (Figura del autor)

- Selección de células muertas con tinción nuclear positiva para el fluorocromo DAPI de entre las células enfocadas, individuales y redondas (figura 68)

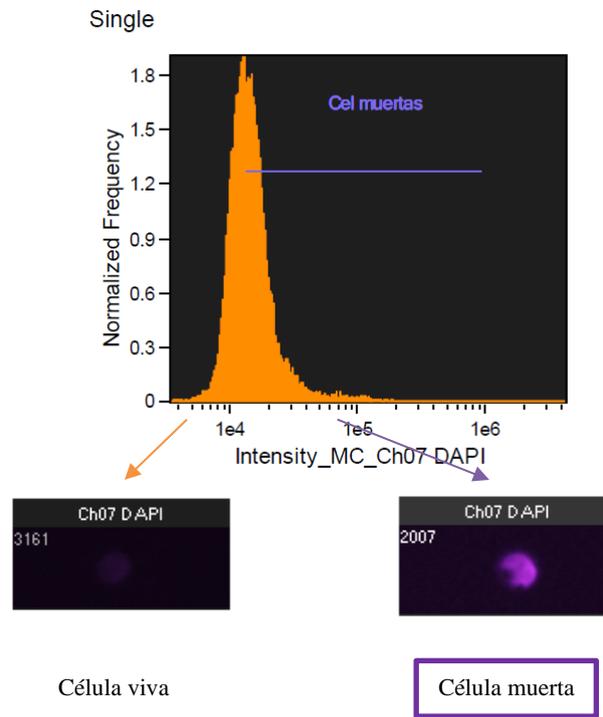


Figura 68. Histograma monoparamétrico de células muertas con DAPI en queratinocitos HaCaT irradiados. (Figura del autor)

- Caracterización de subpoblaciones celulares combinando HE y DAPI. Las células irradiadas vivas que produzcan radicales libres mostrarán una tinción roja en el canal 5 con el fluorocromo HE ya que presentarán una alta concentración de anión superóxido. Las células muertas mostrarán tinción nuclear en color violeta con el fluorocromo DAPI que será registrado en el canal 7 (figura 69).

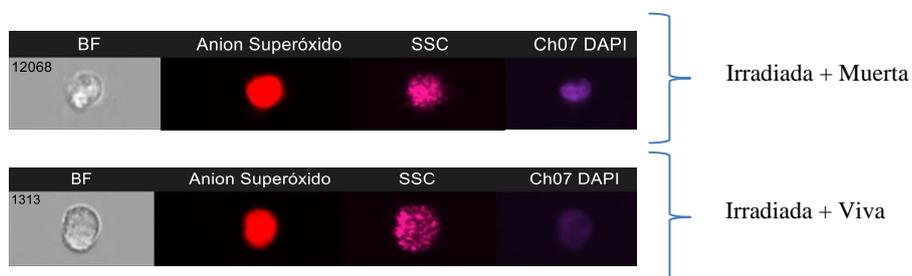


Figura 69. Células fotografiadas con el citómetro AMNIS®. Queratinocitos HaCaT irradiados (Figura del autor)

7. De entre las células vivas, selección de la subpoblación de células con producción de anión superóxido (fluorescencia roja con el fluorocromo HE).
8. Evolución de las unidades de fluorescencia arbitrarias registradas durante la lectura de la muestra en el canal 5 del citómetro de imagen para HE en células vivas (Figura 70).

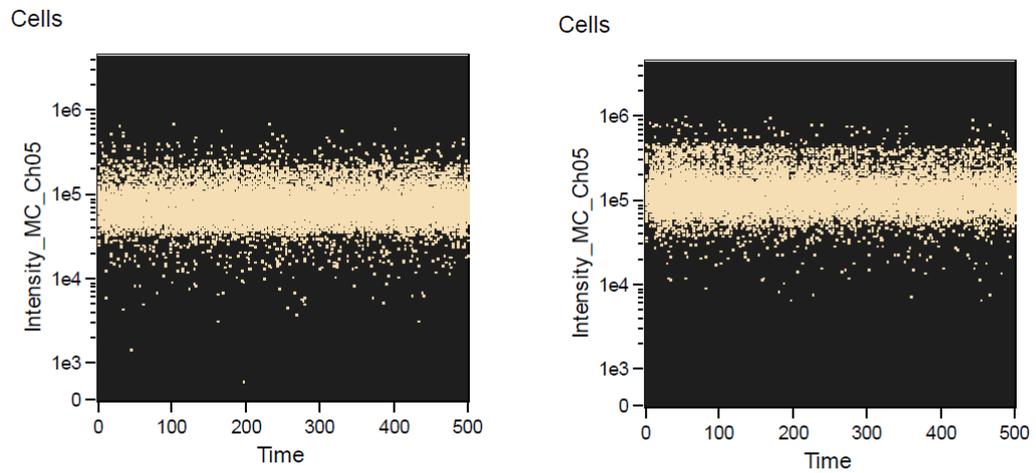


Figura 70. Histograma monoparamétrico de variación temporal en las UFA para el fluorocromo HE durante la lectura de la muestra en células vivas. En la izquierda queratinocitos HaCaT no irradiados. En la derecha HaCaT irradiados. (Figura del autor)

C.2.12. Protocolo del experimento de senolisis. Experimento 5.

Tras realizar y analizar los resultados del experimento 3, se estudió el efecto senolítico del resveratrol a concentraciones crecientes de 2,5 μM , 25 μM , 100 μM , 400 μM y 1,6 mM, evaluando simultáneamente la mortalidad y senescencia celular en queratinocitos y fibroblastos humanos, tras 72 horas de incubación en estufa con dicho reactivo. A diferencia del experimento 3, en el experimento 5 se ha estudiado el efecto del resveratrol, sobre la mortalidad y senescencia celular, únicamente en células no irradiadas.

Para llevar a cabo los estudios de senolisis sobre células humanas y partiendo de placas de 6 pocillos se ha realizado el experimento según el siguiente protocolo (figura 71):

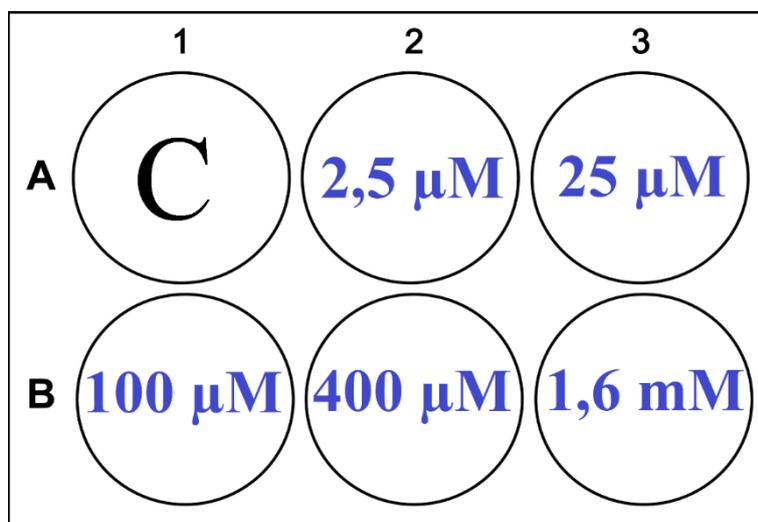


Figura 71. Plantilla del estudio de senolisis. En azul: [Resveratrol]. C: Control. (Figura del autor)

Tras 72 horas de incubación en estufa con el reactivo resveratrol a distintas concentraciones, se procedió a estudiar la viabilidad, mortalidad, apoptosis y senescencia mediante citometría de imagen, siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para el experimento 3.

C.3. Aspectos éticos

El proyecto se ha desarrollado siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.

El proyecto cuenta con el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad Autónoma de Aragón (CEICA), tras ser evaluada la propuesta de trabajo en su reunión del día 02/06/2021, Acta N° 11/2021 (Anexo K.1.) (página 285).

El autor declara no tener ningún conflicto de interés relativo al contenido e investigación para la realización de esta tesis doctoral.

D. Resultados

Los resultados se han dividido en cinco bloques de experimentos. En el primero se estudian los efectos de someter a las células a distintas concentraciones de reactivo. En el resto, utilizando las dosis de reactivo más beneficiosas del apartado anterior, se analizará el efecto de los reactivos sobre células irradiadas con UV.

D.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos

D.1.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

D.1.1.1. Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

En este primer experimento, como se puede observar en la figura 72, realizamos una evaluación del posible efecto de la metformina a concentraciones de 5 μ M, 1 mM, 2,5 mM y 5 mM sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos sin irradiar.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

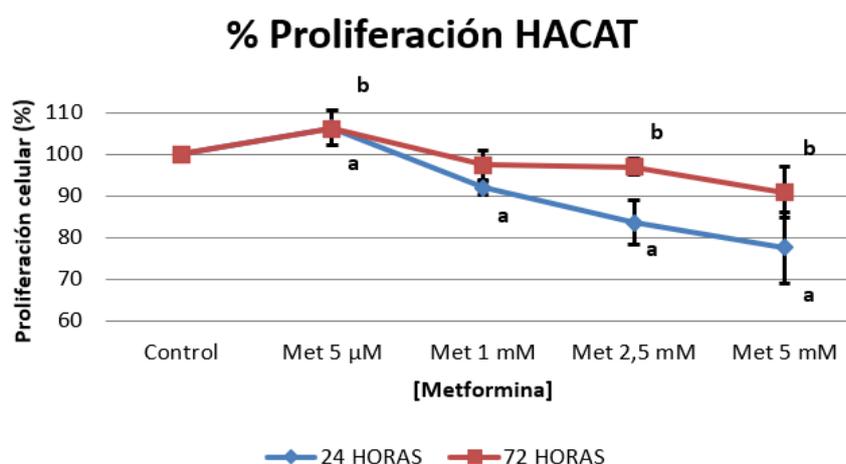


Figura 72. Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de metformina y su control sin reactivo a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de metformina y su control sin reactivo a las 72 horas ($p < 0,05$). No se realizó análisis estadístico comparativo entre dos mismas concentraciones de reactivo a las 24 y 72 horas puesto que en cada una de las líneas se consideró 100% a la proliferación celular de sus respectivos controles sin reactivo, siendo las absorbancias entre ambos controles distintas.

Tal y como se presenta en la figura 72, se observó un incremento de la proliferación celular, en cultivo celular de queratinocitos h μ M anos, tanto a las 24 horas (5 μ M = 106,17%) como a las 72 horas (5 μ M = 106,12%) post tratamiento con metformina 5 μ M, siendo las diferencias, respecto a su control sin reactivo, estadísticamente significativas tanto a las 24 horas como a las 72 horas post tratamiento.

Por lo que respecta a los queratinocitos humanos tratados con metformina a concentraciones mM, se observó un descenso de la proliferación celular de forma dosis-dependiente al incrementarse la concentración de metformina en el medio celular tanto a 24 horas (línea azul) (1 mM= 91,95%, 2,5 mM= 83,54% y 5 mM= 77,52%) como a las 72 horas (línea roja) (1 mM= 97,33%, 2,5 mM= 96,97% y 5 mM= 90,84%) tras añadir el reactivo al medio, siendo en todos los puntos las diferencias, con respecto a sus controles sin reactivo, estadísticamente significativas, a excepción del punto metformina 1 mM a las 72 horas post tratamiento.

El descenso dosis-dependiente de proliferación celular a las 24 horas fue más pronunciado que a las 72 horas en las tres distintas concentraciones de metformina a dosis mM.

72 HORAS						
	VACIO	Met 5 uM	Met 1 mM	Met 2,5 mM	Met 5 mM	CONTROL
	1	2	3	4	5	6
A	0,054	0,865	0,79	0,804	0,788	0,851
B	0,053	0,87	0,842	0,82	0,805	0,842
C	0,053	0,858	0,847	0,844	0,793	0,847
D	0,054	0,861	0,811	0,819	0,791	0,849
E	0,052	0,866	0,873	0,786	0,771	0,847
F	0,052	0,869	0,876	0,807	0,801	0,844
G	0,052	0,855	0,862	0,812	0,821	0,842
H	0,052	0,866	0,816	0,794	0,804	0,832
	VACIO	Met 5 uM	Met 1 mM	Met 2,5 mM	Met 5 mM	CONTROL
	1	2	3	4	5	6
A	0,048	0,078	0,072	0,068	0,065	0,062
B	0,047	0,073	0,069	0,07	0,073	0,07
C	0,047	0,073	0,074	0,069	0,073	0,069
D	0,048	0,076	0,071	0,07	0,069	0,068
E	0,047	0,075	0,071	0,07	0,069	0,068
F	0,046	0,071	0,07	0,066	0,069	0,072
G	0,047	0,067	0,066	0,067	0,072	0,066
H	0,046	0,075	0,068	0,067	0,073	0,062

Tabla LI. Datos primarios de proliferación celular en queratinocitos HaCaT, obtenidos tras lectura en espectrofotómetro de microplacas utilizando el reactivo WST-1, a las 72 horas de añadir la metformina en el medio celular. Las lecturas se realizaron a 450 nm (filas A-H superiores) y a 630 nm (filas A-H inferiores). Cada celda de la tabla representa un pocillo de la placa de cultivo celular de 96 pocillos. Se aprecia una disminución dosis dependiente de la absorbancia a 450 nm, siendo la absorbancia de la metformina a dosis micromolar (columna 2) superior a la metformina a dosis milimolar (columnas 3,4,5).

D.1.1.2. Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

En este apartado, siguiendo el mismo protocolo que en el apartado anterior, realizamos una evaluación del posible efecto del resveratrol a concentraciones de 2,5 μM , 10 μM y 25 μM sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos sin irradiar, tal y como vemos en la figura 73.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

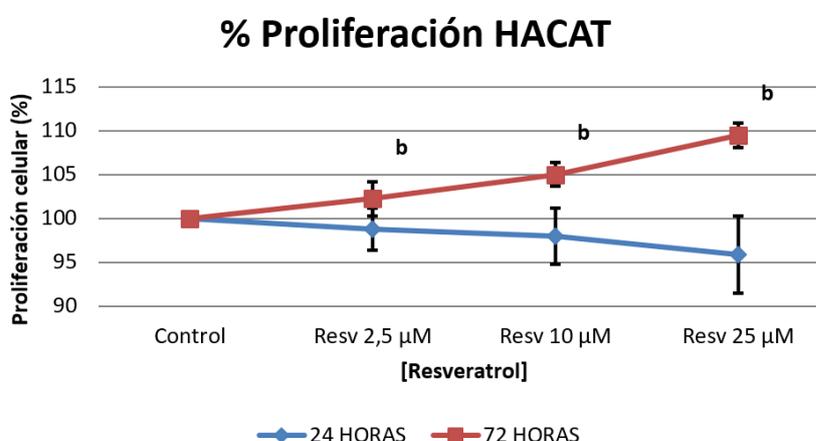


Figura 73. Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo a las 72 horas ($p < 0,05$). No se realizó análisis estadístico comparativo entre dos mismas concentraciones de reactivo a las 24 y 72 horas puesto que en cada una de las líneas se consideró 100% a la proliferación celular de sus respectivos controles sin reactivo, siendo las absorbancias entre ambos controles distintas.

En la figura 73 se puede ver como a las 24 horas tras añadir resveratrol al medio de cultivo se produjo un descenso dosis-dependiente en la proliferación de los queratinocitos humanos (2,5 μM = 98,79%, 10 μM = 97,98%, 25 μM = 95,88%) aunque en las tres distintas concentraciones, las diferencias de proliferación con respecto a su control sin reactivo no fueron estadísticamente significativas.

A las 72 horas de añadir el reactivo al medio de cultivo se observó un incremento dosis-dependiente en la proliferación celular (2,5 μM = 102,27%, 10 μM = 105,03%, 25 μM = 109,49%) y en las tres distintas concentraciones, las diferencias de proliferación con respecto a su control sin reactivo fueron estadísticamente significativas.

D.1.1.3. Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

Para la realización de este apartado, tras analizar los resultados de los dos experimentos anteriores, se seleccionó las dos concentraciones individuales de metformina y resveratrol que producían mayor incremento en la proliferación celular de queratinocitos humanos *in vitro* a las 72 horas post tratamiento. Con todo ello se evaluó el efecto combinado de las dosis óptimas de metformina (5 μ M) y resveratrol (25 μ M) sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos sin irradiar, tal y como vemos en la figura 74.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

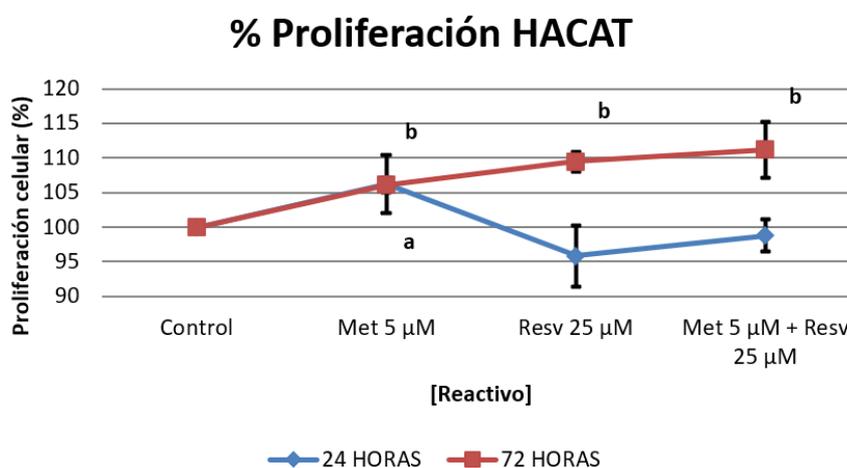


Figura 74. Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo a las 72 horas ($p < 0,05$). No se realizó análisis estadístico comparativo entre dos mismas concentraciones de reactivo a las 24 y 72 horas puesto que en cada una de las líneas se consideró 100% a la proliferación celular de sus respectivos controles sin reactivo, siendo las absorbancias entre ambos controles distintas.

A las 24 horas post tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular de queratinocitos humanos *in vitro* con respecto a su control sin reactivo. A las 24 horas post tratamiento, tampoco se evidenciaron diferencias de proliferación celular estadísticamente significativas entre el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M = 98,79%) y el reactivo resveratrol 25 μ M aislado (Resv 25 μ M = 95,88%). La proliferación celular 24 horas tras el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M) fue inferior a la observada con metformina 5 μ M (Met 5 μ M = 106,17%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 74).

A las 72 horas post tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), se evidenció un incremento de la proliferación celular de queratinocitos humanos *in vitro* con respecto a su control sin reactivo, siendo las diferencias estadísticamente significativas. A las 72 horas post tratamiento, aunque el incremento en la proliferación celular con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M = 111,21%) fue superior al observado con los reactivos aislados metformina (Met 5 μ M = 106,12%) y resveratrol (Resv 25 μ M = 109,49%), las diferencias de proliferación observadas entre el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M) y cada uno de los reactivos, metformina 5 μ M y resveratrol 25 μ M, por separado no fueron estadísticamente significativas.

D.1.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

D.1.2.1. Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

En este primer experimento, como se puede observar en la figura 75, realizamos una evaluación del posible efecto de la metformina a concentraciones de 5 μ M, 1 mM, 2,5 mM y 5 mM sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos sin irradiar.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

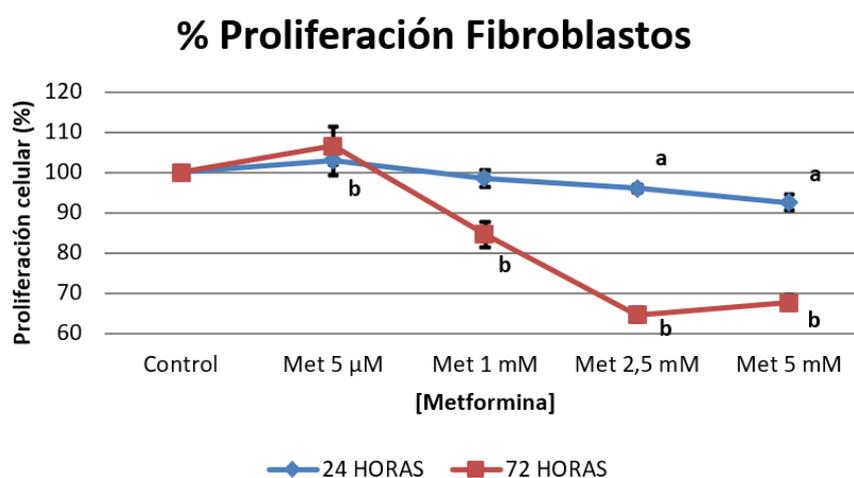


Figura 75. Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de metformina y su control sin reactivo a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de metformina y su control sin reactivo a las 72 horas ($p < 0,05$). No se realizó análisis estadístico comparativo entre dos mismas concentraciones de reactivo a las 24 y 72 horas puesto que en cada una de las líneas se consideró 100% a la proliferación celular de sus respectivos controles sin reactivo, siendo las absorbancias entre ambos controles distintas.

En la figura 75 se observó un incremento de la proliferación celular, en cultivo celular primario de fibroblastos humanos, tanto a las 24 horas (5 μ M = 103,11%) como a las 72 horas (5 μ M = 106,64%) post tratamiento con metformina 5 μ M, aunque las diferencias, respecto a su control si reactivo, fueron estadísticamente significativas únicamente a las 72 horas post tratamiento.

Por lo que respecta a los fibroblastos humanos tratados con metformina a concentraciones mM, se observó un descenso de la proliferación celular de forma dosis-dependiente al incrementarse la concentración de metformina en el medio celular tanto a 24 horas (línea azul) (1 mM= 98,56%, 2,5 mM= 96,01% y 5 mM= 92,50%) como a las 72 horas (línea roja) (1 mM= 84,56%, 2,5 mM= 64,61% y 5 mM= 67,66%) tras añadir el reactivo al medio, siendo en todos los puntos las diferencias, con respecto a sus controles sin reactivo, estadísticamente significativas, a excepción del punto metformina 1 mM a las 24 horas post tratamiento.

El descenso dosis-dependiente de proliferación celular a las 72 horas fue más pronunciado que a las 24 horas en las tres distintas concentraciones de metformina a dosis mM.

D.1.2.2. Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

En este apartado, siguiendo el mismo protocolo que en el apartado anterior, realizamos una evaluación del posible efecto del resveratrol a concentraciones de 2,5 μM , 10 μM y 25 μM sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos sin irradiar, tal y como vemos en la figura 76.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

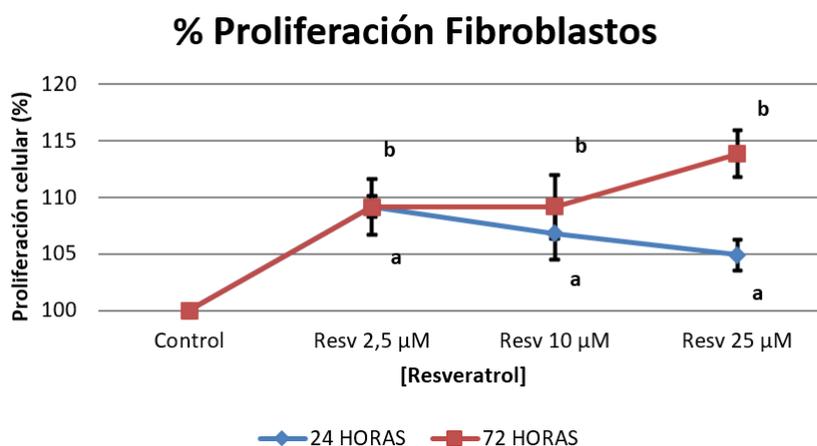


Figura 76. Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo a las 72 horas ($p < 0,05$). No se realizó análisis estadístico comparativo entre dos mismas concentraciones de reactivo a las 24 y 72 horas puesto que en cada una de las líneas se consideró 100% a la proliferación celular de sus respectivos controles sin reactivo, siendo las absorbancias entre ambos controles distintas.

En la figura 76 se puede ver como a las 24 horas tras añadir resveratrol al medio de cultivo se produce un incremento en la proliferación de los fibroblastos humanos (2,5 μM = 109,19%, 10 μM = 106,81%, 25 μM = 104,94%) y que en las tres distintas concentraciones, las diferencias de proliferación con respecto a su control sin reactivo son estadísticamente significativas.

A las 72 horas de añadir el reactivo al medio de cultivo también se aprecia un aumento en la proliferación celular (2,5 μM = 109,15%, 10 μM = 109,21%, 25 μM = 113,86%) y en las tres distintas concentraciones, las diferencias de proliferación con respecto a su control sin reactivo son estadísticamente significativas.

D.1.2.3. Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

Para la realización de este apartado, tras analizar los resultados de los dos experimentos anteriores, se seleccionó las dos concentraciones individuales de metformina y resveratrol que producían mayor incremento en la proliferación celular de fibroblastos humanos *in vitro* a las 72 horas post tratamiento. Con todo ello se evaluó el efecto combinado de las dosis óptimas de metformina (5 μ M) y resveratrol (25 μ M) sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos sin irradiar, tal y como vemos en la figura 77.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

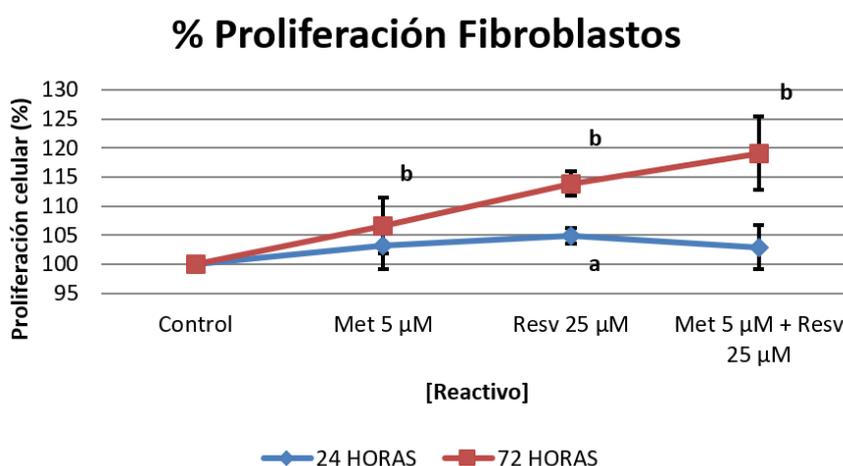


Figura 77. Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo a las 72 horas ($p < 0,05$). No se realizó análisis estadístico comparativo entre dos mismas concentraciones de reactivo a las 24 y 72 horas puesto que en cada una de las líneas se consideró 100% a la proliferación celular de sus respectivos controles sin reactivo, siendo las absorbancias entre ambos controles distintas.

A las 24 horas post tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular de fibroblastos humanos *in vitro* con respecto a su control sin reactivo. A las 24 horas post tratamiento, tampoco se evidenciaron diferencias de proliferación celular estadísticamente significativas entre el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M = 102,91%) y ambos reactivos por separado (Met 5 μ M = 103,11%, Resv 25 μ M = 104,94%) (Figura 77).

A las 72 horas post tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), se evidenció un incremento de la proliferación celular de fibroblastos humanos *in vitro* con respecto a su control sin reactivo, siendo las diferencias estadísticamente significativas. A las 72 horas post tratamiento, aunque el incremento en la proliferación celular con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M = 119,09%) fue superior al observado con los reactivos aislados metformina (Met 5 μ M = 106,64%) y resveratrol (Resv 25 μ M = 113,86%), las diferencias únicamente fueron estadísticamente significativas entre el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M) y el reactivo metformina 5 μ M aislado.

D.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB

D.2.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB

D.2.1.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos 24 horas post irradiación con UVB

Con este experimento, resumido gráficamente en la tabla LII y figura 78, cuantificamos el posible efecto beneficioso de la metformina a concentraciones de 5 μM y 5 mM, del resveratrol a concentraciones de 2,5 μM y 25 μM y del tratamiento combinado (Met 5 μM + Resv 25 μM) sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos a las 24 horas post irradiación con una dosis única de 1,8 J/cm² de UVB.

Para la realización de este experimento, se realizaron dos fases. En una primera fase se evaluó el efecto beneficioso del tratamiento con metformina o resveratrol aislados previo a la irradiación con UVB. En una segunda fase se seleccionó las dos concentraciones individuales de metformina y resveratrol que producían un mayor incremento en la proliferación celular de queratinocitos humanos *in vitro* a las 24 horas post irradiación para estudiar posibles efectos beneficiosos del tratamiento combinado sobre la proliferación celular en queratinocitos irradiados. Para cada una de ambas fases se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

24 HORAS												
	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO
	VACIO	CONTROL	Met 5 μM	Met 5 mM	Resv 2'5 μM	Resv 25 μM	CONTROL	Met 5 μM	Met 5 mM	Resv 2'5 μM	Resv 25 μM	VACIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,062	0,188	0,229	0,278	0,26	0,307	0,528	0,505	0,384	0,528	0,522	0,054
B	0,068	0,361	0,382	0,312	0,383	0,327	0,72	0,693	0,424	0,76	0,717	0,057
C	0,063	0,363	0,378	0,321	0,391	0,347	0,712	0,679	0,416	0,743	0,718	0,053
D	0,053	0,381	0,388	0,328	0,409	0,399	0,711	0,7	0,43	0,75	0,725	0,057
E	0,051	0,343	0,386	0,317	0,388	0,384	0,728	0,717	0,425	0,752	0,72	0,053
F	0,055	0,309	0,343	0,323	0,371	0,356	0,721	0,725	0,446	0,743	0,703	0,052
G	0,054	0,275	0,336	0,305	0,319	0,341	0,707	0,692	0,422	0,747	0,705	0,054
H	0,052	0,148	0,175	0,16	0,178	0,303	0,439	0,416	0,331	0,44	0,422	0,057
	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	IRRADIADO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO	ALUMINIO
	VACIO	CONTROL	Met 5 μM	Met 5 mM	Resv 2'5 μM	Resv 25 μM	CONTROL	Met 5 μM	Met 5 mM	Resv 2'5 μM	Resv 25 μM	VACIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,054	0,063	0,067	0,065	0,074	0,079	0,059	0,06	0,066	0,064	0,111	0,049
B	0,063	0,078	0,077	0,061	0,08	0,082	0,066	0,062	0,064	0,066	0,065	0,05
C	0,056	0,074	0,073	0,058	0,078	0,075	0,06	0,063	0,057	0,062	0,067	0,047
D	0,049	0,078	0,072	0,062	0,076	0,076	0,06	0,059	0,056	0,063	0,066	0,049
E	0,047	0,074	0,077	0,057	0,074	0,082	0,06	0,063	0,059	0,065	0,067	0,047
F	0,049	0,074	0,072	0,058	0,078	0,081	0,062	0,062	0,057	0,065	0,069	0,047
G	0,049	0,08	0,078	0,063	0,078	0,078	0,066	0,061	0,063	0,067	0,067	0,049
H	0,046	0,058	0,064	0,063	0,064	0,133	0,061	0,06	0,061	0,063	0,12	0,052

Tabla LII. Datos primarios de proliferación celular en queratinocitos HaCaT, obtenidos tras lectura en espectrofotómetro de microplacas utilizando el reactivo WST-1, a las 24 horas post irradiación con UVB. Las lecturas se realizaron a 450 nm (filas A-H superiores) y a 630 nm (filas A-H inferiores). Cada celda de la tabla representa un pocillo de la placa de cultivo celular de 96 pocillos. En las 5 columnas donde los queratinocitos HACAT han sido irradiados (columna 2-6) se aprecia una menor absorbancia a 450 nm con respecto a las 5 columnas donde los queratinocitos no han sido irradiados tras haber sido cubiertos con papel de aluminio (columna 7-11).

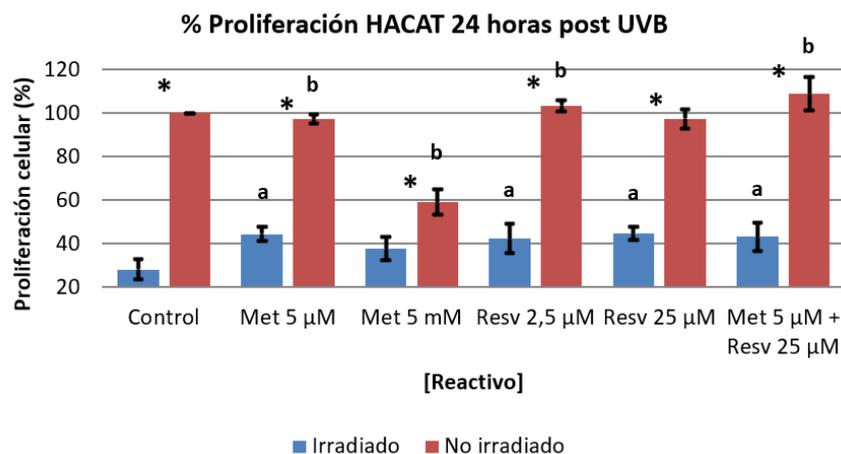


Figura 78. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos 24 horas post irradiación con UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$). (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas, a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas, a las 24 horas ($p < 0,05$).

El primer aspecto a destacar es que con esta dosis única de $1,8 \text{ J/cm}^2$ de UVB las diferencias de proliferación celular a las 24 horas post irradiación entre queratinocitos sin reactivo no irradiados (100%) y queratinocitos sin reactivo irradiados (28,23%) fueron estadísticamente significativas.

En las 5 barras donde las células con reactivo son irradiadas (barras azules), a las 24 horas post UVB se apreciaron incrementos relativos de la proliferación celular con respecto al control sin reactivo irradiado del 16,26% con la metformina $5 \mu\text{M}$, 9,59% con la metformina a 5 mM , 14,22% con el resveratrol a $2,5 \mu\text{M}$, 16,49% con el resveratrol a $25 \mu\text{M}$ y 15,01% con el tratamiento combinado (Met $5 \mu\text{M}$ + Resv $25 \mu\text{M}$). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos excepto para la metformina 5 mM .

En las 5 barras donde las células con reactivo no fueron irradiadas (barras rojas), se apreciaron disminuciones relativas de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 2,71% con la metformina $5 \mu\text{M}$, del 40,81% con la metformina a 5 mM . y del 2,62% con el resveratrol $25 \mu\text{M}$. Por el contrario, se observaron incrementos relativos de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 3,35% con el resveratrol $2,5 \mu\text{M}$ y del 8,91% con el tratamiento combinado (Met $5 \mu\text{M}$ + Resv $25 \mu\text{M}$). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos excepto para el resveratrol $25 \mu\text{M}$.

A las 24 horas post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto entre la proliferación celular en queratinocitos con metformina irradiados (barra azul) (Met $5 \mu\text{M}$ =44,49%, Met 5 mM =37,81%) y con metformina sin irradiar (barra roja) (Met $5 \mu\text{M}$ =97,29%, Met 5 mM =59,19%), como entre la proliferación celular en queratinocitos con resveratrol irradiados (barra azul) (Resv $2,5 \mu\text{M}$ = 42,45% y Resv $25 \mu\text{M}$ = 44,71%) y con resveratrol sin irradiar (barra roja) (Resv $2,5 \mu\text{M}$ = 103,35% y Resv $25 \mu\text{M}$ = 97,38%). Las diferencias también fueron estadísticamente significativas entre la proliferación celular en

queratinocitos con tratamiento combinado irradiados (barra azul) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=43,24%) y con tratamiento combinado sin irradiar (barra roja) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=108,91%).

D.2.1.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En la figura 79 se representa el posible efecto beneficioso de la metformina a concentraciones de 5 μ M y 5 mM, del resveratrol a 2,5 μ M y 25 μ M y del tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M) sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos a las 72 horas post irradiación con una dosis única de 1,8 J/cm² de UVB.

Para la realización de esta lectura a las 72 horas post UVB, se emplearon las mismas placas celulares con queratinocitos humanos *in vitro* que habían sido leídas previamente a las 24 horas, siguiendo el mismo protocolo.

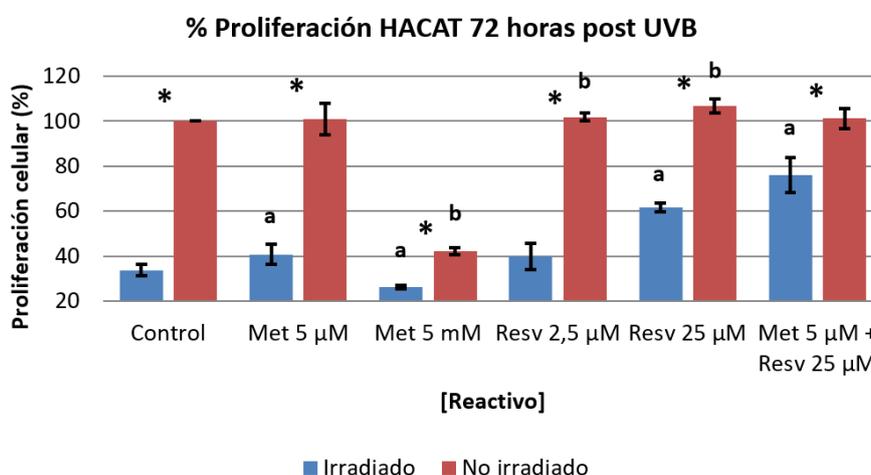


Figura 79. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$). (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas, a las 72 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas, a las 72 horas ($p < 0,05$).

A las 72 horas post irradiación con esta dosis de UVB, al igual que ya ocurría a las 24 horas, se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de proliferación celular entre queratinocitos sin reactivo no irradiados (100%) y queratinocitos sin reactivo irradiados (33,76%).

Al igual que ya ocurría a las 24 horas post UVB, a las 72 horas post irradiación (barras azules) se apreciaron incrementos relativos de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 6,99% con la metformina a 5 μ M, del 6,27%

con el resveratrol a 2,5 μM , del 27,83% con el resveratrol a 25 μM , y del 42,29% con el tratamiento combinado (Met 5 μM + Resv 25 μM), siendo las diferencias observadas estadísticamente significativas en todos los casos excepto con el resveratrol 2,5 μM . No obstante, al contrario de lo que se observó inicialmente a las 24 horas, a las 72 horas post irradiación se apreciaron disminuciones relativas de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 7,53% con la metformina a 5 mM siendo estas diferencias observadas estadísticamente significativas.

Por lo que respecta a las 5 barras donde las células con reactivo no fueron irradiadas (barras rojas), en una de ellas se observó una disminución relativa de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 57,73% con la metformina a 5 mM. Por el contrario, en el resto de barras se apreciaron incrementos relativos de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 0,95% con la metformina 5 μM , del 1,89% con el resveratrol 2,5 μM , del 6,88% con el resveratrol 25 μM y del 1,19% con el tratamiento combinado (Met 5 μM + Resv 25 μM). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso de la metformina 5 mM, del resveratrol 2,5 μM y del resveratrol 25 μM .

A las 72 horas post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto entre la proliferación celular en queratinocitos con metformina irradiados (barra azul) (Met 5 μM =40,75%, Met 5 mM=26,23%) y con metformina sin irradiar (barra roja) (Met 5 μM =100,95%, Met 5 mM=42,27%), como entre la proliferación celular en queratinocitos con resveratrol irradiados (barra azul) (Resv 2,5 μM = 40,03% y Resv 25 μM = 61,59%) y con resveratrol sin irradiar (barra roja) (Resv 2,5 μM = 101,89% y Resv 25 μM = 106,88%). Las diferencias también fueron estadísticamente significativas entre la proliferación celular en queratinocitos con tratamiento combinado irradiados (barra azul) (Met 5 μM + Resv 25 μM =76,05%) y con tratamiento combinado sin irradiar (barra roja) (Met 5 μM + Resv 25 μM =101,19%).

D.2.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB

D.2.2.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos 24 horas post irradiación con UVB

Con este experimento, resumido gráficamente en la figura 80, cuantificamos el posible efecto beneficioso de la metformina a concentraciones de 5 μM y 5 mM, del resveratrol a concentraciones de 2,5 μM y 25 μM y del tratamiento combinado (Met 5 μM + Resv 25 μM) sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos a las 24 horas post irradiación con una dosis única de 1,8 J/cm² de UVB.

Para la realización de este experimento, se realizaron dos fases. En una primera fase se evaluó el efecto beneficioso del tratamiento con metformina o resveratrol aislados previo a la irradiación con UVB. En una segunda fase se seleccionó las dos concentraciones individuales de metformina y resveratrol que producían un mayor incremento en la proliferación celular de fibroblastos humanos *in vitro* a las 24 horas post irradiación para estudiar posibles efectos beneficiosos del tratamiento combinado sobre la proliferación celular en fibroblastos irradiados. Para cada una de ambas fases se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 96 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

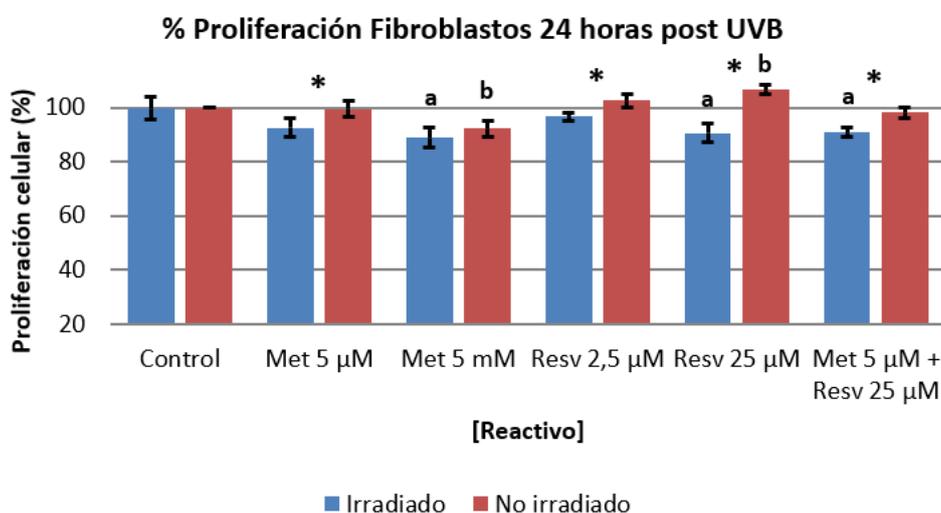


Figura 80. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos 24 horas post irradiación con UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$). (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas, a las 24 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas, a las 24 horas ($p < 0,05$).

El primer aspecto a destacar es que con esta dosis única de $1,8 \text{ J/cm}^2$ de UVB las diferencias de proliferación celular a las 24 horas post irradiación entre fibroblastos sin reactivo no irradiados (100%) y fibroblastos sin reactivo irradiados (99,72%) no fueron estadísticamente significativas.

En las 5 barras donde las células con reactivo son irradiadas (barras azules), a las 24 horas post UVB se apreciaron disminuciones relativas de la proliferación celular con respecto al control sin reactivo irradiado del 7,25% con la metformina $5 \mu\text{M}$, 10,86% con la metformina a 5 mM, 3,07% con el resveratrol a $2,5 \mu\text{M}$, 9,19% con el resveratrol a $25 \mu\text{M}$ y 8,94% con el tratamiento combinado (Met $5 \mu\text{M}$ + Resv $25 \mu\text{M}$). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso de la metformina 5 mM, resveratrol $25 \mu\text{M}$ y del tratamiento combinado (Met $5 \mu\text{M}$ + Resv $25 \mu\text{M}$).

En las 5 barras donde las células con reactivo no fueron irradiadas (barras rojas), se apreciaron disminuciones relativas de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 0,41% con la metformina $5 \mu\text{M}$, 7,65% con la metformina a 5 mM y 1,68% con el tratamiento combinado (Met $5 \mu\text{M}$ + Resv $25 \mu\text{M}$). Por el contrario, se observaron incrementos relativos de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 2,6% con el resveratrol $2,5 \mu\text{M}$ y 6,57% con el resveratrol $25 \mu\text{M}$. Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso de la metformina 5 mM y del resveratrol $25 \mu\text{M}$.

A las 24 horas post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativa entre la proliferación celular de fibroblastos humanos irradiados pretratados con: metformina $5 \mu\text{M}$, resveratrol $2,5 \mu\text{M}$, resveratrol $25 \mu\text{M}$ y tratamiento combinado (Met $5 \mu\text{M}$ = 92,48%, Resv $2,5 \mu\text{M}$ = 96,65%, Resv $25 \mu\text{M}$ = 90,53% y Met $5 \mu\text{M}$ + Resv $25 \mu\text{M}$ = 90,78%) y sus respectivos controles sin irradiar (barra roja) (Met $5 \mu\text{M}$ = 99,59%, Resv $2,5 \mu\text{M}$ = 102,60%, Resv $25 \mu\text{M}$ = 106,57% y Met $5 \mu\text{M}$ + Resv $25 \mu\text{M}$ = 98,32%). No se observaron diferencias estadísticamente entre la proliferación celular de fibroblastos humanos pretratados con metformina 5 mM irradiados (barra azul) (Met 5 mM=88,86%) y su respectivo control sin irradiar (barra roja) (Met 5 mM=92,35%).

D.2.2.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En la figura 81 se representa el posible efecto beneficioso de la metformina a concentraciones de 5 μ M y 5 mM, del resveratrol a 2,5 μ M y 25 μ M y del tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M) sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos a las 72 horas post irradiación con una dosis única de 1,8 J/cm² de UVB.

Para la realización de esta lectura a las 72 horas post UVB, se emplearon las mismas placas celulares con fibroblastos humanos *in vitro* que habían sido leídas previamente a las 24 horas, siguiendo el mismo protocolo.

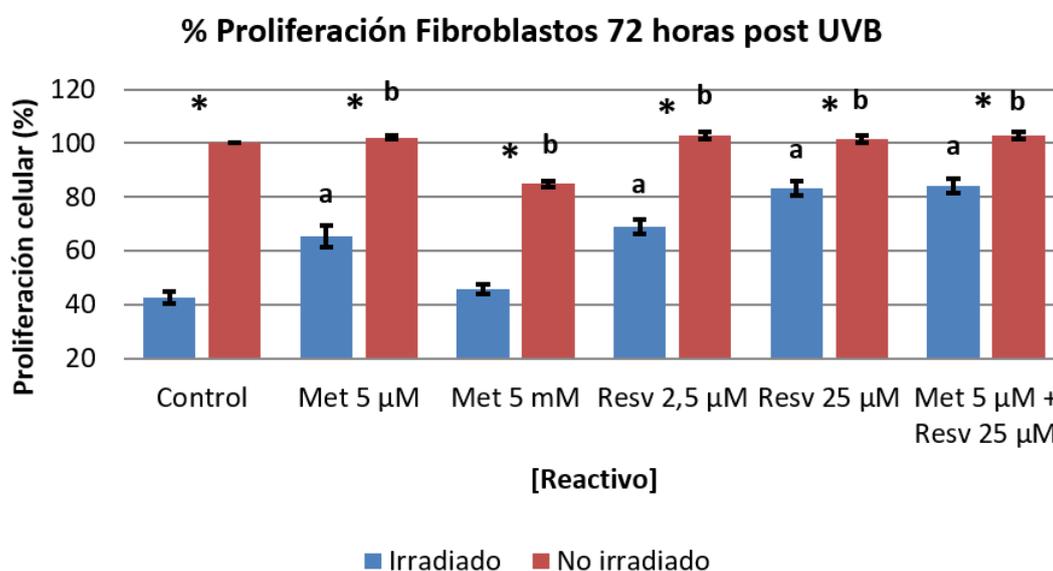


Figura 81. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$). (a) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas, a las 72 horas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de proliferación estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas, a las 72 horas ($p < 0,05$).

A las 72 horas post irradiación con esta dosis de UVB, a diferencia de lo que ocurría a las 24 horas, sí que se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de proliferación celular entre fibroblastos sin reactivo no irradiados (100%) y fibroblastos sin reactivo irradiados (42,57%).

Al contrario de lo que sucedía a las 24 horas, en las 5 barras donde las células con reactivo fueron irradiadas (barras azules) se apreciaron incrementos relativos de la proliferación celular a las 72 horas post UVB, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 22,77% con la metformina a 5 μ M, del 3,35% con la metformina a 5 mM,

26,26% con el resveratrol a 2,5 μM , del 40,70% con el resveratrol a 25 μM , y del 41,39% con el tratamiento combinado (Met 5 μM + Resv 25 μM), siendo las diferencias observadas estadísticamente significativas únicamente en el caso de la metformina a 5 μM , del resveratrol a 2,5 μM , del resveratrol a 25 μM y del tratamiento combinado (Met 5 μM + Resv 25 μM).

Por lo que respecta a las 5 barras donde las células con reactivo no fueron irradiadas (barras rojas), en una de ellas se observó una disminución relativa de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 15,16% con la metformina a 5 mM. Por el contrario, en el resto de barras se apreciaron incrementos relativos de la proliferación celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 2,06% con la metformina 5 μM , del 2,92% con el resveratrol 2,5 μM , del 1,74% con el resveratrol 25 μM y del 2,75% con el tratamiento combinado (Met 5 μM + Resv 25 μM). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos.

A las 72 horas post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto entre la proliferación celular en fibroblastos con metformina irradiados (barra azul) (Met 5 μM =65,34%, Met 5 mM=45,92%) y con metformina sin irradiar (barra roja) (Met 5 μM =102,06%, Met 5 mM=84,85%), como entre la proliferación celular en fibroblastos con resveratrol irradiados (barra azul) (Resv 2,5 μM = 68,83% y Resv 25 μM = 83,27%) y con resveratrol sin irradiar (barra roja) (Resv 2,5 μM = 102,92% y Resv 25 μM = 101,48%). Las diferencias también fueron estadísticamente significativas entre la proliferación celular en fibroblastos con tratamiento combinado irradiados (barra azul) (Met 5 μM + Resv 25 μM =83,96%) y con tratamiento combinado sin irradiar (barra roja) (Met 5 μM + Resv 25 μM =102,75%).

D.3. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB

D.3.1. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB

D.3.1.1. Efecto de la radiación UVB sobre la viabilidad y muerte celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

El análisis del tipo de muerte celular, inducida en queratinocitos humanos, a las 72 horas post radiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), en comparación con los controles no irradiados, se muestra en las figuras 82 y 83. En la figura 82 se comparan los distintos tipos de muerte celular, mientras que en la figura 83 se comparan los controles no irradiados con las células expuestas a la radiación.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

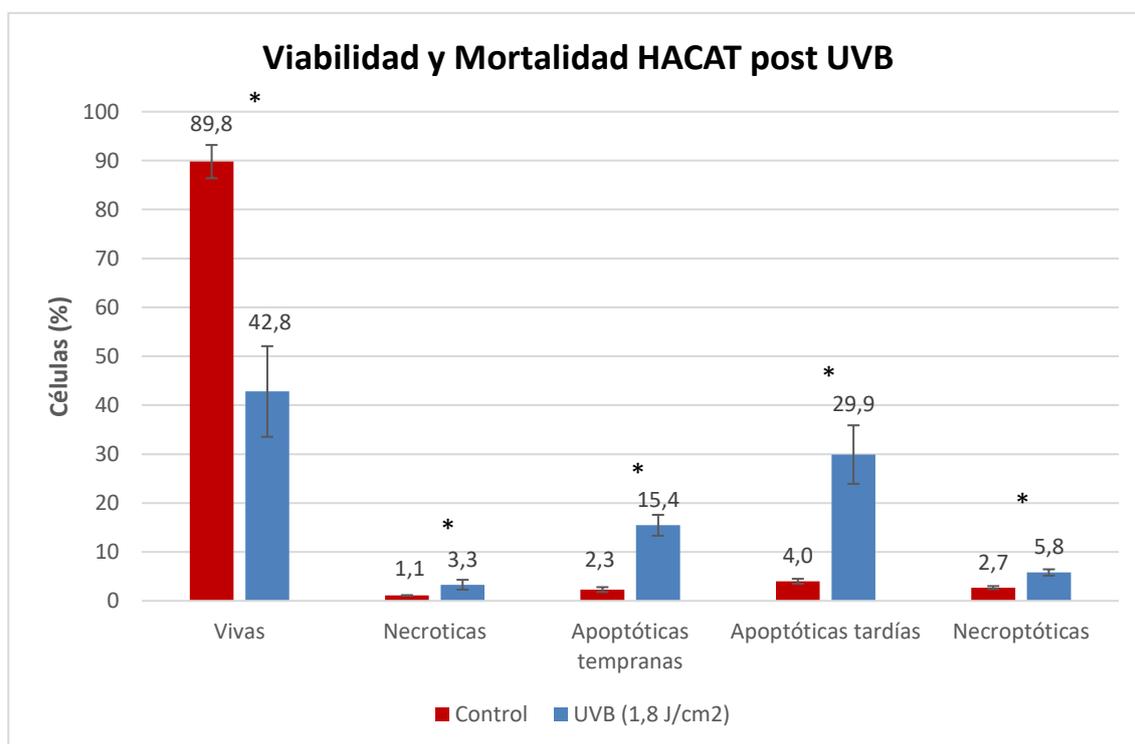


Figura 82. Efecto de la radiación UVB sobre la muerte celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$). Variaciones en cada tipo de muerte celular. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias estadísticamente significativas para viabilidad o un mismo tipo de mortalidad entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

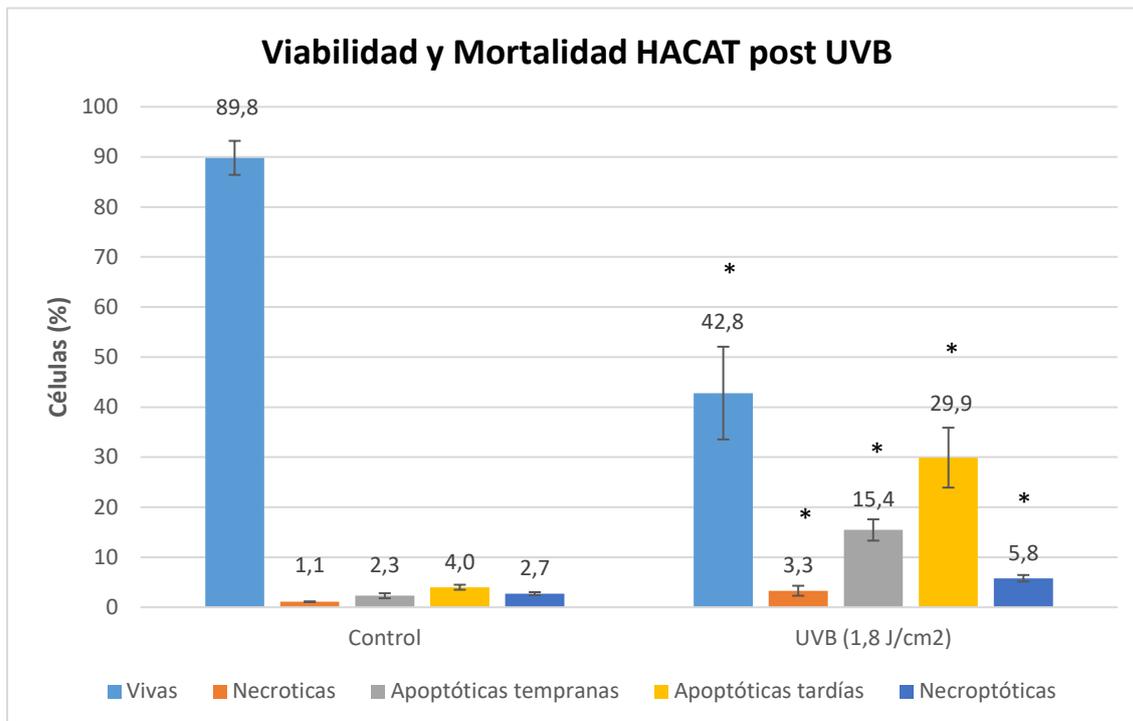


Figura 83. Efecto de la radiación UVB sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias estadísticamente significativas para viabilidad o un mismo tipo de mortalidad entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

En primer lugar, observamos que a las 72 horas post irradiación con UVB el porcentaje de células vivas disminuye en un 47%, pasando del 89,8% (células control sin irradiar) al 42,8% (células irradiadas).

En las células control la mortalidad total es del 10,1%, siendo la apoptosis tardía (4%) el tipo de muerte celular predominante. En las células irradiadas la mortalidad total es del 54,4%, predominando la apoptosis tardía (29,9%) sobre el resto de subtipos.

Las diferencias en el porcentaje de viabilidad y en los porcentajes de los distintos subtipos de mortalidad objetivadas entre queratinocitos irradiados y no irradiados fueron estadísticamente significativas en todos los casos.

Las diferencias metodológicas entre el experimento 2 y el experimento 3 tanto en el tiempo de incubación previo a la irradiación como en la técnica de determinación, hace que los resultados de ambos experimentos no sean comparables.

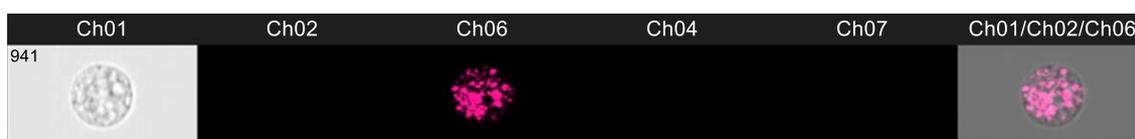


Figura 84. Queratinocitos HaCaT vivos proliferantes mediante técnica APO5-Sen, en citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica de 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Negatividad en canal 2 para fluorocromo C₁₂-FDG. Negatividad en canal 4 para fluorocromo PE. Granulosidad celular en canal 6. Negatividad en canal 7 para fluorocromo DAPI. Integración o composite de canales 1, 2 y 6 en un mismo canal. (Figura del autor)

D.3.1.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los queratinocitos humanos.

Puesto que en experimentos previos de la presente tesis con espectrofotómetro se observó un incremento significativo de la proliferación celular de queratinocitos humanos no irradiados tras 72 horas de tratamiento con metformina a concentraciones de 5 μ M, resveratrol a concentraciones de 25 μ M y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), en el presente experimento se ha utilizado técnicas citométricas para evaluar la viabilidad y mortalidad celular tras 7 días de incubación a estas concentraciones de reactivo. También se empleó la concentración de metformina 5 mM por haber sido utilizada previamente por otros autores en la literatura en experimentos *in vitro*.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 85 se representa los valores de viabilidad y cada tipo de muerte celular, para cada concentración de metformina, resveratrol o tratamiento combinado, en queratinocitos HaCaT no irradiados tras 7 días de incubación.

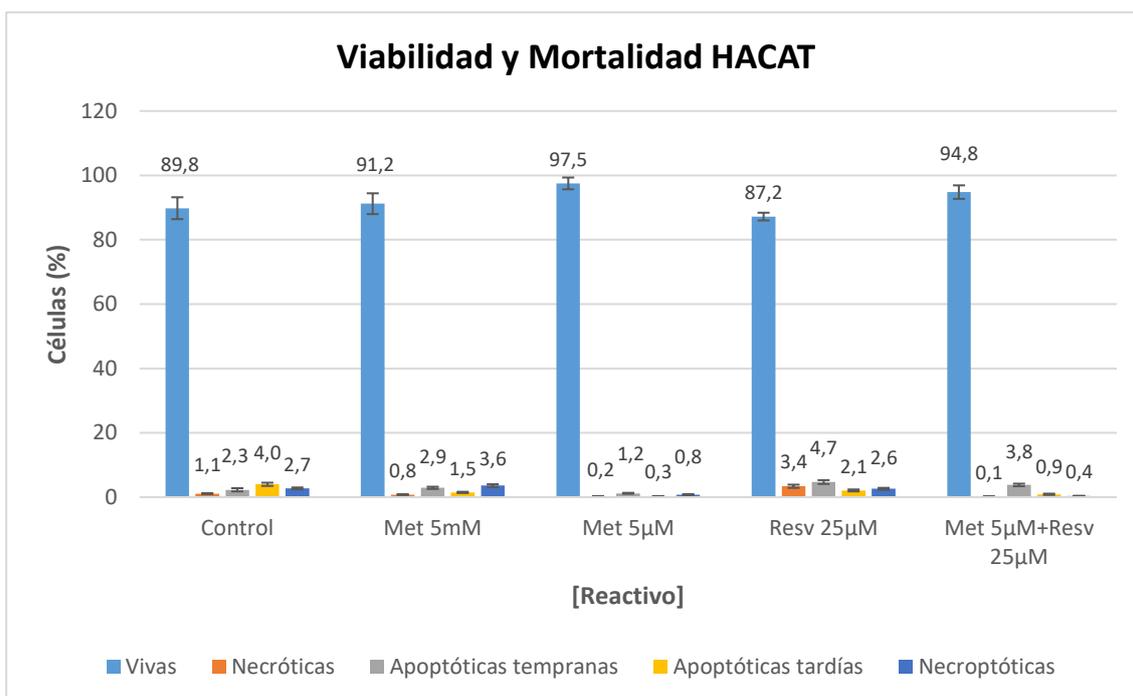


Figura 85. Protección de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la mortalidad celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD.

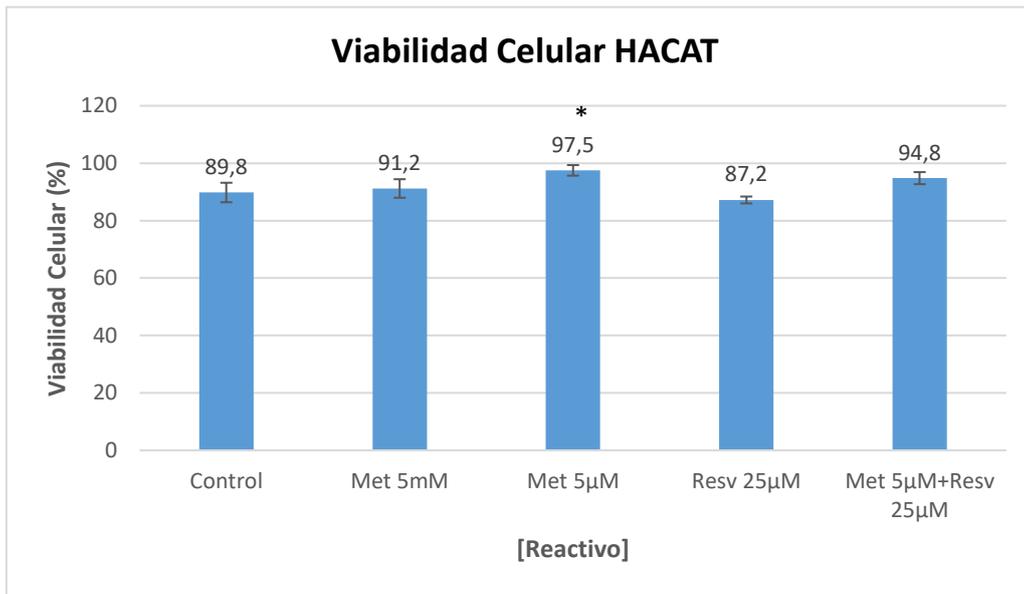


Figura 86. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la viabilidad celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en incremento de viabilidad estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

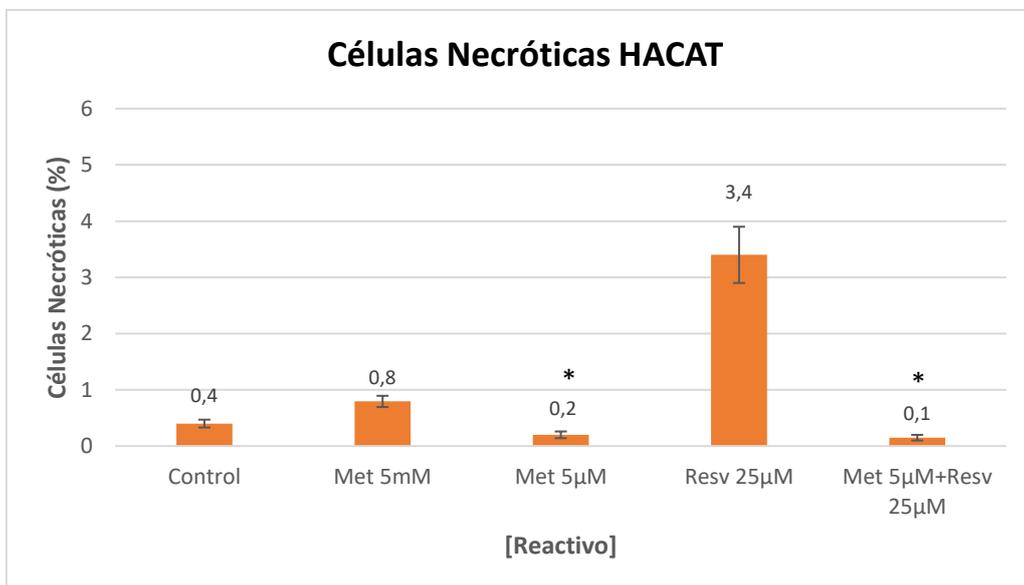


Figura 87. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necrosis celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necrosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

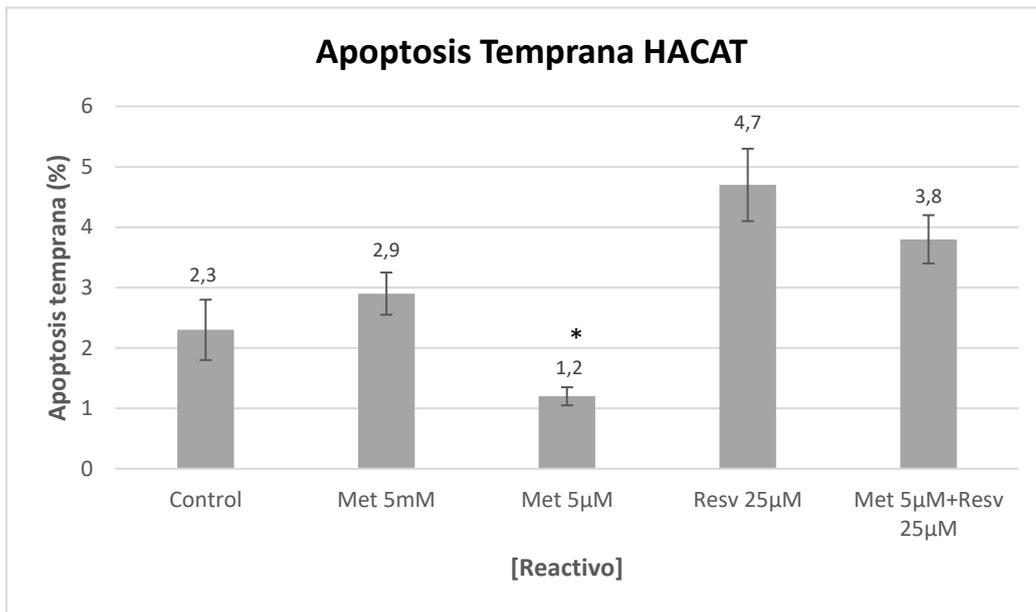


Figura 88. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis temprana de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis temprana estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

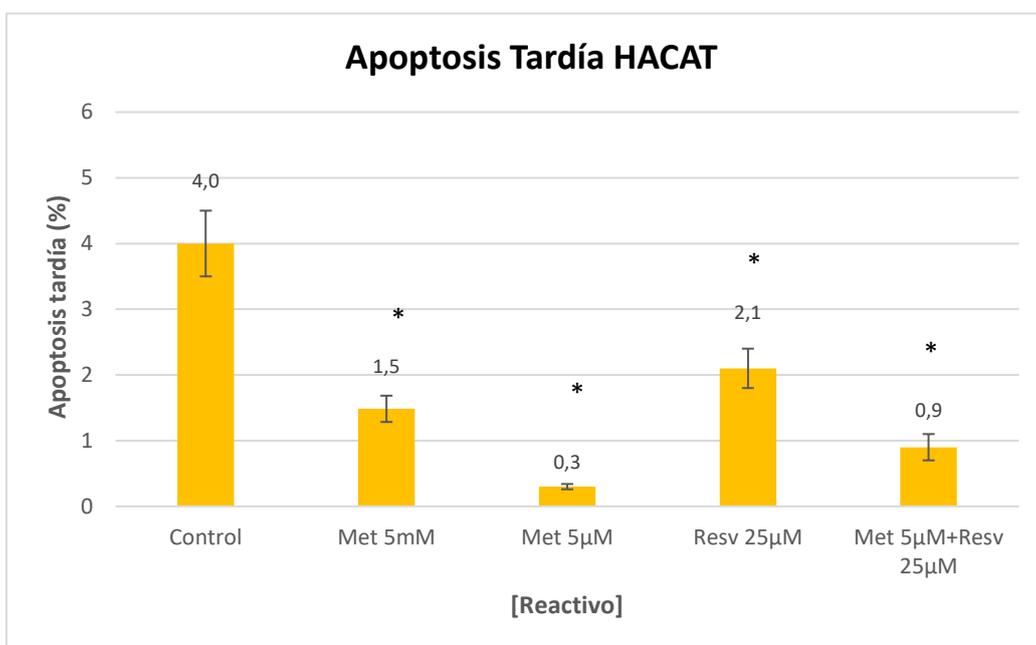


Figura 89. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis tardía de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis tardía estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

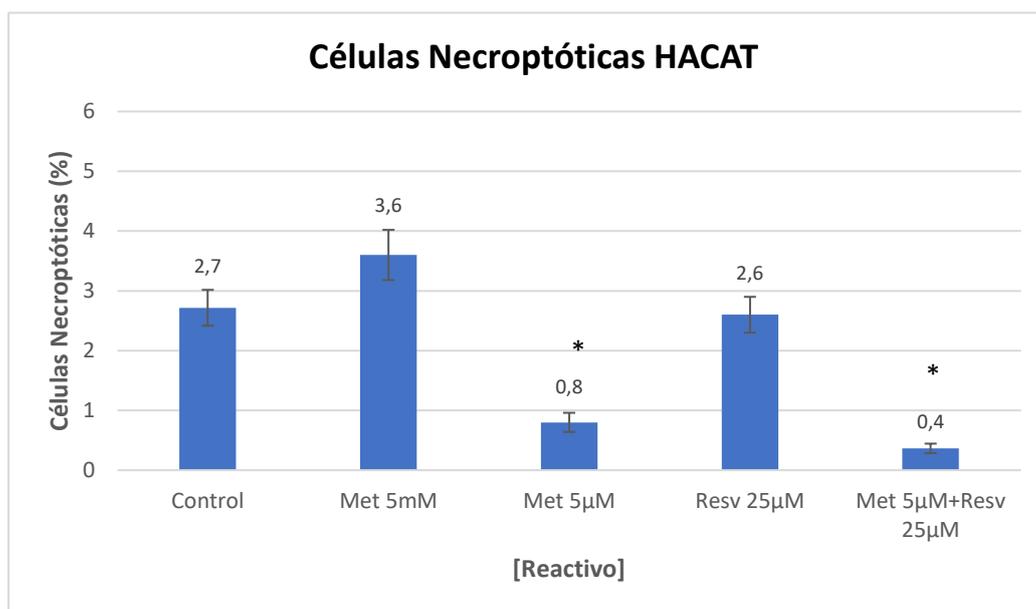


Figura 90. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necroptosis de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necroptosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

En la figura 86 observamos que únicamente se detectó un incremento de viabilidad celular, siendo las diferencias estadísticamente significativas, en queratinocitos HaCaT tratados con metformina 5 μ M, donde se objetivó un incremento en el porcentaje de células vivas del 7,7% si comparamos la viabilidad del grupo control no irradiado (89,8%) con la viabilidad del tratamiento con metformina 5 μ M no irradiado (97,5%).

Además de un incremento en la viabilidad celular, comparando los porcentajes de mortalidad celular entre queratinocitos no irradiados tratados con metformina 5 μ M y el grupo control no irradiado, se objetivó un descenso en el porcentaje de necrosis del 0,2% (figura 87), un descenso en el porcentaje de apoptosis temprana del 1,1% (figura 88), un descenso en el porcentaje de apoptosis tardía del 1,9% (figura 89) y un descenso en el porcentaje de necroptosis del 1,9% (figura 90). Estas diferencias objetivadas fueron estadísticamente significativas para todos los subtipos de mortalidad.

La metformina 5 μ M, por tanto, fue la única concentración de reactivo que, de forma estadísticamente significativa, en queratinocitos HaCaT no irradiados, incrementó la viabilidad celular y disminuyó todos los subtipos de mortalidad celular analizados con respecto al control no irradiado sin reactivo.

D.3.1.3. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

Puesto que en experimentos citométricos previos de la presente tesis se observó un incremento significativo de la mortalidad de queratinocitos humanos tras la irradiación con UVB, se investigó el tipo de protección que ofrece el pretratamiento con metformina a concentraciones de 5 μM y 5 mM, resveratrol a concentraciones de 25 μM y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μM + Resv 25 μM), evaluando la mortalidad celular a las 72 horas post irradiación de queratinocitos HACAT con UVB (1,8 J/cm²).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 91 se representa los valores de viabilidad y de cada tipo de muerte celular, inducida por radiación UVB (1,8 J/cm²), para cada concentración de reactivo, en queratinocitos HaCaT.

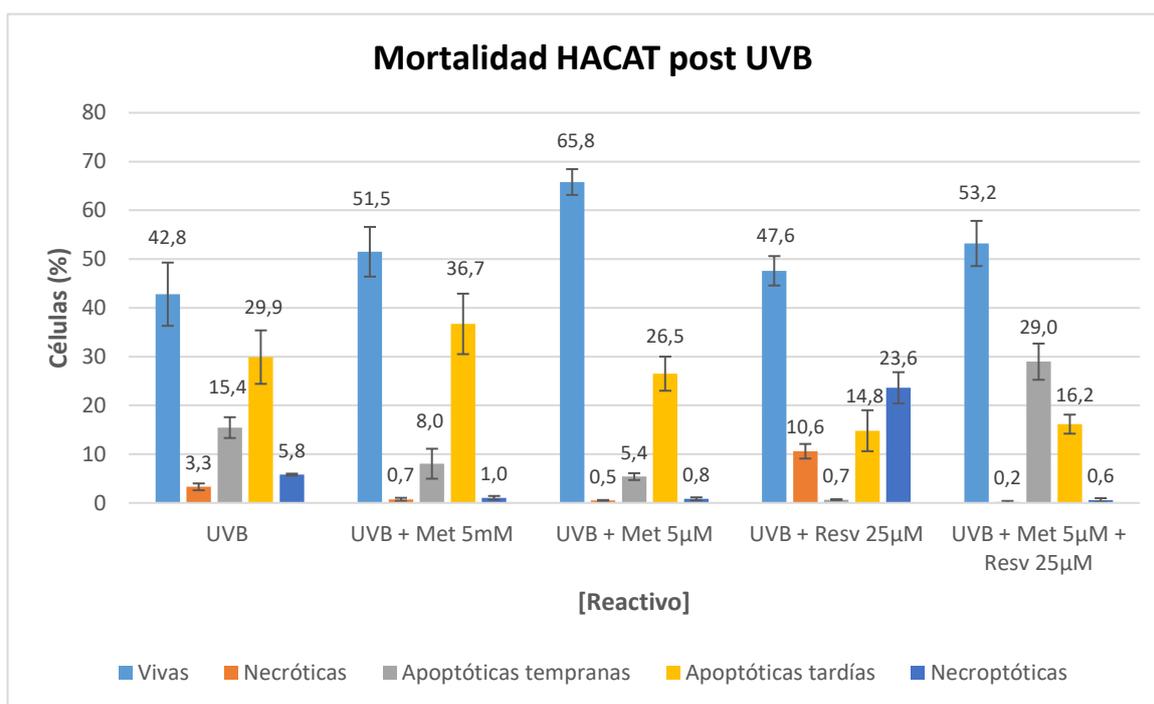


Figura 91. Protección de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD.

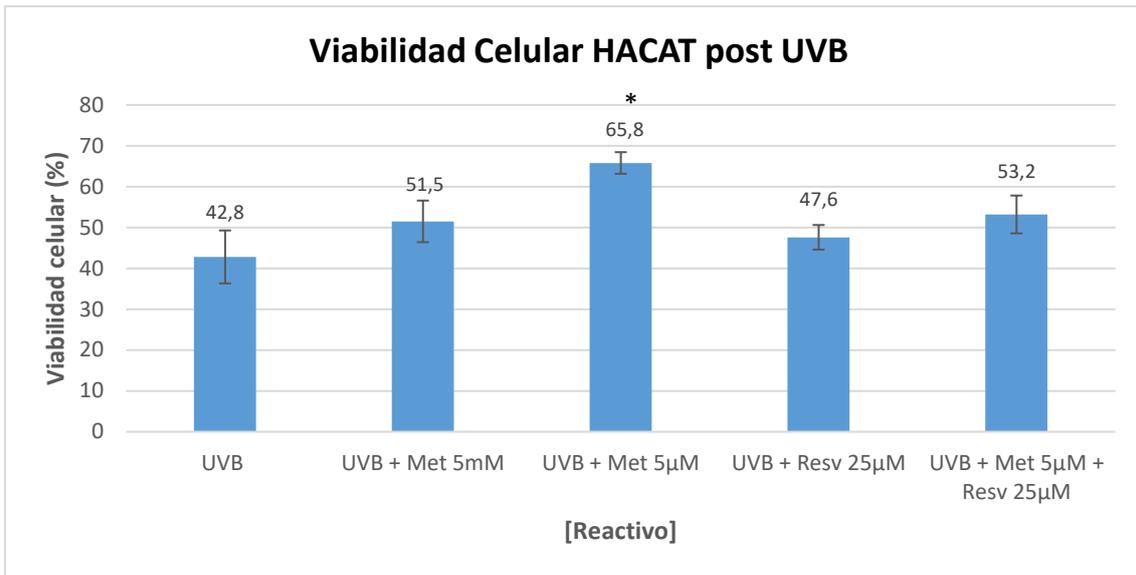


Figura 92. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la viabilidad celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en incremento de viabilidad estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

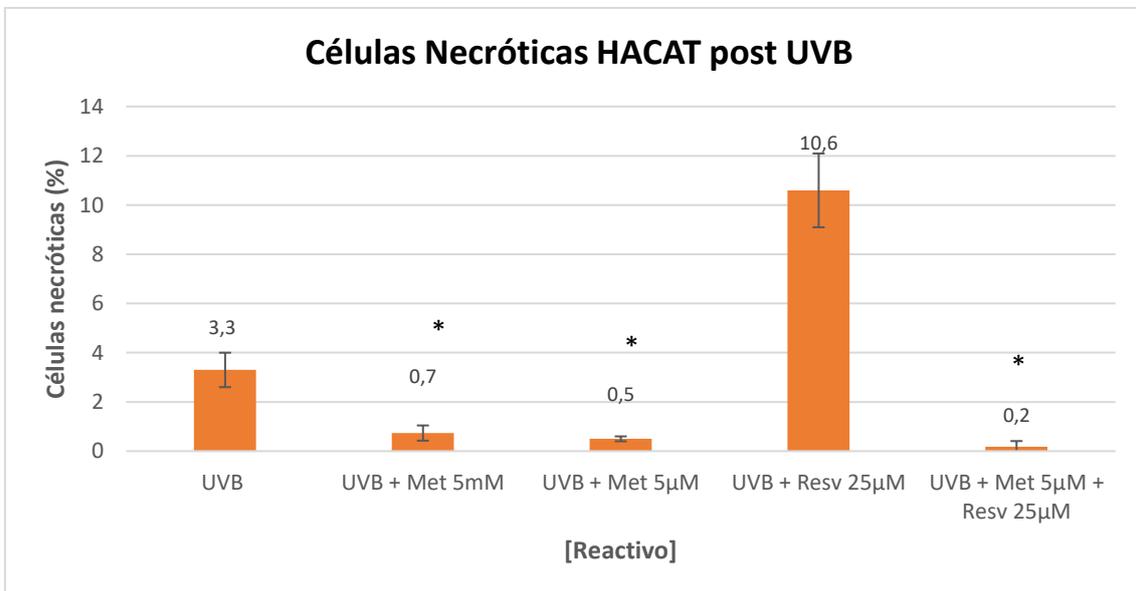


Figura 93. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la necrosis celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necrosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

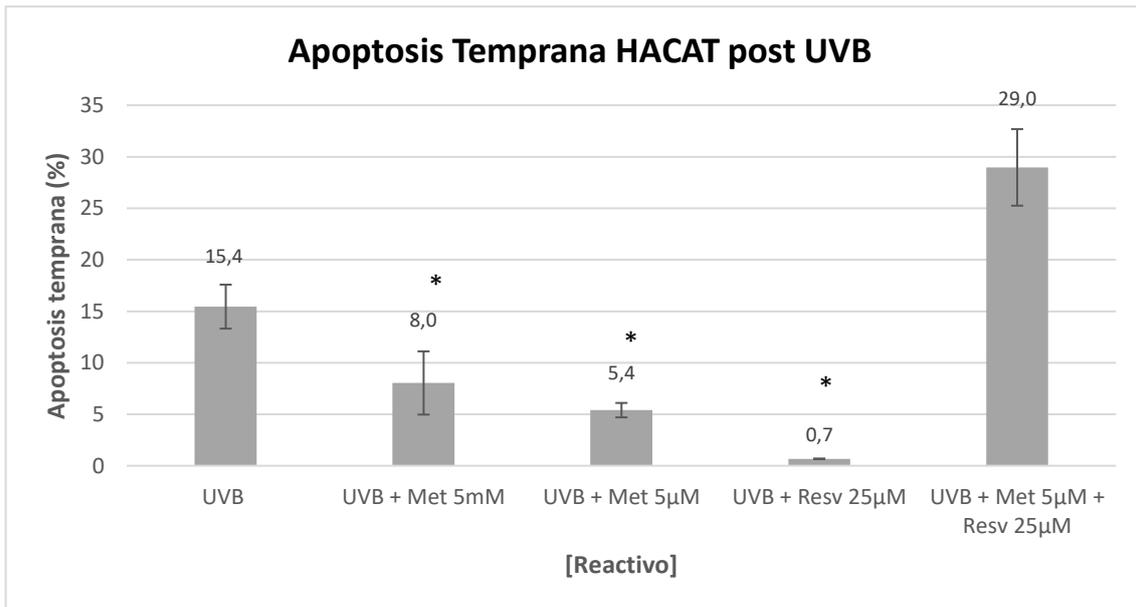


Figura 94. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la apoptosis temprana de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis temprana estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

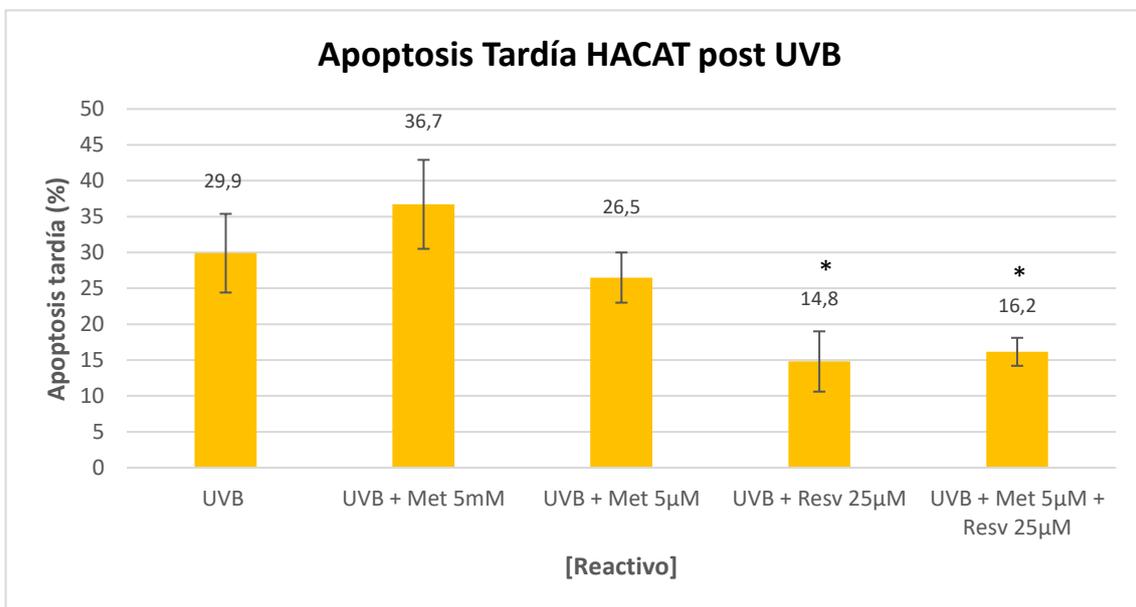


Figura 95. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la apoptosis tardía de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis tardía estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

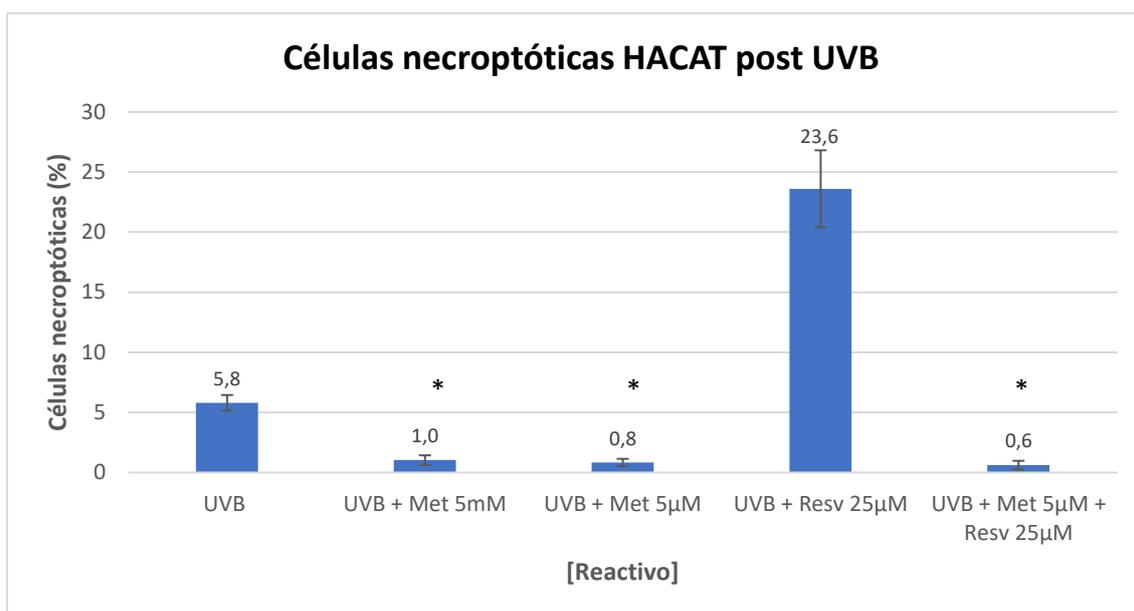


Figura 96. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la necroptosis de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necroptosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

En la figura 92 observamos que, a las 72 horas post irradiación UVB, únicamente se detectó incremento de viabilidad celular, siendo las diferencias estadísticamente significativas, en queratinocitos HaCaT pretratados con metformina $5 \mu\text{M}$, donde se objetivó un incremento en el porcentaje de células vivas del 23% si comparamos la viabilidad del grupo control irradiado (42,8%) con la viabilidad del pretratamiento con metformina $5 \mu\text{M}$ irradiado (65,8%).

Además de un incremento en la viabilidad celular, comparando los porcentajes de mortalidad celular entre queratinocitos irradiados pretratados con metformina $5 \mu\text{M}$ y el grupo control irradiado, se objetivó un descenso en el porcentaje de necrosis del 2,8% (figura 93), un descenso en el porcentaje de apoptosis temprana del 10% (figura 94), un descenso en el porcentaje de apoptosis tardía del 3,4% (figura 95) y un descenso en el porcentaje de necroptosis del 5% (figura 96). Estas diferencias objetivadas fueron estadísticamente significativas para todos los subtipos de mortalidad, excepto en el caso de la apoptosis tardía.

El pretratamiento con metformina $5 \mu\text{M}$, por tanto, fue la única concentración de reactivo que, de forma estadísticamente significativa, en queratinocitos HaCaT irradiados, incrementó la viabilidad celular y disminuyó todos los subtipos de mortalidad celular analizados, excepto en el caso de la apoptosis tardía, con respecto al control irradiado sin reactivo.

Subpoblaciones celulares en queratinocitos humanos HaCaT mediante técnica APO 5 - Sen:

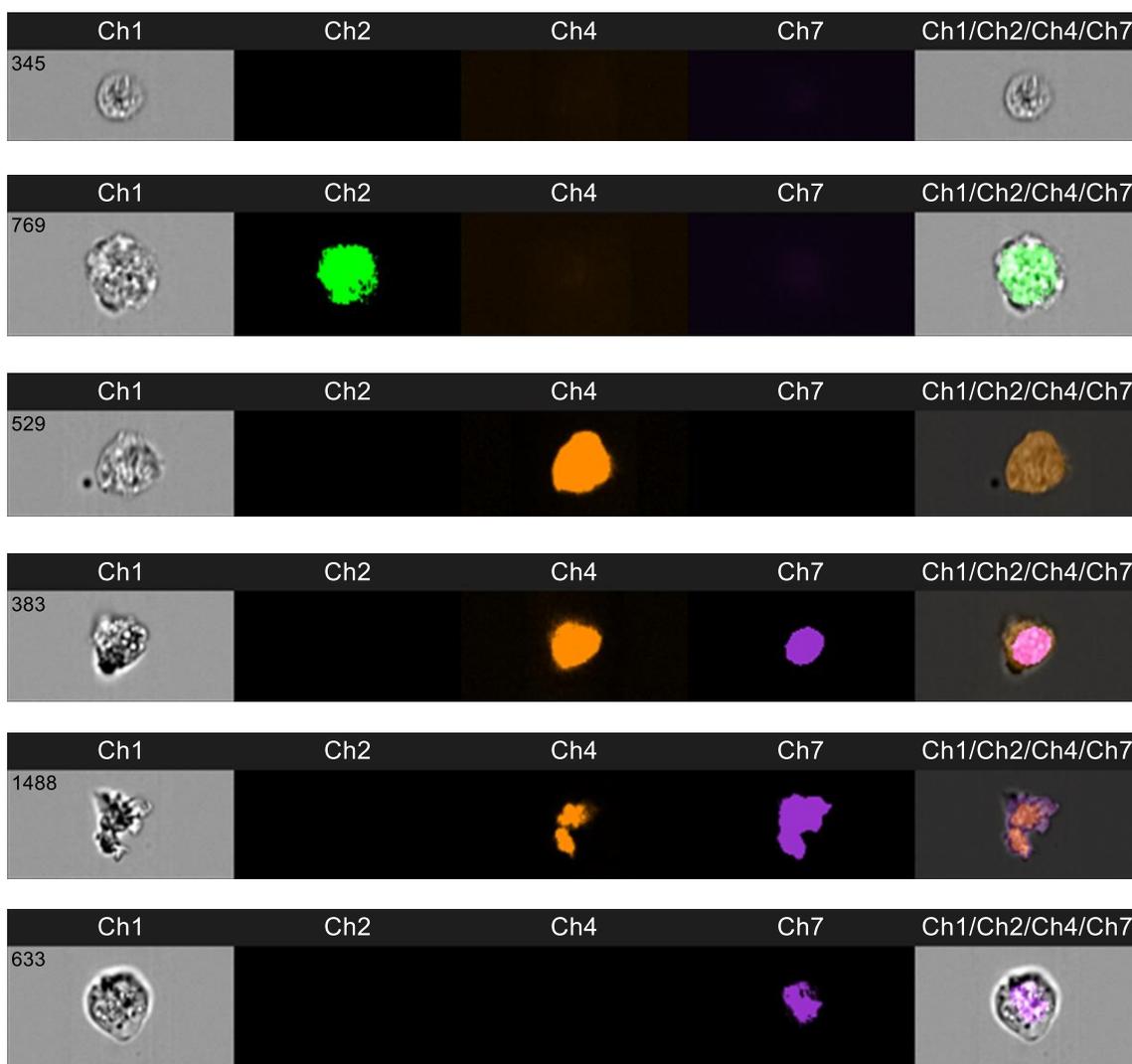


Figura 97. Caracterización de subpoblaciones celulares en queratinocitos humanos HaCaT mediante técnica APO 5-Sen y citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Detección de fluorescencia verde en canal 2 para fluorocromo C₁₂-FDG. Detección de fluorescencia amarillo anaranjada en canal 4 para fluorocromo PE. Detección de fluorescencia violeta en núcleo celular en canal 7 para fluorocromo DAPI. Integración o composite de canales 1,4 y 7 en un mismo canal. (Figura del autor)

- Célula 345: queratinocito humano HaCaT vivo y proliferante, sin fluorescencia en canales 2,4 y 7.
- Célula 769: queratinocito humano HaCaT vivo y senescente, con fluorescencia verde en canal 2 y sin fluorescencia en canales 4 y 7.
- Célula 529: queratinocito humano HaCaT apoptótico temprano, con fluorescencia amarillo anaranjada en canal 4 y ausencia de fluorescencia en canal 7.
- Célula 383: queratinocito humano HaCaT necroptótico, con fluorescencia amarillo anaranjada en canal 4, fluorescencia violeta en núcleo celular en el canal 7 y núcleo celular sin alteraciones morfológicas.
- Célula 1488: queratinocito humano HaCaT apoptótico tardío, con fluorescencia amarillo anaranjada en canal 4, fluorescencia violeta en núcleo celular en el canal 7 y núcleo celular desestructurado.
- Célula 633: queratinocito humano HaCaT necrótico, con ausencia de fluorescencia en canal 4 y fluorescencia violeta e núcleo celular en el canal 7.

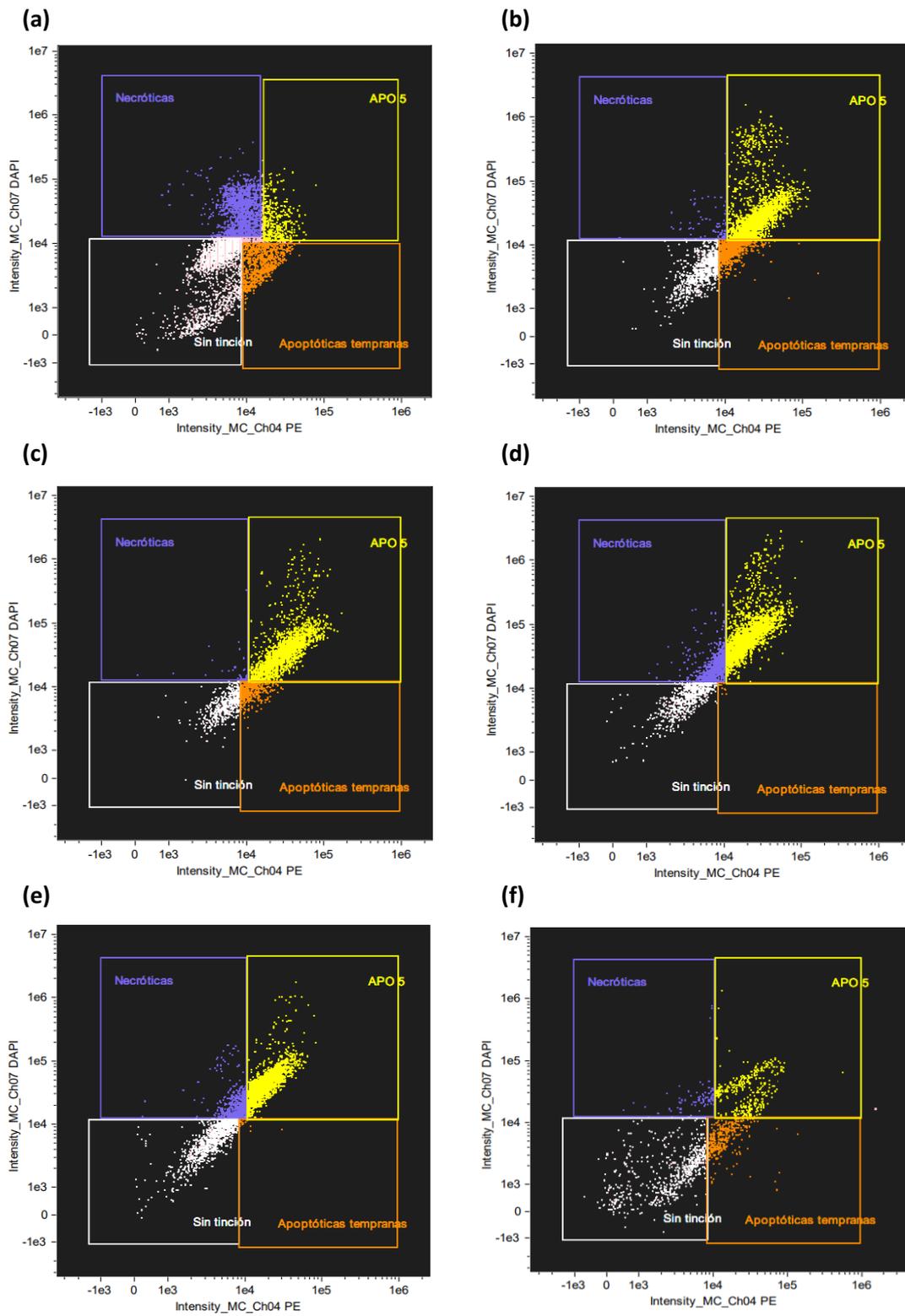


Figura 98. Histograma biparamétrico de queratinocitos HaCaT utilizando técnica APO 5 para análisis de muerte celular 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$). (a) Control. (b) UVB. (c) UVB + [Met 5mM]. (d) UVB + [Met 5 μM]. (e) UVB + [Resv 25 μM]. (f) UVB + [Met 5 μM + Resv 25 μM]. (Figura del autor)

D.3.1.4. Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

El análisis de la senescencia celular, inducida en queratinocitos humanos, a las 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), en comparación con los controles no irradiados se presentan en la figura 99. Las placas se cultivaron durante 72 horas para permitir el envejecimiento y senescencia celular. La senescencia se cuantificó mediante la actividad de la enzima SA- β -Gal en células vivas después de descartar las muertas con citometría de imagen. Esta enzima se encuentra principalmente activa en células senescentes, por lo que es un marcador ampliamente estudiado para valorar el envejecimiento y senescencia celular.

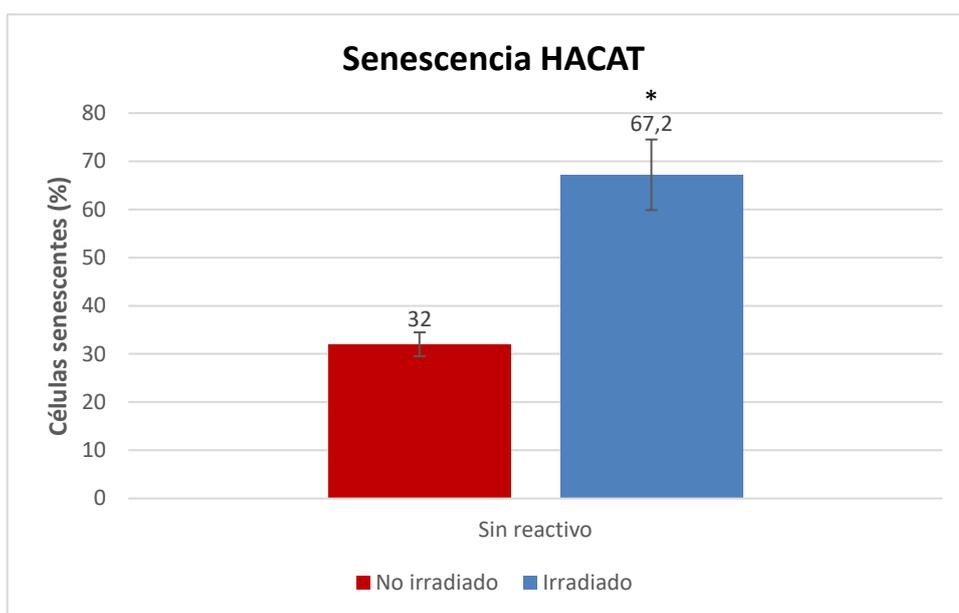


Figura 99. Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$). Diferencias entre células control sin reactivo no irradiadas y células control sin reactivo irradiadas con UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de senescencia celular estadísticamente significativas entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 99 se observa como a las 72 horas post irradiación con $1,8 \text{ J/cm}^2$ de UVB se produce un incremento en el porcentaje de senescencia celular en queratinocitos humanos del 35,2% si comparamos este valor del grupo no irradiado (32%) con la senescencia del grupo irradiado (67,2%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

D.3.1.5. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

Puesto que en experimentos previos se observó una disminución de la proliferación celular, un incremento de la mortalidad celular y un incremento en el porcentaje de senescencia celular de queratinocitos humanos tras la irradiación con UVB, se investigó el tipo de protección que ofrece el pretratamiento con metformina a concentraciones de 5 μ M y 5 mM, resveratrol a concentraciones de 25 μ M y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), evaluando la senescencia celular a las 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²) de queratinocitos HACAT (Figura 100).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

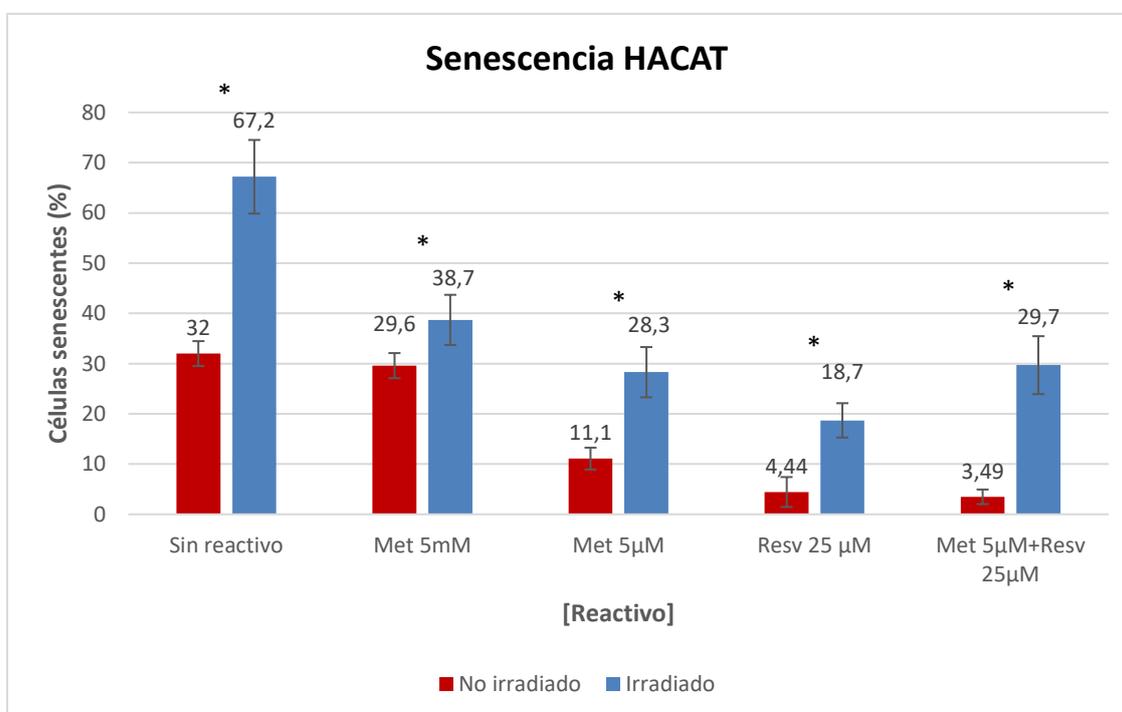


Figura 100. Protección de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de senescencia celular estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

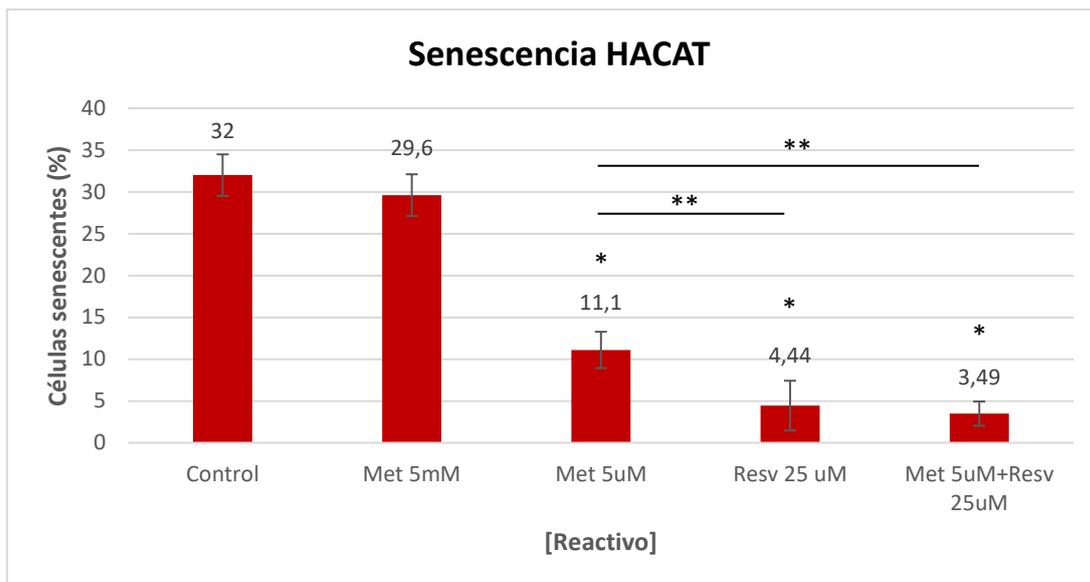


Figura 101. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos no irradiados, entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo ($p < 0,05$). (**) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos no irradiados, entre distintas concentraciones de fármaco ($p < 0,05$).

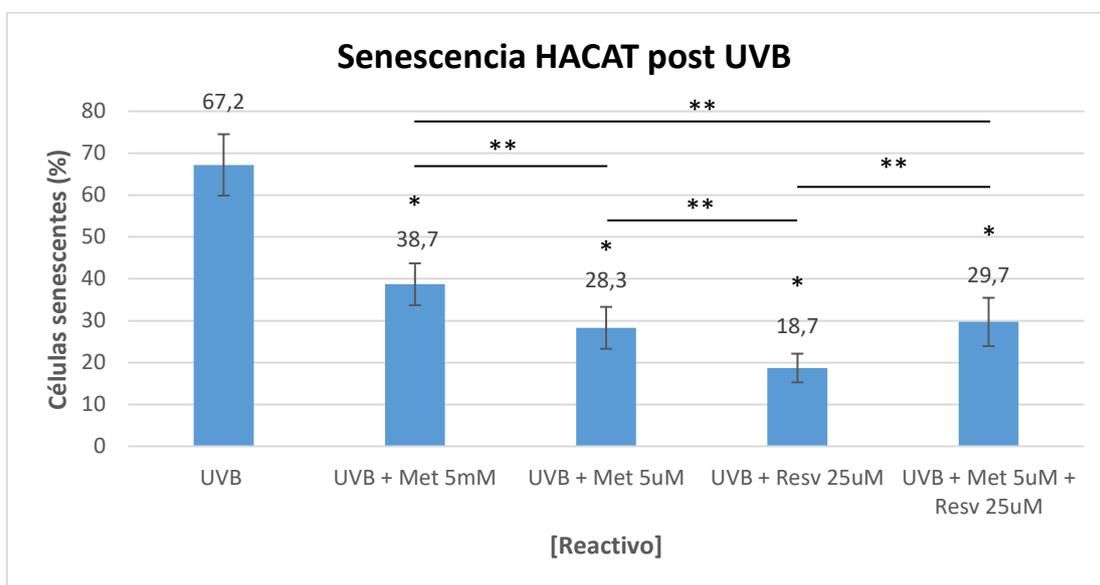


Figura 102. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos irradiados, entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo ($p < 0,05$). (**) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos irradiados, entre distintas concentraciones de fármaco ($p < 0,05$).

En la figura 100 se observa como en los queratinocitos HaCaT irradiados (barras azules) pretratados con metformina o resveratrol, el descenso en el porcentaje de senescencia celular con respecto al control irradiado sin reactivo, en ningún caso llegó a igualar los valores de senescencia celular basales para esa misma concentración de reactivo en queratinocitos no irradiados (barras rojas). Así pues, a las 72 horas post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto entre la senescencia celular en queratinocitos humanos tratados con metformina irradiados (barra azul) (Met 5 mM=38,7%, Met 5 μ M=28,3%) y con metformina sin irradiar (barra roja) (Met 5 mM=29,6%, Met 5 μ M=11,1%), como entre la senescencia celular en queratinocitos con resveratrol irradiados (barra azul) (Resv 25 μ M= 18,7%) y con resveratrol sin irradiar (barra roja) (Resv 25 μ M= 4,44%). Las diferencias también fueron estadísticamente significativas entre la senescencia celular en queratinocitos con tratamiento combinado irradiados (barra azul) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=29,7%) y con tratamiento combinado sin irradiar (barra roja) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=3,49%).

Por lo que respecta a los queratinocitos con reactivo no irradiados (figura 101) se apreciaron disminuciones en el porcentaje de senescencia celular, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 2,4% con la metformina 5 mM, del 20,9 % con la metformina 5 μ M, del 27,56% con el resveratrol 25 μ M y del 28,51% con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos, excepto para la metformina 5 mM. Las diferencias de senescencia celular del 0,95% objetivadas entre queratinocitos pretratados con resveratrol 25 μ M y queratinocitos pretratados con tratamiento combinado no fueron estadísticamente significativas. Las diferencias de senescencia celular del 6,66% objetivadas entre queratinocitos pretratados con metformina 5 μ M y resveratrol 25 μ M fueron estadísticamente significativas. También fueron estadísticamente significativas las diferencias de senescencia celular del 7,61% objetivadas entre queratinocitos pretratados con metformina 5 μ M y tratamiento combinado.

Por tanto, en queratinocitos HaCaT no irradiados, el pretratamiento con resveratrol 25 μ M y tratamiento combinado fueron los más eficaces en la disminución del porcentaje de células senescentes con respecto al control sin irradiar, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

En queratinocitos con reactivo irradiados (figura 102), a las 72 horas post UVB, se apreciaron disminuciones en el porcentaje de senescencia celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 28,5% con la metformina 5 mM, del 38,9 % con la metformina 5 μ M, del 48,5% con el resveratrol 25 μ M y del 37,5% con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos. Entre distintas concentraciones de reactivo, se objetivaron diferencias del 10,4% entre queratinocitos pretratados con metformina 5 mM y queratinocitos pretratados con metformina 5 μ M, del 9,6% entre queratinocitos pretratados con metformina 5 μ M y queratinocitos pretratados con resveratrol 25 μ M, del 11% entre queratinocitos pretratados con resveratrol 25 μ M y tratamiento combinado y del 9% entre queratinocitos pretratados con metformina 5 mM y queratinocitos pretratados con tratamiento combinado. Estas diferencias objetivadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos.

Por tanto, en queratinocitos HaCaT irradiados, el pretratamiento con resveratrol 25 μM fue el más eficaz en la disminución del porcentaje de células senescentes con respecto al control irradiado.

Para cuantificar el porcentaje de células senescentes en este experimento, sólo se contabilizaron los queratinocitos vivos (cuadrante inferior izquierdo de los histogramas biparamétricos del citómetro de imagen con la técnica APO 5), sin incluir aquellas células apoptóticas (tempranas y tardías), necróticas y necroptóticas.

En los apartados D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, se utilizó el término de células vivas o viables para incluir tanto a queratinocitos vivos proliferantes como vivos senescentes. En las gráficas de los apartados D.3.1.4 y D.3.1.5 los valores de senescencia celular se expresan como el porcentaje de células viables que fueron viables y senescentes.

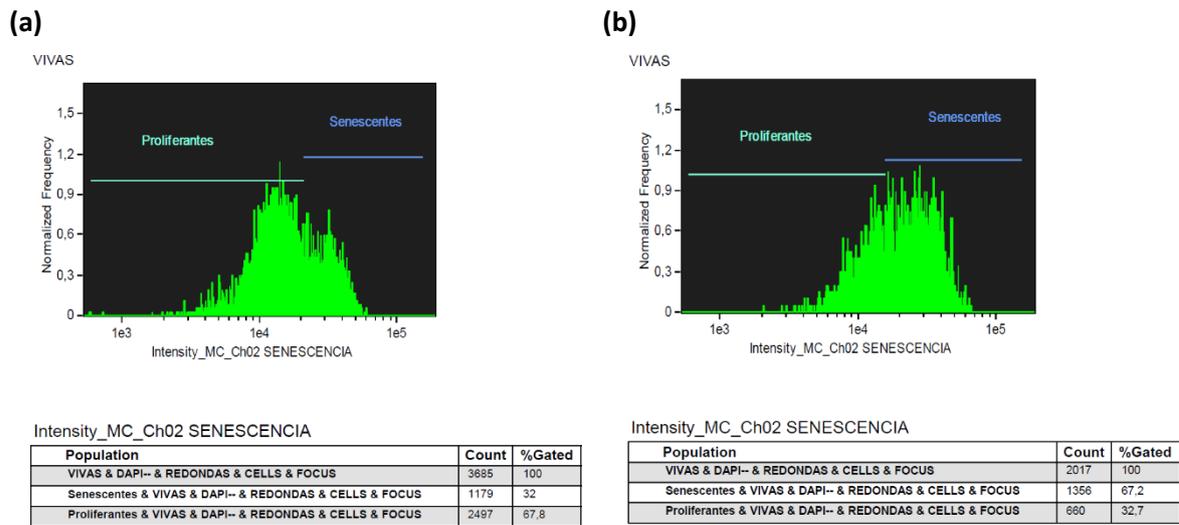


Figura 103. Histograma monoparamétrico de queratinocitos HaCaT, utilizando el fluorocromo C_{12} -FDG, para análisis de senescencia celular 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$). (a) Control. (b) UVB. (Figura del autor)

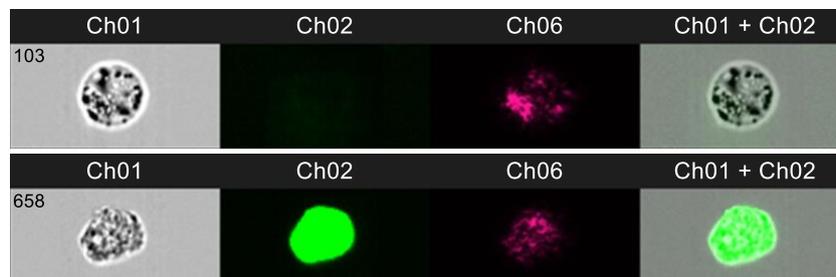


Figura 104. Queratinocitos HaCaT mediante citómetro de imagen AMNIS[®], ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Canal 2 determinación de senescencia celular mediante fluorescencia verde con el fluorocromo C_{12} -FDG. Granulosidad celular en canal 6. Integración o composite de canales 1 y 2 en un mismo canal. Célula 103: viva proliferante. Célula 658: viva senescente (Figura del autor)

D.3.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB

D.3.2.1. Efecto de la radiación UVB sobre la viabilidad y muerte celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

El análisis del tipo de muerte celular, inducida en fibroblastos humanos, a las 72 horas post radiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), en comparación con los controles no irradiados, se muestra en las figuras 105 y 106. En la figura 105 se comparan los distintos tipos de muerte celular, mientras que en la figura 106 se comparan los controles no irradiados con las células expuestas a la radiación.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

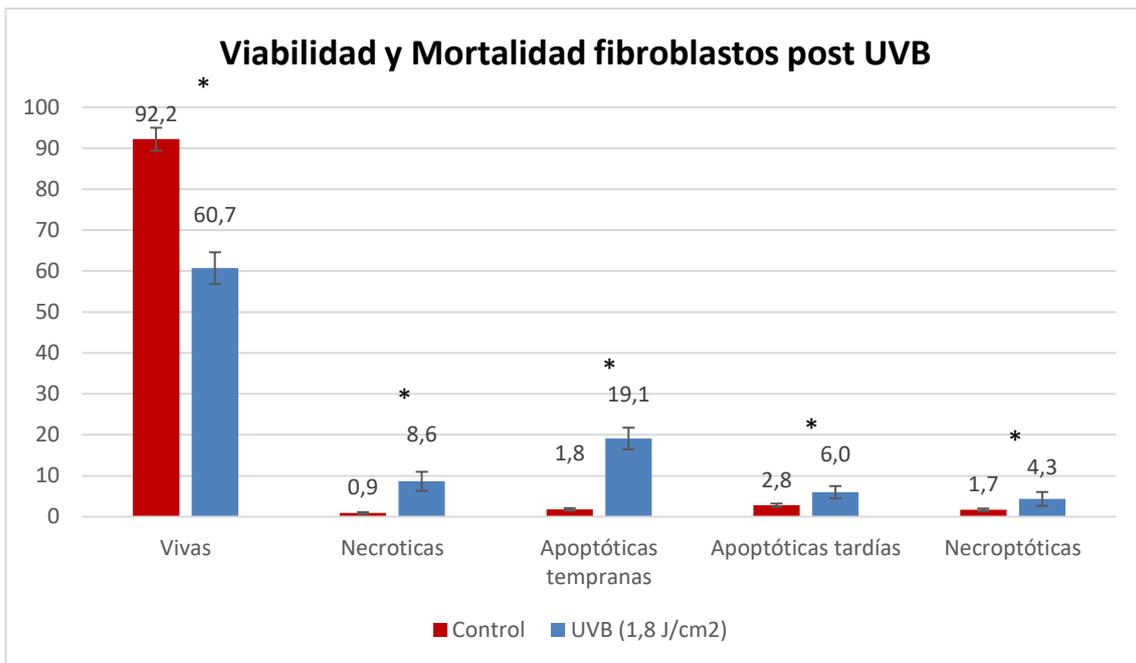


Figura 105. Efecto de la radiación UVB sobre la muerte celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$). Variaciones en cada tipo de muerte celular. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias estadísticamente significativas para viabilidad o un mismo tipo de mortalidad entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

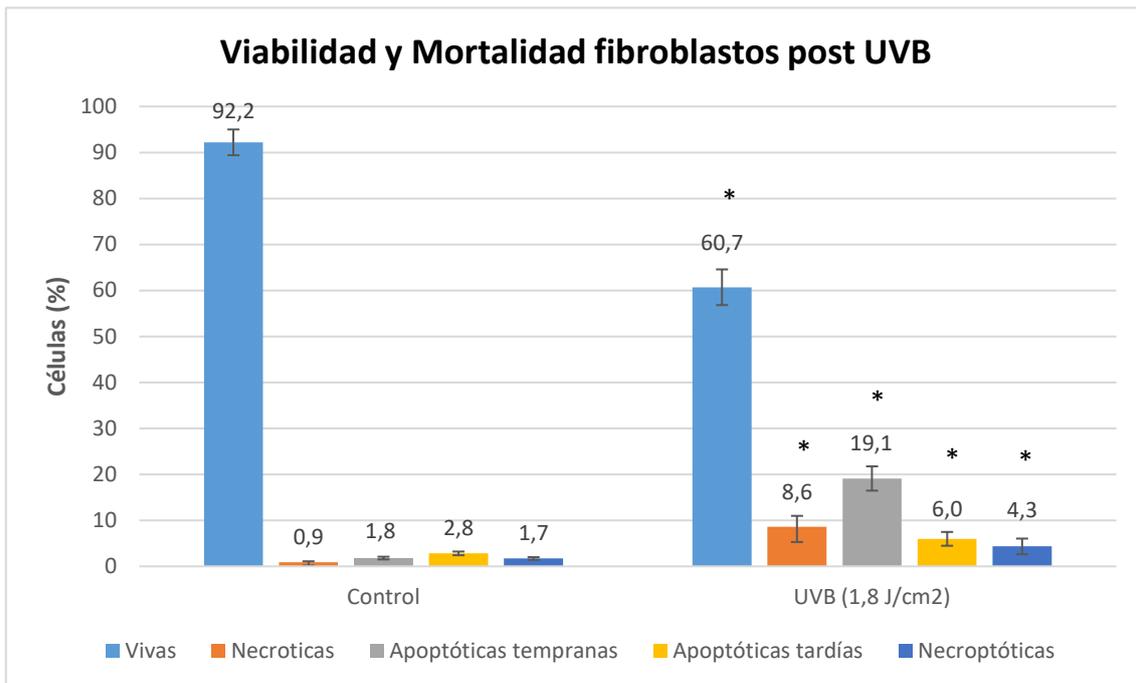


Figura 106. Efecto de la radiación UVB sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias estadísticamente significativas para viabilidad o un mismo tipo de mortalidad entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

En primer lugar observamos que a las 72 horas post irradiación con UVB el porcentaje de células vivas disminuye en un 31,5%, pasando del 92,2% (células control sin irradiar) al 60,7% (células irradiadas).

En las células control la mortalidad total es del 7,2%, siendo la apoptosis tardía (2,8%) el tipo de muerte celular predominante. En las células irradiadas la mortalidad total es del 38%, predominando la apoptosis temprana (19,1%) sobre el resto de subtipos.

Las diferencias en el porcentaje de viabilidad y en los porcentajes de los distintos subtipos de mortalidad objetivadas entre queratinocitos irradiados y no irradiados fueron estadísticamente significativas en todos los casos.

Las diferencias metodológicas entre el experimento 2 y el experimento 3 tanto en el tiempo de incubación previo a la irradiación como en la técnica de determinación, hace que los resultados de ambos experimentos no sean comparables.

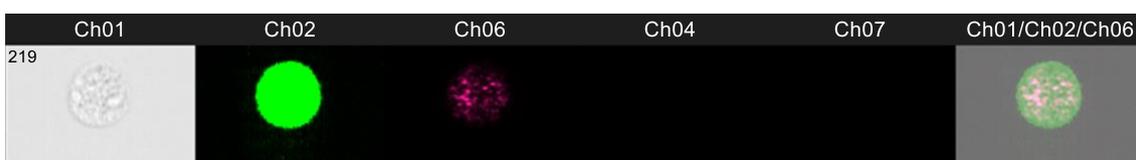


Figura 107. Fibroblastos humanos vivos senescentes mediante técnica APO5-Sen, en citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Fluorescencia verde en canal 2 para fluorocromo C₁₂-FDG. Negatividad en canal 4 para fluorocromo PE. Granulosidad celular en canal 6. Negatividad en canal 7 para fluorocromo DAPI. Integración o composite de canales 1, 2 y 6 en un mismo canal. (Figura del autor)

D.3.2.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los fibroblastos humanos.

Puesto que en experimentos previos de la presente tesis con espectrofotómetro se observó un incremento significativo de la proliferación celular de fibroblastos humanos no irradiados tras 72 horas de tratamiento con metformina a concentraciones de 5 μ M, resveratrol a concentraciones de 25 μ M y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), en el presente experimento se ha utilizado técnicas citométricas para evaluar la viabilidad y mortalidad celular tras 7 días de incubación a estas concentraciones de reactivo. También se empleó la concentración de metformina 5 mM por haber sido utilizada previamente por otros autores en la literatura en experimentos *in vitro*.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 108 se representa los valores de viabilidad y cada tipo de muerte celular, para cada concentración de metformina, resveratrol o tratamiento combinado, en fibroblastos humanos no irradiados tras 7 días de incubación.

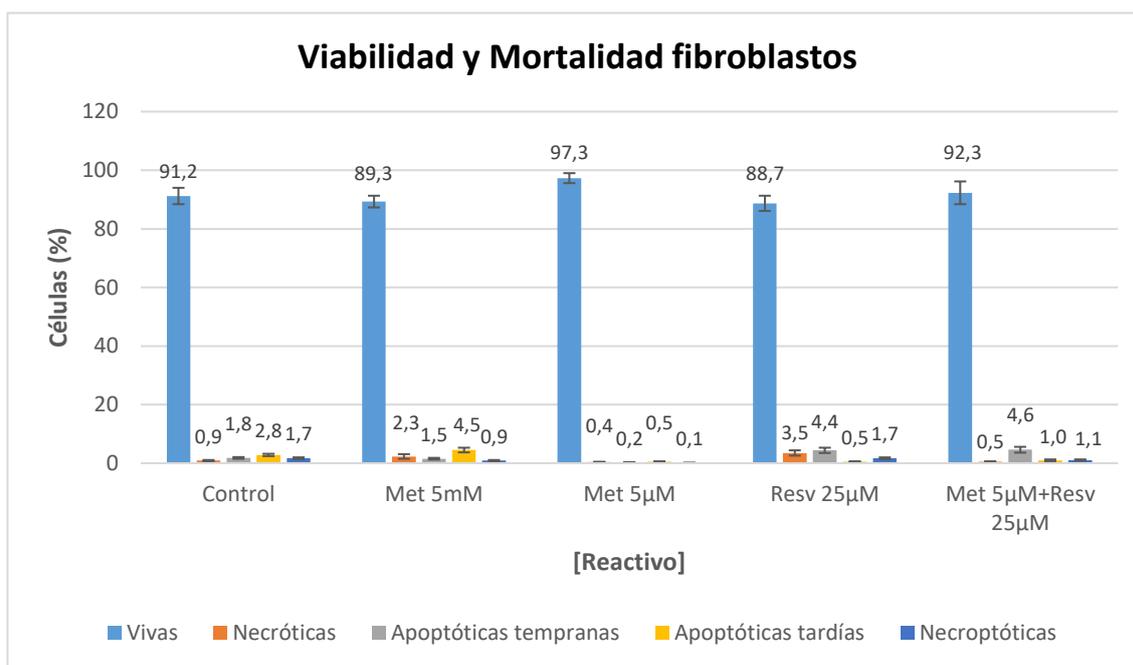


Figura 108. Protección de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la mortalidad celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD.

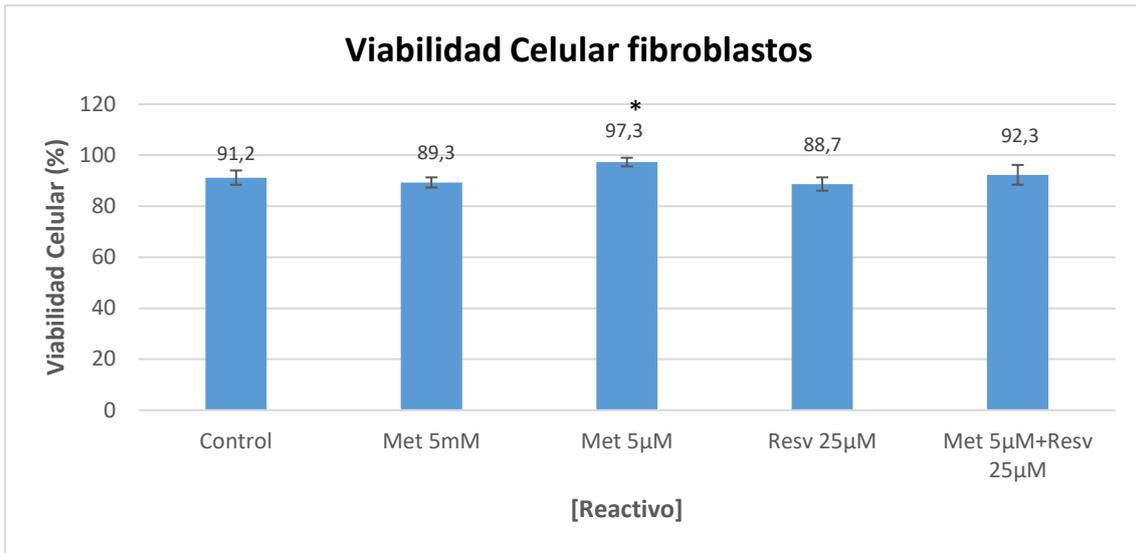


Figura 109. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la viabilidad celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en incremento de viabilidad estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

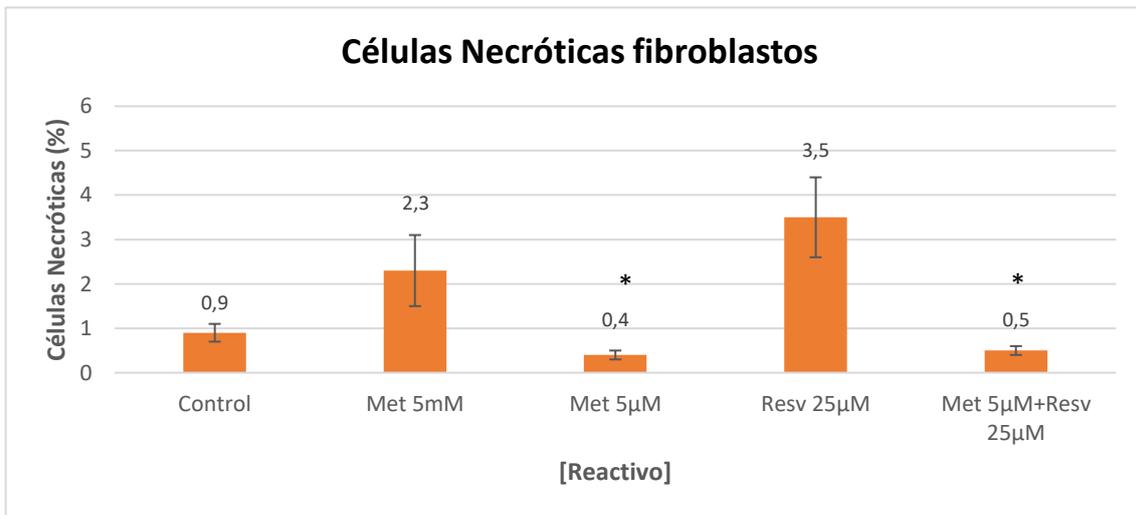


Figura 110. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necrosis celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necrosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

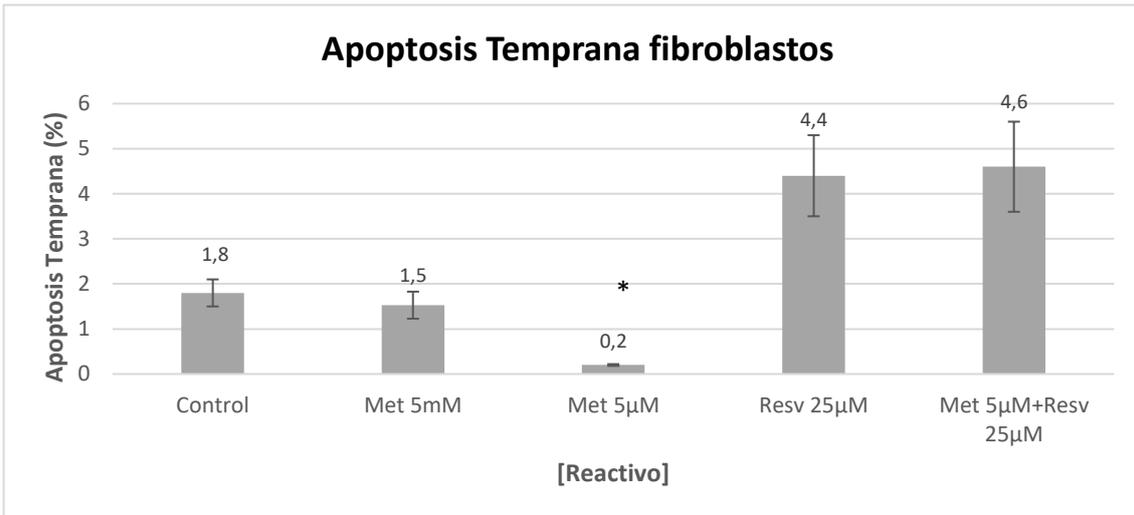


Figura 111. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis temprana de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis temprana estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

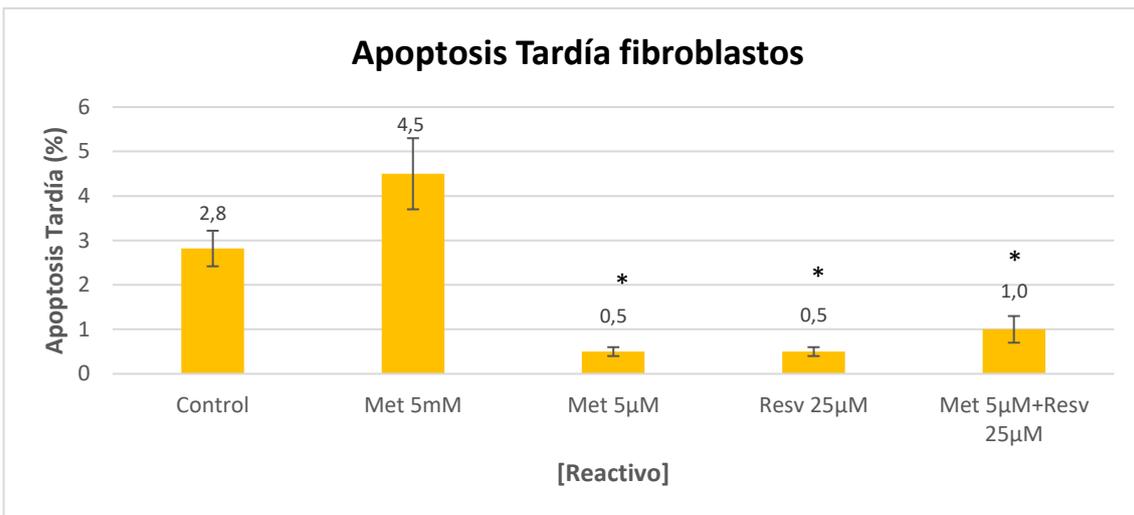


Figura 112. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis tardía de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis tardía estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

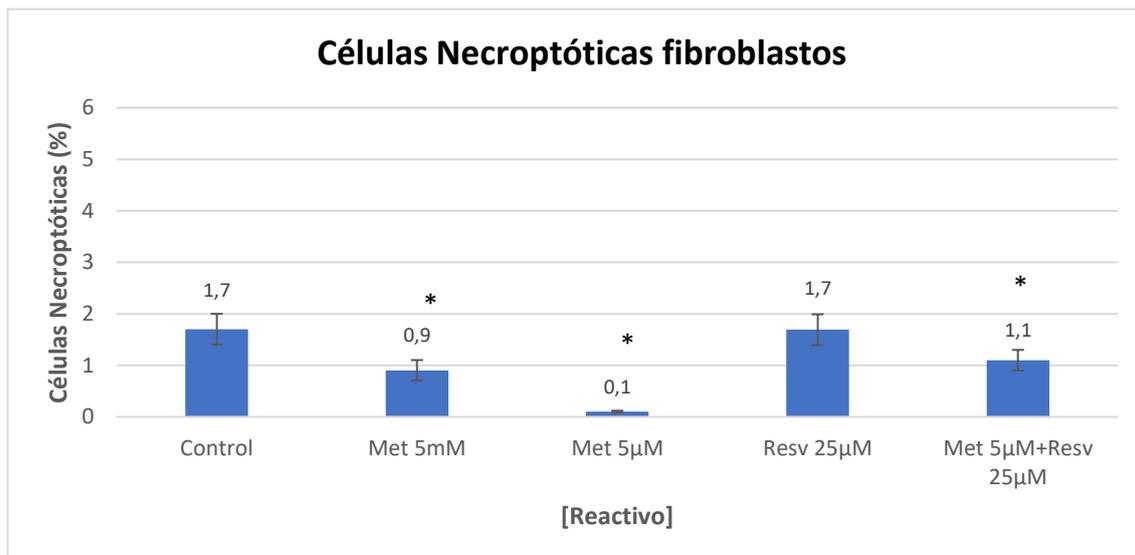


Figura 113. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necroptosis de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necroptosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$).

En la figura 109 observamos que únicamente se detectó incremento de viabilidad celular en fibroblastos humanos tratados con metformina 5 μ M, donde se objetivó un incremento en el porcentaje de células vivas del 6,1% si comparamos la viabilidad del grupo control no irradiado (91,2%) con la viabilidad del tratamiento con metformina 5 μ M en células no irradiadas (97,3%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Además de un incremento en la viabilidad celular, comparando los porcentajes de mortalidad celular entre fibroblastos humanos no irradiados tratados con metformina 5 μ M y el grupo control no irradiado, se objetivó un descenso en el porcentaje de necrosis del 0,5% (figura 110), un descenso en el porcentaje de apoptosis temprana del 1,6% (figura 111), un descenso en el porcentaje de apoptosis tardía del 2,3% (figura 112) y un descenso en el porcentaje de necroptosis del 1,6% (figura 113). Estas diferencias objetivadas fueron estadísticamente significativas para todos los subtipos de mortalidad.

La metformina 5 μ M, por tanto, fue la única concentración de reactivo que, de forma estadísticamente significativa, en fibroblastos humanos no irradiados, incrementó la viabilidad celular y disminuyó todos los subtipos de mortalidad celular analizados con respecto al control no irradiado sin reactivo.

D.3.2.3. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

Puesto que en experimentos citométricos previos de la presente tesis se observó un incremento significativo de la mortalidad de fibroblastos humanos tras la irradiación con UVB, se investigó el tipo de protección que ofrece el pretratamiento con metformina a concentraciones de 5 μM y 5 mM, resveratrol a concentraciones de 25 μM y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μM + Resv 25 μM), evaluando la mortalidad celular a las 72 horas post irradiación de fibroblastos humanos con UVB (1,8 J/cm²).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 114 se representa los valores de viabilidad y de cada tipo de muerte celular, inducida por radiación UVB (1,8 J/cm²), para cada concentración de reactivo, en fibroblastos humanos.

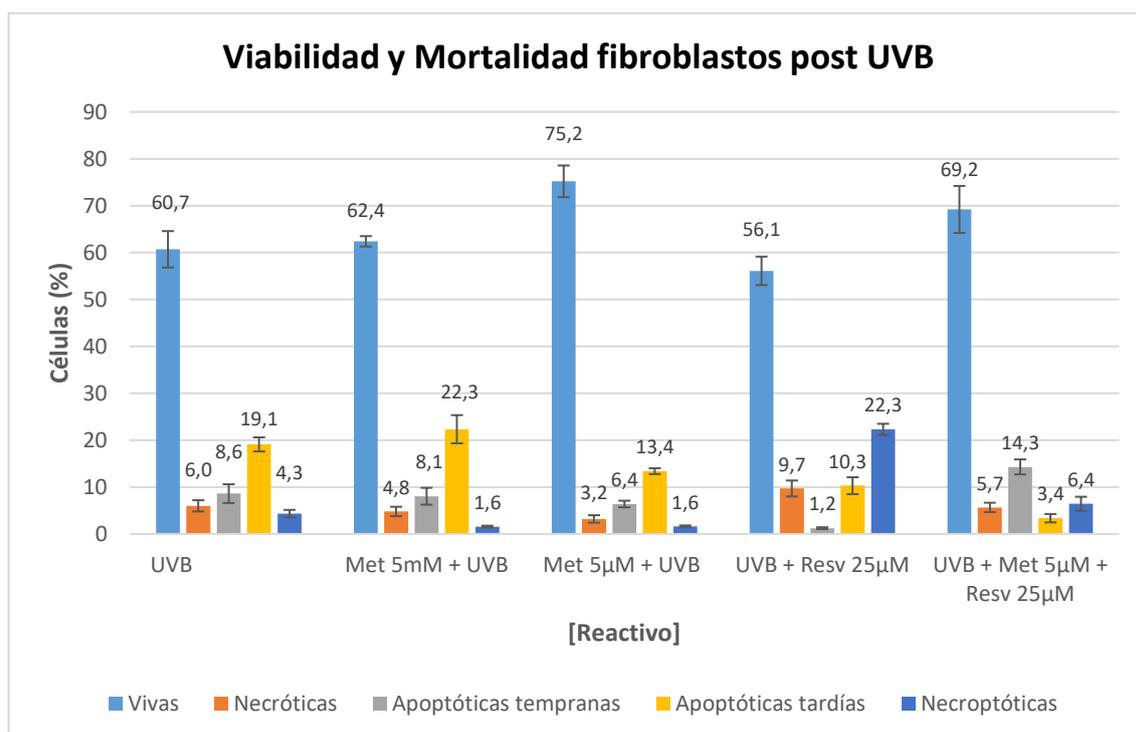


Figura 114. Protección de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD.

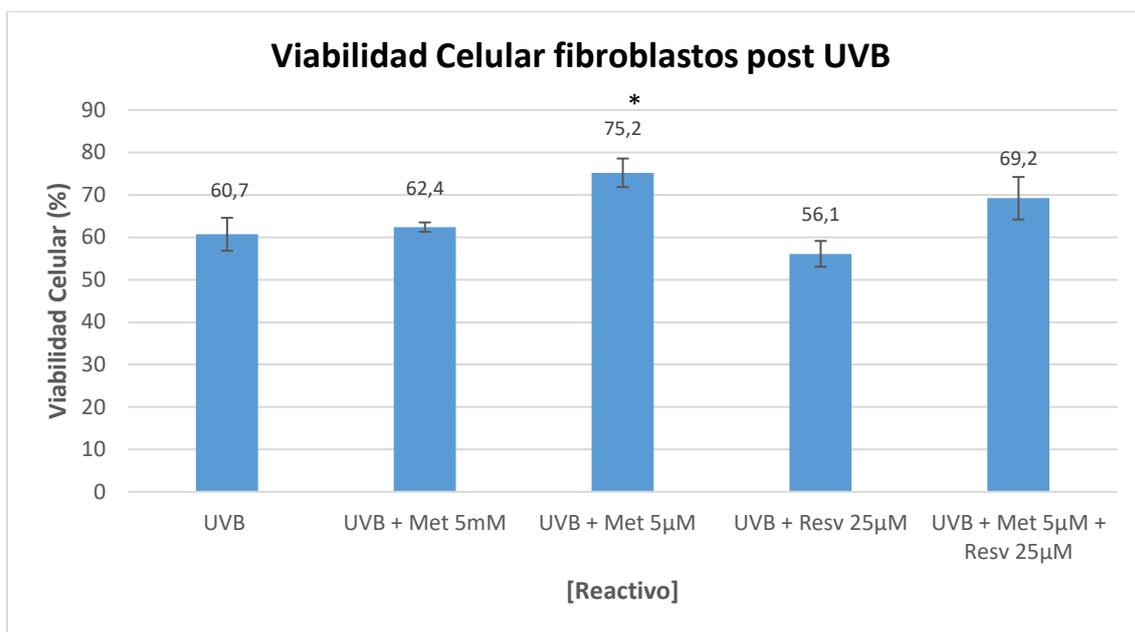


Figura 115. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la viabilidad celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en incremento de viabilidad estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

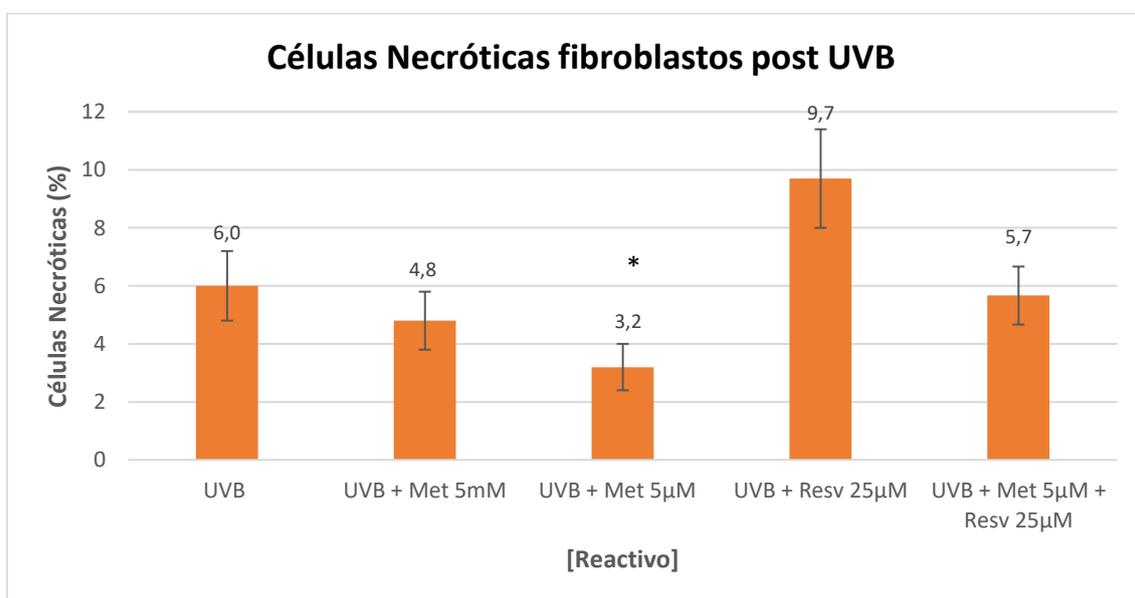


Figura 116. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la necrosis celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necrosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

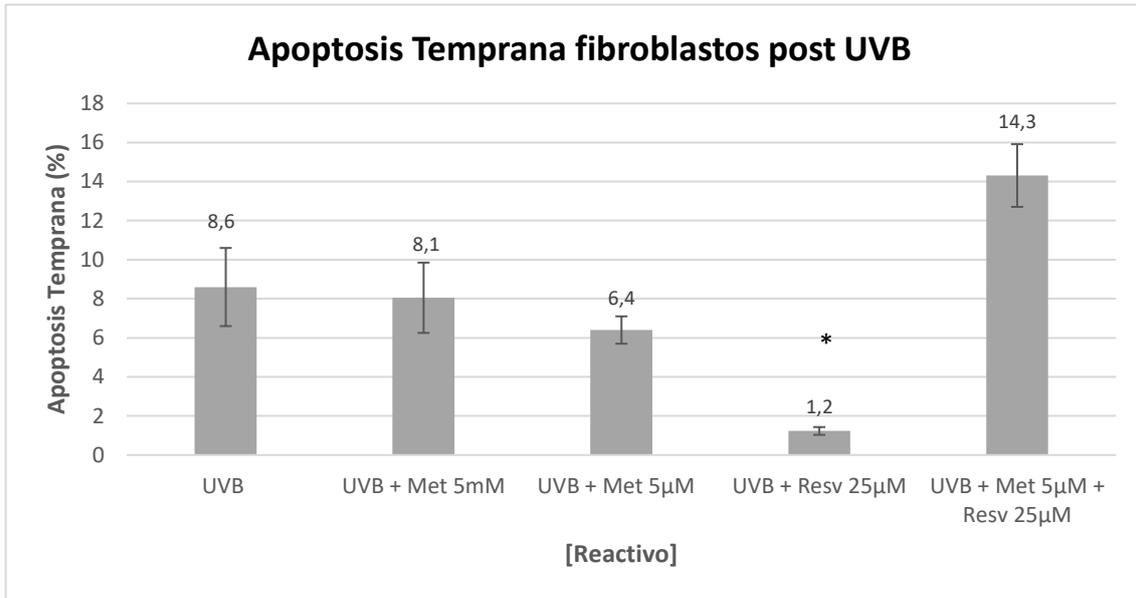


Figura 117. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 J/cm^2$), sobre la apoptosis temprana de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis temprana estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

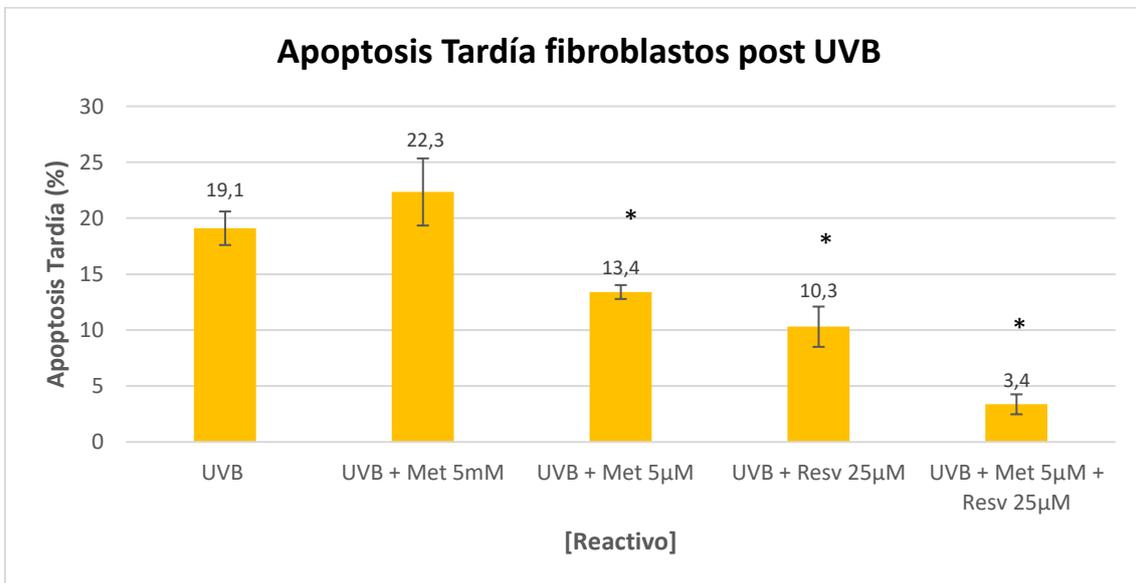


Figura 118. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 J/cm^2$), sobre la apoptosis tardía de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de apoptosis tardía estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

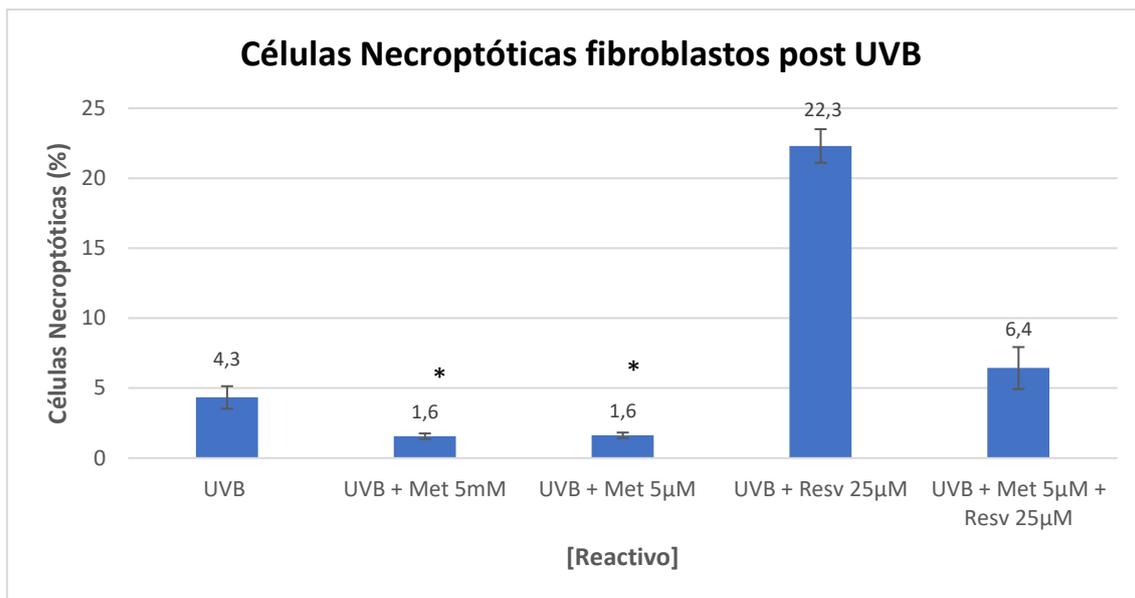


Figura 119. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la necroptosis de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en descenso de necroptosis estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$).

En la figura 115 observamos que, a las 72 horas post irradiación UVB, únicamente se detectó incremento de viabilidad celular en fibroblastos humanos pretratados con metformina $5 \mu\text{M}$, donde se objetivó un incremento en el porcentaje de células vivas del 14,5% si comparamos la viabilidad del grupo control irradiado (60,7%) con la viabilidad del pretratamiento con metformina $5 \mu\text{M}$ irradiadas (75,2%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Además de un incremento en la viabilidad celular, comparando los porcentajes de mortalidad celular entre fibroblastos irradiados pretratados con metformina $5 \mu\text{M}$ y el grupo control irradiado, se objetivó un descenso en el porcentaje de necrosis del 2,8% (figura 116), un descenso en el porcentaje de apoptosis temprana del 2,2% (figura 117), un descenso en el porcentaje de apoptosis tardía del 5,7% (figura 118) y un descenso en el porcentaje de necroptosis del 2,7% (figura 119). Estas diferencias objetivadas fueron estadísticamente significativas para todos los subtipos de mortalidad, excepto en el caso de la apoptosis temprana.

El pretratamiento con metformina $5 \mu\text{M}$, por tanto, fue la única concentración de reactivo que, de forma estadísticamente significativa, en fibroblastos humanos irradiados, incrementó la viabilidad celular y disminuyó todos los subtipos de mortalidad celular analizados, excepto en el caso de la apoptosis temprana, con respecto al control irradiado sin reactivo.

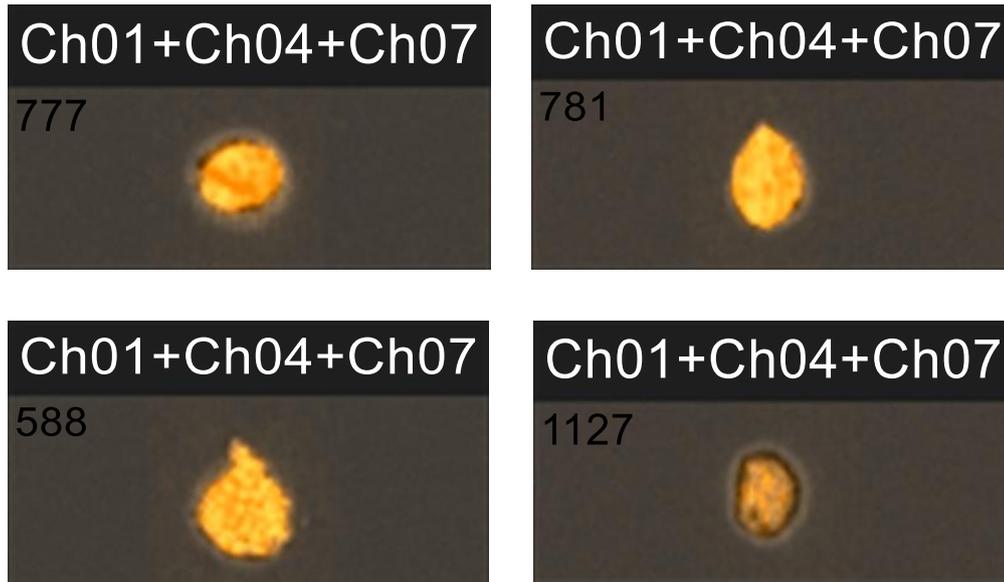


Figura 120. Muestra de 4 fibroblastos humanos apoptóticos tempranos, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), determinados mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Fluorescencia de membrana celular amarilla anaranjada en canal 4 para fluorocromo PE. Negatividad en canal 7 para fluorocromo DAPI. Las imágenes muestran la integración o composite de canales 1, 4 y 7 en un mismo canal. (Figura del autor)



Figura 121. Muestra de 2 fibroblastos humanos apoptóticos tardíos, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), determinados mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Fluorescencia de membrana celular amarilla anaranjada en canal 4 para fluorocromo PE. Fluorescencia violeta ,en núcleo celular desestructurado, en canal 7 para fluorocromo DAPI. Las imágenes muestran la integración o composite de canales 1, 4 y 7 en un mismo canal. (Figura del autor)

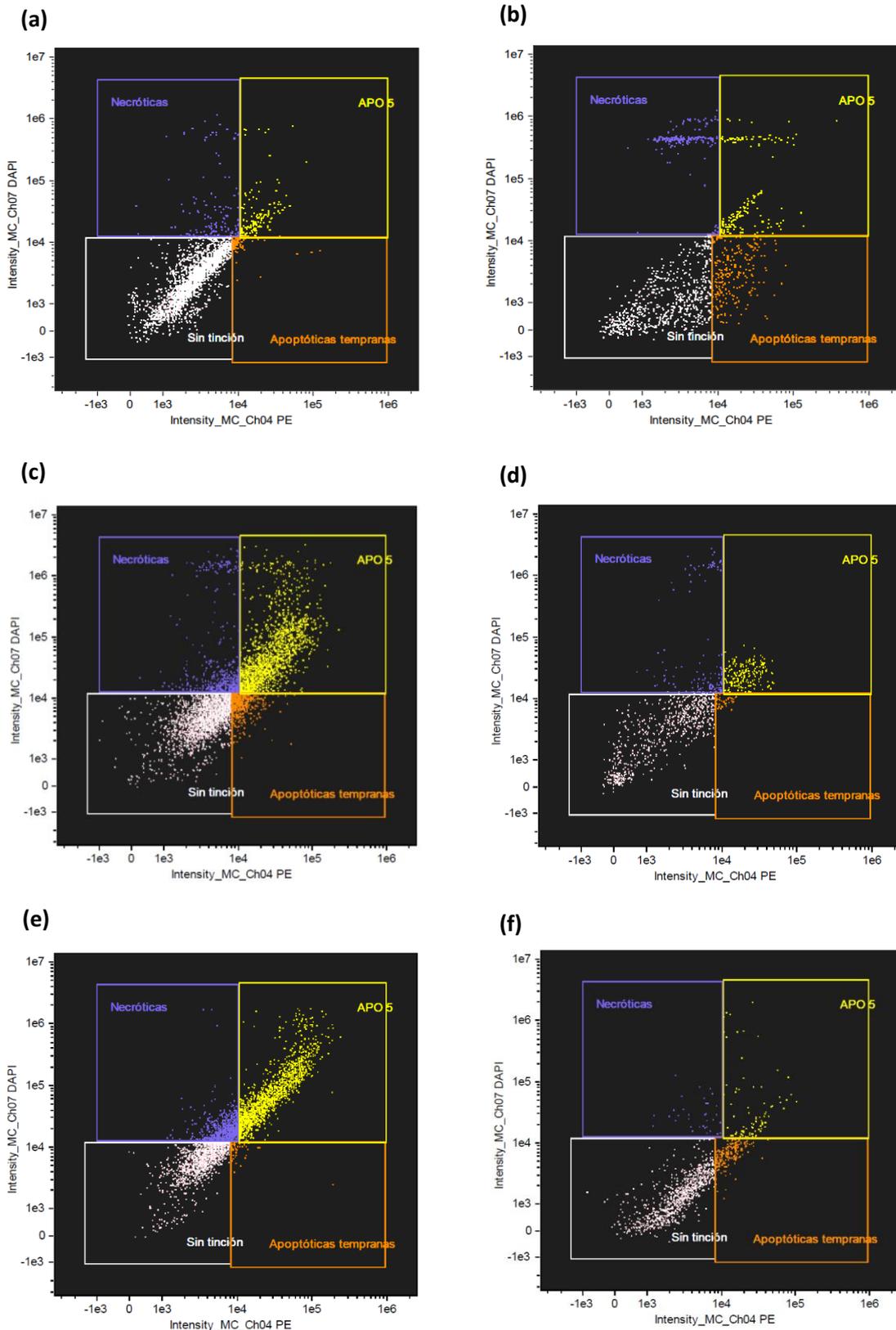


Figura 122. Histograma biparamétrico de fibroblastos humanos utilizando técnica APO 5 para análisis de muerte celular 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$). (a) Control. (b) UVB. (c) UVB + [Met 5mM]. (d) UVB + [Met 5 μM]. (e) UVB + [Resv 25 μM]. (f) UVB + [Met 5 μM + Resv 25 μM]. (Figura del autor)

D.3.2.4. Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

El análisis de la senescencia celular, inducida en fibroblastos humanos, a las 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), en comparación con los controles no irradiados se presentan en la figura 123. Las placas se cultivaron durante 72 horas para permitir el envejecimiento y senescencia celular. La senescencia se cuantificó mediante la actividad de la enzima SA- β -Gal en células vivas después de descartar las muertas con citometría de imagen. Esta enzima se encuentra principalmente activa en células senescentes, por lo que es un marcador ampliamente estudiado para valorar el envejecimiento y senescencia celular.

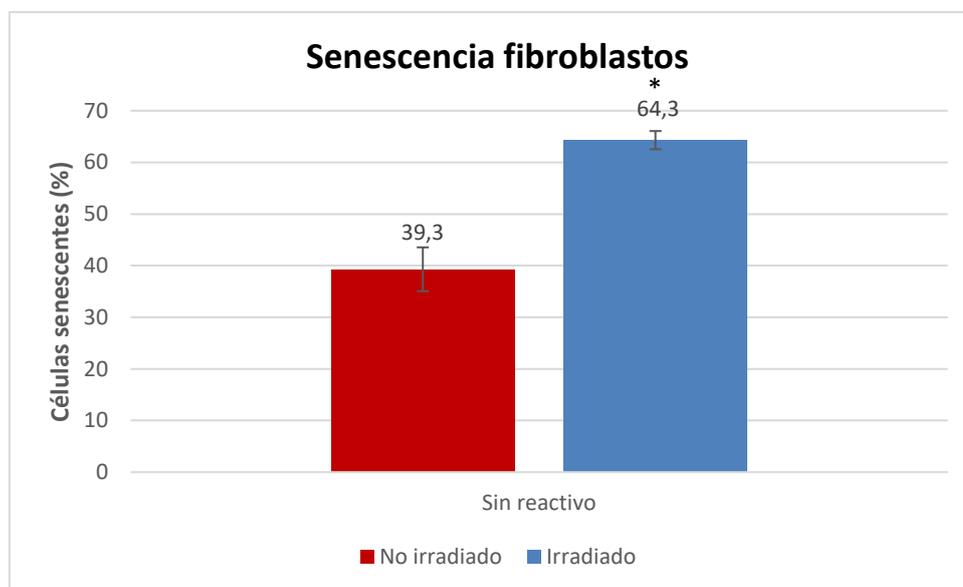


Figura 123. Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$). Diferencias entre células control sin reactivo no irradiadas y células control sin reactivo irradiadas con UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de senescencia celular estadísticamente significativas entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 123 se observa como a las 72 horas post irradiación con $1,8 \text{ J/cm}^2$ de UVB se produce un incremento en el porcentaje de senescencia celular en fibroblastos humanos del 25% si comparamos la senescencia del grupo no irradiado (64,3%) con la senescencia del grupo irradiado (39,3%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

D.3.2.5. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

Puesto que en experimentos previos se observó una disminución de la proliferación celular, un incremento de la mortalidad celular y un incremento en el porcentaje de senescencia celular de fibroblastos humanos tras la irradiación con UVB, se investigó el tipo de protección que ofrece el pretratamiento con metformina a concentraciones de 5 μM y 5 mM, resveratrol a concentraciones de 25 μM y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μM + Resv 25 μM), evaluando la senescencia celular a las 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²) de fibroblastos humanos (Figura 124).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

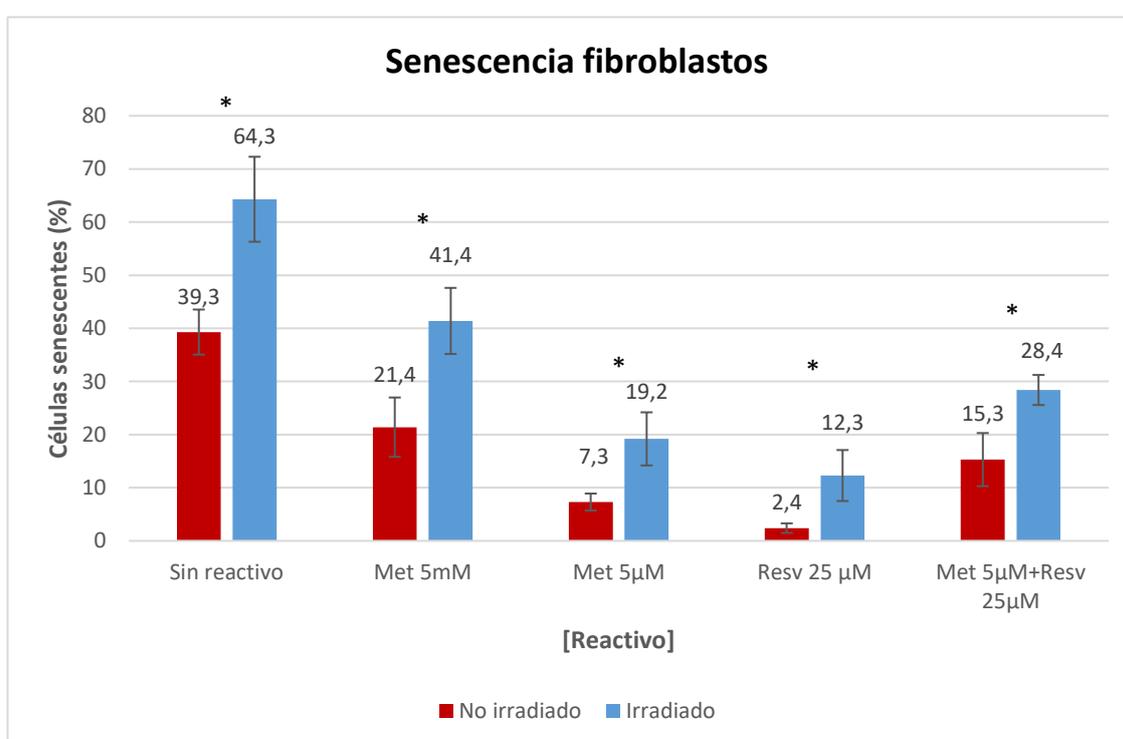


Figura 124. Protección de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de senescencia celular estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$).

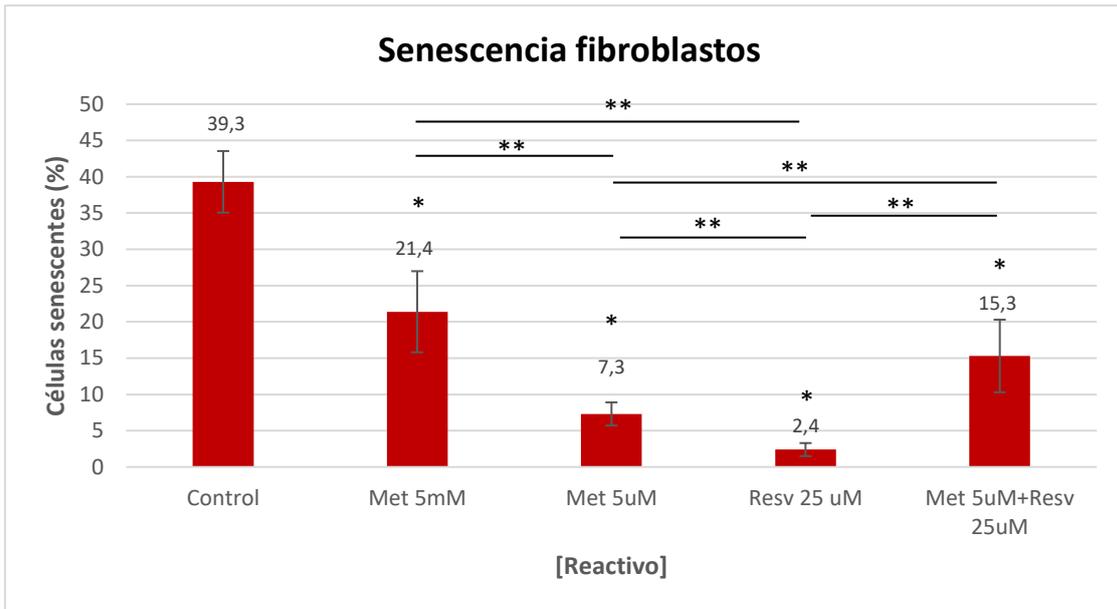


Figura 125. Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos no irradiados, entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo ($p < 0,05$). (**) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos no irradiados, entre distintas concentraciones de fármaco ($p < 0,05$).

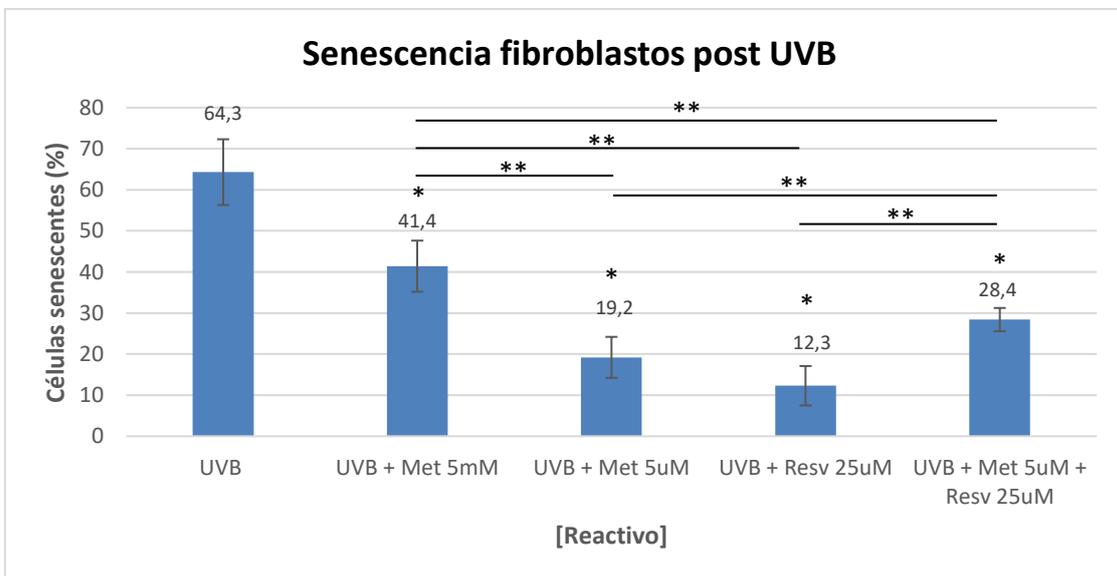


Figura 126. Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB ($1,8 \text{ J/cm}^2$), sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos irradiados, entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo ($p < 0,05$). (**) Diferencias en disminución de senescencia celular estadísticamente significativas, en experimentos irradiados, entre distintas concentraciones de fármaco ($p < 0,05$).

En la figura 124 se observa como en los fibroblastos humanos irradiados (barras azules) pretratados con metformina o resveratrol, el descenso en el porcentaje de

senescencia celular con respecto al control irradiado sin reactivo, en ningún caso llegó a igualar los valores de senescencia celular basales para esa misma concentración de reactivo en queratinocitos no irradiados (barras rojas). Así pues, a las 72 horas post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto entre la senescencia celular en fibroblastos humanos tratados con metformina irradiados (barra azul) (Met 5 mM=41,4%, Met 5 μ M=19,2%) y con metformina sin irradiar (barra roja) (Met 5 mM=21,4%, Met 5 μ M=7,3%), como entre la senescencia celular en fibroblastos con resveratrol irradiados (barra azul) (Resv 25 μ M= 12,3%) y con resveratrol sin irradiar (barra roja) (Resv 25 μ M= 2,4%). Las diferencias observadas entre la senescencia celular en fibroblastos con tratamiento combinado irradiados (barra azul) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=28,4%) y con tratamiento combinado sin irradiar (barra roja) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=15,3%) también fueron estadísticamente significativas.

Por lo que respecta a los fibroblastos con reactivo no irradiados (figura 125) se apreciaron disminuciones en el porcentaje de senescencia celular, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 17,9 % con la metformina 5 mM, del 32 % con la metformina 5 μ M, del 36,9 % con el resveratrol 25 μ M y del 24 % con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos. Entre distintas concentraciones de reactivo, se objetivaron diferencias del 14,1% entre fibroblastos pretratados con metformina 5 mM y fibroblastos pretratados con metformina 5 μ M, del 19% entre fibroblastos pretratados con metformina 5 mM y fibroblastos pretratados con resveratrol 25 μ M, del 4,9 % entre fibroblastos pretratados con metformina 5 μ M y fibroblastos pretratados con resveratrol 25 μ M, del 8% entre fibroblastos pretratados con metformina 5 μ M y fibroblastos pretratados con tratamiento combinado y del 12,9% entre fibroblastos pretratados con resveratrol 25 μ M y fibroblastos pretratados con tratamiento combinado. Estas diferencias objetivadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos.

Por tanto, en fibroblastos humanos no irradiados, el pretratamiento con resveratrol 25 μ M fue el más eficaz en la disminución del porcentaje de células senescentes con respecto al control sin irradiar.

En fibroblastos con reactivo irradiados (figura 126), a las 72 horas post UVB, se apreciaron disminuciones en el porcentaje de senescencia celular, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 22,9 % con la metformina 5 mM, del 45,1 % con la metformina 5 μ M, del 52 % con el resveratrol 25 μ M y del 35,9 % con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos. Entre distintas concentraciones de reactivo, se objetivaron diferencias del 22,2% entre fibroblastos pretratados con metformina 5 mM y fibroblastos pretratados con metformina 5 μ M, del 29,1% entre fibroblastos pretratados con metformina 5 mM y fibroblastos pretratados con resveratrol 25 μ M, del 13% entre fibroblastos pretratados con metformina 5 mM y fibroblastos pretratados tratamiento combinado, del 9,2% entre fibroblastos pretratados con metformina 5 μ M y fibroblastos pretratados con tratamiento combinado y del 16,1% entre fibroblastos pretratados con resveratrol 25 μ M y fibroblastos pretratados con tratamiento combinado. Estas diferencias objetivadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos. Las diferencias de senescencia celular del 6,9% objetivadas entre fibroblastos pretratados con metformina 5 μ M y resveratrol 25 μ M no fueron estadísticamente significativas.

Por tanto, en fibroblastos humanos irradiados, tanto el pretratamiento con resveratrol 25 μM como el pretratamiento con metformina 5 μM fueron los más eficaces en la disminución del porcentaje de células senescentes con respecto al control irradiado, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

Para cuantificar el porcentaje de células senescentes en este experimento, sólo se contabilizaron los fibroblastos vivos (cuadrante inferior izquierdo de los histogramas biparamétricos del citómetro de imagen con la técnica APO 5), sin incluir aquellas células apoptóticas (tempranas y tardías), necróticas y necroptóticas.

En los apartados D.3.2.1, D.3.2.2, D.3.2.3, se utilizó el término de células vivas o viables para incluir tanto a fibroblastos vivos proliferantes como vivos senescentes. En las gráficas de los apartados D.3.2.4 y D.3.2.5 los valores de senescencia celular se expresan como el porcentaje de células viables que fueron viables y senescentes.

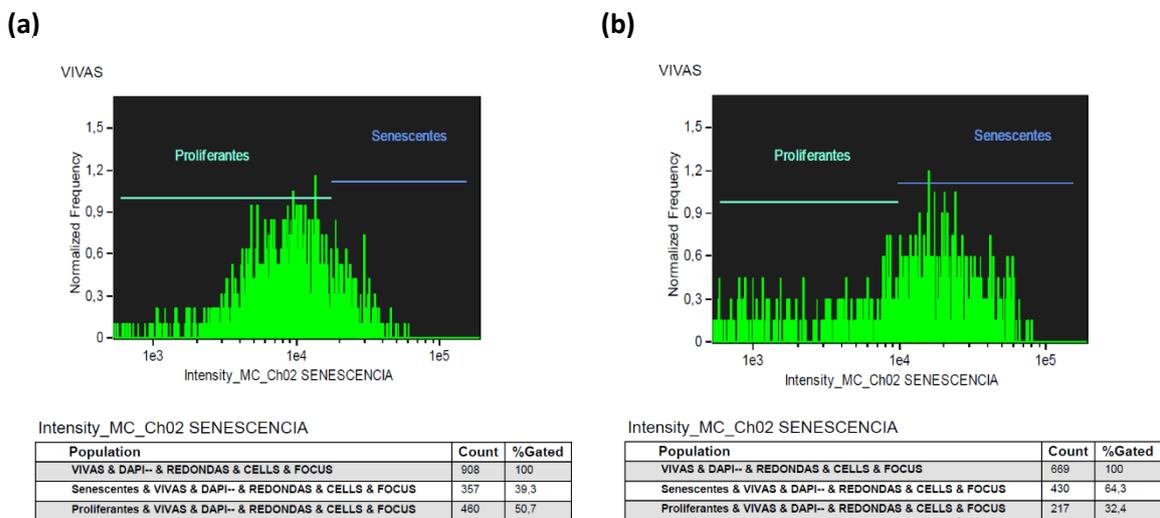


Figura 127. Histograma monoparamétrico de fibroblastos humanos, utilizando el fluorocromo C_{12} -FDG, para análisis de senescencia celular 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm^2). (a) Control. (b) UVB. (Figura del autor)



Figura 128. Muestra de 2 fibroblastos humanos senescentes mediante citómetro de imagen AMNIS[®], ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Fluorescencia verde en canal 2 para fluorocromo C_{12} -FDG. Las imágenes muestran la integración o composite de canales 1 y 2 en un mismo canal. (Figura del autor)

D.4. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB

D.4.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB

D.4.1.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB

En la figura 129 se muestra el efecto de la radiación UVB ($5,6 \text{ J/cm}^2$) sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos HaCaT. La determinación del anión superóxido se realizó utilizando el fluorocromo HE, realizando una cuantificación de la intensidad de la fluorescencia mediante técnicas de citometría de imagen.

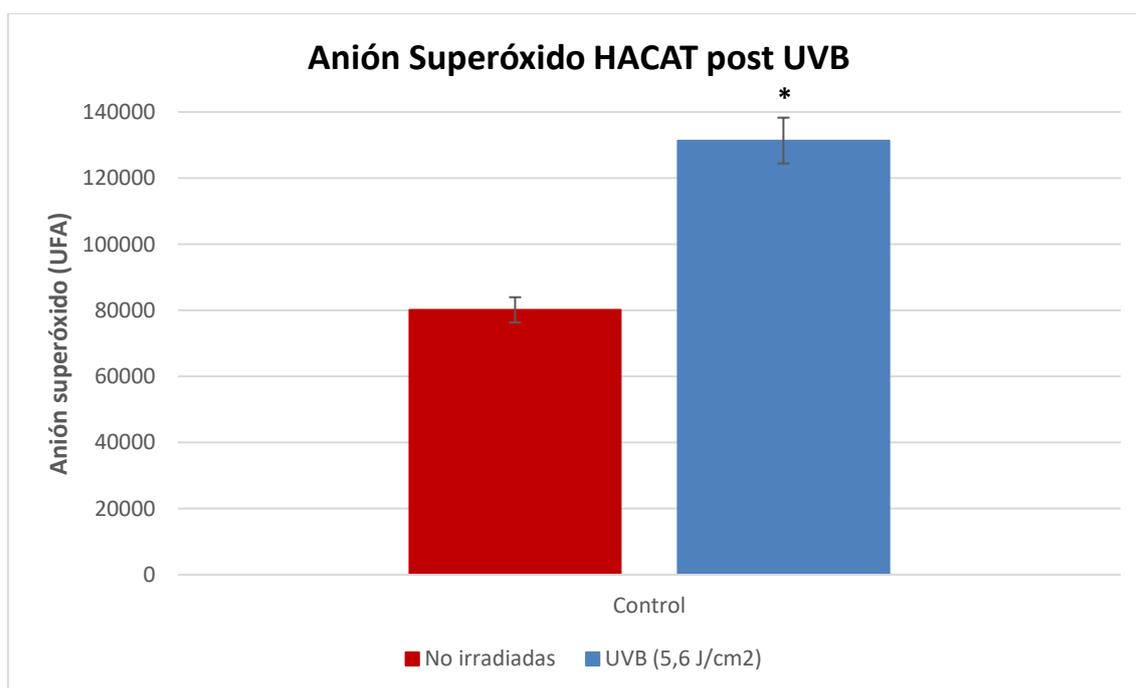


Figura 129. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos post irradiación con UVB ($5,6 \text{ J/cm}^2$). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (UFA) Unidades de Fluorescencia Arbitraria. (*) Diferencias en producción de anión superóxido estadísticamente significativas entre células irradiadas y no irradiadas (aplicando $p < 0,05$).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 129 se observa como inmediatamente después de la irradiación de queratinocitos HaCaT con $5,6 \text{ J/cm}^2$ de UVB se produce un incremento relativo en la producción del radical superóxido del 63,9 % si comparamos la producción de radical superóxido del grupo no irradiado (UFA= 80133,86) con la del grupo irradiado (UFA=131338,17), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Para cuantificar la producción del anión superóxido en este experimento (positividad con el fluorocromo HE), sólo se contabilizaron los queratinocitos HaCaT vivos (negatividad para el fluorocromo DAPI).

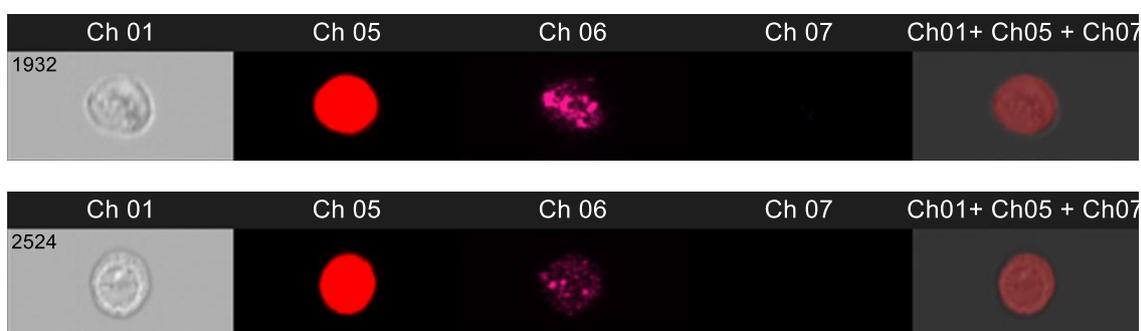


Figura 130. Detección de sobreproducción de anión superóxido, en queratinocitos humanos HaCaT vivos tras irradiación UVB, mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Fluorescencia roja en canal 5 para fluorocromo HE. Granulosidad celular en canal 6. Negatividad en canal 7 para fluorocromo DAPI. Integración o composite de canales 1,5 y 7 en un mismo canal. Muestra de 2 células irradiadas vivas con sobreproducción de anión superóxido. (Figura del autor)

D.4.1.2. Efecto protector de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB

Visto los efectos nocivos de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos, en este experimento analizamos el efecto protector de la metformina a concentraciones de 5 μ M y 5 mM, el resveratrol a concentraciones de 25 μ M y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), evaluando la producción del anión superóxido inmediatamente post-irradiación con UVB (5,6 J/cm²) de queratinocitos humanos HaCaT (Figura 131).

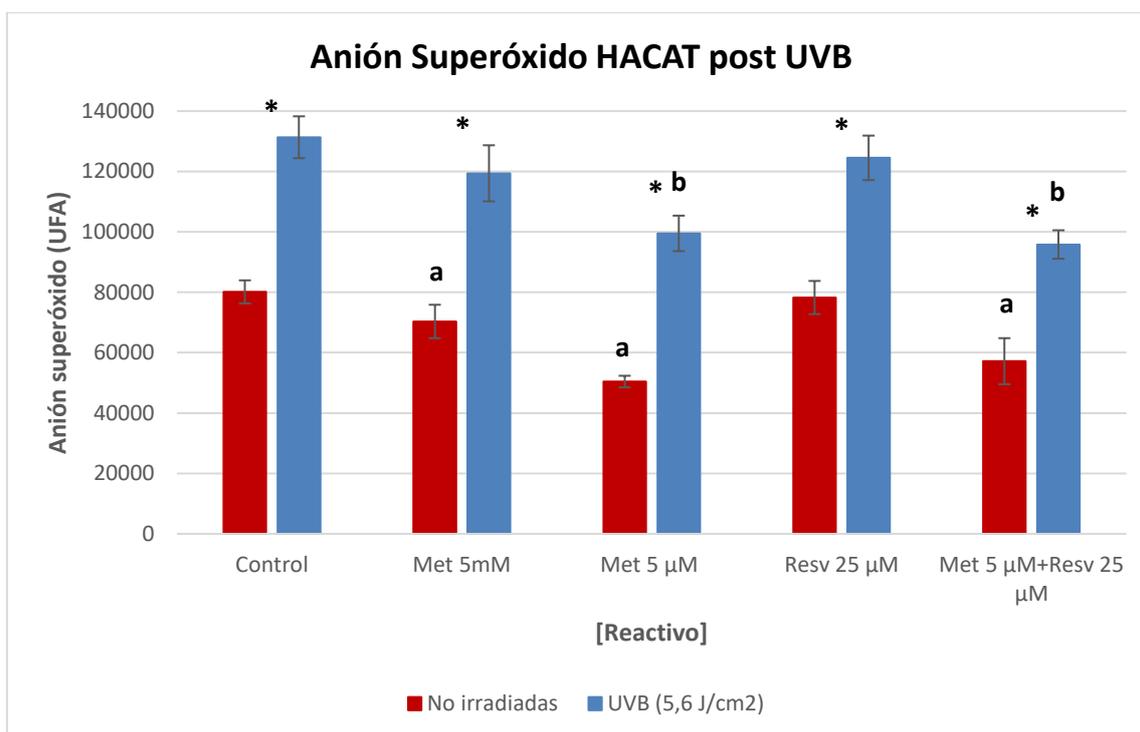


Figura 131. Protección de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos post irradiación con UVB (5,6 J/cm²). Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de producción de anión superóxido estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$). (a) Diferencias de producción de anión superóxido estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de producción de anión superóxido estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$). (UFA) Unidades de Fluorescencia Arbitraria.

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

Por lo que respecta a los queratinocitos con reactivo no irradiados (barras rojas) se apreciaron disminuciones relativas en la producción del radical superóxido, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 12,2% con la metformina 5 mM, del 37,1% con la metformina 5 μ M, del 2,3% con el resveratrol 25 μ M y del 33,7% con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos, excepto para el resveratrol 25 μ M.

En queratinocitos humanos no irradiados, tanto el pretratamiento con metformina 5 μ M como el pretratamiento con tratamiento combinado fueron los más eficaces en la disminución de la sobreproducción de anión superóxido con respecto al control no irradiado, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

En queratinocitos pretratados con reactivo metformina, resveratrol o combinación de ambos e irradiados (barras azules), inmediatamente post UVB, se apreciaron disminuciones relativas en la producción del radical superóxido, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 9,1% con la metformina 5 mM, del 24,2% con la metformina 5 μ M, del 5,2% con el resveratrol 25 μ M y del 27,0% con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas únicamente para el caso de la metformina 5 μ M y del tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M).

Por tanto, en queratinocitos humanos irradiados, tanto el pretratamiento con metformina 5 μ M como el pretratamiento con tratamiento combinado fueron los más eficaces en la disminución de la sobreproducción de anión superóxido con respecto al control irradiado, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

Inmediatamente post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto entre la producción de radical superóxido (expresado en UFA) en queratinocitos humanos tratados con metformina irradiados (barra azul) (Met 5 mM= 119399,89 ; Met 5 μ M= 99499,4) y con metformina sin irradiar (barra roja) (Met 5 mM= 70324,23 ; Met 5 μ M= 50420,19), como entre la producción de radical superóxido (expresado en UFA) en queratinocitos con resveratrol irradiados (barra azul) (Resv 25 μ M= 124510,8) y con resveratrol sin irradiar (barra roja) (Resv 25 μ M= 78254,78). Las diferencias observadas entre la producción de radical superóxido (expresado en UFA) en queratinocitos con tratamiento combinado irradiados (barra azul) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=95821,6) y con tratamiento combinado sin irradiar (barra roja) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M=53089,2) también fueron estadísticamente significativas.

D.4.2. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB

D.4.2.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB

En la figura 132 se muestra el efecto de la radiación UVB ($5,6 \text{ J/cm}^2$) sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos. La determinación del anión superóxido se realizó utilizando el fluorocromo HE, realizando una cuantificación de la intensidad de la fluorescencia mediante técnicas de citometría de imagen.

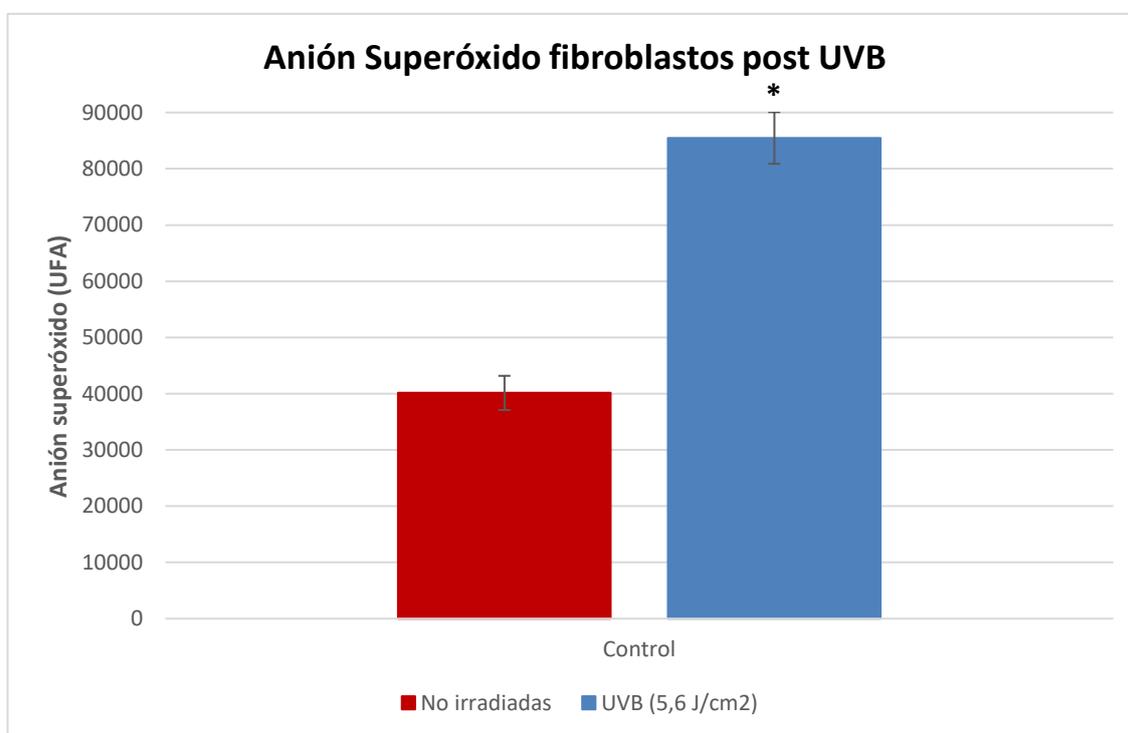


Figura 132. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos post irradiación con UVB ($5,6 \text{ J/cm}^2$). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (UFA) Unidades de Fluorescencia Arbitraria. (*) Diferencias en producción de anión superóxido estadísticamente significativas entre células irradiadas y no irradiadas (aplicando $p < 0,05$).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En la figura 132 se observa como inmediatamente después de la irradiación de fibroblastos humanos con $5,6 \text{ J/cm}^2$ de UVB se produce un incremento relativo en la producción del radical superóxido del 112,92 % si comparamos la producción de radical superóxido del grupo no irradiado (UFA= 40144,21) con la del grupo irradiado (UFA= 85478,54), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Para cuantificar la producción del anión superóxido en este experimento (positividad con el fluorocromo HE), sólo se contabilizaron los fibroblastos humanos vivos (negatividad para el fluorocromo DAPI).

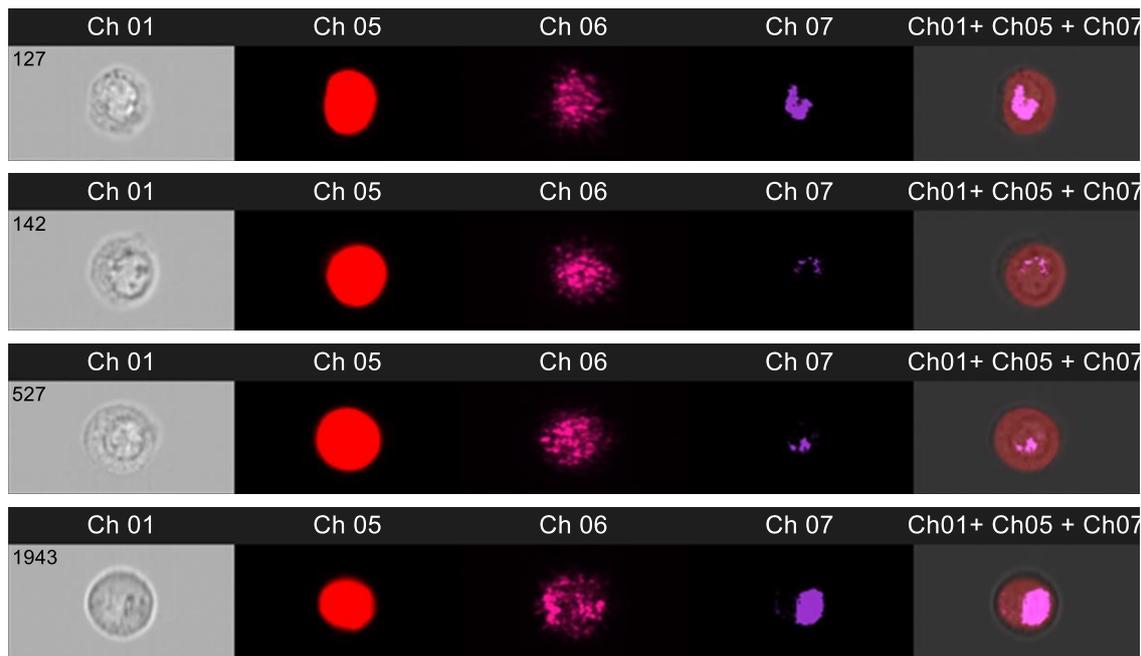


Figura 133. Detección de sobreproducción de anión superóxido, en fibroblastos humanos muertos tras irradiación UVB, mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X. Células enfocadas mediante óptica 40X con campo claro o brightfield en canal 1. Fluorescencia roja en canal 5 para fluorocromo HE. Granulosidad celular en canal 6. Fluorescencia violeta en núcleo celular en canal 7 para fluorocromo DAPI. Integración o composite de canales 1,5 y 7 en un mismo canal. Selección de células irradiadas muertas con sobreproducción de anión superóxido. (Figura del autor)

D.4.2.2. Efecto protector de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB

Visto los efectos nocivos de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos, en este experimento analizamos el efecto protector de la metformina a concentraciones de 5 μ M y 5 mM, el resveratrol a concentraciones de 25 μ M y la combinación de ambos reactivos (Met 5 μ M + Resv 25 μ M), evaluando la producción del anión superóxido inmediatamente post-irradiación con UVB (5,6 J/cm²) de fibroblastos humanos (Figura 134).

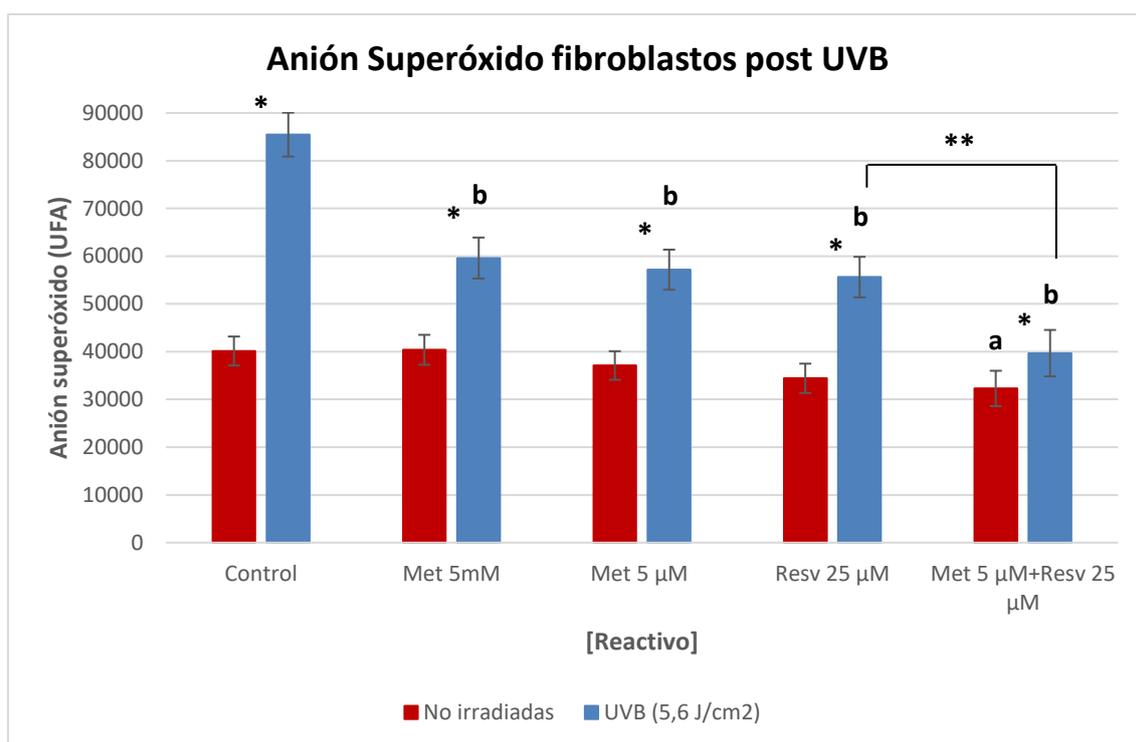


Figura 134. Protección de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos post irradiación con UVB (5,6 J/cm²). Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (*) Diferencias de producción de anión superóxido estadísticamente significativas para una misma concentración de reactivo entre células irradiadas y no irradiadas ($p < 0,05$). (a) Diferencias de producción de anión superóxido estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de producción de anión superóxido estadísticamente significativas entre una concentración de reactivo y su control sin reactivo, en células irradiadas ($p < 0,05$). (UFA) Unidades de Fluorescencia Arbitraria. (**) Diferencias en producción de anión superóxido estadísticamente significativas entre fibroblastos pretratados con resveratrol 25 μ M irradiados y fibroblastos pretratados con tratamiento combinado irradiados ($p < 0,05$).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

En fibroblastos con reactivo no irradiados (barras rojas) se apreciaron disminuciones relativas en la producción del radical superóxido, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 7,5% con la metformina 5 μ M, del 14,3% con el resveratrol 25 μ M y del 19,5% con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso del tratamiento combinado. En cuanto a la dosis de metformina 5 mM, se apreció un incremento relativo en la producción del radical superóxido, con respecto al control sin reactivo no irradiado, del 0,6% , aunque estas diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

Por tanto, en fibroblastos humanos no irradiados, el pretratamiento con tratamiento combinado fue el más eficaz en la disminución de la sobreproducción de anión superóxido con respecto al control no irradiado.

Por lo que respecta a los fibroblastos con reactivo irradiados (barras azules), inmediatamente post UVB, se apreciaron disminuciones relativas en la producción del radical superóxido, con respecto al control sin reactivo irradiado, del 30,3% con la metformina 5 mM, del 33,1% con la metformina 5 μ M, del 34,9% con el resveratrol 25 μ M y del 53,6% con el tratamiento combinado (Met 5 μ M + Resv 25 μ M). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos. Entre distintas concentraciones de reactivo, se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre la disminución en la producción de radical superóxido en fibroblastos pretratados con resveratrol 25 μ M y los fibroblastos pretratados con tratamiento combinado.

Por tanto, en fibroblastos humanos irradiados, el pretratamiento con tratamiento combinado fue el más eficaz en la disminución de la sobreproducción de anión superóxido con respecto al control irradiado.

Inmediatamente post irradiación, para una misma concentración de reactivo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto entre la producción de radical superóxido (expresado en UFA) en fibroblastos humanos tratados con metformina irradiados (barra azul) (Met 5 mM= 59618,3 ; Met 5 μ M= 57172,9) y con metformina sin irradiar (barra roja) (Met 5 mM= 40393,0 ; Met 5 μ M= 37110,9), como entre la producción de radical superóxido (expresado en UFA) en fibroblastos con resveratrol irradiados (barra azul) (Resv 25 μ M= 55627,0) y con resveratrol sin irradiar (barra roja) (Resv 25 μ M= 34422,8). Las diferencias observadas entre la producción de radical superóxido (expresado en UFA) en fibroblastos con tratamiento combinado irradiados (barra azul) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M= 39694,3) y con tratamiento combinado sin irradiar (barra roja) (Met 5 μ M + Resv 25 μ M= 32299,6) también fueron estadísticamente significativas.

D.5. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos y fibroblastos humanos

D.5.1. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos humanos

En los experimentos citométricos de senescencia celular con queratinocitos HaCaT de la presente tesis, el resveratrol de 25 μM fue, junto con el tratamiento combinado, el reactivo antisenescente más eficaz, comparado con el control sin reactivo no irradiado (figura 101). En los experimentos citométricos de mortalidad celular, las diferencias de viabilidad celular entre el resveratrol 25 μM y el control sin reactivo no irradiado no fueron estadísticamente significativas (figura 86). Con estos datos, se analizó el efecto senolítico del resveratrol a concentraciones crecientes de 2,5 μM , 25 μM , 100 μM , 400 μM y 1,6 mM, evaluando simultáneamente la mortalidad y senescencia celular en queratinocitos humanos, tras 72 horas de incubación en estufa con dicho reactivo (figura 135).

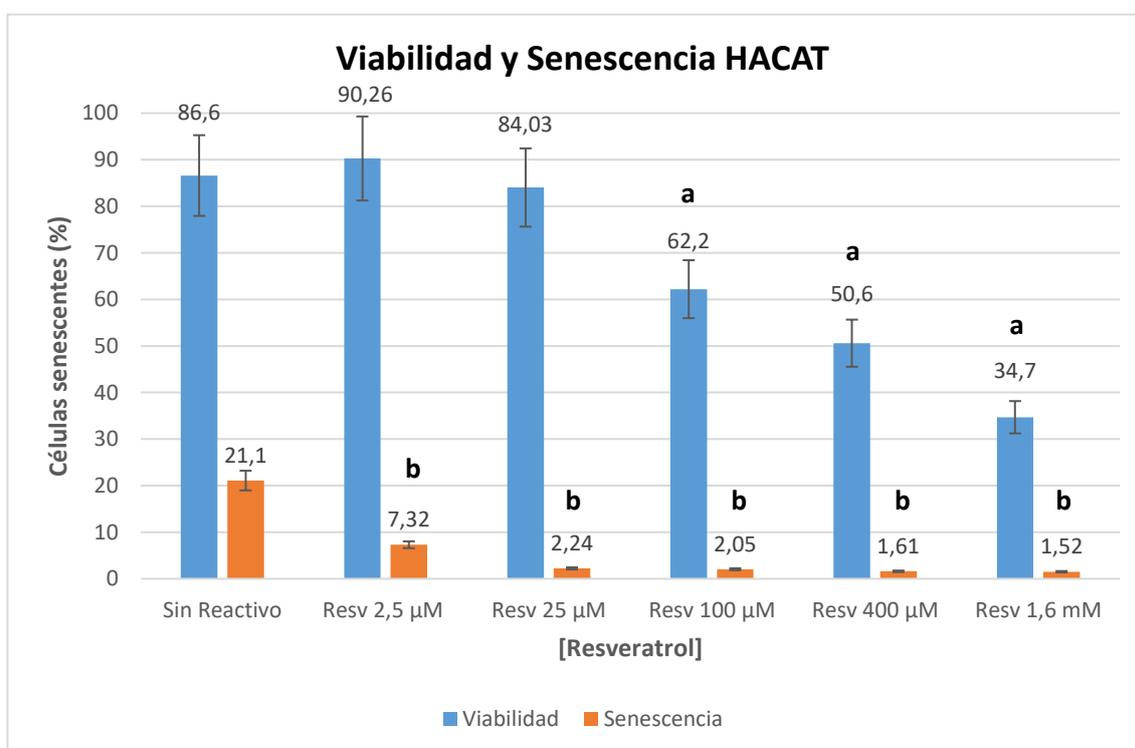


Figura 135. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos humanos tras 72 horas de incubación. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. **(a)** Diferencias de viabilidad celular estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$). **(b)** Diferencias de senescencia celular estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$). Las diferencias de viabilidad celular entre el resveratrol 2,5 μM y el resveratrol 25 μM no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las diferencias de senescencia celular entre el resveratrol 2,5 μM y el resveratrol 25 μM fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

Mediante técnicas de citometría de imagen, se determinó simultáneamente apoptosis, necrosis y senescencia, seleccionando únicamente las células vivas para contabilizar la senescencia, excluyendo apoptóticas y necróticas. En la figura 135 se observa que los controles sin reactivo presentaban un 21,1% de células senescentes y que tras la exposición a resveratrol a concentración 1,6 mM disminuían hasta cifras de 1,52%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

En queratinocitos humanos *in vitro*, tras 72 horas de incubación con resveratrol 2,5 μ M y 25 μ M, las diferencias observadas de viabilidad celular, con respecto al control sin reactivo, no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, las disminuciones dosis dependiente de senescencia celular observadas a estas concentraciones, con respecto al control sin reactivo, fueron estadísticamente significativas.

Las diferencias de viabilidad celular del 6,23% objetivadas entre queratinocitos HaCaT pretratados con resveratrol 2,5 μ M y queratinocitos HaCaT pretratados con resveratrol 25 μ M no fueron estadísticamente significativas. Las diferencias de senescencia celular del 5,08% existentes entre queratinocitos humanos pretratados con resveratrol 2,5 μ M y queratinocitos humanos pretratados con resveratrol 25 μ M fueron estadísticamente significativas.

Tras incubación de 72 horas en queratinocitos humanos *in vitro*, con resveratrol 100 μ M, 400 μ M y 1,6 mM las disminuciones dosis dependientes de viabilidad celular, con respecto al control sin reactivo, fueron estadísticamente significativas. Las disminuciones dosis dependiente de senescencia celular observadas a estas concentraciones, con respecto al control sin reactivo, también fueron estadísticamente significativas.

Por tanto, en queratinocitos humanos HaCaT *in vitro* no irradiados, el pretratamiento con resveratrol 25 μ M fue la concentración senolítica más eficaz, ya que se objetivó la mayor disminución estadísticamente significativa en porcentaje de células senescentes sin observarse disminución estadísticamente significativa en porcentaje de células viables con respecto al control sin reactivo.

Las diferencias metodológicas entre el experimento 1 y el experimento 5 con respecto a la técnica de determinación mediante espectrofotómetro en el experimento 1 y mediante citómetro de imagen en el experimento 5, hace que los resultados de ambos experimentos no sean comparables

Las diferencias metodológicas entre el experimento 3 y el experimento 5 tanto en cuanto al tiempo de incubación de 7 días en el experimento 3 y 3 días en el experimento 5, hace que los resultados de ambos experimentos no sean comparables.

En el apartado D.5.1 se utilizó el término de células viables para incluir tanto a queratinocitos vivos proliferantes como vivos senescentes. Los valores de senescencia celular se expresan como el porcentaje de células viables que fueron viables y senescentes.

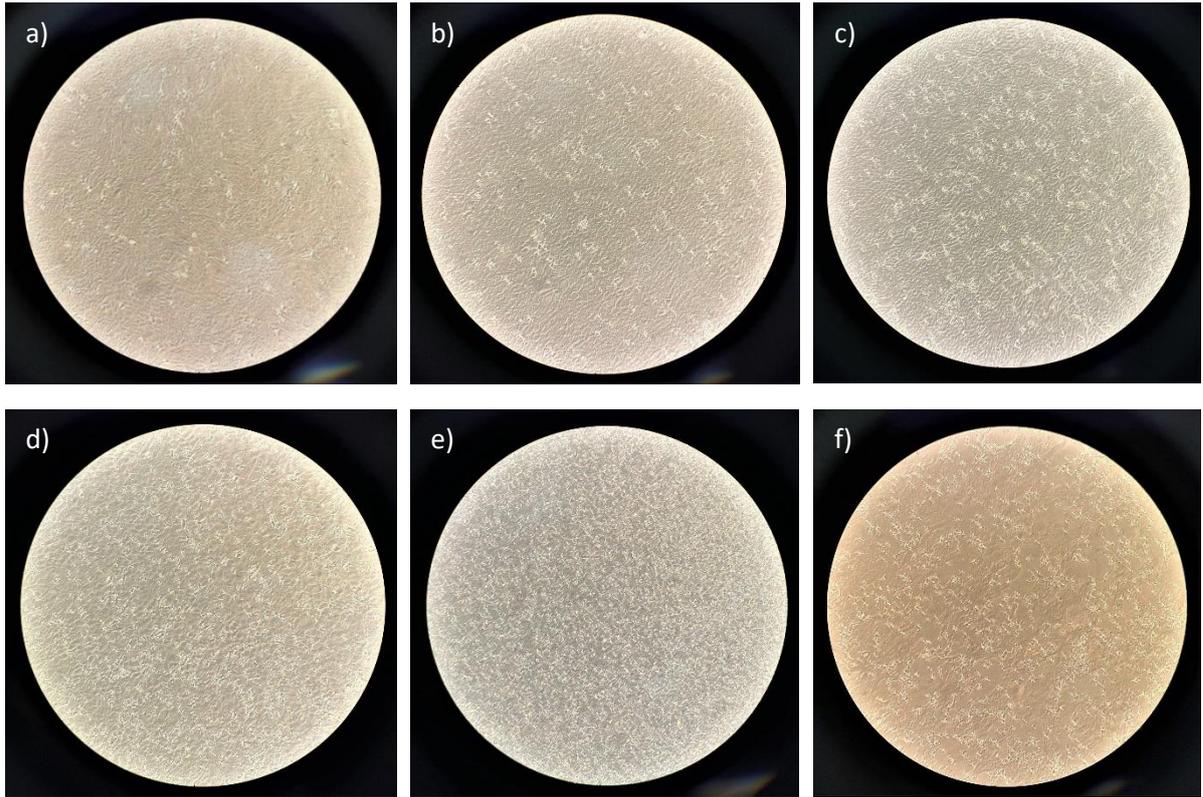


Figura 136. Queratinocitos humanos HaCaT tras 72 horas de incubación con resveratrol a concentraciones crecientes de 2,5 μM , 25 μM , 100 μM , 400 μM y 1,6 mM. (a) Control sin reactivo. (b) Resveratrol [2,5 μM]. (c) Resveratrol [25 μM]. (d) Resveratrol [100 μM]. (e) Resveratrol [400 μM]. (f) Resveratrol [1,6 mM]. Microscopio óptico a 10x (Fotografías del autor)

D.5.2. Efecto senolítico del resveratrol en fibroblastos humanos

En los experimentos citométricos de senescencia celular con fibroblastos humanos de la presente tesis, el resveratrol de 25 μM fue el reactivo antisenescente más eficaz, comparado con el control sin reactivo no irradiado (figura 125). En los experimentos citométricos de mortalidad celular, las diferencias de viabilidad celular entre el resveratrol 25 μM y el control sin reactivo no irradiado no fueron estadísticamente significativas (figura 109). Con estos datos, se analizó el efecto senolítico del resveratrol a concentraciones crecientes de 2,5 μM , 25 μM , 100 μM , 400 μM y 1,6 mM, evaluando simultáneamente la mortalidad y senescencia celular en fibroblastos humanos, tras 72 horas de incubación en estufa con dicho reactivo (Figura 137).

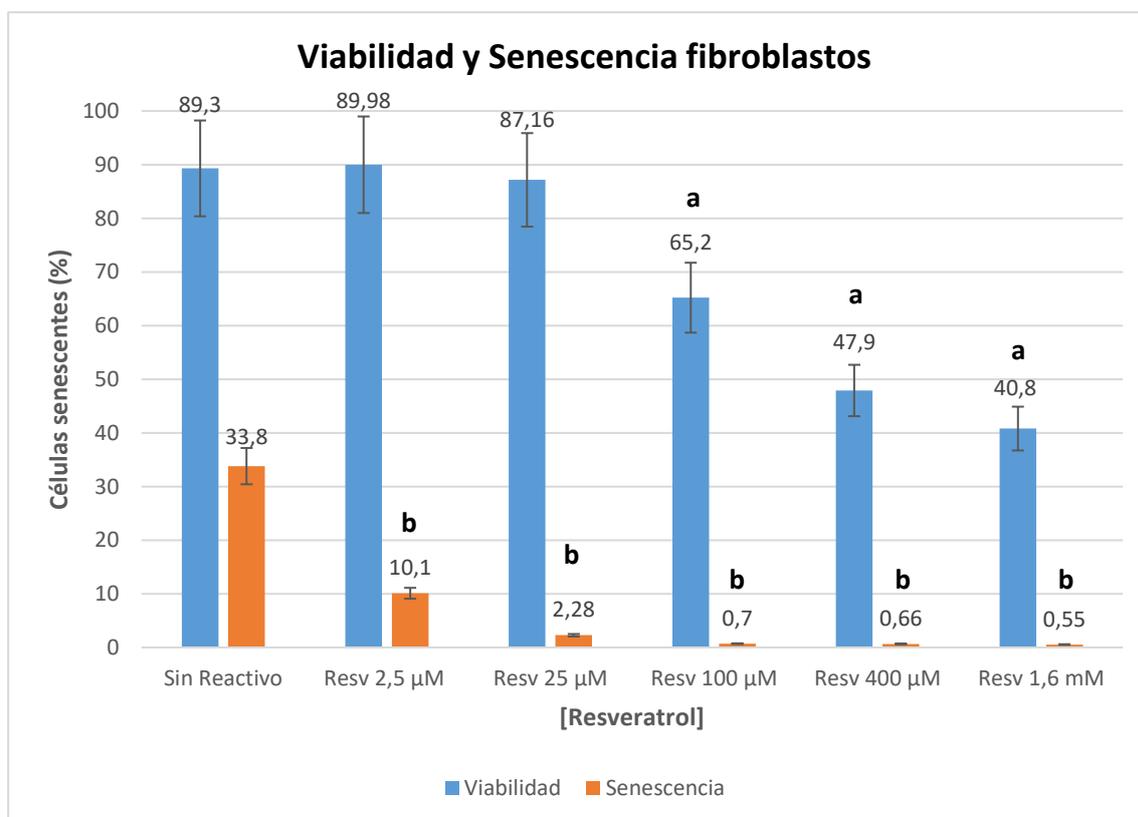


Figura 137. Efecto senolítico del resveratrol en fibroblastos humanos tras 72 horas de incubación. Cada punto representa el promedio de 9 determinaciones independientes \pm SD. (a) Diferencias de viabilidad celular estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$). (b) Diferencias de senescencia celular estadísticamente significativas entre una concentración de resveratrol y su control sin reactivo, en células no irradiadas ($p < 0,05$). Las diferencias de viabilidad celular entre el resveratrol 2,5 μM y el resveratrol 25 μM no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las diferencias de senescencia celular entre el resveratrol 2,5 μM y el resveratrol 25 μM fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Para la realización de este experimento, se llevó a cabo un total de 9 ensayos, empleando para cada uno de ellos una placa de cultivo celular de 12 pocillos. La lectura de los datos se realizó en 3 días distintos, realizando lecturas de 3 ensayos cada día.

Mediante técnicas de citometría de imagen, determinó simultáneamente apoptosis, necrosis y senescencia, seleccionando únicamente las células vivas para contabilizar la senescencia, excluyendo apoptóticas y necróticas. En la figura 137 se observa que los controles sin reactivo presentaban un 33,8% de células senescentes y que tras la exposición a resveratrol a concentración 1,6 mM disminuían hasta cifras de 0,55%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

En fibroblastos humanos *in vitro*, tras 72 horas de incubación con resveratrol 2,5 μ M y 25 μ M, las diferencias observadas de viabilidad celular, con respecto al control sin reactivo, no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, las disminuciones dosis dependiente de senescencia celular observadas a estas concentraciones, con respecto al control sin reactivo, fueron estadísticamente significativas.

Las diferencias de viabilidad celular del 2,82% objetivadas entre fibroblastos humanos pretratados con resveratrol 2,5 μ M y fibroblastos humanos pretratados con resveratrol 25 μ M no fueron estadísticamente significativas. Las diferencias de senescencia celular del 7,82% existentes entre fibroblastos humanos pretratados con resveratrol 2,5 μ M y fibroblastos humanos pretratados con resveratrol 25 μ M fueron estadísticamente significativas.

Tras incubación de 72 horas en fibroblastos humanos *in vitro*, con resveratrol 100 μ M, 400 μ M y 1,6 mM las disminuciones dosis dependientes de viabilidad celular, con respecto al control sin reactivo, fueron estadísticamente significativas. Las disminuciones dosis dependiente de senescencia celular observadas a estas concentraciones, con respecto al control sin reactivo, también fueron estadísticamente significativas.

Por tanto, en fibroblastos humanos *in vitro* no irradiados, el pretratamiento con resveratrol 25 μ M fue la concentración senolítica más eficaz, ya que se objetivó la mayor disminución estadísticamente significativa en porcentaje de células senescentes sin observarse disminución estadísticamente significativa en porcentaje de células viables con respecto al control sin reactivo.

Las diferencias metodológicas entre el experimento 1 y el experimento 5 con respecto a la técnica de determinación mediante espectrofotómetro en el experimento 1 y mediante citómetro de imagen en el experimento 5, hace que los resultados de ambos experimentos no sean comparables

Las diferencias metodológicas entre el experimento 3 y el experimento 5 tanto en cuanto al tiempo de incubación de 7 días en el experimento 3 y 3 días en el experimento 5, hace que los resultados de ambos experimentos no sean comparables.

En el apartado D.5.2 se utilizó el término de células viables para incluir tanto a fibroblastos vivos proliferantes como vivos senescentes. Los valores de senescencia celular se expresan como el porcentaje de células viables que fueron viables y senescentes.

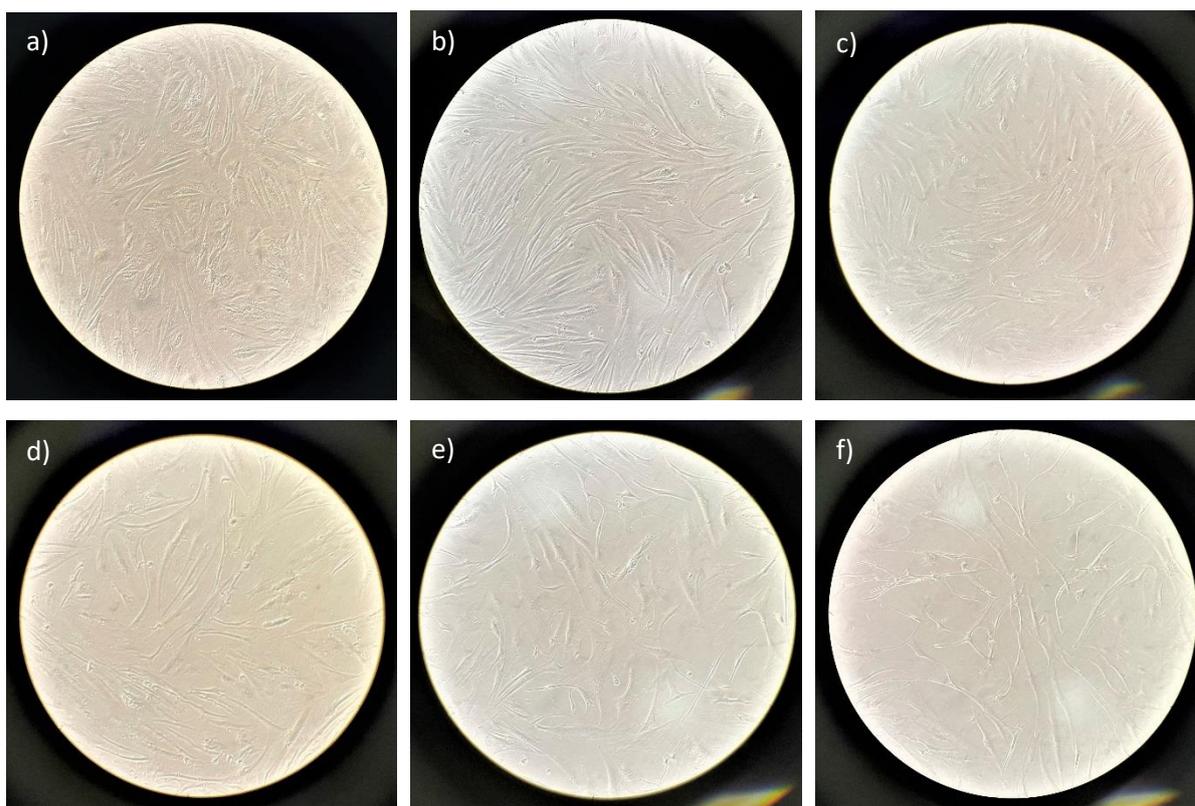


Figura 138. Fibroblastos humanos tras 72 horas de incubación con resveratrol a concentraciones crecientes de 2,5 μM , 25 μM , 100 μM , 400 μM y 1,6 mM. (a) Control sin reactivo. (b) Resveratrol [2,5 μM]. (c) Resveratrol [25 μM]. (d) Resveratrol [100 μM]. (e) Resveratrol [400 μM]. (f) Resveratrol [1,6 mM]. Microscopio óptico a 10x (Fotografías del autor)

E. Discusión

En el presente apartado se discuten los resultados obtenidos en nuestros experimentos y se comparan con los datos de los trabajos publicados obtenidos en la revisión bibliográfica

E.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos

E.1.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

E.1.1.1. Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

En los experimentos donde se evalúa el efecto de la metformina a distintas concentraciones sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos (figura 72) se aprecia un incremento de la proliferación celular tras el tratamiento con metformina 5 μ M tanto a las 24 horas (incremento del 6,17%) como a las 72 horas (incremento del 6,12%) post tratamiento. Por el contrario, a dosis milimolar se observa un descenso dosis dependiente de la proliferación celular tanto a las 24 horas (descensos: 1 mM= 8,05%, 2,5 mM= 16,46% y 5 mM= 22,48%) como a las 72 horas (descensos: 1 mM= 2,67%, 2,5 mM= 3,03% y 5 mM= 9,16%).

Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos donde se haya evaluado el efecto de la metformina micromolar sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos. Así pues, se objetivó un efecto tóxico dosis dependiente. Mientras que concentraciones de metformina 5 μ M fueron beneficiosas en el incremento de la proliferación celular de queratinocitos humanos, dosis de 1 mM, 2,5 mM y 5 mM fueron tóxicas.

Por lo que respecta al efecto de la metformina a dosis milimolar se observa datos de toxicidad aguda sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos ya observados a las 24 horas post tratamiento. Estos resultados a dosis milimolar no fueron tan acentuados a las 72 horas post tratamiento, y este efecto podría justificarse a un consumo del reactivo una vez transcurridas 72 horas post tratamiento.

E.1.1.2. Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

En cuanto a los experimentos donde se estudió el efecto del resveratrol a distintas concentraciones sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos (figura 73) se apreció un incremento dosis dependiente de la proliferación celular a las 72 horas post

tratamiento con resveratrol (incrementos: 2,5 μM = 2,27%, 10 μM = 5,03%, 25 μM = 9,49%).

Con lo dicho anteriormente se observa propiedades favorecedoras de la proliferación celular de queratinocitos humanos a las 72 horas post tratamiento con dosis crecientes de resveratrol micromolar. Estos resultados no se observaron a las 24 horas, por lo que se trata de un efecto dependiente del tiempo.

Holian y colaboradores (149) sometieron a queratinocitos humanos a dosis crecientes de resveratrol (0-100 μM) y observaron la proliferación celular de queratinocitos humanos a las 24, 48 y 72 horas. A diferencia de nuestros resultados, observaron que el efecto beneficioso del resveratrol a concentraciones 10 μM a las 72 horas post tratamiento era superior al resveratrol a dosis superiores o inferiores. En nuestro trabajo la concentración óptima fue de 25 μM . Al igual que nuestros resultados, no se observaron diferencias de proliferación celular a las 24 ni 48 horas post tratamiento, lo que defiende que este efecto es dependiente del tiempo. Los autores observaron que concentraciones de resveratrol 100 μM fueron tóxicas tanto a las 24,48 como 72 horas post tratamiento.

E.1.1.3. Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos

El incremento de proliferación observado a las 24 y 72 horas post tratamiento combinado con metformina 5 μM y resveratrol 25 μM de queratinocitos humanos no fue significativamente superior al observado con cada uno de los reactivos por separado (figura 74).

Así pues, observó un efecto aditivo no sinérgico en el incremento de proliferación celular en queratinocitos humanos tras el tratamiento combinado con metformina 5 μM y resveratrol 25 μM . Atendiendo a nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos en los que se haya evaluado el efecto sinérgico de la metformina y el resveratrol a dosis micromolar sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos.

E.1.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

E.1.2.1. Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

En los experimentos donde se evalúa el efecto de la metformina a distintas concentraciones sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos (figura 75) se aprecia un incremento de la proliferación celular tras el tratamiento con metformina 5 μM tanto a las 24 horas (incremento del 3,11%) como a las 72 horas (incremento del 6,64%) post tratamiento. Por el contrario, a dosis milimolar se observa un descenso dosis dependiente de la proliferación celular tanto a las 24 horas (descensos: 1 mM= 1,44%,

2,5 mM= 3,99% y 5 mM= 7,50%) como a las 72 horas (descensos: 1 mM= 15,44%, 2,5 mM= 35,39% y 5 mM= 32,34%).

Gillespie y colaboradores (249) evaluaron el efecto de 5 días de tratamiento con metformina a concentraciones de 0,5 mM y 5 mM sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos. Observaron disminuciones de la proliferación celular con ambas concentraciones, siendo más acentuadas a concentraciones de 5 mM.

Soydas y colaboradores en el año 2018 (191) publicaron un trabajo en el que evaluaron, en fibroblastos humanos senescentes tras exposición a hiperglucemia, el efecto 24 horas post tratamiento con metformina 50-500 μ M. Observaron un incremento de la proliferación celular dosis dependiente siendo máximo a dosis de 500 μ M.

En nuestro trabajo se observó que mientras que la metformina a dosis 5 μ M incrementaba la proliferación celular, estos efectos eran nocivos a dosis milimolar siendo este efecto tóxico dosis dependiente. Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos donde se haya descrito el umbral de concentración a partir del cual la metformina pasaría a ser de un compuesto beneficioso para la proliferación celular en fibroblastos humanos a ser un producto tóxico.

A diferencia de lo observado en nuestros experimentos con queratinocitos, en nuestros resultados se observa datos de toxicidad tardía sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos a las 72 horas post tratamiento con metformina a dosis milimolar. Estos resultados a dosis milimolar no fueron tan acentuados a las 24 horas post tratamiento, por lo que se trata de un proceso dependiente del tiempo.

E.1.2.2. Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

En lo que respecta a los experimentos donde se estudió el efecto del resveratrol a distintas concentraciones sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos (figura 76) se apreció un incremento dosis dependiente de la proliferación celular tanto a las 24 horas (incrementos: 2,5 μ M= 9,19%, 10 μ M= 6,81%, 25 μ M= 4,94%) como a las 72 horas post tratamiento con resveratrol (incrementos: 2,5 μ M= 9,15%, 10 μ M= 9,21%, 25 μ M= 13,86%).

Con lo dicho anteriormente se observa propiedades favorecedoras de la proliferación celular de queratinocitos humanos tanto a las 24 como a las 72 horas post tratamiento con dosis crecientes de resveratrol micromolar. El efecto beneficioso fue superior a las 72 horas con respecto a las 24 horas, por lo que al igual que se observaba en queratinocitos humanos, se trata de un efecto dependiente del tiempo.

Birar y colaboradores (156) expusieron a fibroblastos humanos a resveratrol y distintos derivados del resveratrol a concentraciones de 0-100 μ M y estudiaron la proliferación celular. Observaron un efecto dosis dependiente con un umbral de concentración. Así pues, se observó un incremento de proliferación celular dosis dependiente a concentraciones inferiores a 10 μ M. A concentraciones superiores a 25 μ M se observó un descenso dosis dependiente de la proliferación celular.

En nuestros experimentos se han utilizado concentraciones iguales o inferiores a resveratrol 25 μM , por lo que se ha observado un efecto beneficioso dosis dependiente de forma similar a lo reportado por Birar y colaboradores.

E.1.2.3. Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos

El incremento de proliferación observado a las 24 post tratamiento combinado con metformina 5 μM y resveratrol 25 μM de fibroblastos humanos no fue significativamente superior al observado con cada uno de los reactivos por separado (figura 77). A las 72 horas post tratamiento combinado de fibroblastos humanos el incremento de proliferación celular fue superior al observado con metformina 5 μM mientras que no fue superior al observado con resveratrol 25 μM .

Con estos datos, se observó un efecto aditivo pero no sinérgico en el incremento de proliferación celular en fibroblastos humanos tras el tratamiento combinado con metformina 5 μM y resveratrol 25 μM . Al igual que lo observado en queratinocitos humanos, según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos en los que se haya estudiado el efecto sinérgico de la metformina y el resveratrol a dosis micromolar sobre la proliferación celular en queratinocitos humanos.

E.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB

En nuestros experimentos se utilizó una dosis única de radiación UVB de $1,8 \text{ J/cm}^2$, que se corresponde con la dosis máxima de radiación UVB utilizada por sesión en consultas de fototerapia para pacientes con fototipo 4. (277)

Para nuestro trabajo se evaluó la proliferación celular a las 24 y 72 horas post irradiación para conocer el efecto de la radiación sobre la proliferación celular y comparar las posibles diferencias según el tiempo post irradiación. Se utilizó una única sesión de radiación donde se administró la dosis total de energía ($1,8 \text{ J/cm}^2$).

Nayeri Rad y colaboradores (44) en fibroblastos humanos presentaron un modelo de inducción de senescencia celular utilizando una dosis única de radiación UVB de $0,00178 \text{ J/cm}^2$.

Aunque en nuestro trabajo, al igual que el trabajo citado anteriormente (44), se utilizó una dosis única de irradiación para inducir senescencia celular, las dosis utilizadas para nuestros experimentos fueron mayores ($0,00178 \text{ J/cm}^2$ vs $1,8 \text{ J/cm}^2$) para aproximarnos a las dosis máximas terapéuticas utilizadas en consulta (277), y con estas dosis el tiempo necesario hasta obtener diferencias de proliferación estadísticamente fue menor (360 horas vs 72 horas).

En los experimentos del presente apartado los mejores efectos fotoprotectores a las 72 horas post irradiación (figura 79 y 81) fueron observados con metformina $5 \mu\text{M}$, resveratrol $25 \mu\text{M}$ y tratamiento combinado (metformina $5 \mu\text{M}$ + resveratrol $25 \mu\text{M}$) por lo que fueron las concentraciones utilizadas para los experimentos de mortalidad, senescencia y radicales libres. También se empleó la concentración de metformina 5 mM ya que aunque en nuestros experimentos demostró toxicidad a las 72 horas, esta concentración milimolar es similar a la utilizada por otros autores en experimentos donde se ha estudiado el efecto fotoprotector de la metformina. (36,216,251)

E.2.1. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB

En nuestros experimentos con queratinocitos humanos HaCaT, a las 24 horas post irradiación con UVB ya se observaron descensos significativos de proliferación celular del 71,77% que se mantuvieron a las 72 horas

En queratinocitos humanos, a las 24 horas post irradiación con UVB, el pretratamiento con metformina 5 mM fue el único que no protegió frente al descenso de proliferación celular inducido por UVB, ya que las diferencias no fueron estadísticamente significativas. A las 72 horas esta misma concentración mostró efectos tóxicos ya que la proliferación celular de este subgrupo fue inferior al control irradiado siendo las diferencias estadísticamente significativas.

A las 72 horas post irradiación, las diferencias de proliferación de los queratinocitos pretratados con resveratrol 2,5 μ M y el control irradiado no fueron estadísticamente significativas.

E.2.2. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos, a las 72 horas post irradiación con UVB se observaron descensos significativos de proliferación celular del 57,43%. A diferencia de lo observado en nuestros trabajos con queratinocitos, a las 24 horas post irradiación no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En fibroblastos humanos, a las 72 horas post irradiación, el pretratamiento con metformina 5mM fue el único que no protegió frente al descenso de proliferación celular inducido por UVB, ya que las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al control irradiado.

Al contrario de lo observado en queratinocitos humanos, en nuestros experimentos con fibroblastos humanos, a las 72 horas post irradiación, las diferencias de proliferación de los fibroblastos pretratados con resveratrol 2,5 μ M y el control irradiado sí que fueron estadísticamente significativas, observándose efectos fotoprotectores.

E.3. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB

Para nuestros experimentos de mortalidad y senescencia celular se ha empleado la técnica APO5-Sen utilizando los fluorocromos DAPI y AnexinaV-PE para el estudio de viabilidad y muerte celular (apoptosis temprana, necrosis, población doble tinción positiva). Mediante el estudio morfológico de la integridad o no del núcleo celular, utilizando del citómetro de imagen, se ha podido subdividir a la población doble positiva en necroptóticas o apoptóticas tardías. Con el fluorocromo C12-FDG se ha cuantificado las células senescentes de entre aquellas viables.

En el trabajo de Soydas y colaboradores (191) mediante citometría de flujo y los fluorocromos DAPI y AnexinaV-PE para estudio de mortalidad celular. Los autores denominan apoptóticas tardías a las células con doble tinción positiva, pero a diferencia de nuestro trabajo no se estudia la integridad nuclear mediante citometría de imagen para distinguirlas de aquellas células necroptóticas.

Los datos de proliferación/senescencia entre los experimentos 2 y 3 no se han comparado puesto que existen diferencias metodológicas. En primer lugar, con respecto a la técnica de determinación utilizando el espectrofotómetro y reactivo WST-1 en el experimento 2 y mediante citómetro de imagen y la técnica APO5-Sen en el experimento 5. En segundo lugar, los tiempos de incubación de 4 días en el experimento 2 (1 día previo a la irradiación + 3 días posteriores a la irradiación) y de 7 días en el experimento 3 (4 días previos a la irradiación + 3 días posteriores a la irradiación).

Flor de lis y colaboradores (32) evaluaron en fibroblastos humanos la mortalidad celular a las 24 horas post irradiación con $1,8 \text{ J/cm}^2$ de UVB, que fue aproximadamente del 25% (Dosis Letal 25). Para nuestros experimentos de mortalidad y senescencia se utilizó el mismo equipo y la misma dosis de irradiación, aunque, a diferencia de estos autores, las determinaciones en nuestros experimentos se realizaron a las 72 horas post UVB.

El efecto fotoprotector preventivo de la metformina a dosis milimolar ha sido estudiado por otros autores previamente. Lee y colaboradores (251) sometieron a células de cáncer de pulmón A549 a incubación con metformina 5 mM durante 48 horas y posteriormente irradiaron con UVC a dosis de 20 J/m^2 , analizando la senescencia celular a las 4 horas post irradiación. En fibroblastos humanos Wu y colaboradores (216) trataron con metformina 2 mM la noche antes de la irradiación, irradiaron con 5 mJ/cm^2 y evaluaron la proliferación celular a las 72 horas post irradiación. En queratinocitos, Xiao y colaboradores (36) irradiaron las células con UVB (50 mJ/cm^2) e inmediatamente después fueron incubadas con metformina 10-40 mM durante 12-48 horas, para evaluar mortalidad celular y liberación de interleuquinas asociadas a fenotipo celular senescente (SASP) tales como IL-1 β .

En lo que respecta al efecto antisenescente preventivo de la metformina a dosis micromolar, Soydas y colaboradores (250) evaluaron el efecto antisenescente preventivo de la metformina en fibroblastos humanos al incubar durante 24 horas metformina (50-500 μM) e inducir posteriormente senescencia celular con una dosis única de glucosa

(5,5-50 mM). Nayeri Rad y colaboradores (44) irradiaron con dosis única de UVB (0,00178 J/cm²) fibroblastos humanos inmediatamente post irradiación incubaron con metformina (500 µM) durante 10 días. Los autores en el manuscrito describen que se ha evaluado el efecto fotoprotector preventivo utilizando esta técnica, aunque a diferencia de nuestro método, la metformina no ha sido administrada antes de la irradiación.

En queratinocitos Ribeiro y colaboradores (197) también han utilizado la metformina a dosis micromolar pero para estudiar el efecto fotoprotector de la incubación con metformina durante 24 horas (1-500 µM) administrada inmediatamente después de irradiación UVB (40 mJ/cm²). No obstante, en este trabajo no se evaluó senescencia celular y se evaluó viabilidad y muerte celular.

Según nuestros criterios de búsqueda los resultados de nuestros experimentos son el primer trabajo publicado en el que se ha evaluado el efecto fotoprotector preventivo de la metformina a dosis micromolar, sobre la senescencia celular fotoinducida, administrada antes de la irradiación celular.

El efecto protector del resveratrol frente a la senescencia celular fotoinducida cuando es administrado previamente a la irradiación celular ha sido estudiado de forma indirecta mediante el análisis de interleuquinas asociadas al SASP tales como NF-KB en el trabajo de Aldhami y colaboradores (105) e IL-6 en los trabajos de Potapovich y colaboradores y Cui y colaboradores (107,109). Según nuestros criterios de búsqueda, no se ha evaluado de forma directa mediante técnicas de citometría de imagen el efecto fotoprotector preventivo del resveratrol frente a la senescencia celular fotoinducida cuando es administrado previamente a la irradiación celular.

Lee y colaboradores (251) en su trabajo estudian, en células de cáncer de pulmón A549, el efecto protector sinérgico de la metformina y el resveratrol frente al daño del ADN inducido por UVC. Según nuestros criterios de búsqueda no se ha estudiado en células de la piel el efecto fotoprotector preventivo de la combinación de metformina y resveratrol evaluando la viabilidad, muerte y senescencia celular.

E.3.1. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los queratinocitos humanos post irradiación con UVB

E.3.1.1. Efecto de la radiación UVB sobre la viabilidad y muerte celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En queratinocitos humanos se observó un incremento de la mortalidad celular a las 72 horas post irradiación con 1,8 J/cm² de UVB del 47%, pasando del 89,8% de células viables al 42,8% (figura 82). Se objetivó un incremento en todos los subtipos de muerte celular analizados, siendo la apoptosis tardía el subtipo de muerte celular predominante.

Este incremento de mortalidad celular fotoinducida en queratinocitos HaCaT (47%) fue superior al observado en nuestros experimentos con fibroblastos humanos (31,5%). Además, aunque en ambos casos la apoptosis fue el principal tipo de muerte celular tras

la irradiación, en queratinocitos fue la apoptosis tardía mientras que en fibroblastos lo fue la apoptosis precoz. Con estos resultados los queratinocitos HaCaT fueron más sensibles a la radiación UVB que los fibroblastos humanos en cuanto a la inducción de muerte celular fotoinducida.

E.3.1.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los queratinocitos humanos.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados, el grupo metformina a concentraciones de 5 μM fue el único en el que se evidenció un incremento estadísticamente significativo de viabilidad celular tras 7 días de tratamiento (figura 86). Este incremento de viabilidad celular fue secundario a un descenso de todos los tipos de muerte celular estudiados (necrosis, apoptosis temprana, necroptosis y apoptosis tardía).

No se objetivaron diferencias de viabilidad celular estadísticamente significativas tras 7 días de tratamiento con metformina 5 mM, resveratrol 25 μM ni efecto sinérgico con el tratamiento combinado (metformina 5 μM + resveratrol 25 μM).

Esta propiedad de la metformina en el incremento de la viabilidad celular ya había sido descrita previamente por Li y colaboradores (26), mediado por la inhibición de la señalización de mTOR y la activación de SIRT1, de forma simultánea.

E.3.1.3. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En queratinocitos HaCaT irradiados con UVB (1,8 J/cm²), el pretratamiento durante 96 horas con metformina 5 μM fue la única concentración de reactivo que, de forma estadísticamente significativa, incrementó la viabilidad celular y disminuyó todos los subtipos de mortalidad celular analizados a excepción de la apoptosis tardía. (figura 92)

Ribeiro y colaboradores (197), de forma similar a nuestros resultados, en queratinocitos HaCaT objetivaron un incremento de viabilidad celular y un descenso en el porcentaje de células apoptóticas en células irradiadas con UVB (40 mJ/cm²) que fueron tratadas inmediatamente después con metformina a concentraciones micromolar (1-500 μM). Los autores justificaron este efecto debido a un descenso en los niveles de ERK 1/2 fosforilado.

Xiao y colaboradores (36) observaron un descenso de la mortalidad celular en queratinocitos irradiados con UVB (50 mJ/cm²) que fueron inmediatamente después tratados con metformina 10-40 mM durante 12-48 horas. Estos resultados con metformina a dosis milimolar son distintos a los obtenidos con nuestros experimentos con metformina 5 mM en fibroblastos humanos, ya que aunque se objetivó un descenso de la mortalidad total del 8,7% con respecto al control irradiado, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (figura 92)

Existen distintos trabajos en los que se ha objetivado en queratinocitos humanos efectos fotoprotectores preventivos del resveratrol administrados previamente a la irradiación con UVB, en los que se objetivó un incremento de la viabilidad celular:

Cao y colaboradores (103) pretrataron fibroblastos humanos con resveratrol 10 μM durante 1 hora y posteriormente irradiaron con UVB (30 mJ/cm^2). Observaron un incremento de la viabilidad celular secundario a un descenso en la apoptosis que justifican a una activación de SIRT1. En nuestros resultados también se observó un incremento de la viabilidad celular en queratinocitos HaCaT pretratados con resveratrol 25 μM del 4,8 % respecto al control irradiado, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En cuanto al análisis de apoptosis, de forma similar a Cao y colaboradores, en nuestros experimentos se objetivó un descenso de la apoptosis temprana del 14,7% y de la apoptosis tardía del 15,1% siendo ambas diferencias estadísticamente significativas.

Este descenso de la apoptosis en células irradiadas pretratadas con resveratrol también ha sido descrito por Zhou y colaboradores (110), que incubaron durante 24 horas queratinocitos con resveratrol (0-10 μM) para posteriormente irradiarlos con UVB (30 mJ/cm^2). 72 horas post irradiación se objetivó un efecto antiapoptótico en aquellos queratinocitos pretratadas con resveratrol. Los autores justifican estos resultados a un incremento de los niveles de HSP27.

Juškaitė y colaboradores (104) pretrataron queratinocitos con resveratrol 2% durante 2 horas. Posteriormente irradiaron con UVB (5-100 mJ/cm^2) y de forma similar a los trabajos de Cao y Zhou también observaron un incremento de la viabilidad celular en aquellas células pretratadas con respecto al control irradiado.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no se observó un efecto fotoprotector preventivo sinérgico con el pretratamiento combinado (metformina 5 μM + resveratrol 25 μM) previo a la irradiación con UVB (1,8 J/cm^2). Aunque se objetivó un incremento de la viabilidad celular del 10,4% en el grupo irradiado pretratado con tratamiento combinado en comparación con el control irradiado, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Lee y colaboradores (251) evaluaron en células de cáncer de pulmón A549, el efecto protector sinérgico de la metformina y el resveratrol frente al daño del ADN inducido por UVC. No obstante, atendiendo a nuestros criterios de búsqueda no se ha estudiado previamente el efecto fotoprotector preventivo de la combinación de metformina y el resveratrol evaluando la viabilidad y muerte celular en queratinocitos humanos.

E.3.1.4. Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En nuestros experimentos queratinocitos humanos se observó un incremento de la senescencia celular a las 72 horas post irradiación con 1,8 J/cm^2 de UVB del 35,2%, pasando del 67,2% de células viables al 32%. (figura 99)

Este incremento de mortalidad celular fotoinducida en queratinocitos HaCaT (35,2%) fue superior al observado en nuestros experimentos con fibroblastos humanos (25%). Con estos resultados, al igual que se objetivó en el análisis de viabilidad y muerte celular, los queratinocitos HaCaT fueron más sensibles a la radiación UVB que los fibroblastos humanos en cuanto a la inducción de senescencia celular fotoinducida.

E.3.1.5. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de los queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados, el tratamiento durante 7 días con tratamiento combinado (metformina 5 μ M + resveratrol 25 μ M) y con resveratrol 25 μ M fueron los más eficaces a la hora de disminuir la senescencia celular con respecto al control no irradiado. Las disminuciones fueron del 28,51% con el tratamiento combinado y del 27,56 % con resveratrol 25 μ M, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados. Con menor eficacia que los anteriores, también demostró un efecto antisenescente, tras 7 días de tratamiento, la metformina 5 μ M reduciendo la senescencia celular en un 20,9% con respecto al control no irradiado. (figura 101)

Al igual que nuestros resultados, en la literatura existen otros trabajos publicados trabajos en los que el tratamiento de queratinocitos humanos no irradiados con resveratrol favorece la proliferación celular a bajas concentraciones (149), mientras que disminuye la proliferación a concentraciones superiores a 20-25 μ M (92,149–152,155).

En nuestros experimentos, el tratamiento de queratinocitos HaCaT durante 7 días con metformina 5 mM no demostró ser eficaz como tratamiento antisenescente. (figura 101)

Según nuestros criterios de búsqueda, no existen trabajos publicados hasta la fecha en los que se haya estudiado en queratinocitos HaCaT no irradiados el efecto del tratamiento con metformina (a concentraciones micromolar y milimolar) sobre la senescencia celular mediante citometría de imagen. No obstante nuestros resultados son similares a los reportados por otros autores con fibroblastos humanos: Fang y colaboradores (248) observaron efectos antisenescentes en fibroblastos tratados con metformina micromolar (100 μ M). Gillespie y colaboradores objetivaron un descenso de la proliferación celular en fibroblastos tratados con metformina milimolar (0,5-1 mM). Por tanto, al igual que lo publicado en fibroblastos humanos, en nuestros experimentos con queratinocitos el efecto antisenescente de la metformina micromolar fue superior al de la metformina milimolar.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados (figura 101), aunque el tratamiento combinado se mostró como uno de los más eficaces frente a la senescencia celular, no mostró efecto sinérgico. Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto sinérgico antisenescente de la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en queratinocitos HaCaT *in vitro* no irradiados.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados con UVB, el pretratamiento durante 4 días con resveratrol 25 μM se mostró como el más eficaz a la hora de disminuir la senescencia celular fotoinducida con respecto al control irradiado. La disminución fue del 48,5%. Con menor eficacia que el grupo anterior, también demostraron un efecto antisenescente, tras 7 días de tratamiento, la metformina 5 μM (reduciendo la senescencia celular en un 38,9% con respecto al control irradiado) y el tratamiento combinado (reduciendo la senescencia celular en un 37,5% con respecto al control irradiado). (figura 102)

Cao y colaboradores (103) en queratinocitos irradiados con UVB (30 mJ/cm^2) pretratados con resveratrol 10 μM durante 1 hora observaron un incremento de SIRT1 con respecto al control irradiado.

Adhami y colaboradores (105) en su trabajo con queratinocitos irradiados con UVB (40 mJ/cm^2) pretratados con resveratrol 5-25 μM durante 24 horas observaron una menor concentración y actividad de NF κ B (incluido en fenotipo SASP) respecto al control irradiado.

Otros autores como Potapovich y colaboradores (107) y Cui y colaboradores (109) han estudiado en queratinocitos irradiados con UV el efecto del pretratamiento con resveratrol a dosis micromolar (50-100 μM) objetivando descensos en los niveles de IL6, que es una interleuquina perteneciente al SASP.

Tal y como hemos detallado en los cuatro trabajos comentados previamente hasta la fecha se ha evaluado de forma indirecta el efecto antisenescente del pretratamiento con resveratrol a dosis micromolar, en queratinocitos irradiados, cuantificando los niveles de SIRT 1 y marcadores del SASP. No obstante, según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos publicados previamente en los que se haya estudiado este efecto mediante citometría de imagen en queratinocitos humanos *in vitro*.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados con UVB, a diferencia de lo que se objetivó en queratinocitos no irradiados, el pretratamiento durante 4 días con metformina 5 mM demostró ser eficaz como tratamiento antisenescente (reduciendo la senescencia celular en un 28,5% con respecto al control irradiado). (figura 102)

Wu y colaboradores (216) en queratinocitos humanos irradiados con UVB (20 mJ/cm^2) pretratados con metformina 2mM (la noche previa a la irradiación y 3 días post irradiación) objetivaron un descenso de la proliferación celular. Estos resultados fueron distintos a los observados en nuestros experimentos (figura 102), donde se observó un descenso de la senescencia celular tras el pretratamiento con metformina 5 mM.

Siguiendo nuestros criterios de búsqueda, no existen trabajos publicados previamente, en queratinocitos humanos *in vitro*, en los que se haya estudiado el efecto fotoprotector antisenescente de la metformina a concentraciones micromolar, administrada previamente a la irradiación UVB y cuantificado mediante citometría de imagen.

En nuestros experimentos, el efecto fotoprotector antisenescente en queratinocitos pretratados con metformina a dosis micromolar (con metformina 5 μM reducción de la senescencia celular en un 38,9% con respecto al control irradiado) fue superior al

observado con metformina milimolar (con metformina 5 mM reducción de la senescencia celular en un 28,5% con respecto al control irradiado). (figura 102)

Lee YS y colaboradores (251) estudian el efecto sinérgico del pretratamiento combinado con resveratrol (2,5 μ M o 25 μ M) y metformina (5 mM) administrado 48 horas antes de irradiación UVC (20 J/m²) en cultivos celulares con células pulmonares tumorales de la línea A549. Observan que tanto el resveratrol como la metformina de forma individual son eficaces a la hora de conferir protección contra el daño al ADN inducido por radiación UV (siendo más efectiva la metformina que el resveratrol cuando se administra de forma individual). No obstante, cuando se administran ambos de forma combinada, se aprecia sinergismo, observándose una expresión a la baja de p53, γ H2AX y p-chk2.

Si observamos las gráficas de nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados (figura 102), aunque el pretratamiento combinado se mostró eficaz frente a la senescencia celular fotoinducida, no mostró efecto sinérgico.

Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto sinérgico fotoprotector antisenescente del pretratamiento con la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en queratinocitos HaCaT *in vitro* irradiados.

E.3.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad y senescencia celular de los fibroblastos humanos post irradiación con UVB

E.3.2.1. Efecto de la radiación UVB sobre la viabilidad y muerte celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En fibroblastos humanos se observó un incremento de la mortalidad celular a las 72 horas post irradiación con 1,8 J/cm² de UVB del 31,5%, pasando del 92,2% de células viables al 60,7% (figura 105). Se objetivó un incremento en todos los subtipos de muerte celular analizados, siendo la apoptosis temprana el subtipo de muerte celular predominante.

Flor de lis y colaboradores (32) evaluaron en fibroblastos humanos la viabilidad celular a las 24 horas post irradiación con 1,8 J/cm² de UVB, que fue aproximadamente del 75%. Estos datos de viabilidad fueron superiores a los observados en nuestros experimentos a las 72 horas (60,7%). Con estos resultados observamos que existen diferencias en la mortalidad celular dependiente del tiempo post irradiación.

E.3.2.2. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los fibroblastos humanos.

Al igual que se observó en queratinocitos HaCaT, en nuestros experimentos con fibroblastos humanos no irradiados, el grupo metformina a concentraciones de 5 μM fue el único en el que se evidenció un incremento estadísticamente significativo de viabilidad celular tras 7 días de tratamiento (figura 109). Este incremento de viabilidad celular fue secundario a un descenso de todos los tipos de muerte celular estudiados (necrosis, apoptosis temprana, necroptosis y apoptosis tardía)

No se objetivaron diferencias de viabilidad celular estadísticamente significativas tras 7 días de tratamiento con metformina 5 mM, resveratrol 25 μM ni efecto sinérgico con el tratamiento combinado (metformina 5 μM + resveratrol 25 μM)

Soydas y colaboradores (191,250) en sus experimentos trataron a fibroblastos humanos con metformina a dosis micromolar (50-500 μM) durante 24 horas y de forma similar a nuestros resultados observaron un descenso de la apoptosis mediado por un descenso de la señalización NF-KB.

E.3.2.3. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la viabilidad y muerte celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

De forma similar a lo objetivado en queratinocitos HaCaT, en fibroblastos humanos irradiados con UVB (1,8 J/cm²), el pretratamiento durante 96 horas con metformina 5 μM fue la única concentración de reactivo que, de forma estadísticamente significativa, incrementó la viabilidad celular y disminuyó todos los subtipos de mortalidad celular analizados a excepción de la apoptosis temprana (figura 115). Esta constituye la diferencia entre ambas poblaciones celulares, ya que en HaCaT el único grupo donde no disminuyó la mortalidad de forma estadísticamente significativa fue en el subgrupo de apoptóticas tardías.

Según nuestros criterios de búsqueda no se han publicado previamente trabajos en el que se haya evaluado el efecto fotoprotector preventivo (referido a viabilidad y muerte celular) de la metformina (concentraciones micromolar y milimolar) administrada previamente a la irradiación con UVB en fibroblastos humanos.

Subedi y colaboradores (111), de forma similar a nuestro planteamiento metodológico, evaluaron el efecto fotoprotector sobre fibroblastos humanos del resveratrol analizando la viabilidad celular. De este modo los fibroblastos fueron irradiados con UVB (144 mJ/cm²) e inmediatamente después tratados con resveratrol 10-100 $\mu\text{g/mL}$ durante 24-72 horas. Los autores objetivaron un incremento de la viabilidad celular en fibroblastos tratados con respecto al control irradiado. En nuestro trabajo (figura 115) las diferencias de viabilidad celular entre fibroblastos irradiados pretratados y el control irradiado no pretratado no fueron estadísticamente significativas. No obstante, al igual que se objetivó en nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT, en fibroblastos humanos irradiados pretratados con resveratrol 25 μM se objetivó un efecto antiapoptótico (apoptosis temprana y tardía) siendo estas diferencias estadísticamente significativas para ambos tipos de apoptosis.

En nuestros experimentos con fibroblastos no se observó un efecto fotoprotector preventivo sinérgico con el pretratamiento combinado (metformina 5 μ M + resveratrol 25 μ M) previo a la irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Aunque se objetivó un incremento de la viabilidad celular del 8,5% en el grupo irradiado pretratado con tratamiento combinado en comparación con el control irradiado, al igual que lo observado en los experimentos con queratinocitos HaCaT, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Según nuestros criterios de búsqueda no se ha estudiado previamente en fibroblastos humanos el efecto fotoprotector preventivo de la combinación de metformina y el resveratrol evaluando la viabilidad y muerte celular.

E.3.2.4. Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos se observó un incremento de la senescencia celular a las 72 horas post irradiación con 1,8 J/cm² de UVB del 25%, pasando del 64,3% de células senescentes al 39,3%. (figura 123)

De forma similar a nuestro planteamiento, Nayeri Rad y colaboradores en fibroblastos humanos *in vitro* han descrito un modelo de senescencia celular fotoinducida con dosis única de radiación UVB (17.78 \pm 0.19 W/m²) a los 15 días post irradiación (44). A diferencia de estos autores, nuestra dosis de irradiación UVB fue superior (1,8 J/cm²), pero los tiempos necesarios para estudiar senescencia celular fueron inferiores (3 días post irradiación). Los autores en su trabajo (44) estudian este incremento de senescencia en fibroblastos humanos fotoinducida por UVB mediante cuantificación de la actividad SA- β -galactosidasa y de los niveles de p16, p21, p53 que se encontraron incrementados en fibroblastos irradiados. En nuestros experimentos únicamente se evaluó la actividad SA- β -galactosidasa mediante la técnica APO5-Sen en la que se cuantificó la actividad enzimática únicamente en fibroblastos vivos.

E.3.2.5. Efecto de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de los fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos no irradiados, el tratamiento durante 7 días con tratamiento combinado resveratrol 25 μ M fue el más eficaz a la hora de disminuir la senescencia celular con respecto al control no irradiado. La disminución fue del 36,9%. Con menor eficacia que el tratamiento anterior, también demostró un efecto antisenescente, tras 7 días de tratamiento, la metformina 5 μ M (reduciendo la senescencia celular en un 32% con respecto al control no irradiado) y el tratamiento combinado (reduciendo la senescencia celular en un 24% con respecto al control no irradiado). (figura 125)

De forma similar a lo observado en nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados (figura 101), en fibroblastos humanos el tratamiento con resveratrol 25 μ M demostró ser el más eficaz como tratamiento antisenescente. (figura 125)

Estos efectos antisenescentes del resveratrol a dosis micromolar en fibroblastos no irradiados ya habían sido descritos previamente por Birar y colaboradores (156) en el que se objetivó como el resveratrol a dosis no superiores a 25 μ M presentó efectos antisenescentes con una disminución de la actividad SA- β -galactosidasa y un incremento en los niveles de SIRT1 y del índice Ki67. Por el contrario, estos autores observaron un descenso de la proliferación celular con concentraciones de resveratrol superiores a 25 μ M.

Fang y colaboradores (248) trataron fibroblastos humanos con metformina 100 μ M durante 24 horas. De forma similar a nuestros resultados objetivaron un descenso en la actividad de la enzima SA- β -galactosidasa en células tratadas con metformina a dosis micromolar.

A diferencia de lo objetivado en nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados (figura 101), el tratamiento de fibroblastos humanos durante 7 días con metformina 5 mM sí que demostró ser eficaz como tratamiento antisenescente (reduciendo la senescencia celular en un 17,9% con respecto al control no irradiado). (figura 125)

Gillespie y colaboradores (249) en fibroblastos humanos no irradiados tratados con metformina 0,5- 1 mM observaron un descenso en la proliferación celular dosis dependiente. En nuestros experimentos con fibroblastos no irradiados, aunque, a diferencia de lo reportado por Gillespie, la metformina 5 mM presentó propiedades antisenescentes, este efecto fue inferior al observado con metformina 5 μ M, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. (figura 125)

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos no irradiados (figura 125), al igual que lo observado en queratinocitos HaCaT no irradiados (figura 101), aunque el tratamiento combinado se mostró eficaz frente a la senescencia celular, no mostró efecto sinérgico. Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto sinérgico antisenescente de la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en fibroblastos humanos *in vitro* no irradiados.

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos irradiados con UVB, el pretratamiento durante 4 días con resveratrol 25 μ M y metformina 5 μ M se mostraron como los más eficaces a la hora de disminuir la senescencia celular fotoinducida con respecto al control irradiado. Las disminuciones fueron del 52 % con resveratrol 25 μ M y del 45,1 % con metformina 5 μ M, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados. Con menor eficacia que los grupos anteriores, también demostró un efecto antisenescente el tratamiento combinado (reduciendo la senescencia celular en un 35,9% con respecto al control irradiado). (figura 126)

De forma similar a lo observado en nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados (figura 102), en fibroblastos humanos el pretratamiento con resveratrol 25 μ M demostró ser el más eficaz como tratamiento antisenescente. (figura 126)

Subedi y colaboradores (111) en su trabajo con fibroblastos irradiados con UVB (144 mJ/cm^2) tratados inmediatamente después de la irradiación con resveratrol 10 o 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 24-72 horas observaron una menor concentración de algunas citocinas incluidas en el fenotipo SASP tales como IL6 y TNF- α respecto al control irradiado.

Aunque se ha evaluado de forma indirecta el efecto antisenescente del tratamiento con resveratrol a dosis micromolar, en fibroblastos humanos irradiados, cuantificando los niveles de marcadores del SASP, según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos publicados previamente en los que se haya estudiado este efecto mediante citometría de imagen en fibroblastos humanos *in vitro*. Con nuestros criterios de búsqueda bibliográfica tampoco se han obtenido trabajos publicados previamente en los que se haya estudiado mediante citometría de imagen el efecto fotoprotector preventivo antisenescente del resveratrol administrado antes de la irradiación UVB.

Nayeri Rad y colaboradores (44) en fibroblastos humanos irradiados con UVB ($17.78 \pm 0.19 \text{ W/m}^2$) evalúan el efecto del tratamiento, inmediatamente post irradiación, con metformina a concentraciones micromolar (500 μM) durante 10 días. Observaron un efecto antisenescente con un descenso en la actividad SA- β -galactosidasa y disminución de los niveles de p16, p21 y p53. No obstante a diferencia de nuestros experimentos el tratamiento con metformina fue post irradiación. Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos publicados previamente en el que se haya evaluado el efecto fotoprotector antisenescente de la metformina micromolar administrada antes de la irradiación UVB en queratinocitos humanos.

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos irradiados con UVB, al igual que lo que se objetivó en queratinocitos HaCaT irradiados, el pretratamiento durante 4 días con metformina 5 mM demostró ser eficaz como tratamiento antisenescente (reduciendo la senescencia celular en un 22,9% con respecto al control irradiado). (figura 126)

Wu y colaboradores (216) en fibroblastos humanos irradiados con UVB (5 mJ/cm^2) pretratados con metformina 2mM (la noche previa a la irradiación y 3 días post irradiación) objetivaron un descenso de la proliferación celular. Estos resultados fueron distintos a los observados en nuestros experimentos (figura 126), donde se observó un descenso de la senescencia celular tras el pretratamiento con metformina 5 mM.

En nuestros experimentos, el efecto fotoprotector antisenescente en fibroblastos pretratados con metformina a dosis micromolar (con metformina 5 μM reducción de la senescencia celular en un 45,1% con respecto al control irradiado) fue superior al observado con metformina milimolar (con metformina 5 mM reducción de la senescencia celular en un 22,9% con respecto al control irradiado). (figura 126)

Lee JS y colaboradores (261) pretrataron a fibroblastos humanos con metformina (5-10 mM) o resveratrol (50 μM) 1 hora antes de irradiación con UVB (30 mJ/cm^2), y observaron un descenso en los niveles de la metaloproteasa de tipo 9 (MMP-9). En su trabajo concluyen que la administración de estos agonistas de SIRT1 protege el colágeno dérmico de la degradación tras exposición a radiación UVB, aunque no se evaluó el efecto del tratamiento combinado con metformina y resveratrol.

Si observamos las gráficas de nuestros experimentos con fibroblastos humanos irradiados (figura 126), aunque el pretratamiento combinado se mostró eficaz frente a la senescencia celular fotoinducida, no mostró efecto sinérgico.

Según nuestros criterios de búsqueda, al igual que sucede con queratinocitos HaCaT, no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto sinérgico fotoprotector antisenescente del pretratamiento con la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en fibroblastos *in vitro* irradiados.

E.4. Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos y fibroblastos humanos irradiados con UVB

Flor de lis y colaboradores (32) evaluaron en fibroblastos humanos la mortalidad celular a las 24 horas post irradiación con $5,6 \text{ J/cm}^2$ de UVB, que fue aproximadamente del 50% (Dosis Letal 50). Para nuestros experimentos de radicales libres se utilizó el mismo equipo y la misma dosis de irradiación, aunque, a diferencia de estos autores, las determinaciones en nuestros experimentos se realizaron al inmediatamente después post UVB.

E.4.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB

E.4.1.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB

En nuestros experimentos queratinocitos humanos se observó un incremento en la producción de anión superóxido tras irradiación con $5,6 \text{ J/cm}^2$ de UVB del 63,9%. (figura 129)

Este incremento de producción de anión superóxido en queratinocitos HaCaT (63,9%) fue inferior al observado en nuestros experimentos con fibroblastos humanos (112,92%). Con estos resultados, al contrario que se objetivó en el análisis de viabilidad, muerte y senescencia celular, los fibroblastos humanos fueron más sensibles a la radiación UVB que los queratinocitos HaCaT en cuanto a la producción de anión superóxido fotoinducida.

E.4.1.2. Efecto protector de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos irradiados con UVB

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados, el tratamiento durante 24 horas con metformina $5 \mu\text{M}$ y con tratamiento combinado (metformina $5 \mu\text{M}$ + resveratrol $25 \mu\text{M}$) fueron los más eficaces a la hora de disminuir la concentración de anión superóxido con respecto al control no irradiado. Las disminuciones fueron del 37,1% con metformina $5 \mu\text{M}$ y del 33,7 % con el tratamiento combinado, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados. En queratinocitos HaCaT no irradiados, no demostró eficacia antirradical el tratamiento con resveratrol $25 \mu\text{M}$, ya que, aunque se observó una disminución de la concentración de anión superóxido del 2,3%, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (figura 131)

Ribeiro y colaboradores (197) en su trabajo con queratinocitos no irradiados tratados con metformina a concentraciones micromolar (1-500 μM) durante 1 hora

observan que las diferencias en la concentración de anión superóxido entre células tratadas y su control negativo no son estadísticamente significativas. Los autores concluyen que en queratinocitos no irradiados el tratamiento con metformina a dosis micromolar durante 1 hora no presenta actividad barredora de radicales libres. Estos resultados son distintos a los observados en nuestros experimentos (figura 131) donde la metformina a dosis micromolar en queratinocitos no irradiados sí que mostró eficacia como barredor de radicales libres. A diferencia de los experimentos de Ribeiro y colaboradores que incubaron con metformina durante 1 hora, en nuestros experimentos se incubó con metformina durante 24 horas.

En el trabajo de Krajka-Kuźniak y colaboradores (79) con queratinocitos no irradiados tratados con resveratrol 20-60 μM durante 24 horas, se observó un incremento en la actividad GST. Para este trabajo se utilizaron, de forma similar a nuestros experimentos, queratinocitos no expuestos a radiación ni otro agente nocivo. En nuestros resultados no se evaluaron los niveles de GST, pero al contrario de lo esperable según los resultados de este trabajo, las diferencias de concentración de anión superóxido entre queratinocitos tratados con resveratrol 25 μM y el control no fueron estadísticamente significativas (figura 131). Aunque en nuestros experimentos se realizaron un mínimo de 9 ensayos, deberán realizarse más ensayos en las mismas condiciones para evaluar la validez de nuestros resultados.

En nuestros trabajo, el tratamiento de queratinocitos HaCaT no irradiados, durante 24 horas, con metformina 5 mM demostró ser eficaz como tratamiento antirradical, con una reducción en la concentración de anión superóxido del 12,2%. (figura 131)

Según nuestros criterios de búsqueda, no existen trabajos previos publicados hasta la fecha en los que se haya estudiado en queratinocitos HaCaT no irradiados el efecto del tratamiento con metformina a concentraciones milimolar sobre la producción de anión superóxido mediante citometría de imagen. En nuestros experimentos con queratinocitos el efecto barredor de radicales libres de la metformina micromolar fue superior al de la metformina milimolar.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados (figura 131), aunque el tratamiento combinado se mostró como uno de los más eficaces frente a la producción de anión superóxido, no mostró efecto sinérgico. Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto sinérgico antirradical de la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en queratinocitos HaCaT *in vitro* no irradiados.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados con UVB, el pretratamiento durante 24 horas con tratamiento combinado (metformina 5 μM + resveratrol 25 μM) y con metformina 5 μM fueron los más eficaces a la hora de disminuir la concentración de anión superóxido con respecto al control irradiado. Las disminuciones fueron del 27% con el tratamiento combinado y del 24,2% con metformina 5 μM , sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados. Al igual que lo objetivado en queratinocitos no irradiados, no demostró eficacia antirradical, tras 24 horas de pretratamiento, el resveratrol 25 μM , ya que aunque se observó una reducción de la concentración de anión superóxido del 5,2% con respecto al control irradiado, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (figura 131)

Ribeiro y colaboradores (197) en su trabajo con queratinocitos irradiados tratados con metformina a concentraciones micromolar (1-500 μM) tras la irradiación (durante 1 hora) observan que las diferencias en la concentración de anión superóxido entre células tratadas y su control irradiado son estadísticamente significativas. Los autores concluyen que en queratinocitos irradiados, a diferencia de lo que observaron en los no irradiados, el tratamiento con metformina a dosis micromolar presenta actividad como barredor de anión superóxido. Estos resultados son similares a los observados en nuestros experimentos (figura 131) donde la metformina a dosis micromolar en queratinocitos irradiados demostró eficacia en la prevención de producción de anión superóxido. A diferencia de los experimentos de Ribeiro y colaboradores que incubaron con metformina durante 1 hora post irradiación, en nuestros experimentos se incubó con metformina durante 24 horas previas a la irradiación., realizando la lectura inmediatamente después de la irradiación. Así pues, en nuestros experimentos con queratinocitos irradiados se estudió el efecto preventivo, pero no se evaluó el efecto barredor de anión superóxido.

Li y colaboradores (106) en su trabajo con queratinocitos irradiados con UVB (30 mJ/cm^2), pretratados con el análogo de resveratrol pterostilbeno 5-10 μM durante 24 horas, observaron un descenso en la producción de radicales libres respecto al control irradiado.

Cui y colaboradores (109) en su trabajo con queratinocitos irradiados con UVB (50 mJ/cm^2), pretratados con resveratrol 0-100 μM durante 24 horas, también observaron un descenso en la producción de radicales libres respecto al control irradiado.

Vitale y colaboradores (82) en su trabajo con queratinocitos irradiados con UVB (10, 20, 40 o 100 mJ/cm^2), pretratados con resveratrol (25 o 100 μM) durante 2 o 24 horas, observaron un descenso en la producción de radicales libres respecto al control irradiado.

Tal y como hemos detallado en los tres trabajos comentados previamente existe evidencia de que el pretratamiento de queratinocitos irradiados con resveratrol micromolar previene de la sobreproducción de radicales libres. No obstante, en nuestros resultados las diferencias de concentración de anión superóxido entre queratinocitos pretratados con resveratrol 25 μM y el control no fueron estadísticamente significativas (figura 131). Aunque en nuestros experimentos se realizaron un mínimo de 9 ensayos, deberán realizarse más ensayos en las mismas condiciones para evaluar la validez de nuestros resultados.

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados con UVB, a diferencia de lo que se objetivó en queratinocitos no irradiados, el pretratamiento durante 24 horas con metformina 5 mM no demostró ser eficaz como tratamiento antirradical, ya que, aunque se observó una disminución de la concentración de anión superóxido del 9,1% con respecto al control irradiado, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (figura 131)

Según nuestros criterios de búsqueda, no existen trabajos previos publicados hasta la fecha en los que se haya estudiado en queratinocitos HaCaT irradiados el efecto del pretratamiento con metformina a concentraciones milimolar sobre la producción de anión superóxido mediante citometría de imagen.

En nuestros experimentos, el efecto fotoprotector antirradical en queratinocitos pretratados con metformina a dosis micromolar (con metformina 5 μ M reducción de la concentración de anión superóxido en un 24,2% con respecto al control irradiado) fue superior al observado con metformina milimolar (con metformina 5 mM reducción de la concentración de anión superóxido en un 9,1% con respecto al control irradiado). (figura 131)

Si observamos las gráficas de nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados (figura 131), aunque el pretratamiento combinado se mostró eficaz frente a la producción de anión superóxido fotoinducida, no mostró efecto sinérgico.

Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto sinérgico fotoprotector antirradical del pretratamiento con la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en queratinocitos HaCaT *in vitro* irradiados.

Con todo lo dicho anteriormente, en nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT, la metformina a concentraciones micromolar y el tratamiento combinado fueron los tratamientos antirradicales libres más eficaces, tanto en queratinocitos sin irradiación como en irradiados. En queratinocitos no irradiados la disminución en la concentración basal de radicales libres sugiere un efecto barredor de radicales libres con ambos tratamientos. En queratinocitos irradiados pretratados con metformina micromolar o tratamiento combinado, se aprecia además un efecto preventivo frente a la producción de anión superóxido.

E.4.2. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido y efecto protector de la metformina y resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB

E.4.2.1. Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos se observó un incremento en la producción de anión superóxido tras irradiación con 5,6 J/cm² de UVB del 112,92 %. (figura 132)

De forma similar a nuestro planteamiento, Subedi y colaboradores (111) en fibroblastos humanos *in vitro* evalúan la producción de radicales libres fotoinducida con dosis única de radiación UVB (144 mJ/cm²) inmediatamente post irradiación (111). Los autores en su trabajo estudian la sobreproducción de radicales libres en fibroblastos humanos, fotoinducida por UVB, mediante cuantificación de la fluorescencia emitida por DCF-DA. En nuestros experimentos, a diferencia de estos autores, se evaluó la fluorescencia emitida por el fluorocromo HE mediante citometría de imagen en la que se cuantificó dicha fluorescencia únicamente en fibroblastos vivos. Además, la dosis de irradiación UVB empleada en nuestros experimentos fue superior (5,6 J/cm²).

E.4.2.2. Efecto protector de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos irradiados con UVB

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos no irradiados, el tratamiento durante 24 horas con la combinación de metformina 5 μM +y resveratrol 25 μM fue el único eficaz a la hora de disminuir la concentración de anión superóxido, con una reducción de la concentración de anión superóxido en un 19,5% con respecto al control no irradiado (figura 134). Estos resultados coinciden con los objetivados con queratinocitos HaCaT, donde el tratamiento combinado se presentaba como uno de los mejores tratamientos barredores de anión superóxido. (figura 131)

Las diferencias en la producción de anión superóxido, con respecto al grupo control, tras 24 horas de tratamiento con metformina 5 μM o resveratrol 25 μM no fueron estadísticamente significativas en ningún caso. Estos resultados difieren de los observados en nuestros experimentos con queratinocitos, donde el tratamiento con metformina micromolar si presentaba efecto barredor de radicales libres. En nuestros experimentos con fibroblastos, al igual que sucedía con queratinocitos HaCaT, el resveratrol no demostró ser eficaz como barredor de anión superóxido. (figura 134)

Ribeiro y colaboradores (197) en su trabajo con queratinocitos no irradiados tratados con metformina a concentraciones micromolar (1-500 μM) durante 1 hora observan que las diferencias en la concentración de anión superóxido entre células tratadas y su control negativo no son estadísticamente significativas. Estos resultados son similares a los observados en nuestros experimentos con fibroblastos no irradiados, donde la metformina 5 μM no mostró ser un barredor de anión superóxido.

En el trabajo de Krajka-Kuźniak y colaboradores (79) con queratinocitos no irradiados tratados con resveratrol 20-60 μM durante 24 horas, se observó un incremento en la actividad GST. En nuestros resultados con fibroblastos humanos no se evaluaron los niveles de GST, pero al igual que lo observado en queratinocitos HaCaT, las diferencias de concentración de anión superóxido entre fibroblastos tratados con resveratrol 25 μM y el control no fueron estadísticamente significativas (figura 134). Aunque en nuestros experimentos se realizaron un mínimo de 9 ensayos, deberán realizarse más ensayos en las mismas condiciones para evaluar la validez de nuestros resultados.

En nuestros experimentos con fibroblastos, a diferencia de lo observado en queratinocitos HaCaT, el tratamiento de fibroblastos humanos no irradiados, durante 24 horas, con metformina 5 mM no demostró ser eficaz como tratamiento antirradical (figura 134).

Según nuestros criterios de búsqueda, no existen trabajos previos publicados hasta la fecha en los que se haya estudiado en fibroblastos humanos no irradiados el efecto del tratamiento con metformina a concentraciones milimolar sobre la producción de anión superóxido mediante citometría de imagen. En nuestros experimentos con fibroblastos humanos, el efecto barredor de radicales libres de la metformina micromolar fue similar al de la metformina milimolar, sin objetivarse diferencias significativas entre ambos.

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos no irradiados (figura 134), el tratamiento combinado se mostró como el único eficaz frente a la producción de anión

superóxido, mostrando efecto aditivo pero no sinérgico. Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto aditivo antirradical de la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en fibroblastos humanos *in vitro* no irradiados. Este efecto aditivo no se objetivó en nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados.

Similar a lo observado en queratinocitos HaCaT, en nuestros experimentos con fibroblastos humanos irradiados con UVB, el pretratamiento durante 24 horas con tratamiento combinado (metformina 5 μM + resveratrol 25 μM) fue el más eficaz a la hora de disminuir la concentración de anión superóxido, con una reducción de la concentración de anión superóxido en un 53,6% con respecto al control irradiado. (figura 134)

También demostraron eficacia como tratamiento antirradical libre la metformina 5 μM (reducción de anión superóxido en un 33,1% con respecto al control irradiado) y resveratrol 25 μM (reducción de anión superóxido en un 34,9% con respecto al control irradiado) (figura 134). Estos resultados difieren de los observados con queratinocitos HaCaT donde las diferencias de anión superóxido entre el grupo pretratado con resveratrol y el control irradiado no fueron estadísticamente significativas. Al igual que en queratinocitos HaCaT irradiados, el pretratamiento con metformina micromolar presentó eficacia antirradical (figura 131).

De forma similar a nuestros resultados, Subedi y colaboradores (111) en fibroblastos irradiados con UVB (144 mJ/cm^2) e inmediatamente después tratados con resveratrol (10 o 100 $\mu\text{g/mL}$) durante 24-72 horas observaron una disminución en la sobreproducción de radicales libres.

En nuestros experimentos con fibroblastos humanos irradiados con UVB, a diferencia de lo que se objetivó en queratinocitos irradiados, el pretratamiento durante 24 horas con metformina 5 mM demostró ser eficaz como tratamiento antirradical, con una disminución de la concentración de anión superóxido del 30,3% con respecto al control irradiado, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. (figura 134)

Según nuestros criterios de búsqueda, no existen trabajos previos publicados hasta la fecha en los que se haya estudiado en fibroblastos humanos irradiados el efecto del pretratamiento con metformina (a concentraciones micromolar o milimolar) sobre la producción de anión superóxido mediante citometría de imagen.

En nuestros experimentos, a diferencia de lo observado en queratinocitos HaCaT, el efecto fotoprotector antirradical en fibroblastos pretratados con metformina a dosis micromolar (con metformina 5 μM reducción de la concentración de anión superóxido en un 33,1% con respecto al control irradiado) no fue significativamente superior al observado con metformina milimolar (con metformina 5 mM reducción de la concentración de anión superóxido en un 30,3% con respecto al control irradiado). (figura 134)

Si observamos las gráficas de nuestros experimentos con fibroblastos humanos irradiados (figura 134), el pretratamiento combinado se mostró el más eficaz frente a la producción de anión superóxido fotoinducida, observándose un efecto aditivo pero no sinérgico. Este efecto aditivo no se objetivó en nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT irradiados.

Según nuestros criterios de búsqueda no existen trabajos previos publicados en los que se haya evaluado el efecto sinérgico fotoprotector antirradical del pretratamiento con la combinación de metformina y resveratrol a dosis micromolar en fibroblastos humanos *in vitro* irradiados.

Con todo lo dicho anteriormente, en nuestros experimentos con fibroblastos humanos, el tratamiento combinado fue el único tratamiento antirradical libre eficaz tanto en fibroblastos sin irradiación como en irradiados. En fibroblastos no irradiados tratados, la disminución en la concentración basal de radicales libres sugiere un efecto barredor de radicales libres. En fibroblastos irradiados pretratados, se aprecia además un efecto preventivo frente a la producción de anión superóxido.

E.5. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos y fibroblastos humanos

Las células senescentes han experimentado un daño irreparable, pero sin llegar a activado un programa de muerte celular. Durante el envejecimiento tisular, las células senescentes se acumulan de forma difusa (hasta un 5-10 % de todas las células) en los tejidos, llegando a acumularse masivamente en múltiples enfermedades fibróticas o en tejidos muy envejecidos (hasta un 30-50% de todas las células).

En el congreso anual de la *European Academy of Dermatology and Venereology* del año 2021, el Dr. Serrano comentó los siguientes puntos: (1) la senescencia celular es un componente causal y presente de la fibrosis tisular; (2) los fármacos antifibróticos actuales actúan selectivamente sobre las células senescentes reduciendo su secreción profibrótica; (3) los fármacos experimentales que eliminan las células senescentes, es decir, la actividad senolítica, constituyen un enfoque complementario prometedor para tratar la fibrosis (278)

En nuestra tesis los principales trabajos donde publicados en los que se ha evaluado las propiedades antisenescentes del resveratrol en la piel se recogen en el apartado A.5.2.6. (tablas XIX-XXI)

Entre los resultados de nuestra tesis se observa que a mayor tiempo sin recambio de medio celular (DMEM o RPMI) se produce un incremento en el acúmulo de células senescentes, de forma similar al envejecimiento tisular, que justifican las diferencias de observadas entre la senescencia basal de los controles no irradiados del experimento 3 y 5. Así pues en queratinocitos HaCaT no irradiados la senescencia basal del experimento 3 en el que las células no experimentaron cambio de medio durante 7 días (senescencia celular del 32%, figura 99) fue superior a la observada en el experimento 5, donde a las células no se les cambió el medio durante 3 días (senescencia celular del 21,1%, figura 135). Del mismo modo, en fibroblastos humanos no irradiados la senescencia basal del experimento 3 en el que las células no experimentaron cambio de medio durante 7 días (senescencia celular del 39,3%, figura 123) fue superior a la observada en el experimento 5, donde a las células no se les cambió el medio durante 3 días (senescencia celular del 33,8%, figura 137).

Al igual que otros autores (149), en el experimento 3 de nuestra tesis observamos datos que inicialmente nos parecieron discordantes, ya que el resveratrol 25 μ M tras 7 días de tratamiento, mostraba tendencia a un descenso en la viabilidad celular tanto en queratinocitos no irradiados (figura 86) como en fibroblastos no irradiados (figura 108). En cambio, en el experimento 5 de nuestra tesis observamos que el resveratrol fue el fármaco más eficaz a la hora de disminuir la senescencia celular tanto en queratinocitos no irradiados (figura 101) como en fibroblastos no irradiados (figura 125). Con estos resultados decidimos planificar el experimento 5, en el que se estudió las propiedades senolíticas del resveratrol a distintas dosis tanto en queratinocitos como en fibroblastos humanos no irradiados.

Hasta la fecha la metformina había sido propuesto como un fármaco con propiedades senolíticas en trabajos previamente publicados por otros autores (51) mientras que el resveratrol se había descrito como una sustancia antisenescente

independiente de la senolisis (279), sin existir, según nuestros criterios de búsqueda, trabajos previos en el que se haya descrito las propiedades senolíticas del resveratrol.

E.5.1. Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos humanos

En nuestros experimentos con queratinocitos HaCaT no irradiados, el tratamiento durante 72 horas con resveratrol 25 μ M fue la concentración más eficaz como senolítico. Así pues, el tratamiento de queratinocitos HaCaT con resveratrol 25 μ M fue la concentración que más disminuyó la senescencia celular (reducción con respecto al control del 18,86%) sin disminuir de forma estadísticamente significativa la viabilidad celular. (figura 135)

E.5.2. Efecto senolítico del resveratrol en fibroblastos humanos

Al igual que lo observado en queratinocitos HaCaT, en nuestros experimentos con fibroblastos humanos no irradiados, el tratamiento durante 72 horas con resveratrol 25 μ M fue la concentración más eficaz como senolítico. Del mismo modo, el tratamiento de fibroblastos con resveratrol 25 μ M fue la concentración que más disminuyó la senescencia celular (reducción con respecto al control del 31,52%) sin disminuir de forma estadísticamente significativa la viabilidad celular. (figura 137)

Birar y colaboradores (156) en su trabajo con fibroblastos humanos tratados con resveratrol 25 μ M, observan un incremento en la activación de SIRT1, que podrían justificar las propiedades senolíticas objetivadas en nuestro trabajo a estas concentraciones. Estos mismos autores utilizando concentraciones de resveratrol 100 μ M observan un descenso de la viabilidad, al igual que en nuestros resultados (figura 137). No obstante, a estas concentraciones, a diferencia de nuestros resultados, objetivaron un descenso de la Ki67 y un incremento de la actividad SA- β -galactosidasa. Como elementos metodológicos que podrían justificar estas diferencias, estos autores incubaron con resveratrol durante 24 horas y en nuestro trabajo las propiedades antisenescentes se observaron a las 72 horas post tratamiento. Además, en su trabajo, determinaron la fracción de senescencia celular, contabilizando 1000 células en campos aleatorios mientras que en nuestros experimentos utilizando la técnica APO-5-Sen se contabilizaron de forma automatizada mediante citometría de imagen un mínimo de 10.000 células en cada determinación.

F. Conclusiones

El modelo de cuantificación de muerte celular y senescencia causada por radiación UVB sobre cultivos celulares y medido mediante la técnica de citometría de imagen APO5-Sen, se mostró simple, repetible y fiable.

La irradiación con dosis única de UVB a $1,8 \text{ J/cm}^2$ se aproxima a la DL50 en queratinocitos HaCaT y DL30 en fibroblastos humanos. Con esta dosis existe una inducción de senescencia celular del 35,2% en queratinocitos y del 25% en fibroblastos humanos, pasadas 72 horas del estímulo lumínico.

El tratamiento preventivo con metformina $5 \mu\text{M}$ fue más eficaz que el tratamiento con metformina 5 mM como tratamiento protector frente a la muerte celular, senescencia celular y sobreproducción de radicales libres inducidos por radiación UVB.

El tratamiento preventivo con metformina $5 \mu\text{M}$ protege frente a la muerte celular inducida por UVB. En queratinocitos reduce la mortalidad celular un 23% y en fibroblastos humanos un 14,5%.

Al analizar los subtipos de muerte celular, el tratamiento preventivo con resveratrol $25 \mu\text{M}$, previo a la irradiación con UVB, presentó propiedades antiapoptóticas en queratinocitos y fibroblastos humanos, aunque no disminuyó de forma estadísticamente significativa la mortalidad celular total.

El tratamiento preventivo con resveratrol $25 \mu\text{M}$, administrado antes de la exposición a UVB, protege frente a la senescencia celular fotoinducida. En queratinocitos reduce la senescencia celular un 48,5% y en fibroblastos humanos un 52%.

El tratamiento preventivo combinado con metformina $5 \mu\text{M}$ y resveratrol $25 \mu\text{M}$ protege frente al incremento de radicales libres inducido por UVB. En queratinocitos reduce la concentración de anión superóxido un 27% y en fibroblastos humanos un 53,6%. En fibroblastos humanos el efecto de esta combinación fue aditivo.

Además, el tratamiento combinado con metformina $5 \mu\text{M}$ y resveratrol $25 \mu\text{M}$ presenta propiedades de agente barredor de radicales libres. En queratinocitos reduce la concentración basal de anión superóxido un 33,7% y en fibroblastos humanos un 19,5%.

El resveratrol presenta propiedades senolíticas dependientes de la dosis. A concentraciones de $25 \mu\text{M}$ se observa disminución del porcentaje de células senescentes en un 18,86% en queratinocitos y en un 31,52% en fibroblastos humanos.

Serán necesarias futuras investigaciones para conocer la efectividad fotoprotectora de la metformina y del resveratrol, a bajas concentraciones, administradas tópicamente o sistémicamente, utilizando modelos *in vivo*.

G. Relevancia y Limitaciones

Desde nuestro punto de vista, la relevancia de este estudio radica en el hecho de que existen escasos estudios en los que se evalúe el efecto fotoprotector de la metformina y/o el resveratrol y su efecto a nivel celular. Además, en nuestro trabajo hemos planteado un nuevo modelo de inducción de senescencia celular utilizando una dosis única de radiación UVB. También presentamos la técnica APO5-Sen en la que es posible evaluar 6 subpoblaciones celulares de forma simultánea mediante citometría de imagen. En nuestro trabajo se ha observado la mayor eficacia antisenescente y antirradical de la metformina a dosis micromolar frente a las dosis milimolar utilizadas comúnmente por otros autores en publicaciones previas.

No obstante, en nuestro trabajo las principales limitaciones observadas son las siguientes:

1. Se ha empleado modelos de trabajo *in vitro* y deberán realizarse futuros trabajos *in vivo* para conocer el efecto de la metformina y resveratrol sobre la piel.
2. Los resultados donde se evaluó el efecto antirradical del resveratrol a dosis micromolar fueron similares a los observados por otros autores, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Serán necesarios mayor número de ensayos para analizar estas diferencias.
3. Aunque, procedente del sol, en nuestra piel indican otras radiaciones tales como la UVA, visible o infrarroja, en nuestros trabajos únicamente se ha evaluado el efecto de la radiación UVB.
4. El estado de conservación de los medios celulares, así como el proceso de tripsinización son variables que aportan variabilidad nuestras determinaciones de mortalidad, senescencia y radicales libres.
5. Las diferencias de método entre los distintos experimentos de nuestra tesis no permitieron comparar los resultados obtenidos entre sí.
6. Los tiempos de incubación de los fluorocromos durante la preparación de la técnica APO5-Sen son largos, lo que supone un factor limitante en el número de lecturas diarias.
7. Durante la irradiación, en las células protegidas con papel de aluminio se alcanzaron altas temperaturas, por lo que inicialmente se observó una mayor mortalidad. Estas diferencias se resolvieron al disminuir la temperatura de la sala de irradiación y favorecer la ventilación en el habitáculo de irradiación celular.
8. El tubo empleado para la irradiación UVB no emite homogéneamente a lo largo de toda su longitud, por lo que pudo existir diferencias entre pocillos irradiados en un extremo del tubo y los irradiados en el centro. Para disminuir estas diferencias, para la irradiación las células se dispusieron en la zona central del tubo y siempre se empleó esta disposición.
9. Para garantizar la validez de los resultados de citometría de imagen, se necesita un número mínimo de células a la hora de realizar la lectura. En los experimentos donde hubo mucha mortalidad celular y las células fueron destruidas en pequeños fragmentos, estos residuos no pudieron ser analizados como células muertas mediante la técnica APO5-Sen, por lo que pudo infravalorarse la mortalidad.

H. Perspectivas de futuro

Con los resultados de nuestro trabajo se abre la puerta a futuras líneas de investigación donde se evalúe:

1. Efecto del tratamiento tópico/sistémico con metformina a bajas concentraciones, administrada previa a irradiación ultravioleta, sobre la muerte celular en modelos *in vivo*.
2. Evaluación del efecto senolítico del resveratrol a bajas concentraciones administrado tópicamente/sistémicamente sobre piel envejecida en modelos *in vivo*.
3. Estudio del efecto antisenescente preventivo del resveratrol a bajas concentraciones administrado tópicamente/sistémicamente, antes de radiación ultravioleta, en modelos *in vivo*.
4. Evaluación del efecto antiapoptótico del tratamiento tópico/sistémico con resveratrol a bajas concentraciones en modelos *in vivo*.
5. Evaluación del efecto barrador de radicales libres del tratamiento combinado con metformina y resveratrol, administrado tópicamente/sistémicamente, en modelos *in vivo*.
6. Estudio del efecto antirradical libre tras pretratamiento tópico/sistémico combinado con metformina y resveratrol en piel animal, antes de radiación UVB.
7. Evaluación del efecto fotoprotector preventivo de la metformina y/o resveratrol como compuesto aislados o en combinación con otras sustancias.
8. Evaluación del efecto fotoprotector preventivo de la metformina y/o resveratrol en pacientes con susceptibilidad cutánea a la radiación UVB tales como el xeroderma pigmentoso, donde existe predisposición al desarrollo de cáncer cutáneo.

I. Índice de tablas y figuras

I.1. TABLAS

1. **Tabla I.** Comparación de las características citomorfológicas de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis.
2. **Tabla II.** Producción de radicales libres
3. **Tabla III.** Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vitro con cultivos celulares.
4. **Tabla IV.** Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vitro con piel humana reconstruida.
5. **Tabla V.** Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vivo con ratones.
6. **Tabla VI.** Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vivo con piel humana.
7. **Tabla VII.** Efecto del resveratrol sobre el cáncer cutáneo. Modelos in vitro con cultivos celulares.
8. **Tabla VIII.** Efecto del resveratrol sobre el cáncer cutáneo. Modelos in vivo con ratones.
9. **Tabla IX.** Efecto fotoprotector del resveratrol. Modelos in vitro con cultivos celulares.
10. **Tabla X.** Efecto fotoprotector del resveratrol. Modelos in vitro con piel humana reconstruida.
11. **Tabla XI.** Efecto fotoprotector del resveratrol. Modelos in vivo con ratones.
12. **Tabla XII.** Efecto fotoprotector del resveratrol. Modelos in vivo con piel humana.
13. **Tabla XIII.** Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos in vitro con cultivos celulares.
14. **Tabla XIV.** Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos in vitro con piel humana reconstruida.
15. **Tabla XV.** Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos in vivo con ratones.
16. **Tabla XVI.** Efecto del resveratrol sobre dermatosis inflamatorias. Modelos in vivo con piel humana.
17. **Tabla XVII.** Efecto del resveratrol sobre la cicatrización. Modelos in vitro con cultivos celulares.
18. **Tabla XVIII.** Efecto del resveratrol sobre la cicatrización. Modelos in vivo con roedores.
19. **Tabla XIX.** Efecto del resveratrol sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vitro con cultivos celulares.
20. **Tabla XX.** Efecto del resveratrol sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vivo con animales.
21. **Tabla XXI.** Efecto del resveratrol sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vivo con piel humana.
22. **Tabla XXII.** Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vitro con cultivos celulares.
23. **Tabla XXIII.** Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vitro con piel humana reconstruida.
24. **Tabla XXIV.** Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vivo con animales.
25. **Tabla XXV.** Efecto del resveratrol sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vivo con piel humana.
26. **Tabla XXVI.** Efecto del resveratrol en tricología. Modelos in vitro con cultivos celulares.
27. **Tabla XXVII.** Efecto del resveratrol en tricología. Modelos in vivo con animales.
28. **Tabla XXVIII.** Efecto de la metformina sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vitro con cultivos celulares.
29. **Tabla XXIX.** Efecto de la metformina sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vitro con piel humana reconstruida.
30. **Tabla XXX.** Efecto de la metformina sobre el estrés oxidativo en la piel. Modelos in vivo con ratones.
31. **Tabla XXXI.** Efecto de la metformina sobre el cáncer cutáneo. Modelos in vitro con cultivos celulares.
32. **Tabla XXXII.** Efecto de la metformina sobre el cáncer cutáneo. Modelos in vivo con ratones.
33. **Tabla XXXIII.** Efecto de la metformina sobre el cáncer cutáneo. Modelos in vivo con piel humana.

34. **Figura XXXIV.** Efecto fotoprotector de la metformina. Modelos in vitro con cultivos celulares.
35. **Tabla XXXV.** Efecto fotoprotector de la metformina. Modelos in vivo con ratones.
36. **Tabla XXXVI.** Efecto de la metformina sobre dermatosis inflamatorias. Modelos in vivo con piel humana.
37. **Tabla XXXVII.** Efecto de la metformina sobre la cicatrización. Modelos in vitro con cultivos celulares.
38. **Tabla XXXVIII.** Efecto de la metformina sobre la cicatrización. Modelos in vivo con roedores.
39. **Tabla XXXIX.** Efecto de la metformina sobre la cicatrización. Modelos in vivo con piel humana.
40. **Tabla XL.** La metformina mejora la salud y la longevidad de distintas especies.
41. **Tabla XLI.** Efecto de la metformina sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vitro con cultivos celulares.
42. **Tabla XLII.** Efecto de la metformina sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vitro con piel humana reconstruida.
43. **Tabla XLIII.** Efecto de la metformina sobre el envejecimiento cutáneo. Modelos in vivo con animales.
44. **Tabla XLIV.** Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vitro con cultivos celulares.
45. **Tabla XLV.** Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vitro con piel humana reconstruida.
46. **Tabla XLVI.** Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vivo con animales.
47. **Tabla XLVII.** Efecto de la metformina sobre hiperpigmentaciones cutáneas. Modelos in vivo con piel humana.
48. **Tabla XLVIII.** Efecto de la metformina en tricología. Modelos in vitro con cultivos celulares.
49. **Tabla XLIX.** Efecto de la metformina sobre dermatosis relacionadas con endocrinopatías. Modelos in vivo con piel humana.
50. **Tabla L.** Equivalencias tiempo-irradiación para una distancia fija.
51. **Tabla LI.** Datos primarios de proliferación celular en queratinocitos HaCaT, obtenidos tras lectura en espectrofotómetro de microplacas utilizando el reactivo WST-1, a las 72 horas de añadir la metformina en el medio celular.
52. **Tabla LII.** Datos primarios de proliferación celular en queratinocitos HaCaT, obtenidos tras lectura en espectrofotómetro de microplacas utilizando el reactivo WST-1, a las 24 horas post irradiación con UVB.

I.2. FIGURAS

1. **Figura 1.** Ilustración de las capas de la piel humana.
2. **Figura 2.** Ilustración de las capas de la epidermis.
3. **Figura 3.** Ilustración de las capas de la dermis.
4. **Figura 4.** Vías de señalización en el fenómeno de senescencia celular propuestas por Vicencio y colaboradores.
5. **Figura 5.** Teoría multi paso en el fenómeno de senescencia celular propuesta por Van Deusen y colaboradores.
6. **Figura 6.** Teoría de dos fases en el fenómeno de senescencia celular propuesta por Abbadie y colaboradores.
7. **Figura 7.** Reducción monovalente del oxígeno molecular
8. **Figura 8.** Ilustración del espectro electromagnético.
9. **Figura 9.** Ecuación de las relaciones entre frecuencia (f), longitud de onda (λ) y energía de los fotones (E).
10. **Figura 10.** Índice ultravioleta según la Organización Mundial de la Salud.
11. **Figura 11.** Efecto de dosis crecientes de radiación UVB sobre la mortalidad celular en queratinocitos HaCaT, 72 horas post irradiación, determinados mediante citometría de flujo.
12. **Figura 12.** Senescencia celular y envejecimiento de la piel. Factores intrínsecos y extrínsecos determinantes y cambios histológicos observados con el envejecimiento de la piel.
13. **Figura 13.** Ilustración de la fisiopatogenia del fotoenvejecimiento.
14. **Figura 14.** Biosíntesis de resveratrol en las plantas
15. **Figura 15.** Esquema de los mecanismos por los cuales el resveratrol presenta propiedades terapéuticas en dermatología.
16. **Figura 16.** Efecto del resveratrol sobre el fotoenvejecimiento inducido por UVB.
17. **Figura 17.** Esquema del efecto del resveratrol sobre la melanogénesis y sus vías de señalización en los melanocitos.
18. **Figura 18.** Efecto del resveratrol en tricología. Modelos in vitro con cultivos celulares. NE: No estudiado.
19. **Figura 19.** Síntesis química de la metformina.
20. **Figura 20.** Diagrama esquemático del efecto anti-hiperglicémico de la metformina en el hepatocito.
21. **Figura 21.** Mecanismo fotoprotector de la metformina (flechas azules) contra la formación de ROS inducida por UVB en queratinocitos humanos (flechas rojas).
22. **Figura 22.** Vías de acción del metformina sobre la esperanza de vida.
23. **Figura 23.** Efecto de los miméticos de la restricción calórica sobre el envejecimiento de la piel.
24. **Figura 24.** De izquierda a derecha, detalle de los objetivos de las ópticas de 40x, 60x y 20x integrados en el citómetro de imagen AMNIS[®], ImageStream X del SAI Citómica.
25. **Figura 25.** Representación esquemática de la configuración de citómetro de imagen AMNIS[®]
26. **Figura 26.** Esquema de las 5 poblaciones celulares obtenidas con citometría de imagen y fluorocromos DAPI y AnexinaV-PE mediante la técnica APO 5.
27. **Figura 27.** Histograma biparamétrico obtenido con citometría de imagen y fluorocromos DAPI y Anexina V-PE mediante la técnica APO 5.
28. **Figura 28.** Histograma biparamétrico obtenido con citometría de imagen y fluorocromos DAPI y Anexina V-PE mediante la técnica APO 5. Subanálisis de células AnexinaV positivo y DAPI positivo según morfología nuclear mediante óptica del citómetro.
29. **Figura 29.** Acción de la Succinato Tetrazolio-reductasa.
30. **Figura 30.** Mecanismo de la Anexina V para la detección de apoptosis
31. **Figura 31.** Espectro de excitación y emisión de los fluorocromos ficoeritrina (PE) y 7-ADD.
32. **Figura 32.** Espectro de excitación y emisión del fluorocromo C₁₂-FDG.
33. **Figura 33.** Espectro de excitación y emisión del fluorocromo DAPI.
34. **Figura 34.** Espectro de excitación y emisión del fluorocromo HE.
35. **Figura 35.** Equipos de laboratorio. (a) Agitador de mezclas Vortex, Heidolph[®], Reax top. (b) Agitador orbital, Lab-Line[®], 4625 Titer Plate Shaker. (c) Balanza electrónica, AND[®], HR-120.
36. **Figura 36.** Equipos de laboratorio. (a) Baño termostático, JP Selecta[®], Unitronic Or. (b) Cabina de seguridad microbiológica clase II, Telstar[®], Bio-II-A. (c) Centrífuga, Eppendorf[®], 5810R.
37. **Figura 37.** Citómetro de imagen, AMNIS[®], ImageStream X, SAI Citómica, Universidad de Zaragoza.
38. **Figura 38.** Espectrofotómetro de microplacas termostaticado, BioTeK[®], EonTM.

39. **Figura 39.** Estufa de cultivo, Binder®.
40. **Figura 40.** Microscopia. (a) Microscopio Invertido de Fluorescencia, Nikon®, Eclipse TE2000-S. (b) Microscopio Óptico de Fluorescencia, Nikon®, Eclipse E800.
41. **Figura 41.** pHmetro, Crison®, micropH 2002
42. **Figura 42.** Lámpara UVB, Philips®, PL-L 36 W/01/4P y espectro de emisión de la misma, con pico en 311 nm.
43. **Figura 43.** Fungibles. (a) Frascos de cultivo. (b) Tubos de ensayo. (c) Placas de cultivo.
44. **Figura 44.** Pipetas. (a) Pipeteador motorizado. (b) Micropipetas automáticas. (c) Pipetas multicanal.
45. **Figura 45.** Puntas de precisión desechables.
46. **Figura 46.** Esquema de mantenimiento de cultivo celular.
47. **Figura 47.** Despegamiento celular de la placa de cultivo tras tratamiento con tripsina de queratinocitos HaCaT. Microscopía óptica. (a) 4 aumentos. (b) 10 aumentos.
48. **Figura 48.** Plantilla 1º del estudio de proliferación celular. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control.
49. **Figura 49.** Plantilla 2º del estudio de proliferación celular. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control.
50. **Figura 50.** Efecto de la radiación UVB sobre la mortalidad celular en queratinocitos HaCaT. Microscopio óptico a 4x
51. **Figura 51.** Efecto de la radiación UVB sobre la mortalidad celular en fibroblastos humanos. Microscopio óptico a 4x
52. **Figura 52.** Plantilla 1º del estudio de irradiación. En amarillo: Irradiación con 300". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control.
53. **Figura 53.** Plantilla 2º del estudio de irradiación. En amarillo: Irradiación con 300". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. V: Vacío. C: Control.
54. **Figura 54.** Plantilla del estudio de senescencia. En amarillo: Irradiación con 300". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. C: Control.
55. **Figura 55.** Fluorocromos para medir viabilidad, necrosis, apoptosis temprana, apoptosis tardía, necroptosis y senescencia.
56. **Figura 56.** Histograma monoparamétrico de células enfocadas en queratinocitos HaCaT no irradiados.
57. **Figura 57.** Histograma monoparamétrico de células individuales en queratinocitos HaCaT no irradiados.
58. **Figura 58.** Histograma monoparamétrico de células redondas en queratinocitos HaCaT no irradiados.
59. **Figura 59.** Histograma monoparamétrico de células muertas con DAPI en queratinocitos HaCaT no irradiados.
60. **Figura 60.** Histograma monoparamétrico de células apoptóticas con PE en queratinocitos HaCaT irradiados.
61. **Figura 61.** Histograma biparamétrico de queratinocitos irradiados con técnica APO 5. (Figura del autor)
62. **Figura 62.** Histograma biparamétrico de queratinocitos irradiados para diferenciación de células apoptóticas tardías y necroptóticas según su morfología.
63. **Figura 63.** Histograma monoparamétrico de células senescentes con C12-FDG en queratinocitos HaCaT irradiados.
64. **Figura 64.** Células fotografiadas con el citómetro AMNIS®. Queratinocitos HaCaT.
65. **Figura 65.** Plantilla del estudio de radicales libres. En amarillo: Irradiación con 900". En verde: Sin irradiar. En rojo: [Metformina]. En azul: [Resveratrol]. C: Control.
66. **Figura 66.** Fluorocromos para medir anión superóxido y mortalidad.
67. **Figura 67.** Histograma monoparamétrico de anión superóxido con HE en queratinocitos HaCaT irradiados.
68. **Figura 68.** Histograma monoparamétrico de células muertas con DAPI en queratinocitos HaCaT irradiados.
69. **Figura 69.** Células fotografiadas con el citómetro AMNIS®. Queratinocitos HaCaT irradiados
70. **Figura 70.** Histograma monoparamétrico de variación temporal en las UFA para el fluorocromo HE durante la lectura de la muestra en células vivas. En la izquierda queratinocitos HaCaT no irradiados. En la derecha HaCaT irradiados.
71. **Figura 71.** Plantilla del estudio de senolisis.. En azul: [Resveratrol]. C: Control.
72. **Figura 72.** Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos.
73. **Figura 73.** Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos.

74. **Figura 74.** Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos.
75. **Figura 75.** Efecto de la metformina sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos.
76. **Figura 76.** Efecto del resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos
77. **Figura 77.** Efecto de la combinación de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos.
78. **Figura 78.** Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos 24 horas post irradiación con UVB.
79. **Figura 79.** Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB.
80. **Figura 80.** Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos 24 horas post irradiación con UVB.
81. **Figura 81.** Efecto de la metformina y el resveratrol sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB.
82. **Figura 82.** Efecto de la radiación UVB sobre la muerte celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Variaciones en cada tipo de muerte celular.
83. **Figura 83.** Efecto de la radiación UVB sobre la proliferación celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB.
84. **Figura 84.** Queratinocitos HaCaT vivos proliferantes mediante técnica APO5-Sen, en citómetro de imagen AMNIS[®], ImageStream X.
85. **Figura 85.** Protección de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la mortalidad celular de queratinocitos humanos.
86. **Figura 86.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la viabilidad celular de queratinocitos humanos.
87. **Figura 87.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necrosis celular de queratinocitos humanos.
88. **Figura 88.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis temprana de queratinocitos humanos.
89. **Figura 89.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis tardía de queratinocitos humanos.
90. **Figura 90.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necroptosis de queratinocitos humanos.
91. **Figura 91.** Protección de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
92. **Figura 92.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la viabilidad celular de queratinocitos humanos.
93. **Figura 93.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la necrosis celular de queratinocitos humanos.
94. **Figura 94.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la apoptosis temprana de queratinocitos humanos.
95. **Figura 95.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la apoptosis tardía de queratinocitos humanos.
96. **Figura 96.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la necroptosis de queratinocitos humanos.
97. **Figura 97.** Caracterización de subpoblaciones celulares en queratinocitos humanos HaCaT mediante técnica APO 5-Sen y citómetro de imagen AMNIS[®], ImageStream X.
98. **Figura 98.** Histograma biparamétrico de queratinocitos HaCaT utilizando técnica APO 5 para análisis de muerte celular 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
99. **Figura 99.** Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
100. **Figura 100.** Protección de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
101. **Figura 101.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos.
102. **Figura 102.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la senescencia celular de queratinocitos humanos.
103. **Figura 103.** Histograma monoparamétrico de queratinocitos HaCaT, utilizando el fluorocromo C₁₂-FDG, para análisis de senescencia celular 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
104. **Figura 104.** Queratinocitos HaCaT mediante citómetro de imagen AMNIS[®], ImageStream X.

- 105.Figura 105.** Efecto de la radiación UVB sobre la muerte celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Variaciones en cada tipo de muerte celular.
- 106.Figura 106.** Efecto de la radiación UVB sobre la proliferación celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB.
- 107.Figura 107.** Fibroblastos humanos vivos senescentes mediante técnica APO5-Sen, en citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X.
- 108.Figura 108.** Protección de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la mortalidad celular de fibroblastos humanos.
- 109.Figura 109.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la viabilidad celular de fibroblastos humanos.
- 110.Figura 110.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necrosis celular de fibroblastos humanos.
- 111.Figura 111.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis temprana de fibroblastos humanos.
- 112.Figura 112.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la apoptosis tardía de fibroblastos humanos.
- 113.Figura 113.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la necroptosis de fibroblastos humanos.
- 114.Figura 114.** Protección de la metformina y resveratrol sobre la mortalidad celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
- 115.Figura 115.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la viabilidad celular de fibroblastos humanos.
- 116.Figura 116.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la necrosis celular de fibroblastos humanos.
- 117.Figura 117.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la apoptosis temprana de fibroblastos humanos.
- 118.Figura 118.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la apoptosis tardía de fibroblastos humanos.
- 119.Figura 119.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la necroptosis de fibroblastos humanos.
- 120.Figura 120.** Muestra de 4 fibroblastos humanos apoptóticos tempranos, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), determinados mediante citómetro de imagen AMNIS®.
- 121.Figura 121.** Muestra de 2 fibroblastos humanos apoptóticos tardíos, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), determinados mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X.
- 122.Figura 122.** Histograma biparamétrico de fibroblastos humanos utilizando técnica APO 5 para análisis de muerte celular 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
- 123.Figura 123.** Efecto de la radiación UVB sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²). Diferencias entre células control sin reactivo no irradiadas y células control sin reactivo irradiadas con UVB.
- 124.Figura 124.** Protección de la metformina y resveratrol sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
- 125.Figura 125.** Efecto de la metformina y resveratrol, tras 7 días de incubación, sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos.
- 126.Figura 126.** Efecto del pretratamiento con metformina y resveratrol, 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²), sobre la senescencia celular de fibroblastos humanos
- 127.Figura 127.** Histograma monoparamétrico de fibroblastos humanos, utilizando el fluorocromo C₁₂-FDG, para análisis de senescencia celular 72 horas post irradiación con UVB (1,8 J/cm²).
- 128.Figura 128.** Muestra de 2 fibroblastos humanos senescentes mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X.
- 129.Figura 129.** Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos post irradiación con UVB (5,6 J/cm²). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB.
- 130.Figura 130.** Detección de sobreproducción de anión superóxido, en queratinocitos humanos HaCaT vivos tras irradiación UVB, mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X.
- 131.Figura 131.** Protección de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en queratinocitos humanos post irradiación con UVB (5,6 J/cm²).
- 132.Figura 132.** Efecto de la radiación UVB sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos post irradiación con UVB (5,6 J/cm²). Diferencias entre células control y células expuestas a irradiación UVB.

- 133.Figura 133.** *Detección de sobreproducción de anión superóxido, en fibroblastos humanos muertos tras irradiación UVB, mediante citómetro de imagen AMNIS®, ImageStream X.*
- 134.Figura 134.** *Protección de la metformina y el resveratrol sobre la producción del anión superóxido en fibroblastos humanos post irradiación con UVB (5,6 J/cm²).*
- 135.Figura 135.** *Efecto senolítico del resveratrol en queratinocitos humanos tras 72 horas de incubación.*
- 136.Figura 136.** *Queratinocitos humanos HaCaT tras 72 horas de incubación con resveratrol a concentraciones crecientes de 2,5 μM, 25 μM, 100 μM, 400 μM y 1,6 mM.*
- 137.Figura 137.** *Efecto senolítico del resveratrol en fibroblastos humanos tras 72 horas de incubación.*
- 138.Figura 138.** *Fibroblastos humanos tras 72 horas de incubación con resveratrol a concentraciones crecientes de 2,5 μM, 25 μM, 100 μM, 400 μM y 1,6 mM.*

J. Bibliografía

J.1. Recursos bibliográficos

Para la citación en el texto de las referencias bibliográficas se ha utilizado el gestor bibliográfico Zotero aplicando las normas Vancouver.

J.2. Referencias bibliográficas

1. Capas de la piel: MedlinePlus enciclopedia médica ilustración [Internet]. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/8912.htm
2. McKee P. Pathology of the Skin. 2nd edition. London: Mosby-Wolfe; 1996.
3. Murphy G. Histology of the skin. En: Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B, eds Lever's Histopathology of the Skin. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 5-50.
4. Cribier B GE. Histologie de la peau normale et lésions histopathologiques élémentaires. En: Encycl Méd Chir(Dermatologie). Éditions Techniques (Paris); 2002. p. 98-085 A10, 16 p.
5. El moderno prometeo: El órgano cutáneo: anatomía de la epidermis [Internet]. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://elmodernoprometeo.blogspot.com/2011/09/el-organo-cutaneo-anatomia-de-la.html>
6. Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. Exp Dermatol. febrero de 1998;7(1):1-10.
7. Interpretation of dermoscopic features | Primary Care Dermatology Society | UK [Internet]. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.pcds.org.uk/p/dermoscopy-interpretation-of-dermoscopic-features>
8. (PDF) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin [Internet]. ResearchGate. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/11279803_Anatomy_histology_and_immuno_histochemistry_of_normal_human_skin
9. Saalbach A, Aneregg U, Bruns M, Schnabel E, Herrmann K, Hausteil UF. Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities. J Invest Dermatol. junio de 1996;106(6):1314-9.
10. Eyden B. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. Ultrastruct Pathol. febrero de 2001;25(1):39-50.
11. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, et al. Classification of cell death. Cell Death Differ. enero de 2009;16(1):3-11.

12. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* enero de 2012;19(1):107-20.
13. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* abril de 2004;23(16):2825-37.
14. Salazar MM. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev Colomb Biotecnol.* 1 de julio de 2009;11(2):152-66.
15. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* junio de 2007;35(4):495-516.
16. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* diciembre de 1961;25:585-621.
17. Petersen T, Niklason L. Cellular Lifespan and Regenerative Medicine. *Biomaterials.* septiembre de 2007;28(26):3751-6.
18. Marzo-Pereboom Y. Protección celular por quercetina frente a gas mostaza [Tesis Doctoral]. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2021.
19. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology.* 2008;54(2):92-9.
20. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 22 de mayo de 2014;509(7501):439-46.
21. Wiley CD, Campisi J. From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metab.* 14 de junio de 2016;23(6):1013-21.
22. Abbadie C, Pluquet O, Poutier A. Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses? *Cell Mol Life Sci CMLS.* diciembre de 2017;74(24):4471-509.
23. Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Takimoto K, Maruyama M, Maruyama W, et al. SIRT1 Suppresses the Senescence-Associated Secretory Phenotype through Epigenetic Gene Regulation. *PLoS ONE [Internet].* 30 de enero de 2015 [citado 17 de agosto de 2019];10(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312089/>
24. Zhang E, Guo Q, Gao H, Xu R, Teng S, Wu Y. Metformin and Resveratrol Inhibited High Glucose-Induced Metabolic Memory of Endothelial Senescence through SIRT1/p300/p53/p21 Pathway. *PloS One.* 2015;10(12):e0143814.
25. Choi SY, Bin BH, Kim W, Lee E, Lee TR, Cho EG. Exposure of human melanocytes to UVB twice and subsequent incubation leads to cellular senescence and senescence-associated pigmentation through the prolonged p53 expression. *J Dermatol Sci.* junio de 2018;90(3):303-12.
26. Li Z, Zhang Z, Ren Y, Wang Y, Fang J, Yue H, et al. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology.* abril de 2021;22(2):165-87.

27. Matacchione G, Gurău F, Silvestrini A, Tiboni M, Mancini L, Valli D, et al. Anti-SASP and anti-inflammatory activity of resveratrol, curcumin and β -caryophyllene association on human endothelial and monocytic cells. *Biogerontology*. 1 de junio de 2021;22(3):297-313.
28. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. octubre de 2000;113 (Pt 20):3613-22.
29. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 15 de noviembre de 2010;24(22):2463-79.
30. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1798-806.
31. Yang NC, Hu ML. A fluorimetric method using fluorescein di-beta-D-galactopyranoside for quantifying the senescence-associated beta-galactosidase activity in human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Anal Biochem*. 15 de febrero de 2004;325(2):337-43.
32. Flor-de-Lis AC. Estudio del efecto de la radiación ultravioleta sobre fibroblastos y su protección por quercetina [Tesis Doctoral]. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2015.
33. Introduction to the Electromagnetic Spectrum and Spectroscopy | Analytical Chemistry | PharmaXChange.info [Internet]. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://pharmaxchange.info/2011/08/introduction-to-the-electromagnetic-spectrum-and-spectroscopy/>
34. Euromelanoma | a pan-European campaign and source of information on skin cancer, its prevention and early treatment. [Internet]. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.euromelanoma.org/spain>
35. Factores que determinan el Índice Ultravioleta - Blog | iderma.es Barcelona [Internet]. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.iderma.es/blog.cfm/ID/13106/ESP/factores-determinan-indice-ultravioleta.htm>
36. Xiao T, Chen Y, Song C, Xu S, Lin S, Li M, et al. Possible treatment for UVB-induced skin injury: Anti-inflammatory and cytoprotective role of metformin in UVB-irradiated keratinocytes. *J Dermatol Sci* [Internet]. 9 de febrero de 2021 [citado 12 de mayo de 2021];0(0). Disponible en: [https://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811\(21\)00014-1/abstract](https://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811(21)00014-1/abstract)
37. Granados-López AJ, Manzanares-Acuña E, López-Hernández Y, Castañeda-Delgado JE, Fraire-Soto I, Reyes-Estrada CA, et al. UVB Inhibits Proliferation, Cell Cycle and Induces Apoptosis via p53, E2F1 and Microtubules System in Cervical Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*. 14 de mayo de 2021;22(10):5197.
38. Jost T, Heinzerling L, Fietkau R, Hecht M, Distel LV. Palbociclib Induces Senescence in Melanoma and Breast Cancer Cells and Leads to Additive Growth Arrest in Combination With Irradiation. *Front Oncol*. 2021;11:740002.

39. Van Laethem A, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* agosto de 2005;37(8):1547-53.
40. Low E, Alimohammadiha G, Smith LA, Costello LF, Przyborski SA, von Zglinicki T, et al. How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing? *Ageing Res Rev.* noviembre de 2021;71:101456.
41. Li Y, Zeng N, Qin Z, Chen Y, Lu Q, Cheng Y, et al. Ultrasmall Prussian blue nanoparticles attenuate UVA-induced cellular senescence in human dermal fibroblasts via inhibiting the ERK/AP-1 pathway. *Nanoscale.* 8 de octubre de 2021;13(38):16104-12.
42. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell.* octubre de 2006;5(5):379-89.
43. Lewis DA, Travers JB, Machado C, Somani AK, Spandau DF. Reversing the aging stromal phenotype prevents carcinoma initiation. *Aging.* abril de 2011;3(4):407-16.
44. Nayeri Rad A, Shams G, Safdarian M, Khorsandi L, Grillari J, Sharif Makhmalzadeh B. Metformin loaded cholesterol-lysine conjugate nanoparticles: A novel approach for protecting HDFs against UVB-induced senescence. *Int J Pharm.* 30 de agosto de 2020;586:119603.
45. Gaboriau F, Morlière P, Marquis I, Moysan A, Gèze M, Dubertret L. Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochem Photobiol.* octubre de 1993;58(4):515-20.
46. Hakala M, Rantamäki S, Puputti EM, Tyystjärvi T, Tyystjärvi E. Photoinhibition of manganese enzymes: insights into the mechanism of photosystem II photoinhibition. *J Exp Bot.* 2006;57(8):1809-16.
47. Casati P, Walbot V. Crosslinking of Ribosomal Proteins to RNA in Maize Ribosomes by UV-B and Its Effects on Translation. *Plant Physiol.* octubre de 2004;136(2):3319-32.
48. Muñoz P, Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR, et al. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med.* abril de 1995;18(4):747-55.
49. Frohnmeier H, Staiger D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* diciembre de 2003;133(4):1420-8.
50. Kim DH, Bang E, Jung HJ, Noh SG, Yu BP, Choi YJ, et al. Anti-aging Effects of Calorie Restriction (CR) and CR Mimetics based on the Senoinflammation Concept. *Nutrients.* 6 de febrero de 2020;12(2):E422.
51. Pils V, Ring N, Valdivieso K, Lämmermann I, Gruber F, Schosserer M, et al. Promises and challenges of senolytics in skin regeneration, pathology and ageing. *Mech Ageing Dev.* diciembre de 2021;200:111588.
52. Krutmann J, Bouloc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *J Dermatol Sci.* marzo de 2017;85(3):152-61.

53. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* diciembre de 2000;16(6):239-44.
54. Rousseaux MC, Ballaré CL, Giordano CV, Scopel AL, Zima AM, Szwarcberg-Bracchitta M, et al. Ozone depletion and UVB radiation: impact on plant DNA damage in southern South America. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 de diciembre de 1999;96(26):15310-5.
55. Karran P, Brem R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. *DNA Repair.* agosto de 2016;44:178-85.
56. Gilchrest BA. Photoaging. *J Invest Dermatol.* 1 de julio de 2013;133(E1):E2-6.
57. Eckhart L, Tschachler E, Gruber F. Autophagic Control of Skin Aging. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:143.
58. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules.* 21 de abril de 2015;5(2):545-89.
59. Bhattacharyya TK, Thomas JR. Histomorphologic changes in aging skin: observations in the CBA mouse model. *Arch Facial Plast Surg.* febrero de 2004;6(1):21-5.
60. Meador WD, Sugerman GP, Story HM, Seifert AW, Bersi MR, Tepole AB, et al. The regional-dependent biaxial behavior of young and aged mouse skin: A detailed histomechanical characterization, residual strain analysis, and constitutive model. *Acta Biomater.* 1 de enero de 2020;101:403-13.
61. Haydont V, Bernard BA, Fortunel NO. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mech Ageing Dev.* enero de 2019;177:150-6.
62. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5 de enero de 2015;5(1):a015370.
63. Varani J, Schuger L, Dame MK, Leonard C, Fligiel SEG, Kang S, et al. Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J Invest Dermatol.* junio de 2004;122(6):1471-9.
64. Choi YJ. Shedding Light on the Effects of Calorie Restriction and its Mimetics on Skin Biology. *Nutrients.* 24 de mayo de 2020;12(5):E1529.
65. Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. Skin ageing. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* agosto de 2011;25(8):873-84.
66. Silva SAME, Michniak-Kohn B, Leonardi GR. An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *An Bras Dermatol.* junio de 2017;92(3):367-74.
67. Wen S, Zhang J, Yang B, Elias PM, Man MQ. Role of Resveratrol in Regulating Cutaneous Functions. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2020;2020:2416837.
68. Showing all foods in which the polyphenol Resveratrol is found - Phenol-Explorer [Internet]. [citado 27 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/592>

69. Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, et al. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatria Gerontol*. 1 de marzo de 2013;48(2):79-88.
70. Sung MM, Byrne NJ, Robertson IM, Kim TT, Samokhvalov V, Levasseur J, et al. Resveratrol improves exercise performance and skeletal muscle oxidative capacity in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 de abril de 2017;312(4):H842-53.
71. Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model - PubMed [Internet]. [citado 7 de abril de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29109832/>
72. Resveratrol and diabetes: A critical review of clinical studies - PubMed [Internet]. [citado 7 de abril de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28843911/>
73. Malaguarnera L. Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients*. 26 de abril de 2019;11(5):E946.
74. Resveratrol reduces brain injury after subarachnoid hemorrhage by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress - PubMed [Internet]. [citado 7 de abril de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31169191/>
75. Chiang MC, Nicol CJ, Cheng YC. Resveratrol activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta-induced inflammation and oxidative stress. *Neurochem Int*. mayo de 2018;115:1-10.
76. Soleymani S, Iranpanah A, Najafi F, Belwal T, Ramola S, Abbasabadi Z, et al. Implications of grape extract and its nanoformulated bioactive agent resveratrol against skin disorders. *Arch Dermatol Res*. octubre de 2019;311(8):577-88.
77. Na JI, Shin JW, Choi HR, Kwon SH, Park KC. Resveratrol as a Multifunctional Topical Hypopigmenting Agent. *Int J Mol Sci*. 22 de febrero de 2019;20(4):E956.
78. Zachary CM, Wang JV, Saedi N. Resveratrol as a Skincare Ingredient: Current Evidence and the Future Potential. *Skinmed*. 2021;19(6):414-6.
79. Krajka-Kuźniak V, Szaefer H, Stefański T, Sobiak S, Cichocki M, Baer-Dubowska W. The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on the Nrf2-ARE pathway in mouse epidermis and HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Biol Lett*. septiembre de 2014;19(3):500-16.
80. Soeur J, Eilstein J, Léreaux G, Jones C, Marrot L. Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. *Free Radic Biol Med*. enero de 2015;78:213-23.
81. Bastianetto S, Dumont Y, Durantón A, Vercauteren F, Breton L, Quirion R. Protective action of resveratrol in human skin: possible involvement of specific receptor binding sites. *PloS One*. 23 de septiembre de 2010;5(9):e12935.
82. Vitale N, Kisslinger A, Paladino S, Procaccini C, Matarese G, Pierantoni GM, et al. Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. *PloS One*. 2013;8(11):e80728.

83. Berselli PVR, Zava S, Montorfano G, Corsetto PA, Krzyzanowska J, Oleszek W, et al. A mint purified extract protects human keratinocytes from short-term, chemically induced oxidative stress. *J Agric Food Chem*. 10 de noviembre de 2010;58(21):11428-34.
84. Fasano E, Serini S, Mondella N, Trombino S, Celleno L, Lanza P, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of selected natural compounds contained in a dietary supplement on two human immortalized keratinocyte lines. *BioMed Res Int*. 2014;2014:327452.
85. Sticozzi C, Belmonte G, Cervellati F, Muresan XM, Pessina F, Lim Y, et al. Resveratrol protects SR-B1 levels in keratinocytes exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med*. abril de 2014;69:50-7.
86. Sticozzi C, Cervellati F, Muresan XM, Cervellati C, Valacchi G. Resveratrol prevents cigarette smoke-induced keratinocytes damage. *Food Funct*. septiembre de 2014;5(9):2348-56.
87. Herbert KJ, Snow ET. Modulation of arsenic-induced epidermal growth factor receptor pathway signalling by resveratrol. *Chem Biol Interact*. 25 de junio de 2012;198(1-3):38-48.
88. Szaefer H, Cichocki M, Brauze D, Baer-Dubowska W. Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutr Cancer*. 2004;48(1):70-7.
89. Alonso C, Martí M, Barba C, Carrer V, Rubio L, Coderch L. Skin permeation and antioxidant efficacy of topically applied resveratrol. *Arch Dermatol Res*. agosto de 2017;309(6):423-31.
90. Fuggetta MP, D'Atri S, Lanzilli G, Tricarico M, Cannavò E, Zambruno G, et al. In vitro antitumour activity of resveratrol in human melanoma cells sensitive or resistant to temozolomide. *Melanoma Res*. junio de 2004;14(3):189-96.
91. Zhao S, Tang L, Chen W, Su J, Li F, Chen X, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with regulating the miR-492/CD147 pathway in malignant melanoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. abril de 2021;394(4):797-807.
92. Zhang X, Liu X, Kang S, Liu C, Hao Y. Resveratrol enhances the effects of ALA-PDT on skin squamous cells A431 through p38/ MAPK signaling pathway. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2018;21(4):797-803.
93. Kim AL, Zhu Y, Zhu H, Han L, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. *Exp Dermatol*. julio de 2006;15(7):538-46.
94. Tomikoshi Y, Nomura M, Okudaira N, Sakagami H, Wakabayashi H. Enhancement of Cytotoxicity of Three Apoptosis-inducing Agents Against Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line by Benzoxazinotropone. *Vivo Athens Greece*. 10 de 2016;30(5):645-50.
95. Tyagi A, Gu M, Takahata T, Frederick B, Agarwal C, Siriwardana S, et al. Resveratrol selectively induces DNA Damage, independent of Smad4 expression, in its efficacy against human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de agosto de 2011;17(16):5402-11.

96. Nihal M, Wu J, Stonesifer CJ, Daniels J, Choi J, Geskin L, et al. Epigenetic Regulation of Apoptosis in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Implications for Therapy with Methotrexate, Jak Inhibitors, and Resveratrol. *J Invest Dermatol.* febrero de 2022;142(2):493-496.e7.
97. Gong C, Xia H. Resveratrol suppresses melanoma growth by promoting autophagy through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med.* marzo de 2020;19(3):1878-86.
98. Carletto B, Berton J, Ferreira TN, Dalmolin LF, Paludo KS, Mainardes RM, et al. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de agosto de 2016;144:65-72.
99. Iqbal MK, Iqbal A, Anjum H, Gupta MM, Ali J, Baboota S. Determination of in vivo virtue of dermal targeted combinatorial lipid nanocolloidal based formulation of 5-fluorouracil and resveratrol against skin cancer. *Int J Pharm.* 15 de diciembre de 2021;610:121179.
100. Shi Y, Zhao X, Wang C, Wang Y, Zhang S, Li P, et al. Ultrafast Nonadiabatic Photoisomerization Dynamics Mechanism for the UV Photoprotection of Stilbenoids in Grape Skin. *Chem Asian J.* 4 de mayo de 2020;15(9):1478-83.
101. Chen M liang, Li J, Xiao W rong, Sun L, Tang H, Wang L, et al. Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* octubre de 2006;31(5):635-9.
102. Liu Y, Chan F, Sun H, Yan J, Fan D, Zhao D, et al. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur J Pharmacol.* 10 de enero de 2011;650(1):130-7.
103. Cao C, Lu S, Kivlin R, Wallin B, Card E, Bagdasarian A, et al. SIRT1 confers protection against UVB- and H2O2-induced cell death via modulation of p53 and JNK in cultured skin keratinocytes. *J Cell Mol Med.* septiembre de 2009;13(9B):3632-43.
104. Juškaitė V, Ramanauskienė K, Briedis V. Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress. *Acta Pharm Zagreb Croat.* 27 de junio de 2017;67(2):247-56.
105. Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia N Y N.* febrero de 2003;5(1):74-82.
106. Li H, Jiang N, Liang B, Liu Q, Zhang E, Peng L, et al. Pterostilbene protects against UVB-induced photo-damage through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent Nrf2/ARE pathway in human keratinocytes. *Redox Rep Commun Free Radic Res.* noviembre de 2017;22(6):501-7.
107. Potapovich AI, Lulli D, Fidanza P, Kostyuk VA, De Luca C, Pastore S, et al. Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFkB and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 de septiembre de 2011;255(2):138-49.

108. Potapovich AI, Kostyuk VA, Kostyuk TV, de Luca C, Korkina LG. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* agosto de 2013;62(8):773-80.
109. Cui B, Wang Y, Jin J, Yang Z, Guo R, Li X, et al. Resveratrol Treats UVB-Induced Photoaging by Anti-MMP Expression, through Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiapoptotic Properties, and Treats Photoaging by Upregulating VEGF-B Expression. *Oxid Med Cell Longev.* 4 de enero de 2022;2022:6037303.
110. Zhou F, Huang X, Pan Y, Cao D, Liu C, Liu Y, et al. Resveratrol protects HaCaT cells from ultraviolet B-induced photoaging via upregulation of HSP27 and modulation of mitochondrial caspase-dependent apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 de mayo de 2018;499(3):662-8.
111. 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.
112. Davies S, Contri RV, Guterres SS, Pohlmann AR, Guerreiro ICK. Simultaneous nanoencapsulation of lipoic acid and resveratrol with improved antioxidant properties for the skin. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de agosto de 2020;192:111023.
113. Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 de enero de 2003;186(1):28-37.
114. Aziz MH, Afaq F, Ahmad N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. *Photochem Photobiol.* febrero de 2005;81(1):25-31.
115. Sirerol JA, Feddi F, Mena S, Rodriguez ML, Sirera P, Aupí M, et al. Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1 de agosto de 2015;85:1-11.
116. Szulc-Musioł B, Sarecka-Hujar B. The Use of Micro- and Nanocarriers for Resveratrol Delivery into and across the Skin in Different Skin Diseases-A Literature Review. *Pharmaceutics.* 26 de marzo de 2021;13(4).
117. Oak ASW, Shafi R, Elsayed M, Bae S, Saag L, Wang CL, et al. Dietary table grape protects against ultraviolet photodamage in humans: 1. clinical evaluation. *J Am Acad Dermatol.* octubre de 2021;85(4):1030-2.
118. Oak ASW, Shafi R, Elsayed M, Mishra B, Bae S, Barnes S, et al. Dietary table grape protects against ultraviolet photodamage in humans: 2. molecular biomarker studies. *J Am Acad Dermatol.* octubre de 2021;85(4):1032-4.
119. Wu Y, Jia LL, Zheng YN, Xu XG, Luo YJ, Wang B, et al. Resveratrate protects human skin from damage due to repetitive ultraviolet irradiation. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* marzo de 2013;27(3):345-50.

120. Yi Y, Xie H, Xiao X, Wang B, Du R, Liu Y, et al. Ultraviolet A irradiation induces senescence in human dermal fibroblasts by down-regulating DNMT1 via ZEB1. *Aging*. 16 de febrero de 2018;10(2):212-28.
121. Carbone ML, Lulli D, Passarelli F, Pastore S. Topical Plant Polyphenols Prevent Type I Interferon Signaling in the Skin and Suppress Contact Hypersensitivity. *Int J Mol Sci*. 6 de septiembre de 2018;19(9):E2652.
122. Kang MC, Cho K, Lee JH, Subedi L, Yumnam S, Kim SY. Effect of Resveratrol-Enriched Rice on Skin Inflammation and Pruritus in the NC/Nga Mouse Model of Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci [Internet]*. 21 de marzo de 2019 [citado 21 de abril de 2021];20(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471349/>
123. Ravagnan G, De Filippis A, Cartenì M, De Maria S, Cozza V, Petrazzuolo M, et al. Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces β -defensin production and reduces inflammatory response. *Inflammation*. febrero de 2013;36(1):26-34.
124. Han SY, Choi YJ, Kang MK, Park JHY, Kang YH. Resveratrol Suppresses Cytokine Production Linked to Fc ϵ RI-MAPK Activation in IgE-Antigen Complex-Exposed Basophilic Mast Cells and Mice. *Am J Chin Med*. 2015;43(8):1605-23.
125. Caglayan Sozmen S, Karaman M, Cilaker Micili S, Isik S, Arikan Ayyildiz Z, Bagriyanik A, et al. Resveratrol ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesions through effects on the epithelium. *PeerJ*. 2016;4:e1889.
126. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R, et al. Resveratrol attenuates HMGB1 signaling and inflammation in house dust mite-induced atopic dermatitis in mice. *Int Immunopharmacol*. diciembre de 2014;23(2):617-23.
127. Kjær TN, Thorsen K, Jessen N, Stenderup K, Pedersen SB. Resveratrol ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126599.
128. Fabbrocini G, Staibano S, De Rosa G, Battimiello V, Fardella N, Iardi G, et al. Resveratrol-containing gel for the treatment of acne vulgaris: a single-blind, vehicle-controlled, pilot study. *Am J Clin Dermatol*. 1 de abril de 2011;12(2):133-41.
129. Bavetta M, Silvaggio D, Campione E, Sollena P, Formica V, Coletta D, et al. The Effects of Association of Topical Polydatin Improves the Preemptive Systemic Treatment on EGFR Inhibitors Cutaneous Adverse Reactions. *J Clin Med*. 26 de enero de 2021;10(3):466.
130. Abedini E, Khodadadi E, Zeinalzadeh E, Moaddab SR, Asgharzadeh M, Mehramouz B, et al. A Comprehensive Study on the Antimicrobial Properties of Resveratrol as an Alternative Therapy. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2021;2021:8866311.
131. Docherty JJ, Fu MM, Stiffler BS, Limperos RJ, Pokabla CM, DeLucia AL. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res*. octubre de 1999;43(3):145-55.
132. Docherty JJ, Smith JS, Fu MM, Stoner T, Booth T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. *Antiviral Res*. enero de 2004;61(1):19-26.

133. Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, et al. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res.* octubre de 2008;80(1):62-70.
134. Ramdani LH, Bachari K. Potential therapeutic effects of Resveratrol against SARS-CoV-2. *Acta Virol.* 2020;64(3):276-80.
135. Lin SC, Ho CT, Chuo WH, Li S, Wang TT, Lin CC. Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. *BMC Infect Dis.* 13 de febrero de 2017;17(1):144.
136. Wang XC, Huang HB, Gong W, He WY, Li X, Xu Y, et al. Resveratrol Triggered the Quick Self-Assembly of Gallic Acid into Therapeutic Hydrogels for Healing of Bacterially Infected Wounds. *Biomacromolecules.* 8 de marzo de 2022;
137. Mousavi P, Rahimi Esboei B, Pourhajibagher M, Fakhari M, Shahmoradi Z, Hejazi SH, et al. Anti-leishmanial effects of resveratrol and resveratrol nanoemulsion on *Leishmania major*. *BMC Microbiol.* 15 de febrero de 2022;22(1):56.
138. Ferreira C, Soares DC, Nascimento MTC do, Pinto-da-Silva LH, Sarzedas CG, Tinoco LW, et al. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: in vitro effect of its association with Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* octubre de 2014;58(10):6197-208.
139. Pang K, Li B, Tang Z, Yang W, Hao L, Shi Z, et al. Resveratrol inhibits hypertrophic scars formation by activating autophagy via the miR-4654/Rheb axis. *Mol Med Rep.* octubre de 2020;22(4):3440-52.
140. Kaleci B, Koyuturk M. Efficacy of resveratrol in the wound healing process by reducing oxidative stress and promoting fibroblast cell proliferation and migration. *Dermatol Ther.* noviembre de 2020;33(6):e14357.
141. Yaman I, Derici H, Kara C, Kamer E, Diniz G, Ortac R, et al. Effects of resveratrol on incisional wound healing in rats. *Surg Today.* diciembre de 2013;43(12):1433-8.
142. Zhao P, Sui BD, Liu N, Lv YJ, Zheng CX, Lu YB, et al. Anti-aging pharmacology in cutaneous wound healing: effects of metformin, resveratrol, and rapamycin by local application. *Aging Cell.* 2017;16(5):1083-93.
143. Berce C, Muresan MS, Soritau O, Petrushev B, Tefas L, Rigo I, et al. Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de marzo de 2018;163:155-66.
144. Lakshmanan R, Campbell J, Ukani G, O'Reilly Beringhs A, Selvaraju V, Thirunavukkarasu M, et al. Evaluation of dermal tissue regeneration using resveratrol loaded fibrous matrix in a preclinical mouse model of full-thickness ischemic wound. *Int J Pharm.* 10 de marzo de 2019;558:177-86.
145. Alasmari W, Elsayy NA, Abourehab M, Faruk E, Alasmari AA, Alasmari A. Effect of Topical Resveratrol Formulation on Healing of Experimental Full Thickness Wound in Diabetic Male Albino Rats: (Histological and Immunohistochemical study) [Internet]. 2018 [citado 4 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Effect-of->

146. Zhang D, Lin J, Wang Y, Xu S, Luo C, Cai J, et al. [Effects of resveratrol on aging of mesenchymal stem cells and its mechanism]. *Zhejiang Xue Xue Bao Yi Xue Ban J Zhejiang Univ Med Sci*. 25 de diciembre de 2019;48(6):617-24.
147. Gokce EH, Tuncay Tanriverdi S, Eroglu I, Tsapis N, Gokce G, Tekmen I, et al. Wound healing effects of collagen-laminin dermal matrix impregnated with resveratrol loaded hyaluronic acid-DPPC microparticles in diabetic rats. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. octubre de 2017;119:17-27.
148. Meng E, Chen CL, Liu CC, Liu CC, Chang SJ, Cherng JH, et al. Bioapplications of Bacterial Cellulose Polymers Conjugated with Resveratrol for Epithelial Defect Regeneration. *Polymers*. 15 de junio de 2019;11(6):E1048.
149. Holian O, Walter RJ. Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. *J Cell Biochem Suppl*. 2001;Suppl 36:55-62.
150. Wu Z, Uchi H, Morino-Koga S, Shi W, Furue M. Resveratrol inhibition of human keratinocyte proliferation via SIRT1/ARNT/ERK dependent downregulation of aquaporin 3. *J Dermatol Sci*. julio de 2014;75(1):16-23.
151. Pastore S, Lulli D, Maurelli R, Dellambra E, De Luca C, Korkina LG. Resveratrol induces long-lasting IL-8 expression and peculiar EGFR activation/distribution in human keratinocytes: mechanisms and implications for skin administration. *PloS One*. 2013;8(3):e59632.
152. Redondo P, Jimenez E, Perez A, García-Foncillas J. N-acetylcysteine downregulates vascular endothelial growth factor production by human keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol Res*. diciembre de 2000;292(12):621-8.
153. Elmore E, Siddiqui S, Navidi M, Steele VE, Redpath JL. Correlation of in vitro chemopreventive efficacy data from the human epidermal cell assay with animal efficacy data and clinical trial plasma levels. *J Cell Biochem*. 1 de junio de 2005;95(3):571-88.
154. Blander G, Bhimavarapu A, Mammone T, Maes D, Elliston K, Reich C, et al. SIRT1 promotes differentiation of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. enero de 2009;129(1):41-9.
155. Arun SN, Xie D, Dodd ME, Zhong X, Bollag WB. The potential use of protein kinase D inhibitors for prevention/treatment of epidermal tumors. *J Dermatol Sci*. octubre de 2010;60(1):29-39.
156. Birar VC, Sheerin AN, Ostler EL, Faragher RGA. Novel resveratrol derivatives have diverse effects on the survival, proliferation and senescence of primary human fibroblasts. *Biogerontology*. 1 de diciembre de 2020;21(6):817-26.
157. Cui X, Jin Y, Hofseth AB, Pena E, Habiger J, Chumanevich A, et al. Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prev Res Phila Pa*. abril de 2010;3(4):549-59.

158. Mukherjee S, Dudley JI, Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc.* 18 de marzo de 2010;8(4):478-500.
159. Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, Vercauteren J, Belloc F, Billiard C, et al. Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. *Carcinogenesis.* agosto de 2002;23(8):1327-33.
160. Shin JW, Lee HS, Na JI, Huh CH, Park KC, Choi HR. Resveratrol Inhibits Particulate Matter-Induced Inflammatory Responses in Human Keratinocytes. *Int J Mol Sci.* 13 de mayo de 2020;21(10):3446.
161. Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, Senzaki H, Shikata N, Hioki K, et al. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol.* abril de 2001;127(4):258-64.
162. Moreira-Pinto B, Costa L, Felgueira E, Fonseca BM, Rebelo I. Low Doses of Resveratrol Protect Human Granulosa Cells from Induced-Oxidative Stress. *Antioxid Basel Switz.* 4 de abril de 2021;10(4):561.
163. Arora D, Khurana B, Nanda S. Statistical development and in vivo evaluation of resveratrol-loaded topical gel containing deformable vesicles for a significant reduction in photo-induced skin aging and oxidative stress. *Drug Dev Ind Pharm.* noviembre de 2020;46(11):1898-910.
164. Tsai HY, Ho CT, Chen YK. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *J Food Drug Anal.* 1 de enero de 2017;25(1):134-47.
165. Antiaging potential of resveratrol upon clinical and biomechanical properties of the skin - *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. [citado 5 de abril de 2022]. Disponible en: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(14\)00155-8/fulltext](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(14)00155-8/fulltext)
166. Moyano-Mendez JR, Fabbrocini G, De Stefano D, Mazzella C, Mayol L, Scognamiglio I, et al. Enhanced antioxidant effect of trans-resveratrol: potential of binary systems with polyethylene glycol and cyclodextrin. *Drug Dev Ind Pharm.* octubre de 2014;40(10):1300-7.
167. Ido Y, Duranton A, Lan F, Cacicedo JM, Chen TC, Breton L, et al. Acute activation of AMP-activated protein kinase prevents H2O2-induced premature senescence in primary human keratinocytes. *PLoS One.* 2012;7(4):e35092.
168. Ido Y, Duranton A, Lan F, Weikel KA, Breton L, Ruderman NB. Resveratrol prevents oxidative stress-induced senescence and proliferative dysfunction by activating the AMPK-FOXO3 cascade in cultured primary human keratinocytes. *PLoS One.* 2015;10(2):e0115341.
169. Buonocore D, Lazeretti A, Tocabens P, Nobile V, Cestone E, Santin G, et al. Resveratrol-procyanidin blend: nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebocontrolled, double-blind study. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2012;5:159-65.

170. Farris P, Zeichner J, Berson D. Efficacy and Tolerability of a Skin Brightening/Anti-Aging Cosmeceutical Containing Retinol 0.5%, Niacinamide, Hexylresorcinol, and Resveratrol. *J Drugs Dermatol JDD*. 1 de julio de 2016;15(7):863-8.
171. Bertuccelli G, Zerbinati N, Marcellino M, Nanda Kumar NS, He F, Tsepakolenko V, et al. Effect of a quality-controlled fermented nutraceutical on skin aging markers: An antioxidant-control, double-blind study. *Exp Ther Med*. marzo de 2016;11(3):909-16.
172. Satooka H, Kubo I. Resveratrol as a kcat type inhibitor for tyrosinase: potentiated melanogenesis inhibitor. *Bioorg Med Chem*. 15 de enero de 2012;20(2):1090-9.
173. Park J, Park JH, Suh HJ, Lee IC, Koh J, Boo YC. Effects of resveratrol, oxyresveratrol, and their acetylated derivatives on cellular melanogenesis. *Arch Dermatol Res*. julio de 2014;306(5):475-87.
174. Chen YJ, Chen YY, Lin YF, Hu HY, Liao HF. Resveratrol inhibits alpha-melanocyte-stimulating hormone signaling, viability, and invasiveness in melanoma cells. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2013;2013:632121.
175. Lee TH, Seo JO, Baek SH, Kim SY. Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in Guinea pig skin. *Biomol Ther*. enero de 2014;22(1):35-40.
176. Lin CB, Babiarz L, Liebel F, Roydon Price E, Kizoulis M, Gendimenico GJ, et al. Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J Invest Dermatol*. diciembre de 2002;119(6):1330-40.
177. Kwon SH, Choi HR, Kang YA, Park KC. Depigmenting Effect of Resveratrol Is Dependent on FOXO3a Activation without SIRT1 Activation. *Int J Mol Sci*. 7 de junio de 2017;18(6):E1213.
178. Kolbe L, Mann T, Gerwat W, Batzer J, Ahlheit S, Scherner C, et al. 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. enero de 2013;27 Suppl 1:19-23.
179. Newton RA, Cook AL, Roberts DW, Leonard JH, Sturm RA. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes. *J Invest Dermatol*. septiembre de 2007;127(9):2216-27.
180. Lee TH, Kang JH, Seo JO, Baek SH, Moh SH, Chae JK, et al. Anti-Melanogenic Potentials of Nanoparticles from Calli of Resveratrol-Enriched Rice against UVB-Induced Hyperpigmentation in Guinea Pig Skin. *Biomol Ther*. enero de 2016;24(1):85-93.
181. Jo DJ, Seok JK, Kim SY, Park W, Baek JH, Kim YM, et al. Human skin-depigmenting effects of resveratryl triglycolate, a hybrid compound of resveratrol and glycolic acid. *Int J Cosmet Sci*. 16 de abril de 2018;
182. Ryu JH, Seok JK, An SM, Baek JH, Koh JS, Boo YC. A study of the human skin-whitening effects of resveratryl triacetate. *Arch Dermatol Res*. abril de 2015;307(3):239-47.
183. Liyanage A, Liyanage G, Sirimanna G, Schürer N. Comparative Study on Depigmenting Agents in Skin of Color. *J Clin Aesthetic Dermatol*. febrero de 2022;15(2):12-7.

184. Zhang Y, Ni C, Huang Y, Tang Y, Yang K, Shi X, et al. Hair Growth-Promoting Effect of Resveratrol in Mice, Human Hair Follicles and Dermal Papilla Cells. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021;14:1805-14.
185. Shapiro SL, Parrino VA, Freedman L. Hypoglycemic Agents. I.1 Chemical Properties of β -Phenethylbiguanide.2 A New Hypoglycemic Agent3. *J Am Chem Soc*. 1 de mayo de 1959;81(9):2220-5.
186. Pubchem. Metformin [Internet]. [citado 27 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091>
187. Bubna AK. Metformin - For the dermatologist. *Indian J Pharmacol*. 2016;48(1):4-10.
188. Universidad Nacional de Colombia, Morantes-Caballero JA, Londoño-Zapata GA, Universidad Nacional de Colombia, Rubio-Rivera M, Universidad Nacional de Colombia, et al. Metformina: más allá del control glucémico. *Rev Médicas UIS*. 1 de julio de 2017;30(1):57-71.
189. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-85.
190. Hu D, Xie F, Xiao Y, Lu C, Zhong J, Huang D, et al. Metformin: A Potential Candidate for Targeting Aging Mechanisms. *Aging Dis*. abril de 2021;12(2):480-93.
191. Soydas T, Yaprak Sarac E, Cinar S, Dogan S, Solakoglu S, Tuncdemir M, et al. The protective effects of metformin in an in vitro model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions. *J Physiol Biochem*. mayo de 2018;74(2):273-81.
192. Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardès-Albert M, Jore D, Legrand A, et al. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*. mayo de 2003;52(5):586-9.
193. Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, Sasaki S, Inoue T, Fujimura Y, et al. Metformin and liraglutide ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKC-NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. enero de 2014;232(1):156-64.
194. Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, et al. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*. julio de 2005;54(7):2179-87.
195. Kraemer de Aguiar LG, Laflor CM, Bahia L, Villela NR, Wiernsperger N, Bottino DA, et al. Metformin improves skin capillary reactivity in normoglycaemic subjects with the metabolic syndrome. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. marzo de 2007;24(3):272-9.
196. Skrha J, Prázný M, Hilgertová J, Kvasnicka J, Kalousová M, Zima T. Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol*. diciembre de 2007;63(12):1107-14.
197. Ribeiro FM, Ratti BA, Dos Santos Rando F, Fernandez MA, Ueda-Nakamura T, de Oliveira Silva Lautenschlager S, et al. Metformin effect on driving cell survival pathway through inhibition of UVB-induced ROS formation in human keratinocytes. *Mech Ageing Dev*. diciembre de 2020;192:111387.

198. Sung CT, Chao T, Lee A, Foulad DP, Choi F, Juhasz M, et al. Oral Metformin for Treating Dermatological Diseases: A Systematic Review. *J Drugs Dermatol JDD*. 1 de agosto de 2020;19(8):713-20.
199. Badr D, Kurban M, Abbas O. Metformin in dermatology: an overview. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. noviembre de 2013;27(11):1329-35.
200. Kremslehner C, Miller A, Nica R, Nagelreiter IM, Narzt MS, Golabi B, et al. Imaging of metabolic activity adaptations to UV stress, drugs and differentiation at cellular resolution in skin and skin equivalents - Implications for oxidative UV damage. *Redox Biol*. octubre de 2020;37:101583.
201. Souza-Neto FP, Marinello PC, Melo GP, Ramalho LZN, Cela EM, Campo VE, et al. Metformin inhibits the inflammatory and oxidative stress response induced by skin UVB-irradiation and provides 4-hydroxy-2-nonenal and nitrotyrosine formation and p53 protein activation. *J Dermatol Sci*. noviembre de 2020;100(2):152-5.
202. Park SK, Shin OS. Metformin alleviates ageing cellular phenotypes in Hutchinson-Gilford progeria syndrome dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2017;26(10):889-95.
203. Vitale-Cross L, Molinolo AA, Martin D, Younis RH, Maruyama T, Patel V, et al. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res Phila Pa*. abril de 2012;5(4):562-73.
204. Sikka A, Kaur M, Agarwal C, Deep G, Agarwal R. Metformin suppresses growth of human head and neck squamous cell carcinoma via global inhibition of protein translation. *Cell Cycle*. 1 de abril de 2012;11(7):1374-82.
205. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis*. 1 de septiembre de 2011;2:e199.
206. Cerezo M, Tichet M, Abbe P, Ohanna M, Lehraiki A, Rouaud F, et al. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. *Mol Cancer Ther*. agosto de 2013;12(8):1605-15.
207. Martin MJ, Hayward R, Viros A, Marais R. Metformin accelerates the growth of BRAF V600E-driven melanoma by upregulating VEGF-A. *Cancer Discov*. abril de 2012;2(4):344-55.
208. Byekova YA, Herrmann JL, Xu J, Elmets CA, Athar M. Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of UVB-induced murine basal cell carcinoma. *Arch Biochem Biophys*. 15 de abril de 2011;508(2):204-11.
209. Chaudhary SC, Kurundkar D, Elmets CA, Kopelovich L, Athar M. Metformin, an antidiabetic agent reduces growth of cutaneous squamous cell carcinoma by targeting mTOR signaling pathway. *Photochem Photobiol*. octubre de 2012;88(5):1149-56.
210. Man'cheva TA, Demidov DV, Plotnikova NA, Kharitonova TV, Pashkevich IV, Anisimov VN. Melatonin and metformin inhibit skin carcinogenesis and lipid peroxidation induced by benz(a)pyrene in female mice. *Bull Exp Biol Med*. julio de 2011;151(3):363-5.

211. Checkley LA, Rho O, Angel JM, Cho J, Blando J, Beltran L, et al. Metformin inhibits skin tumor promotion in overweight and obese mice. *Cancer Prev Res Phila Pa.* enero de 2014;7(1):54-64.
212. Ravishankar A, Zhang T, Lindgren BR, Farah RS, Dong Z, Goldfarb NI. The effect of metformin on the risk of recurrent nonmelanoma skin cancers. *Int J Dermatol.* agosto de 2020;59(8):e303-5.
213. Adalsteinsson JA, Muzumdar S, Waldman R, Wu R, Ratner D, Feng H, et al. Metformin is associated with decreased risk of basal cell carcinoma: A whole-population case-control study from Iceland. *J Am Acad Dermatol.* julio de 2021;85(1):56-61.
214. Mitsizis A, Weinstock MA. Metformin use and keratinocyte carcinoma risk. *J Am Acad Dermatol.* octubre de 2021;85(4):e263.
215. Mascaraque M, Delgado-Wicke P, Nuevo-Tapióles C, Gracia-Cazaña T, Abarca-Lachen E, González S, et al. Metformin as an Adjuvant to Photodynamic Therapy in Resistant Basal Cell Carcinoma Cells. *Cancers.* 13 de marzo de 2020;12(3):E668.
216. Wu CL, Qiang L, Han W, Ming M, Viollet B, He YY. Role of AMPK in UVB-induced DNA damage repair and growth control. *Oncogene.* 23 de mayo de 2013;32(21):2682-9.
217. Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auburger P, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.* 1 de julio de 2011;71(13):4366-72.
218. Crane ED, Wong W, Zhang H, O'Neil G, Crane JD. AMPK Inhibits mTOR-Driven Keratinocyte Proliferation after Skin Damage and Stress. *J Invest Dermatol.* septiembre de 2021;141(9):2170-2177.e3.
219. Wang M, Lin Y, Shi W, Chen X, Mi Z, Jia Z, et al. Topical metformin suppresses angiogenesis pathways induced by pulsed dye laser irradiation in animal models. *Exp Dermatol.* marzo de 2022;31(3):393-7.
220. Kim JM, Yoo H, Kim JY, Oh SH, Kang JW, Yoo BR, et al. Metformin Alleviates Radiation-Induced Skin Fibrosis via the Downregulation of FOXO3. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;48(3):959-70.
221. Kaur R, Lang DK, Singh H, Arora A, Garg N, Saini B. Repurposing of Various Current Medicines as Radioprotective Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 4 de abril de 2022;
222. Theut Riis P, Thorlacius LR, Jemec GB. Investigational drugs in clinical trials for Hidradenitis Suppurativa. *Expert Opin Investig Drugs.* enero de 2018;27(1):43-53.
223. Chang JE, Choi MS. A Molecular Perspective on the Potential Benefits of Metformin for the Treatment of Inflammatory Skin Disorders. *Int J Mol Sci.* 25 de noviembre de 2020;21(23):E8960.
224. Robinson S, Kwan Z, Tang MM. Metformin as an adjunct therapy for the treatment of moderate to severe acne vulgaris: A randomized open-labeled study. *Dermatol Ther.* julio de 2019;32(4):e12953.

225. Li Y, Yang L, Wang Y, Deng Z, Xu S, Xie H, et al. Exploring metformin as a candidate drug for rosacea through network pharmacology and experimental validation. *Pharmacol Res.* diciembre de 2021;174:105971.
226. Masadeh MM, Alzoubi KH, Masadeh MM, Aburashed ZO. Metformin as a Potential Adjuvant Antimicrobial Agent Against Multidrug Resistant Bacteria. *Clin Pharmacol Adv Appl.* 2021;13:83-90.
227. Mor A, Petersen I, Sørensen HT, Thomsen RW. Metformin and other glucose-lowering drug initiation and rates of community-based antibiotic use and hospital-treated infections in patients with type 2 diabetes: a Danish nationwide population-based cohort study. *BMJ Open.* 19 de agosto de 2016;6(8):e011523.
228. Lei R, Shen J, Zhang S, Liu A, Chen X, Wang Y, et al. Inactivating the ubiquitin ligase Parkin suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human keloids. *J Cell Physiol.* 19 de febrero de 2019;
229. Qing L, Fu J, Wu P, Zhou Z, Yu F, Tang J. Metformin induces the M2 macrophage polarization to accelerate the wound healing via regulating AMPK/mTOR/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2019;11(2):655-68.
230. Cavalcante-Silva J, Koh TJ. Targeting the NOD-Like Receptor Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome to Improve Healing of Diabetic Wounds. *Adv Wound Care.* 13 de enero de 2022;
231. Chogan F, Mirmajidi T, Rezayan AH, Sharifi AM, Ghahary A, Nourmohammadi J, et al. Design, fabrication, and optimization of a dual function three-layer scaffold for controlled release of metformin hydrochloride to alleviate fibrosis and accelerate wound healing. *Acta Biomater.* 1 de septiembre de 2020;113:144-63.
232. Asghari M, Kanonisabet A, Safakhah M, Azimzadeh Z, Mostafavinia A, Taheri S, et al. The effect of combined photobiomodulation and metformin on open skin wound healing in a non-genetic model of type II diabetes. *J Photochem Photobiol B.* abril de 2017;169:63-9.
233. Bagheri M, Mostafavinia A, Abdollahifar MA, Amini A, Ghoreishi SK, Chien S, et al. Combined effects of metformin and photobiomodulation improve the proliferation phase of wound healing in type 2 diabetic rats. *Biomed Pharmacother Biomedicine Pharmacother.* marzo de 2020;123:109776.
234. Shawky LM, El Bana EA, Morsi AA. Stem cells and metformin synergistically promote healing in experimentally induced cutaneous wound injury in diabetic rats. *Folia Histochem Cytobiol.* 2019;57(3):127-38.
235. Tawfeek HM, Abou-Taleb DAE, Badary DM, Ibrahim M, Abdellatif AAH. Pharmaceutical, clinical, and immunohistochemical studies of metformin hydrochloride topical hydrogel for wound healing application. *Arch Dermatol Res.* marzo de 2020;312(2):113-21.
236. El-Ridy MS, Yehia SA, Elsayed I, Younis MM, Abdel-Rahman RF, El-Gamil MA. Metformin hydrochloride and wound healing: from nanoformulation to pharmacological evaluation. *J Liposome Res.* diciembre de 2019;29(4):343-56.

237. Cabreiro F, Au C, Leung KY, Vergara-Irigaray N, Cochemé HM, Noori T, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell*. 28 de marzo de 2013;153(1):228-39.
238. Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One*. 18 de enero de 2010;5(1):e8758.
239. Anisimov VN, Berstein LM, Popovich IG, Zabezhinski MA, Egormin PA, Piskunova TS, et al. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging*. febrero de 2011;3(2):148-57.
240. Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, et al. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle Georget Tex*. 1 de septiembre de 2008;7(17):2769-73.
241. Anisimov VN, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Tyndyk ML, Yurova MN, et al. Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo. *Cell Cycle Georget Tex*. 1 de enero de 2010;9(1):188-97.
242. Anisimov VN, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, Tyndyk ML, Egormin PA, et al. Gender differences in metformin effect on aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/Sv mice. *Aging*. diciembre de 2010;2(12):945-58.
243. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2192.
244. Ma TC, Buescher JL, Oatis B, Funk JA, Nash AJ, Carrier RL, et al. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci Lett*. 10 de enero de 2007;411(2):98-103.
245. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet Lond Engl*. 12 de septiembre de 1998;352(9131):854-65.
246. Bannister CA, Holden SE, Jenkins-Jones S, Morgan CL, Halcox JP, Scherthaner G, et al. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes Obes Metab*. noviembre de 2014;16(11):1165-73.
247. Fitzgerald JC, Zimprich A, Carvajal Berrio DA, Schindler KM, Maurer B, Schulte C, et al. Metformin reverses TRAP1 mutation-associated alterations in mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain J Neurol*. 1 de septiembre de 2017;140(9):2444-59.
248. Fang J, Yang J, Wu X, Zhang G, Li T, Wang X, et al. Metformin alleviates human cellular aging by upregulating the endoplasmic reticulum glutathione peroxidase 7. *Aging Cell*. agosto de 2018;17(4):e12765.

249. Gillespie ZE, Wang C, Vadan F, Yu TY, Ausió J, Kusalik A, et al. Metformin induces the AP-1 transcription factor network in normal dermal fibroblasts. *Sci Rep.* 29 de marzo de 2019;9(1):5369.
250. Soydas T, Sayitoglu M, Sarac EY, Cinar S, Solakoglu S, Tiryaki T, et al. Metformin reverses the effects of high glucose on human dermal fibroblasts of aged skin via downregulating RELA/p65 expression. *J Physiol Biochem.* agosto de 2021;77(3):443-50.
251. Lee YS, Doonan BB, Wu JM, Hsieh TC. Combined metformin and resveratrol confers protection against UVC-induced DNA damage in A549 lung cancer cells via modulation of cell cycle checkpoints and DNA repair. *Oncol Rep.* junio de 2016;35(6):3735-41.
252. Arkad'eva AV, Mamonov AA, Popovich IG, Anisimov VN, Mikhel'son VM, Spivak IM. [Metformin slows down ageing processes at the cellular level in SHR mice]. *Tsitologiya.* 2011;53(2):166-74.
253. Gunin AG, Golubtsova NN, Subbotkina NO, Subbotkin AS. [The influence of metformin on age-related changes in the number and proliferation of dermal fibroblasts in mice.]. *Adv Gerontol Uspekhi Gerontol.* 2018;31(4):505-9.
254. Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Menendez JA. Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 de marzo de 2010;9(6):1057-64.
255. Menendez JA, Cufí S, Oliveras-Ferraro C, Martin-Castillo B, Joven J, Vellon L, et al. Metformin and the ATM DNA damage response (DDR): accelerating the onset of stress-induced senescence to boost protection against cancer. *Aging.* noviembre de 2011;3(11):1063-77.
256. Lehraiki A, Abbe P, Cerezo M, Rouaud F, Regazzetti C, Chignon-Sicard B, et al. Inhibition of melanogenesis by the antidiabetic metformin. *J Invest Dermatol.* octubre de 2014;134(10):2589-97.
257. Banavase Channakeshavaiah R, Andanooru Chandrappa NK. Topical metformin in the treatment of melasma: A preliminary clinical trial. *J Cosmet Dermatol.* mayo de 2020;19(5):1161-4.
258. Sun C, Hu SH, Dong BQ, Jiang S, Miao F, Lei TC. Metformin Promotes the Hair-Inductive Activity of Three-Dimensional Aggregates of Epidermal and Dermal Cells Self-Assembled In Vitro. *Skin Pharmacol Physiol.* 9 de diciembre de 2021;
259. Patel NU, Roach C, Alinia H, Huang WW, Feldman SR. Current treatment options for acanthosis nigricans. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2018;11:407-13.
260. Streit E, Helmbold P. [65-year-old man with yellow-orange papules on both forearms. Eruptive xanthomas]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb.* octubre de 2009;60(10):834-7.
261. Lee JS, Park KY, Min HG, Lee SJ, Kim JJ, Choi JS, et al. Negative regulation of stress-induced matrix metalloproteinase-9 by Sirt1 in skin tissue. *Exp Dermatol.* diciembre de 2010;19(12):1060-6.

262. Lin C, Li H, Liu J, Hu Q, Zhang S, Zhang N, et al. Arginine hypomethylation-mediated proteasomal degradation of histone H4-an early biomarker of cellular senescence. *Cell Death Differ.* septiembre de 2020;27(9):2697-709.
263. O'Connor JE, Callaghan RC, Escudero M, Herrera G, Martínez A, Monteiro MD, et al. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life.* abril de 2001;51(4):231-9.
264. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 21 de febrero de 2018;120:5.1.1-5.1.11.
265. Janossy G. Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A.* 2004;58A(1):87-97.
266. Valet G, Leary JF, Tárnok A. Cytomics--new technologies: towards a human cytome project. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* junio de 2004;59(2):167-71.
267. Barteneva NS, Fasler-Kan E, Vorobjev IA. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* octubre de 2012;60(10):723-33.
268. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods.* agosto de 2015;423:99-103.
269. Noppe G, Dekker P, Koning-treurniet C De, Blom J, Heemst D Van, Dirks RW, et al. Rapid Flow Cytometric Method for Measuring Senescence Associated β -Galactosidase Activity in Human Fibroblasts. 2009;(10).
270. Ballester-Espigares IM. Relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios intestinales [Tesis Doctoral]. [Granada]: Universidad de Granada; 2006.
271. Annexin V Staining - ES [Internet]. [citado 12 de agosto de 2021]. Disponible en: [//www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/apoptosis/annexin-v-staining.html](http://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/apoptosis/annexin-v-staining.html)
272. Wallberg F, Tenev T, Meier P. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harb Protoc.* 1 de abril de 2016;2016(4):pdb.prot087387.
273. Wang YN, Wu W, Chen HC, Fang H. Genistein protects against UVB-induced senescence-like characteristics in human dermal fibroblast by p66Shc down-regulation. *J Dermatol Sci.* 2010;58(1):19-27.
274. Lucien F, Harper K, Pelletier PP, Volkov L, Dubois CM. Simultaneous pH measurement in endocytic and cytosolic compartments in living cells using confocal microscopy. *J Vis Exp JoVE.* 28 de abril de 2014;(86).
275. Gilaberte Y, Pereboom D, Carapeto FJ, Alda JO. Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* abril de 1997;13(1-2):43-9.

276. Naya MJ, Pereboom D, Ortego J, Alda JO, Lanas A. Superoxide anions produced by inflammatory cells play an important part in the pathogenesis of acid and pepsin induced oesophagitis in rabbits. *Gut*. febrero de 1997;40(2):175-81.
277. Carrascosa JM, Gardeazábal J, Pérez-Ferriols A, Alomar A, Manrique P, Jones-Caballero M, et al. [Consensus document on phototherapy: PUVA therapy and narrow-band UVB therapy]. *Actas Dermosifiliogr*. diciembre de 2005;96(10):635-58.
278. Keynote Speakers | EADV Congress 2021 [Internet]. [citado 16 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.eadvcongress2021.org/index.php/home/scientific/keynote-speakers/>
279. Latorre E, Birar VC, Sheerin AN, Jeynes JCC, Hooper A, Dawe HR, et al. Small molecule modulation of splicing factor expression is associated with rescue from cellular senescence. *BMC Cell Biol*. 17 de octubre de 2017;18:31.

K. Anexo

K.1. Aspectos Éticos



Informe Dictamen Favorable
Trabajos académicos

C.P. - C.I. P121/273

2 de junio de 2021

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 02/06/2021, Acta Nº 11/2021 ha evaluado la propuesta del Trabajo:

Título: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA METFORMINA Y EL RESVERATROL FRENTE A LA SENESCENCIA INDUCIDA POR RADIACIÓN UVB EN QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS HUMANOS.

Alumno: Juan Monte Serrano

Tutores: Desirée Pereboom Maicas y Octavio Alda Torrubia

Versión protocolo: V 2.0 de 22/05/2021

Versión documento de información y consentimiento: V 2.0 de 22/05/2021

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, la obtención de los consentimientos informados, el adecuado tratamiento de los datos en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización del proyecto.

Lo que firmo en Zaragoza

María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

K.2. Publicación Artículo

Atención Primaria 54 (2022) 102354



Atención Primaria

www.elsevier.es/ap



ORIGINAL

Metformina en el tratamiento de enfermedades dermatológicas: una revisión narrativa



Juan Monte-Serrano^{a,b,*}, Pablo Villagrasa-Bolí^{a,b}, Joana Cruañes-Monferrer^c,
Patricia Arbués-Espinosa^d, Sara Martínez-Cisneros^{a,b} y Miguel Fernando García-Gil^{b,e}

^a Servicio de Dermatología y Venereología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

^b Health Research Group GIS100 of Health Research Institute IIS Aragón, Zaragoza, España

^c Servicio de Dermatología y Venereología, Hospital Universitario Reina Sofía, Murcia, España

^d Centro de Salud Delicias Norte, Sector Sanitario Zaragoza III, Zaragoza, España

^e Servicio de Dermatología y Venereología, Hospital Clínico Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

Recibido el 3 de febrero de 2022; aceptado el 15 de marzo de 2022
Disponible en Internet el 12 de mayo de 2022

PALABRAS CLAVE

Metformina;
Dermatología;
Piel;
Pleiotropismo
farmacológico

Resumen

Objetivo: Revisar y discutir la evidencia actual del uso de la metformina como herramienta terapéutica en enfermedades cutáneas.

Diseño: Artículo original. Investigación cualitativa. Revisión narrativa.

Emplazamiento: Aragón y Murcia, España.

Participantes: Médicos Internos Residentes de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología y de Atención Primaria y Comunitaria.

Métodos: Se ha realizado una revisión narrativa utilizando la base de datos bibliográfica PubMed con fecha de búsqueda el 27 de enero de 2022.

Resultados: La metformina ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de dermatosis inflamatorias tales como el acné, hidrosadenitis supurativa, psoriasis y dermatitis de contacto alérgica. También ha demostrado propiedades antitumorales frente al carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular y melanoma. De forma adicional, se ha descrito efectos beneficiosos del tratamiento adyuvante con metformina en pacientes con carcinoma basocelular que reciben terapia fotodinámica. En pacientes con dermatosis relacionadas con endocrinopatías tales como el hirsutismo, la acantosis nigricans y los xantomas eruptivos, el tratamiento con metformina ha demostrado efectividad terapéutica. El tratamiento tópico con metformina ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del melasma. Finalmente se ha propuesto como un fármaco con propiedades antienvejecimiento cutáneo y favorecedoras de la cicatrización. Para ninguna de las indicaciones previamente descritas se han objetivado efectos adversos graves.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: monte.serrano.juan@gmail.com (J. Monte-Serrano).

<https://doi.org/10.1016/j.aprim.2022.102354>

0212-6567/© 2022 El Autor(s). Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

K.3. Certificado Inglés B2

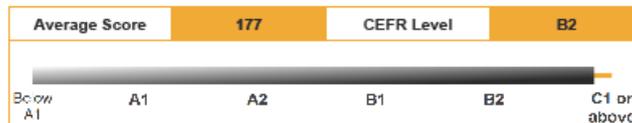


Institution	ES965
Username	JMonteSerrano
Ref. No.	ES965.JMonteSerrano

Test Report

Linguaskill General

Candidate name	Candidate number
Juan Monte Serrano	JMonteSerrano
Date of birth	Organisation
27 March 1993	Enseñalia



Skill	Test Date	Score	CEFR Level
Listening	15 February 2022	180+	C1 or above

Can follow complex spoken language related to daily life and work and unfamiliar topics. Can extract details and key information, and infer intentions that are not explicitly stated. Can follow the sense of spoken information even when it is not clearly structured.

Skill	Test Date	Score	CEFR Level
Reading	15 February 2022	180+	C1 or above

Can understand long and complex texts on a wide range of topics in daily life and work, including unfamiliar and abstract. Can extract key information and details, and comprehend information that is implied. Can detect the writer's tone and point of view.

Skill	Test Date	Score	CEFR Level
Speaking	15 February 2022	159	B1

Can answer questions about routine matters, connecting phrases simply to describe experiences and events and give brief reasons, explanations, reactions or opinions on familiar topics.

Skill	Test Date	Score	CEFR Level
Writing	15 February 2022	180+	C1 or above

Can write well-structured, detailed text on complex subjects. Can write in an engaging style appropriate to the reader, highlight significant points and expand on supporting points of view.

