

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE© 2025. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Evaluación del potencial de extractos herbales en la actividad
de células madre mesenquimales para revertir la senescencia
de fibroblastos dérmicos**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Claudia Martínez Suárez

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Claudia Martínez Suárez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia
Codirectora de tesis

Dr. Jahaziel Gasperin Bulbarela
Codirector de tesis

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Dr. Jacob Licea Rodríguez

Dra. María del Carmen Maya Sánchez



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Claudia Martínez Suárez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida

Evaluación del potencial de extractos herbales en la actividad de células madre mesenquimales para revertir la senescencia de fibroblastos dérmicos

Resumen aprobado por:

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia
Codirectora

Dr. Jahaziel Gasperin Bulbarela
Codirector

La senescencia celular es un proceso biológico caracterizado por la pérdida de la capacidad de las células para dividirse y funcionar adecuadamente. En particular, la senescencia de los fibroblastos juega un papel crucial en el envejecimiento de la piel, ya que está asociada con la pérdida de elasticidad, la formación de arrugas y la disminución de la regeneración cutánea. Dado este contexto, el estudio de estrategias terapéuticas que combatan estos signos de envejecimiento resulta fundamental. En este sentido, se propuso explorar el potencial de los extractos acuoso e hidroalcohólico de Triphala y Damiana, respectivamente, en la actividad de las células madre mesenquimales (MSC). Este estudio estableció un modelo inicial de senescencia celular, evaluado mediante dos metodologías fundamentales: la cuantificación de la actividad de SA- β -gal y la evaluación de la proliferación celular por citometría de flujo, tras la exposición de fibroblastos CCD-1112Sk a diferentes concentraciones de D-galactosa. La concentración de 150 mM fue la más eficaz para inducir el fenotipo senescente, lo cual fue respaldado también por la observación de cambios morfológicos y la sobreexpresión de genes como *MMP1*, *CCN2*, *IL6* y *CDKN1A* (a las 96 h), al igual que la represión de *COL1A1* y *TGFB1*, todos estos cambios característicos de la senescencia celular. La viabilidad celular no se vió afectada al evaluar ambos extractos en los dos tipos celulares empleados. El preconditionamiento de MSC con extractos de Triphala y Damiana no mostró potencial para modular la senescencia inducida por D-galactosa en los fibroblastos bajo las condiciones evaluadas. Estos hallazgos, constituyeron un acercamiento al establecimiento de un modelo *in vitro* de inducción de senescencia mediante D-galactosa, de utilidad para futuros estudios sobre modulación del envejecimiento celular.

Palabras clave: extractos herbales, células madre mesenquimales, senescencia celular, fibroblastos

Abstract of the thesis presented by **Claudia Martínez Suárez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science

Evaluation of the potential of herbal extracts on mesenchymal stem cell activity to reverse dermal fibroblast senescence

Abstract approved by:

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia
Thesis co-Director

Dr. Jahaziel Gasperin Bulbarela
Thesis co-Director

Cellular senescence is a biological process characterized by the inability of cells to divide and perform their functions effectively. In particular, fibroblast senescence plays a crucial role in skin aging, as it is associated with the loss of elasticity, wrinkle formation, and reduced skin regeneration. In this context, exploring therapeutic strategies to mitigate these signs of aging is of great importance. The potential of aqueous and hydroalcoholic extracts of Triphala and Damiana, respectively, was proposed for investigation in relation to mesenchymal stem cell (MSC) activity. This study established an initial model of cellular senescence, evaluated using two main methodologies: quantifying SA- β -gal activity and assessing cell proliferation by flow cytometry, after exposing CCD-112Sk fibroblasts to various concentrations of D-galactose. A concentration of 150 mM was the most effective in inducing the senescent phenotype, which was further supported by the observation of morphological changes and the overexpression of genes such as *MMP1*, *CCN2*, *IL6*, and *CDKN1A* (at 96 hours), as well as the repression of *COL1A1* and *TGF β 1*, both of which are characteristic changes of cellular senescence. Cell viability was not affected when both extracts were evaluated in the two cell types used. Preconditioning MSCs with Triphala and Damiana extracts did not show potential to modulate D-galactose-induced senescence in fibroblasts under the evaluated conditions. These results represented an approach to establishing an in vitro model for senescence induction using D-galactose, which could be valuable for future studies on the modulation of cellular aging.

Keywords: herbal extracts, mesenchymal stem cell, cellular senescence, fibroblast

Dedicatoria

A mis padres, por su amor incondicional y por enseñarme a perseguir mis sueños.

A mis seres queridos, por su apoyo constante y su confianza en mí.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti), por el apoyo económico brindado a través de su beca de manutención, que hizo posible la realización de mis estudios de posgrado y me permitió dedicarme por completo a este proyecto, sin la cual el camino habría sido considerablemente más difícil, CVU: 1247581.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Posgrado en Ciencias de la Vida, que me recibieron con los brazos abiertos y me brindaron la oportunidad de formarme académicamente en un ambiente de excelencia y aprendizaje constante. Gracias por las experiencias, los recursos, y por cada espacio de este instituto que se ha convertido en mi hogar académico y me ha inspirado a crecer profesional y personalmente.

A mis co-directores de tesis: Dra Johanna Bernáldez Sarabia y Dr. Jahaziel Gasperin Bulbarela por asumir el reto que suponía esta investigación, por ser magníficos como investigadores y como personas, por alentarme a seguir adelante y ayudarme siempre que lo necesité. Por haber confiado en mí y haberme llevado a cumplir los objetivos propuestos.

A la Dra. Johanna, cuya guía me ha impulsado a superar cada obstáculo de esta investigación. Su dedicación y sabiduría han sido pilares fundamentales en el desarrollo de este proyecto. Gracias por cada palabra de ánimo, por la claridad en sus enseñanzas y por inspirarme a creer en mis capacidades. Su presencia en esta etapa ha sido, sin duda, una fuente de inspiración y aprendizaje invaluable. Gracias por exigirme superación e impulsarme a hacerlo cada vez mejor. Nunca olvidaré el gran apoyo brindado en “el peor día de mi vida”.

Al Dr. Jahaziel, quien me brindó una guía constante y un apoyo en cada paso del proyecto. Agradezco su confianza en mi trabajo y su disposición para aconsejarme en cada desafío. Su paciencia y sabiduría han sido fundamentales en mi desarrollo profesional. Gracias por cada día de aprendizaje y por su valioso acompañamiento durante todo este proceso. Me satisface, al menos para mí, haber conocido su mejor versión.

A mi comité de tesis, Dra. María del Carmen Maya Sánchez, Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier y Dr. Jacob Licea Rodríguez, por su tiempo, orientación y compromiso. Su apoyo y observaciones fueron fundamentales para la conclusión de mis estudios de maestría.

Al Dr. Alexei, por aceptarme en su grupo de trabajo, cuya generosidad me hizo sentir en casa desde el primer día. Agradezco sinceramente su disposición para brindarme el equipo necesario para desarrollar esta tesis, lo cual me permitió avanzar sin restricciones.

A la Dra. Karla, por sus valiosas enseñanzas en los ensayos de qPCR y su apoyo constante en los ensayos de citometría de flujo. Agradezco profundamente su paciencia y generosidad para compartir su experiencia y conocimientos.

Al Dr. Ricardo, quien siempre estuvo presente en esos momentos cruciales cuando los problemas técnicos surgían. Su ayuda y conocimiento me fueron de gran auxilio en innumerables ocasiones, y le agradezco profundamente su disposición a apoyarme justo cuando más lo necesitaba, especialmente en los días previos a cada entrega de avance de tesis.

A todos mis profesores durante el año de materias, por contribuir a mi formación; a la Dra. Itandehui del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN), por su generosa asistencia en el uso del luminómetro. A todos gracias por su dedicación y disponibilidad en cada momento.

A mis compañeros de laboratorio, quienes se convirtieron en un pilar fundamental a lo largo de este camino. Gracias por estar presentes tanto en los éxitos como en las dificultades, al compartir sus conocimientos y brindar esas palabras de ánimo que tantas veces necesité. En especial, mi gratitud a Ceci, Isaí, Monse y Blanca, por su apoyo constante.

A mi familia, quienes con su ejemplo de esfuerzo y sacrificio me enseñaron el valor de la educación y la perseverancia. Gracias por impulsarme siempre a alcanzar mis sueños y por estar a mi lado, incluso cuando miles de kilómetros nos separan.

A mi querida amiga, roomie, confidente, hermana y compañera de mil batallas Cynthia, por adentrarse en esta aventura conmigo, por mostrarme el valor de la verdadera amistad, por acompañarme en los momentos difíciles, por ayudarme y enseñarme que siempre hay otra alternativa, por sus palabras alentadoras, por su cariño, por su lealtad, su comprensión, por acogerme como una hermana, en fin, por existir. Aunque hoy el destino nos separe nuevamente, estoy convencida de que nos volveremos a encontrar.

A México, por abrirme sus puertas y darme el espacio para crecer. Llevo conmigo un agradecimiento sincero hacia esta tierra que me motiva a seguir adelante.

A la vida por sus infinitas enseñanzas, por demostrarme que cada obstáculo te hace más fuerte y que cada día de existencia es un regalo.

A todos los que de una forma u otra me apoyaron durante estos dos años y no me permitieron rendirme, ***“Muchas gracias”*** por formar parte de mi vida.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Senescencia celular	1
1.1.1.1 Características generales.....	1
1.1.1.2 Dualidad funcional del proceso de senescencia celular.....	2
1.1.1.3 Rol de la senescencia celular en el envejecimiento cutáneo y sistémico	3
1.1.1.4 Senescencia de fibroblastos	6
1.1.2 Células madre mesenquimales	8
1.1.2.1 Características de las células madre mesenquimales	8
1.1.2.2 Aplicaciones de la MSC en el rejuvenecimiento de la piel	9
1.1.3 Extractos herbales	10
1.1.3.1 Importancia de la utilización de los extractos herbales.....	10
1.1.3.2 Damiana	11
1.1.3.3 Triphala.....	12
1.1.3.4 Efectos de los extractos herbales en células madre mesenquimales	13
1.2 Justificación	15
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivos	16

1.4.1	Objetivo general.....	16
1.4.2	Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2.	Metodología.....	17
2.1	Obtención de extractos.....	17
2.1.1	Extracción acuosa de Triphala.....	17
2.1.2	Extracción hidroalcohólica de Damiana.....	17
2.2	Cultivo celular de fibroblastos.....	18
2.3	Cultivo celular de MSC.....	19
2.4	Estandarización de la concentración de células por pozo para ensayos de viabilidad celular.....	20
2.5	Efecto de los extractos de Triphala y Damiana en la viabilidad celular.....	20
2.6	Inducción de la senescencia en fibroblastos dérmicos humanos (CCD-1112Sk).....	21
2.6.1	Evaluación de la proliferación celular.....	21
2.6.2	Cuantificación de la enzima β -galactosidasa (SA- β -gal) mediante el kit "Beta-Glo® Assay System".....	23
2.6.3	Análisis de la expresión de genes.....	25
2.6.3.1	Extracción del ARN total.....	25
2.6.3.2	PCR cuantitativa (qPCR).....	26
2.7	Co-cultivo celular de MSC precondicionadas con extractos herbales y fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk senescentes.....	27
Capítulo 3.	Resultados.....	28
3.1	Obtención de extractos herbales de Triphala y Damiana.....	28
3.1.1	Preparación del extracto acuoso de Triphala.....	28
3.1.2	Preparación del extracto hidroalcohólico de Damiana.....	29
3.2	Estandarización de las condiciones experimentales para ensayos de viabilidad celular.....	30
3.3	Ensayo de viabilidad celular de fibroblastos CCD-1112Sk y MSC tratados con extractos de Triphala y Damiana.....	30
3.4	Inducción de la senescencia en fibroblastos dérmicos humanos (CCD-1112Sk).....	31
3.4.1	Evaluación de la proliferación celular.....	31

3.4.1.1	Curva de concentración de CFSE.....	31
3.4.1.2	Efecto de la concentración de D-galactosa en la proliferación celular.....	32
3.4.2	Cuantificación de la enzima β -galactosidasa (SA- β -gal) mediante el kit "Beta-Glo® Assay System".....	36
3.4.3	Análisis de la expresión de genes.....	38
3.4.3.1	Extracción de ARN total.....	38
3.5	Co-cultivo celular de MSC preconicionadas con extractos herbales y fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk senescentes.....	42
3.5.1	Efecto de los extractos herbales en la expresión de genes de MSC.....	43
3.5.1.1	Extracción de ARN total.....	43
3.5.1.2	Evaluación de la expresión de genes asociados a senescencia celular en MSC.....	44
Capítulo 4.	Discusión.....	46
Capítulo 5.	Conclusiones.....	55
Literatura citada.	56

Lista de figuras

Figura	Página
1. Dualidad funcional del proceso de senescencia celular.....	3
2. Dinámica del envejecimiento celular	4
3. Cambios estructurales en la piel joven vs piel envejecida	5
4. Diferenciación y caracterización de MSC.	8
5. Rol de las MSC en la regeneración y rejuvenecimiento cutáneo.....	10
6. Mecanismos fotoprotectores del extracto de Damiana a través de las vías AP-1 y Nrf2/ARE.	12
7. Composición y acción farmacológica de la Triphala	13
8. Efecto de los extractos herbales en las MSC.....	14
9. Separación de los diferentes órganos de la planta de Damiana	18
10. Microfotografía de fibroblastos de neonato CCD-1112Sk en pase 12.....	19
11. Microfotografía de células madre mesenquimales (MSC) en pase 8.....	19
12. Mecanismo molecular del CFSE	21
13. Análisis de viabilidad y proliferación celular por citometría de flujo.....	23
14. Reacción enzimática acoplada del sistema de ensayo Beta-Glo®.....	24
15. Proceso de obtención del extracto acuoso de Triphala.	28
16. Proceso de obtención del extracto hidroalcohólico de Damiana	29
17. Viabilidad celular de fibroblastos CCD-1112Sk y MSC tratados con extractos de Damiana y Triphala	30
18. Histograma de la curva de concentración de CFSE en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk.....	31
19. Microfotografía de campo claro de fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk marcados con CFSE	32
20. Fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk marcados con CFSE (2uM) y diferentes concentraciones de D-galactosa	33
21. Efecto de la D-galactosa sobre la proliferación celular en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk	34
22. Intensidad de fluorescencia media (MFI) del CFSE en relación con la concentración de D-galactosa en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk	35

23. Evaluación de la fluorescencia de fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk expuestos a D-galactosa..	36
24. Curva de concentración de la lactasa.....	37
25. Efecto de diferentes concentraciones de D-galactosa en la actividad de SA-β-gal en fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk tras 48, 72 y 96 h de tratamiento	37
26. Evaluación de ARN de fibroblastos expuestos a D-galactosa (0 mM, 150 mM, 175 mM y 200 mM) por 24 h	38
27. Evaluación de ARN de fibroblastos expuestos a D-galactosa (0 mM, 150 mM, 175 mM y 200 mM) por 48h	38
28. Niveles de expresión del ARNm de genes asociados con la matriz extracelular (<i>MMP1</i> , <i>COL1A1</i> y <i>CCN2</i>) a las 24h y 48h.....	39
29. Niveles de expresión del ARNm de genes asociados a procesos inflamatorios (<i>IL6</i> y <i>TGFB1</i>) a las 24h y 48h.....	40
30. Niveles de expresión del ARNm de genes inhibidores del ciclo celular (<i>CDKN1A</i>) a las 24h y 48h	41
31. Niveles de expresión del ARNm de genes inhibidores del ciclo celular (<i>CDKN1A</i>) a las 96 h	42
32. Intensidad de fluorescencia media (MFI) de CFSE en fibroblastos dérmicos tratados con D-galactosa y co-cultivado con MSC preconicionadas con extractos herbales	43
33. Extracción de ARN con Tri Reagent® en MSC expuestas a diferentes concentraciones de extractos herbales de Damiana y Triphala.....	44
34. Niveles de expresión del ARNm de <i>MMP1</i> , <i>COL1A1</i> , <i>CCN2</i> , <i>IL6</i> , <i>TGFB1</i> y <i>CDKN1A</i> en MSC pretratadas con extractos herbales durante 24 h.....	45

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Genes probados, secuencia y longitud del transcrito. F: Forward, R: Reverse, pb: pares de base....	26
2. Rendimiento en % de los extractos acuoso (Triphala) e hidroalcohólico (Damiana).....	29

Capítulo 1. Introducción

La senescencia celular, un fenómeno relacionado con el envejecimiento y la reducción de la capacidad de autorrenovación, plantea un desafío en el campo de la medicina regenerativa (Campisi, 2014). En este contexto, las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) han surgido como una herramienta terapéutica prometedora, debido a su capacidad para diferenciarse en diversos tipos celulares y su habilidad para modular el microambiente celular (Squillaro et al., 2016). Además, se ha evidenciado un creciente interés en los extractos herbales como posibles agentes terapéuticos, debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Estudios recientes, han sugerido que los extractos herbales pueden tener un papel relevante en la regulación de la senescencia celular y en la promoción de la regeneración tisular (Udalamattha et al., 2016). La combinación de las propiedades beneficiosas de las MSC y los extractos herbales puede ofrecer un enfoque innovador para revertir la senescencia celular y mejorar la capacidad regenerativa de la piel. Este enfoque podría ser particularmente relevante para combatir los signos del envejecimiento cutáneo, como la pérdida de elasticidad, la disminución de la producción de colágeno y la formación de arrugas, al promover la restauración de la funcionalidad dérmica y la mejora de su apariencia estética.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Senescencia celular

1.1.1.1 Características generales

En la década de 1960, Hayflick y Moorhead mostraron un primer acercamiento al concepto de senescencia. El descubrimiento fue dado, tras la observación de que después de una serie de pases *in vitro*, los fibroblastos humanos normales entraban en un arresto irreversible del crecimiento, que difería fundamentalmente del comportamiento de una célula cancerosa típica (Hayflick, 1965). Posteriormente, otros autores describieron un fenómeno asociado con el acortamiento de los telómeros, conocido como senescencia replicativa (Watson, 1972). La senescencia celular se caracteriza por una forma estable de arresto del ciclo celular. Este proceso se establece mediante la activación de vías como p53/p21 y p16/pRB,

las cuales constituyen mecanismos fundamentales y complementarios de supresión tumoral (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). A su vez, la activación de estas vías se puede producir mediante señales mitogénicas y estrés genómico o epigenético (Campisi, 2014).

Los cuatro elementos principales que caracterizan a las células senescentes incluyen: la inhibición del ciclo celular, donde las células dejan de dividirse de manera permanente para prevenir la proliferación de células dañadas; el daño macromolecular, que se refiere a la acumulación de daños en el ADN, proteínas y otras macromoléculas, lo que actúa como desencadenante de la senescencia; el metabolismo desregulado, que refleja cambios importantes en la producción y uso de energía dentro de la célula senescente; y el fenotipo secretor, donde las células liberan una serie de moléculas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8), quimiocinas (CXCL1), metaloproteinasas de matriz (MMP-3, MMP-1, MMP-9) y factores de crecimiento (HGF, IGFBPs), colectivamente conocidos como el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, por sus siglas en inglés), que afectan su entorno, lo que contribuye a la inflamación crónica y la remodelación tisular (Acosta et al., 2013; Kudlova et al., 2022). Estos elementos son fundamentales para entender cómo las células senescentes juegan un papel importante tanto en procesos biológicos normales como en enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Gorgoulis et al., 2019).

Los fenotipos clave de la senescencia incluyen morfología celular agrandada y plana, actividad de β -galactosidasa (SA- β -gal) detectable a pH 6.0, definida como actividad de SA- β -gal asociada a la senescencia (Dimri et al., 1995), y una elevada autofluorescencia debido a la acumulación de lipofuscina (von Zglinicki et al., 1995). Los niveles de p53, p21WAF1 y p16-INK4a a menudo aumentan gradualmente a medida que los fibroblastos se acercan a la senescencia (Ben-Porath y Weinberg, 2005), y las células senescentes producen altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y contienen niveles elevados de daño oxidativo en el ADN (Chen et al., 1995; Song et al., 2005).

1.1.1.2 Dualidad funcional del proceso de senescencia celular

La senescencia celular ejemplifica una de las paradojas más intrigantes en biología: un solo proceso puede actuar simultáneamente como protector y destructor del organismo (Di Micco et al., 2021). Esta dualidad funcional se manifiesta en su capacidad para, por un lado, salvaguardar contra el cáncer y facilitar la reparación tisular, y por otro, contribuir al envejecimiento y a diversas patologías relacionadas con la edad (McHugh y Gil, 2018). En etapas tempranas de la vida, las células senescentes desempeñan roles críticos en el desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular, al actuar como centinelas contra la

transformación maligna (Muñoz-Espín y Serrano, 2014). Sin embargo, su acumulación progresiva con el tiempo puede desencadenar efectos deletéreos, al promover la inflamación crónica y el deterioro funcional de los tejidos (van Deursen, 2014). Esta dualidad funcional (Figura 1) sugiere que la senescencia celular podría representar un ejemplo de pleiotropía antagónica evolutiva, que actúa como un programa celular con efectos tanto beneficiosos como perjudiciales para el organismo (Di Micco et al., 2021).

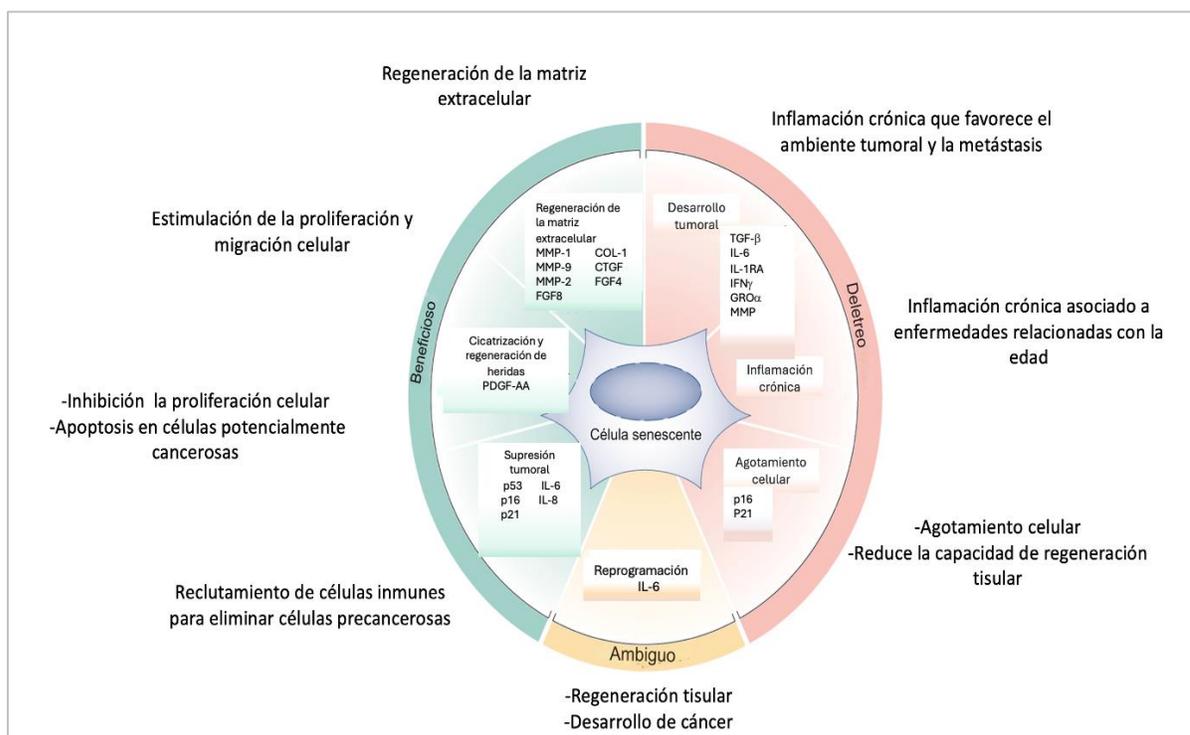


Figura 1. Dualidad funcional del proceso de senescencia celular. Modificado de Di Micco et al., 2021.

1.1.1.3 Rol de la senescencia celular en el envejecimiento cutáneo y sistémico

La conceptualización de Hayflick y Moorhead (1961) sobre la senescencia celular, enmarcada dentro del proceso más amplio de envejecimiento celular, se alinea estrechamente con la distinción moderna entre envejecimiento replicativo, senescencia celular y muerte celular, como se ilustra en la Figura 2. Esta perspectiva integral del envejecimiento celular abarca desde el establecimiento de cultivos primarios hasta la eventual muerte celular, e incluye fases críticas como el envejecimiento replicativo y la senescencia celular. Esta representación gráfica subraya la naturaleza continua del proceso de envejecimiento celular, al destacar la senescencia como un estadio crítico caracterizado por la detención del ciclo celular y cambios funcionales, que preceden a la muerte celular (Ogrodnik, 2021).

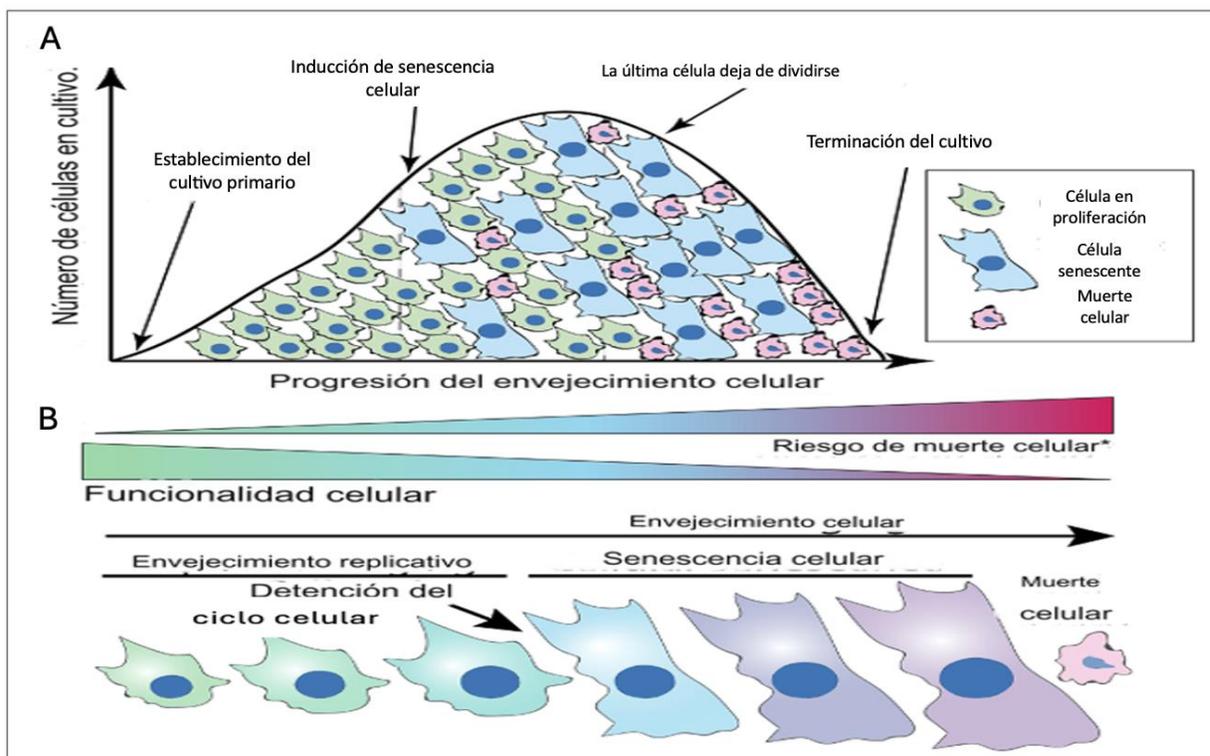


Figura 2. Dinámica del envejecimiento celular. A) Curva de vida útil del cultivo de células primarias B) Etapas del envejecimiento celular. Modificado de Ogrodnik (2021).

La piel, el órgano más extenso del cuerpo humano, es una estructura compleja y multifuncional compuesta por múltiples capas. La capa más externa, la epidermis, está formada principalmente por queratinocitos organizados en estratos, con células proliferativas en la base que se diferencian a medida que ascienden hacia la superficie. Subyacente a la epidermis se encuentra la dermis, separada por la unión dermoepidérmica. La dermis es un tejido conectivo vascularizado, rico en matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) y poblado principalmente por fibroblastos. Estos fibroblastos son cruciales para la síntesis y el mantenimiento de los componentes de la ECM, lo que incluye colágeno y elastina, que proporcionan integridad estructural y soporte nutritivo a la piel. La composición y organización de estas capas son fundamentales para las diversas funciones de la piel, como la protección contra el estrés ambiental, la percepción sensorial, la termorregulación y la inmunovigilancia (Zargaran et al., 2022).

El envejecimiento de la piel es un proceso multifactorial que afecta a casi todos los aspectos de su biología y función; está impulsado tanto por factores intrínsecos (tiempo, factores genéticos u hormonas) como por factores extrínsecos, exposición a los rayos UV o la contaminación (López-Otín et al., 2013). Cada vez hay más evidencia que sugiere que las células senescentes se acumulan en la piel cronológicamente

envejecida y fotoenvejecida; y pueden contribuir a los cambios y patologías de la piel relacionados con la edad (Chin et al., 2023). Con el paso del tiempo, se observan cambios significativos en la estructura y función de este órgano (Figura 3). En la dermis, los fibroblastos senescentes muestran una disminución en la producción de componentes de la ECM, como el colágeno, elastina y fibronectina, y un aumento en la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), lo que resulta en la degradación y fragmentación de las fibrillas de colágeno (Quan et al., 2012). Estos cambios alteran el microambiente dérmico y disminuye la tensión mecánica que normalmente mantiene a los fibroblastos en un estado activo. Como consecuencia, la piel envejecida presenta características fenotípicas como sequedad, rugosidad, pigmentación desigual, menor capacidad de cicatrización, arrugas y una red de colágeno y elastina deteriorada. Además, se observa una disminución en el crecimiento del cabello, deterioro en la función de las glándulas sebáceas, aplanamiento de las papilas dérmicas y menor recambio celular (Farage et al., 2013). Estos cambios no solo afectan la apariencia de la piel, sino que también comprometen sus funciones fisiológicas (Farage et al., 2013; Fullard et al., 2024).

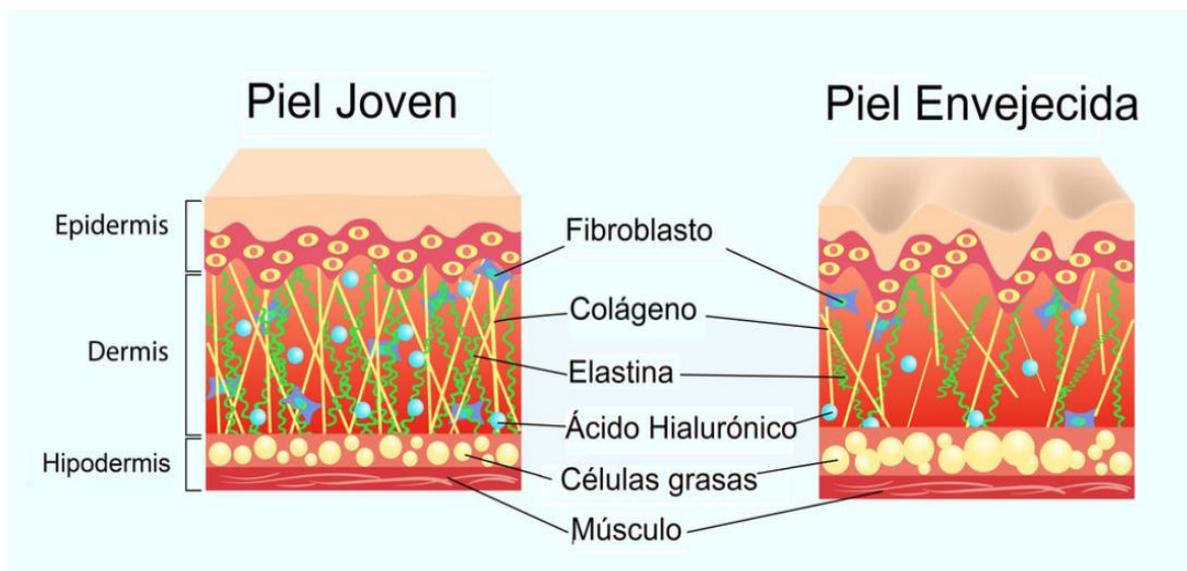


Figura 3. Cambios estructurales en la piel joven vs piel envejecida. Tomado de (No+Vello Portugaete, 2024) <https://nomasvelloportugaete.es/uncategorized/todo-lo-que-debes-saber-sobre-el-funcionamiento-de-tu-piel/>

La senescencia en la piel, parece tener un impacto significativo en el envejecimiento del organismo en su conjunto. Su desarrollo puede influir en el envejecimiento de todo el cuerpo, ya que se ha observado que refleja el estado de salud y la longevidad (Gunn et al., 2013). Además, la piel tiene una estrecha comunicación con el sistema neuroendocrino, lo que sugiere que su senescencia puede afectar la función cerebral y, por lo tanto, el proceso de envejecimiento del organismo. Aunque se han establecido correlaciones entre la senescencia de la piel y el envejecimiento general, se necesita más investigación

para comprender completamente los mecanismos involucrados y su impacto en la función del hipotálamo y el envejecimiento sistémico (Franco et al., 2022).

Diferentes estudios han demostrado que la piel refleja el estado de salud, el riesgo de mortalidad y la longevidad, ya que se han establecido correlaciones entre la reducción de arrugas en áreas protegidas del sol y una mayor longevidad (Gunn et al., 2013). También se ha encontrado, que la senescencia de la piel se correlaciona con el envejecimiento general del organismo, demostrado por la frecuencia de células positivas para p16-INK4a en la piel, lo cual se asocia con marcadores de inmunosenescencia de las células T CD4⁺ y la edad biológica (Waaijer et al., 2012).

La investigación sobre el papel de las células senescentes en el envejecimiento ha avanzado considerablemente gracias al desarrollo de modelos murinos transgénicos, como el modelo INK-ATTAC con fondo genético progeroide (BubR1). Este modelo demostró que la eliminación inducida de células senescentes retrasa la aparición de patologías relacionadas con el envejecimiento en tejidos clave, como el adiposo, muscular y ocular (Baker et al., 2011). Además, los estudios han revelado que la eliminación de estas células no solo mejora la función física y la longevidad en ratones envejecidos (Xu et al., 2018), sino que también atenúa patologías asociadas al envejecimiento, como la disfunción metabólica vinculada a la obesidad (Palmer et al., 2019) y la arteriosclerosis (Childs et al., 2016). Estos hallazgos refuerzan la idea de que la senescencia celular contribuye a los fenotipos de envejecimiento y que su eliminación puede mejorar la funcionalidad tisular y prolongar una vida saludable (Baker et al., 2016).

Aunque estas correlaciones son notables, es importante destacar que la senescencia celular y el envejecimiento no son conceptos intercambiables. El envejecimiento es un proceso intrínsecamente dependiente del tiempo, mientras que la senescencia ocurre constantemente, incluso durante la embriogénesis (Bulbaniakova et al., 2023).

1.1.1.4 Senescencia de fibroblastos

Existen hipótesis que proponen que la senescencia de los fibroblastos es un factor clave en el envejecimiento de la piel, debido al aumento en la liberación de SASPs. Este proceso conduce a una detención irreversible de la proliferación celular (Coppé et al., 2008; Salzer et al., 2018; Wlaschek et al., 2021). Además, la activación de esta cascada de señalización contribuye a la formación de arrugas, al promover la degradación del colágeno y la pérdida de elasticidad en la piel (Wlaschek et al., 2021). Los

fibroblastos senescentes se caracterizan por una elevada expresión de marcadores como p16-INK4a, p21, p53 y SA- β -gal, los cuales reflejan su estado senescente y respaldan su papel en el envejecimiento cutáneo (Lee et al., 2021).

El envejecimiento cutáneo está estrechamente relacionado con la senescencia de los fibroblastos, ya que estos experimentan un aumento en la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP-1), que promueve la fragmentación del colágeno tipo I, como reporta Fisher et al. (2009). Esta degradación genera un ciclo de retroalimentación positiva entre el estrés oxidativo y la expresión de MMP-1, mediado por factores como AP-1 y α 2 β 1 integrina, que perpetúan la pérdida de función fibroblástica y la detención de la proliferación celular, características del fenotipo secretor asociado a la senescencia. Esto refuerza el papel de los fibroblastos senescentes como impulsores clave del envejecimiento dérmico (Fisher et al., 2009). De igual manera, Varani et al. (2006) evidencian que la senescencia de los fibroblastos contribuye significativamente al envejecimiento cutáneo al reducir la síntesis de colágeno tipo I y III en la piel envejecida. Los fibroblastos de personas mayores presentan una menor capacidad de producción de colágeno y una reducción en la estimulación mecánica debido a alteraciones en la interacción celular con las fibras colágenas, lo que propicia un entorno tisular deteriorado (Verani et al., 2006).

Se ha descrito que TGF- β es uno de los factores desencadenantes de la senescencia celular, principalmente mediante la inducción de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina, como p15Ink4b, p21 y p27, lo que lleva a la detención del ciclo celular y la promoción de la senescencia en diversas condiciones celulares (Papageorgis, 2017; Zhang et al, 2017). Además, el TGF- β no solo impulsa la senescencia, sino que también ejerce un control sobre su propia señalización, un mecanismo de autorregulación que asegura una respuesta adecuada frente al daño celular. Este proceso es crucial, ya que en principio esta citocina contribuye a la proliferación de fibroblastos, por lo que su auto-inhibición contribuye a la acumulación de células senescentes, lo que promueve el envejecimiento y la progresión de enfermedades relacionadas con la edad (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Senturk et al., 2010; Minagawa et al., 2011).

Asimismo, se ha reportado que el TGF- β regula la biosíntesis de la ECM a través de la vía TGF- β /Smad, crucial para la síntesis de colágeno tipo I en fibroblastos dérmicos humanos, lo que mantiene la homeostasis del colágeno (Semkova y Hsuan, 2021). Esta señalización estimula la producción de colágeno tipo I y aumenta la expresión de genes de la ECM, como fibronectina, mientras reduce la actividad de las MMPs (Shin et al., 2019). La interrupción de la señalización de TGF- β desencadena la inhibición en la síntesis de colágeno tipo I, lo que afecta negativamente la integridad y funcionalidad de la ECM (Lee et al., 2022). El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) es otro marcador asociado a la vía de

señalización de TGF- β . Su expresión aumenta en respuesta a la concentración de TGF- β , y se ha descrito que su sobreexpresión se identifica como un marcador de senescencia en fibroblastos dérmicos (Kim et al., 2004).

1.1.2 Células madre mesenquimales

1.1.2.1 Características de las células madre mesenquimales

Las MSC son células madre somáticas que pueden ser aisladas de diversos tejidos y tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares, como adipocitos, osteocitos, condrocitos, células neuronales y neurogliales (Salehinejad et al., 2020). Estas células expresan marcadores de superficie característicos como CD73, CD90 y CD105, mientras que no expresan marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 y CD79 (Figura 4). Debido a sus propiedades de auto-renovación, pluripotencia e inmunomoduladoras, las MSC han sido utilizadas en terapia celular, ingeniería tisular y medicina regenerativa (Abdal et al., 2019). Hasta abril de 2023, se habían registrado 1120 ensayos clínicos con el uso MSC en todo el mundo, aunque solo 12 productos han sido aprobados por agencias regulatorias para su comercialización (Fernández-Garza et al., 2023).

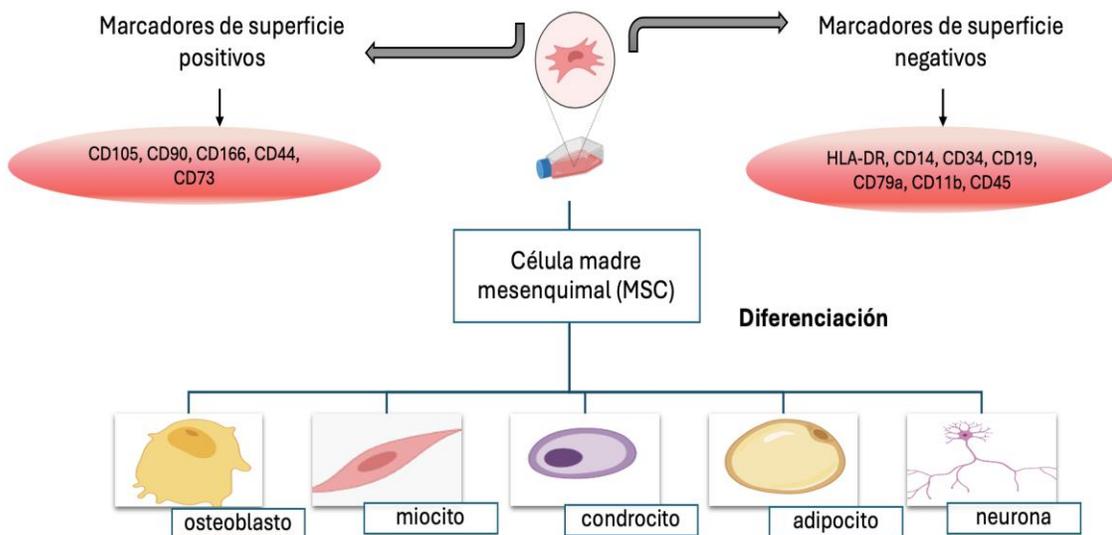


Figura 4. Diferenciación y caracterización de MSC.

Además de su capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares, las MSC desempeñan un papel vital en la inmunomodulación, lo que significa que pueden regular la respuesta inmunitaria del organismo (Song et al., 2020). Asimismo, las MSC están implicadas indirectamente en la hematopoyesis, el proceso de formación de células sanguíneas en la médula ósea (Tamma y Ribatti, 2017). También, juegan un papel importante en la reparación de tejidos, ya que pueden migrar a áreas dañadas del cuerpo y promover la regeneración de los tejidos afectados (Liu et al., 2014). Las MSC son células versátiles que tienen aplicaciones significativas en la terapia regenerativa (Liu et al., 2022).

1.1.2.2 Aplicaciones de la MSC en el rejuvenecimiento de la piel

El envejecimiento de la piel conlleva a cambios estructurales y funcionales no deseables, lo que aumenta la demanda de terapias de rejuvenecimiento. Las MSC han surgido como una opción alentadora para revertir la senescencia celular y mejorar la regeneración dérmica. Estudios han demostrado que las MSC tienen un impacto positivo en la regeneración de la piel envejecida y fotoenvejecida. Por ejemplo, Liu et al. (2017) analizaron los efectos de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSC, por sus siglas en inglés) en ratones con envejecimiento inducido por D-galactosa, y observaron efectos beneficiosos en la piel envejecida. Asimismo, Kim et al. (2018) reportaron que el medio condicionado de células madre mesenquimales derivadas de la sangre del cordón umbilical (UCB-MSC, por sus siglas en inglés), contiene factores de crecimiento como EGF, bFGF, TGF- β y colágeno tipo I, lo que promueve la regeneración de la matriz extracelular y el rejuvenecimiento cutáneo. En humanos, Prakoeswa et al. (2019) administraron con microagujas células madre mesenquimales derivadas de la membrana amniótica (AM-MSC, por sus siglas en inglés) para tratar fotoenvejecimiento, quienes reportaron mejoras visibles. Además, Charles-de-Sá et al. (2015) evidenciaron cambios histológicos en la piel facial envejecida tras inyecciones de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (AD-MSC, por sus siglas en inglés), al resaltar el aumento en colágeno y elastina. Estos hallazgos destacan el potencial terapéutico de las MSC en el rejuvenecimiento cutáneo.

Las MSC juegan un papel esencial en los procesos de regeneración y rejuvenecimiento cutáneo, lo que interviene en la reparación de la piel a través de múltiples mecanismos, como la modulación de la inflamación, el estímulo de la producción de colágeno y elastina, y la promoción de la angiogénesis. Estas acciones permiten la restauración tanto estructural como funcional de la piel envejecida o dañada, lo que resalta su relevancia en la estética médica. El impacto de las MSC en la regeneración del tejido cutáneo se ilustra en la Figura 5, que muestra cómo estas células contribuyen a la reparación y regeneración de la

piel (Li et al., 2024). Además, las vesículas extracelulares de las MSC también han mostrado efectos beneficiosos en la mejora del fotoenvejecimiento cutáneo. Estos hallazgos sugieren que el empleo de las MSC y sus productos secretados tiene un potencial terapéutico para revertir la senescencia celular y mejorar la salud y apariencia de la piel en procesos de envejecimiento (Jo et al., 2021).

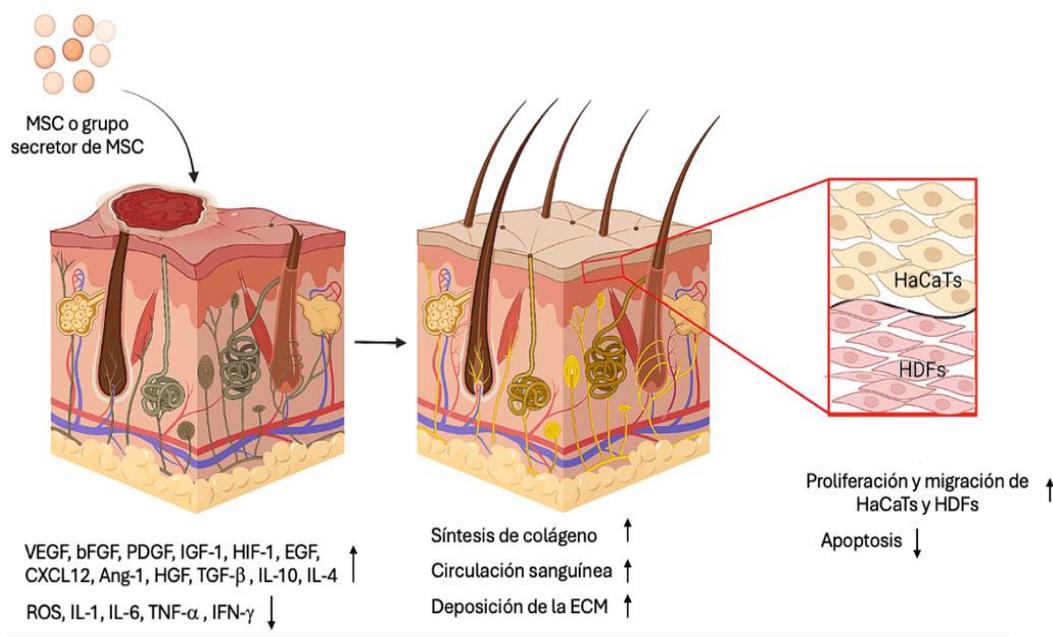


Figura 5. Rol de las MSC en la regeneración y rejuvenecimiento cutáneo. Modificado de Li et al., 2024

1.1.3 Extractos herbales

1.1.3.1 Importancia de la utilización de los extractos herbales

Los extractos herbales, provienen principalmente de prácticas antiguas de la medicina tradicional china, la medicina ayurvédica india y otras tradiciones medicinales del sudeste asiático y Medio Oriente (Udalamaththa et al., 2016). Si bien los extractos herbales individuales han demostrado ser beneficiosos, las combinaciones de diferentes extractos también lo han sido. Estos beneficios han sido mostrados en resultados prometedores según la sabiduría acumulada en la medicina tradicional. Las diversas partes de las plantas, como las raíces, las hojas, los tallos y los frutos, se utilizan en preparaciones que abordan una amplia gama de enfermedades y afecciones. El creciente interés científico por los extractos herbales en el tratamiento de diversas enfermedades ha llevado a la identificación y aislamiento de sus compuestos

activos, con el fin de explorar su integración como terapias complementarias en la medicina moderna (Udalamaththa et al., 2016). Por ejemplo, la curcumina, principal componente de la cúrcuma (*Curcuma longa*), ha mostrado propiedades antiinflamatorias y antioxidantes efectivas en enfermedades como la artritis reumatoide al reducir biomarcadores inflamatorios (Chandran y Goel, 2012). De manera similar, el resveratrol, presente en la piel de las uvas, ha sido estudiado por su impacto en la salud cardiovascular y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, al destacar por su capacidad antioxidante (Baur y Sinclair, 2006). Asimismo, el ginseng (*Panax ginseng*), contiene ginsenosidos que mejoran la memoria y combaten la fatiga, con evidencias de mejora en la función cognitiva en personas mayores (Reay et al., 2005). Los saberes ancestrales y la ciencia moderna, se combinan para su investigación como estimulantes celulares basados en la medicina tradicional (Udalamaththa et al., 2016).

1.1.3.2 Damiana

La Damiana (*Turnera diffusa*), un arbusto silvestre, se distribuye ampliamente en México, América Central y el Caribe, así como en algunas regiones de América del Sur. En México, esta planta se desarrolla en áreas áridas y semiáridas, especialmente en la región de Los Cabos (Alcaraz-Meléndez et al., 2004). Las hojas de Damiana contienen flavonoides, glucósidos de maltol, fenoles, glucósidos cianogénicos, monofenoides, sesquiterpenoides, triterpenoides, politefenfenol-11, ácidos grasos y cafeína (Alcaraz-Meléndez et al., 1994).

Kim et al. (2022), demostraron que el extracto de hojas de Damiana disminuyó la actividad de la señalización AP-1 y potenció la expresión de las enzimas antioxidantes reguladas por la vía de señalización Nrf2/ARE. Estas enzimas desempeñan un papel crucial en la inhibición del daño celular inducido por la generación de ROS, al proporcionar protección a las células HaCaT y HDF contra el fotoenvejecimiento y el daño celular (Figura 6). A concentraciones adecuadas, el extracto no mostró citotoxicidad significativa, lo que sugiere que su uso en dosis apropiadas puede ser seguro y beneficioso para el cuidado de la piel. Además, el extracto protegió las células de la piel contra la radiación UVB, lo que disminuyó la producción de ROS y la degradación del colágeno inducida por la radiación *in vitro*. En conjunto, los efectos antioxidantes y protectores del extracto de Damiana contribuyen a mantener la función y la vitalidad de los HDFs, lo que podría mitigar los efectos asociados a la senescencia.

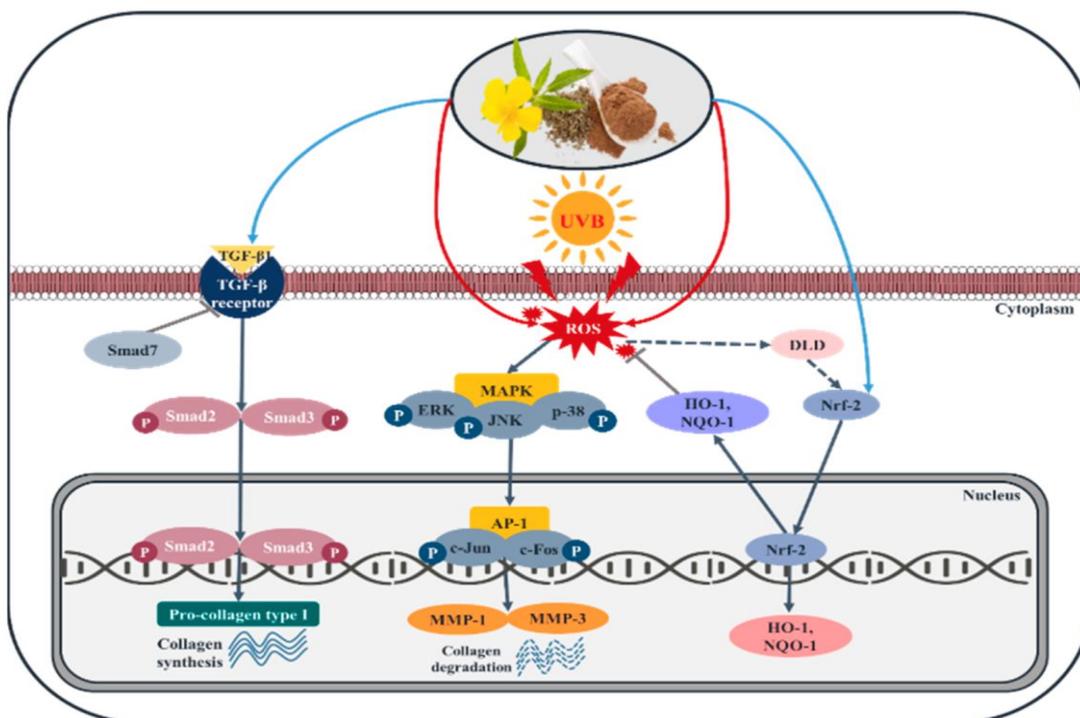


Figura 6. Mecanismos fotoprotectores del extracto de Damiana a través de las vías AP-1 y Nrf2/ARE. Tomado de Kim et al., 2022.

1.1.3.3 Triphala

Triphala es una fórmula de la medicina tradicional india, conocida como Ayurveda, que se compone de tres frutas diferentes generalmente en proporciones iguales: *Amalaki* (*Emblica officinalis*), también conocida como grosella espinosa india o amla; *Bibhitaki* (*Terminalia bellirica*), conocida como *beleric* o *beleric myrobalan* y *Haritaki* (*Terminalia chebula*), también llamada *chebulic myrobalan*. La combinación de estas tres frutas se ha utilizado en la medicina tradicional durante más de 1000 años. Triphala representa una fórmula esencial, ya que promueve la digestión, la absorción, la eliminación y el rejuvenecimiento de manera eficiente (Peterson et al., 2017).

Los principales componentes de la fórmula son: los taninos, el ácido gálico, el ácido elálgico y el ácido chebulínico. Estos componentes son potentes antioxidantes y explican, en parte, la actividad inmunomoduladora observada de la fórmula. Triphala también contiene otros compuestos bioactivos como flavonoides, saponinas, antraquinonas, aminoácidos, ácidos grasos y varios carbohidratos. Además, los polifenoles derivados de Triphala, como el ácido quimioplínico, también son transformados por el microbiota intestinal humano en metabolitos bioactivos, que han demostrado potencial *in vitro* para prevenir el daño oxidativo (Olennikov et al., 2015).

Se han identificado diversas acciones terapéuticas, como actividad antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, antidiabética, antitumoral y antivírica, entre otras (Figura 7). Además, se destacan efectos específicos como la neuroprotección, hepatoprotección, prevención de la obesidad, protección radiológica y mejora de la función gastrointestinal. Estas propiedades sugieren que Triphala posee un perfil farmacológico amplio y diverso, lo que respalda su uso potencial en el tratamiento y prevención de diversas patologías (Wang et al., 2023). Estudios *in vitro* señalan que el extracto de Triphala ejerció efectos antienvjecimiento altamente protectores en las células de la piel humana. La formulación estimuló la expresión génica de colágeno tipo 1 y los genes sintetizadores de elastina. Asimismo, el extracto, mostró una actividad significativa de eliminación de radicales libres en el daño celular inducidos por el peróxido de hidrógeno y una protección en los efectos senescentes relacionados con la sobreexpresión de SA-β-gal (Varma et al., 2016). El mecanismo biológico detallado del extracto de Tripala detrás de la acción protectora de la piel, aún está en investigación a nivel celular y molecular (Peterson et al., 2017).

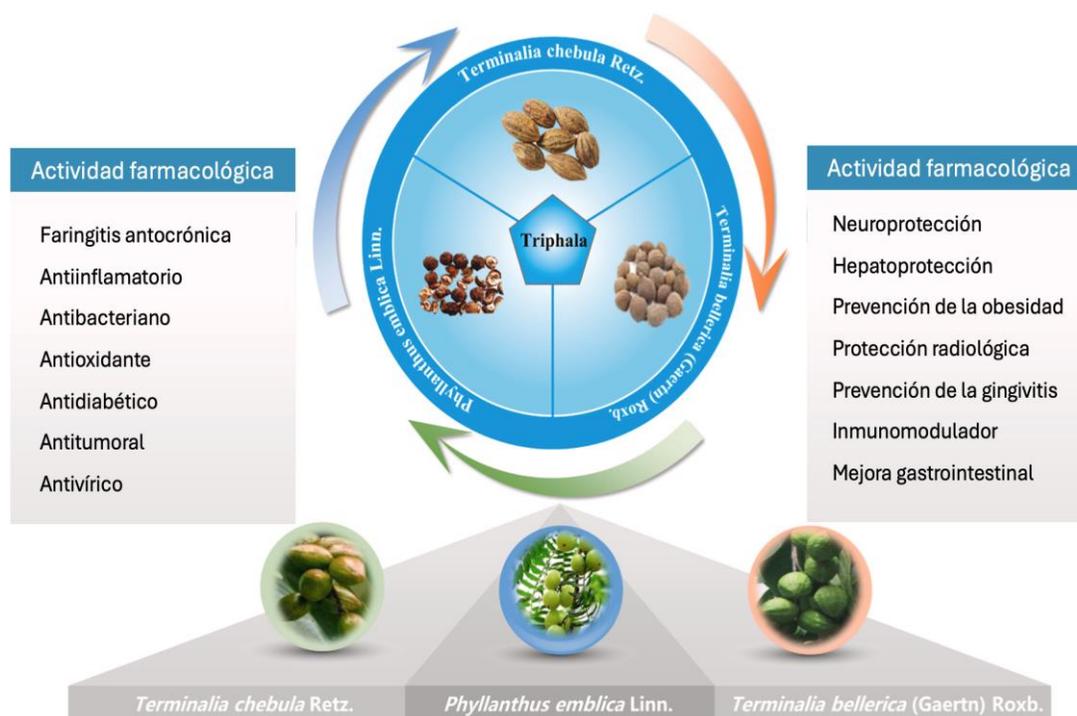


Figura 7. Composición y acción farmacológica de la Triphala. Modificado de Wang et al., 2023.

1.1.3.4 Efectos de los extractos herbales en células madre mesenquimales

Los extractos herbales han demostrado, en diversos estudios, un impresionante potencial en cuanto a la estimulación de la proliferación y diferenciación de las MSC (Figura 8). Por ejemplo, el extracto de una

fórmula herbal tradicional china, conocido como ZD-1, estimula la proliferación y regula marcadores osteogénicos (Chen et al., 2009), mientras que el *Foeniculum vulgare* promueve la proliferación y diferenciación de MSC hacia osteoblastos mediante actividad estrogénica (Mahmoudi et al., 2013). Además, se ha observado que el extracto de *Tithonia diversifolia* muestra actividad antiadipogénica al reducir las especies reactivas de oxígeno (Di Giacomo et al., 2015); y la *Aloe-emodina* inhibe la diferenciación adipocítica en MSC (Subash-Babu y Alshatwi, 2012). En el ámbito neurogénico, el extracto de *Mucuna gigantea* y el extracto de *Angelica sinensis* han demostrado estimular la proliferación y expresión de marcadores neuronales en MSC y mejorar su diferenciación neuronal (Huang et al., 2008; Kongros et al., 2012). Por otro lado, el extracto de hoja de olivo y la curcumina han mostrado promover la diferenciación de MSC en células endoteliales y células progenitoras endoteliales, respectivamente, al fomentar la génesis endotelial/vascular y la angiogénesis (Quesada-Gómez et al., 2012; Widowati et al., 2012). Estos hallazgos sugieren el potencial de los extractos herbales para modular el comportamiento de las MSC y promover diversas vías de diferenciación celular (Udalamaththa et al., 2016). Estos estudios indican que los extractos herbales podrían tener diversas aplicaciones terapéuticas en el campo de la medicina regenerativa y la terapia con células madre.

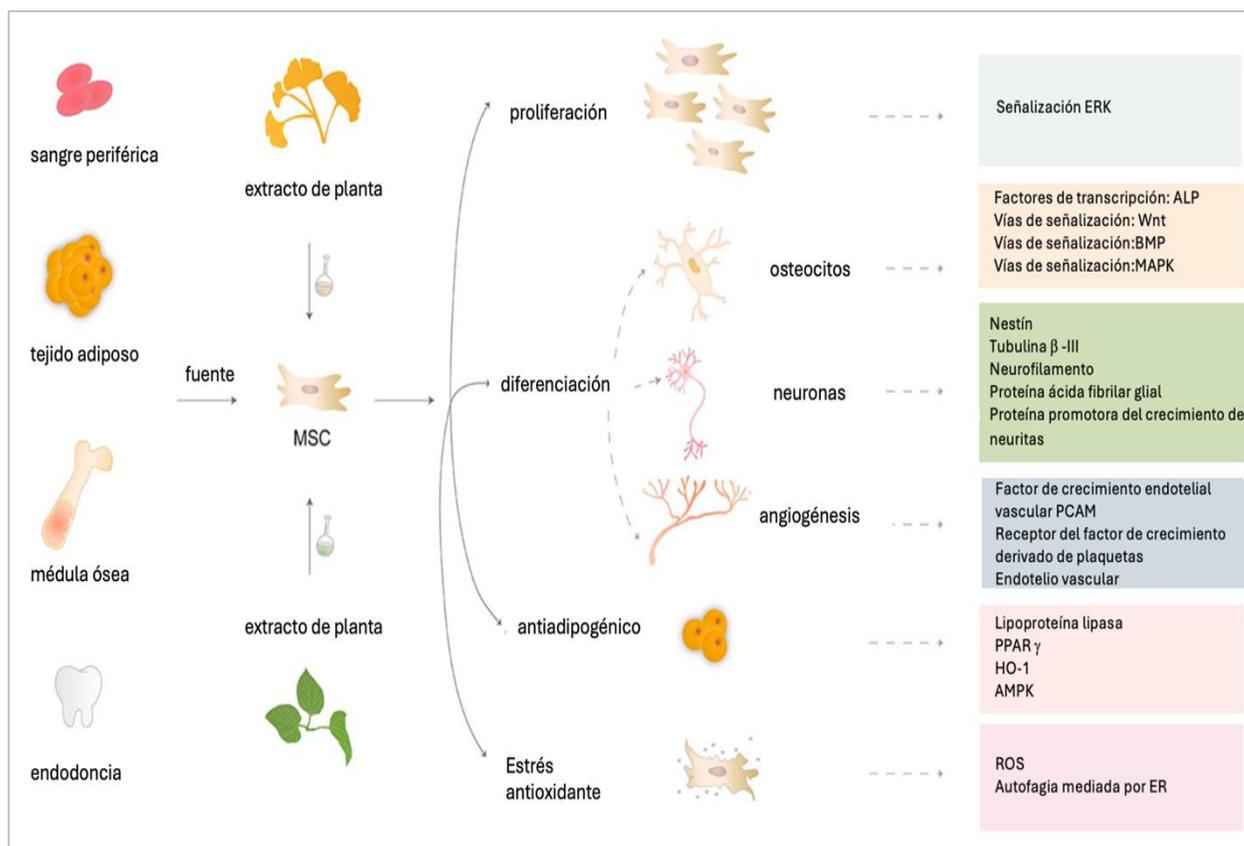


Figura 8. Efecto de los extractos herbales en las MSC. Modificado de Li et al., 2022

1.2 Justificación

La senescencia celular es un proceso biológico que se caracteriza por la pérdida progresiva de la capacidad de las células para dividirse y funcionar adecuadamente. A medida que envejecemos, nuestras células experimentan cambios que pueden resultar en la acumulación de células senescentes en diversos tejidos, incluida la piel, lo cual contribuye a la aparición de diversas enfermedades relacionadas con la edad. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias que puedan revertir o prevenir la senescencia celular se ha convertido en un área de gran interés en la investigación biomédica.

Las células madre mesenquimales son un tipo de células progenitoras con propiedades únicas que las hacen atractivas para la terapia regenerativa. Se ha demostrado que las MSC tienen la capacidad de modular la respuesta inflamatoria y secretar factores de crecimiento que promueven la regeneración tisular.

En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el uso de extractos herbales como posibles agentes terapéuticos para revertir o prevenir la senescencia celular. Las plantas medicinales han sido utilizadas durante siglos en la medicina tradicional debido a sus propiedades terapéuticas y su potencial para promover la salud y el bienestar. El enfoque combinado de extractos herbales junto con las células madre mesenquimales, se ha convertido en una línea de investigación altamente prometedora en el ámbito de la regeneración celular. Estudios recientes, han evidenciado el potencial terapéutico de las plantas y, de manera destacada, la capacidad específica de ciertos extractos para influir en la actividad de las MSC. Estos hallazgos han convergido, para generar una base sólida de evidencia científica, que respalda la perspectiva de emplear los extractos herbales, en la estimulación de la capacidad regenerativa de las células madre mesenquimales. Por tales motivos, se hace necesario conocer el potencial de extractos herbales en la actividad de las células madre mesenquimales para revertir la senescencia de los fibroblastos dérmicos.

1.3 Hipótesis

El precondicionamiento de células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical con extractos de Triphala o Damiana, potencia la capacidad para revertir la senescencia celular inducida por D-galactosa en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk (ATCC).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de extractos herbales en la actividad de células madre mesenquimales para modular la senescencia de fibroblastos dérmicos.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos herbales acuoso e hidroalcohólico de Triphala y Damiana, respectivamente.
2. Determinar la concentración óptima de los extractos herbales que garantice la viabilidad celular, para el preconditionamiento de las MSC.
3. Establecer un modelo de senescencia celular en fibroblastos CCD-1112Sk mediante la adición controlada de D-galactosa.
4. Evaluar la eficacia del preconditionamiento de células madre mesenquimales con extractos herbales de Damiana y Triphala en un co-cultivo, mediante el análisis de la proliferación celular por citometría de flujo.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención de extractos

2.1.1 Extracción acuosa de Triphala

El proceso de obtención del extracto acuoso de Triphala fue ejecutado conforme a la metodología adoptada por Rubio-Elizalde et al. (2019). El polvo de Triphala fue adquirido en Banyan Botanicals Albuquerque, NM 87113 USA, Lot No.750069-327.

La preparación del extracto se realizó con una relación 1:10 (masa/volumen) en 100 mL de agua destilada, previamente calentada a 75 °C. La mezcla se agitó de forma continua durante cinco minutos. En este proceso, se cubrió el vaso de precipitado con papel de aluminio para evitar la posible pérdida de compuestos por evaporación. Se realizó una primera filtración del sobrenadante con dos filtros de papel de poro de 20 µm, con el fin de separar el sobrenadante y minimizar cualquier potencial de ruptura que pudiera ocurrir al entrar en contacto con el extracto. Posteriormente, se continuó con el proceso de centrifugación a temperatura ambiente (TA) durante cinco minutos a una velocidad de 2151 x *g* (Kendro Heraeus Multifuge 1 S-R). A continuación, se llevó a cabo una segunda filtración, con el propósito de eliminar cualquier residuo que pudiera haber quedado tras el proceso de centrifugación. El filtrado resultante se almacenó en un recipiente a una temperatura de - 80 °C, para su posterior liofilización que incluyó una etapa de congelación a - 40 °C y un secado final bajo condiciones de vacío de 0.01 mbar (FreeZone™, LABCONCO). Una vez liofilizado, se pesaron 4 mg y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Seguidamente, se prepararon las soluciones de trabajo a concentraciones de 400, 200, 100, 50 y 25 µg/mL, con el medio de cultivo específico para cada línea celular evaluada como diluyente, las diluciones fueron preparadas justo antes de su aplicación. El extracto fue almacenado a 4°C.

2.1.2 Extracción hidroalcohólica de Damiana

El protocolo de extracción hidroalcohólica de Damiana se realizó a partir de modificaciones al protocolo de extracción acuosa para Triphala. La planta fue recolectada manualmente en su entorno natural (La Paz,

Baja California Sur, septiembre del 2023). La identificación taxonómica de la especie vegetal fue realizada por la Dra. Carolina Gutiérrez, investigadora del Instituto de Medio Ambiente y Desarrollo de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). El proceso de secado de la planta transcurrió a TA, hasta que la planta estuvo completamente seca. Posteriormente se procedió a la separación de los órganos de la planta, donde únicamente se emplearon las hojas para la preparación del extracto (Figura 9).



Figura 9. Separación de los diferentes órganos de la planta de Damiana. A) Bolsas con tallos y hojas secas, B) Tallos separados de las hojas y C) Hojas secas listas para la preparación del extracto.

Se procedió a macerar 5 g de hojas de Damiana en 50 mL de etanol al 70 %, se tapó la boca del matraz con parafilm y se cubrió con papel de aluminio, para mantenerlo en agitación continua durante 12 h a TA. Una vez concluido el proceso de agitación, se procedió con el clarificado del macerado, de igual manera que en el protocolo de extracción acuosa de Triphala. Posteriormente, el solvente fue eliminado mediante un proceso de evaporación en el Rotavaporador® R-100 (Buchi), con una temperatura del baño de agua controlada entre 40-50 °C y una presión de trabajo de 175 mbar. Luego, la muestra fue sometida a liofilización, que incluyó una etapa de congelación a - 40 °C y un secado final bajo condiciones de vacío de 0.01 mbar. Seguidamente, se pesaron 4 mg de extracto liofilizado y se resuspendieron en 1 mL de DMSO al 20 %. Se prepararon las soluciones de trabajo al realizar las diluciones correspondientes hasta obtener las concentraciones a ensayar (400 - 25 µg/mL), con medio de cultivo como diluyente, las diluciones fueron preparadas justo antes de su aplicación. Finalmente, el extracto fue almacenado a 4 °C.

2.2 Cultivo celular de fibroblastos

Se trabajó con la línea celular CCD-1112Sk (ATCC® CRL-2429), que corresponde a fibroblastos derivados del prepucio de neonatos humanos de origen caucásico, tomados de tejido normal. El cultivo de estas células, se realizó en un ambiente controlado a una temperatura de 37 °C con CO₂ al 5 % y se trabajó entre

los pases 6 y 12 (Figura 10). Esta línea celular presenta un tiempo de duplicación aproximado de 43 h (Lu et al., 2012). Se empleó medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM, por sus siglas en inglés), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibiótico/antimicótico (A/A) al 1 %. El cambio de medio se realizó cada 3-4 días hasta que las células alcanzaron una confluencia mayor al 80 %. Esta confluencia fue alcanzada entre 5-10 días. Los subcultivos se realizaron, con una relación de expansión celular desde 1:4 hasta 1:8. Este proceso fue repetido en varias ocasiones según la necesidad de células.

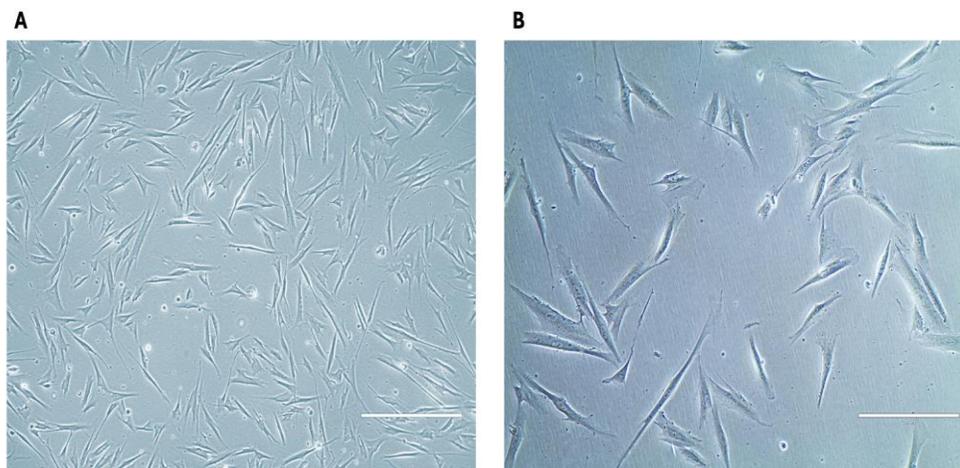


Figura 10. Microfotografía de contraste de fases de fibroblastos de neonato CCD-1112Sk en fase 12. A) Objetivo 10x, la barra indica 400 µm, B) Objetivo 20x, la barra indica 200 µm.

2.3 Cultivo celular de MSC

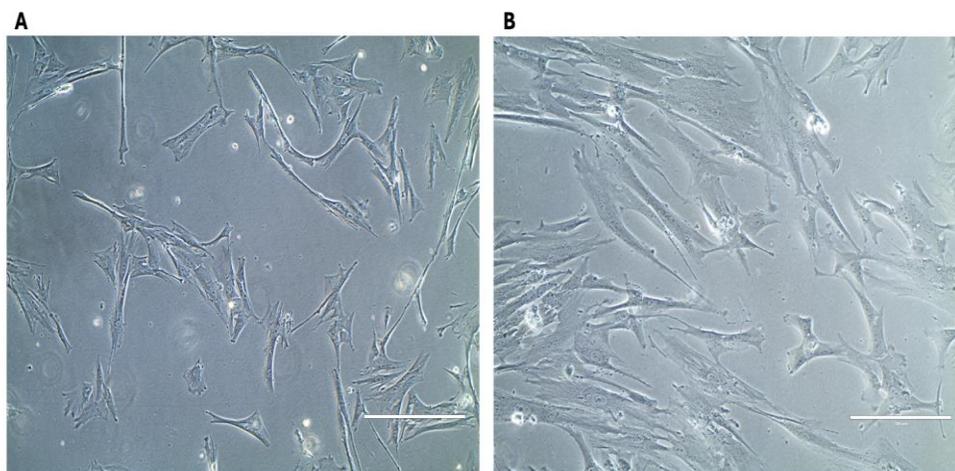


Figura 11. Microfotografía de contraste de fases de células madre mesenquimales (MSC) en fase 8. A) Objetivo 10x, la barra indica 400 µm, B) Objetivo 20x, la barra indica 200 µm.

Las MSC derivadas del cordón umbilical empleadas en este proyecto fueron donadas por la compañía REGEN by TRINITY. Las MSC fueron recibidas en fase 4 y se activaron en una placa de 100 mm en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés), con bajo contenido de glucosa y suplementado con SFB al 20 % (Figura 11). El mantenimiento de estas se realizó en condiciones estándar (37 °C con un 5 % de CO₂), con cambio de medio cada 3-4 días, hasta alcanzar una confluencia de 80-90 %. Posteriormente, se procedió a realizar la subdivisión celular con expansiones de 1:3 hasta 1:6. Los ensayos fueron realizados entre los pases 5 y 8.

2.4 Estandarización de la concentración de células por pozo para ensayos de viabilidad celular

Se estandarizó el proceso de siembra celular en placas de 96 pozos, para ensayos de viabilidad celular. Se realizaron análisis comparativos donde se utilizaron tres cantidades celulares distintas: 5×10^3 , 7.5×10^3 y 1×10^4 células/pozo. Después de 24 h de incubación, mediante un registro fotográfico se determinó la densidad celular óptima, que mostrara una confluencia adecuada. Este proceso de evaluación, se aplicó tanto a los fibroblastos como a las MSC.

2.5 Efecto de los extractos de Triphala y Damiana en la viabilidad celular

Como parte de la etapa de estandarización, se realizaron ensayos de viabilidad celular para evaluar el efecto de los extractos de Damiana y Triphala. Se analizó la viabilidad celular en ambos tipos de células expuestas a diferentes concentraciones (400-25 µg/mL) de los extractos herbales de Triphala y Damiana. El análisis se realizó por triplicado, en placas de cultivo celular de 96 pozos. La siembra celular se realizó a 7.5×10^3 células/pozo para los fibroblastos dérmicos y 1×10^4 células/pozo para las MSC, seguida de una incubación por 24 h a 37 °C con CO₂ al 5 %. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo por preparaciones a las diferentes concentraciones de los extractos, y se incubó durante 24 h en las mismas condiciones. La evaluación de la viabilidad celular se llevó a cabo con un ensayo colorimétrico basado en MTS, para ello se retiró el medio de las células, los pozos se lavaron con 100 µL de PBS y se adicionó a cada pozo 10 µL del reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) diluidos en 90 µL de medio de cultivo. Las células se incubaron durante un periodo comprendido entre 1 h y 3 h. Posteriormente, las placas se leyeron en un espectrofotómetro de placas EPOCH (BioTek) a una longitud de onda de 492 nm.

La viabilidad celular se expresó como un porcentaje en relación con la absorbancia del grupo control (células sin extracto).

2.6 Inducción de la senescencia en fibroblastos dérmicos humanos (CCD-1112Sk)

2.6.1 Evaluación de la proliferación celular

La molécula de éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés), es un tinte no fluorescente permeable a las células. Una vez que la molécula está dentro de la célula, el grupo acetato es escindido por esterasas celulares y la molécula de carboxifluoresceína verde fluorescente resultante ya no es permeable a la membrana, por lo que no puede salir de la célula. Este compuesto, se une a grupos amina libres a través del grupo éster succinimidílico y genera conjugados colorante-proteína covalentes (Pereira et al., 2020). Cuando la célula se divide, el CFSE se reparte equitativamente entre las células hijas (Figura 12), por lo que cada generación de células tiene la mitad de la intensidad de fluorescencia que la generación anterior (Quah et al., 2010).

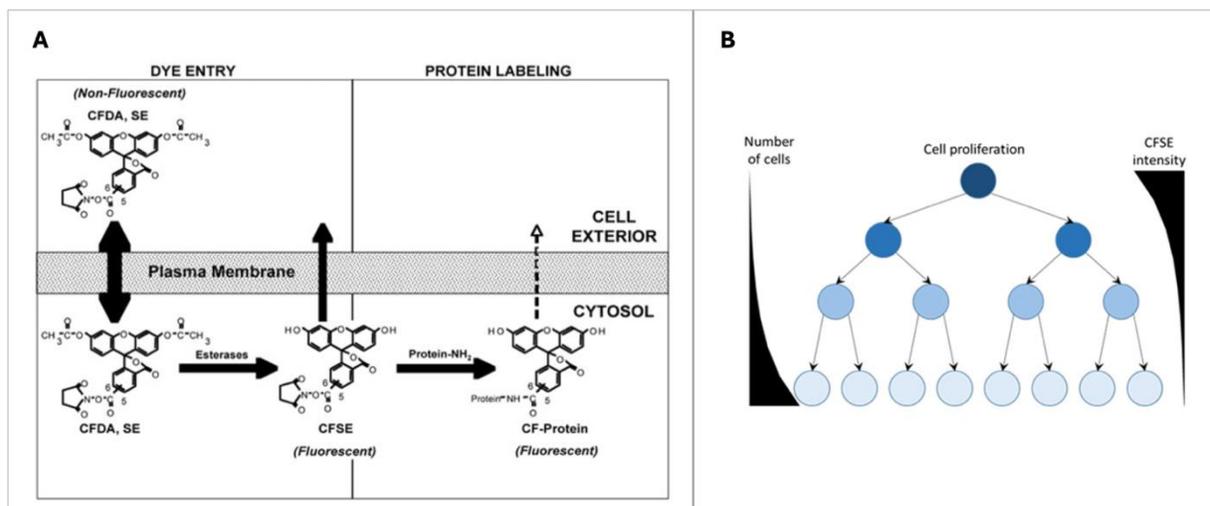


Figura 12. Mecanismo molecular del CFSE. A) Representación de los eventos moleculares que ocurren en el interior de la célula durante el marcaje con CFSE. B) En cada división celular, la célula hija contiene la mitad del CFSE presente en la célula madre. (Tomado de Quah et al., 2010; Pereira et al., 2020).

Para determinar la concentración óptima de CFSE, que permita apreciar el proceso de división celular en

fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk mediante citometría de flujo, se realizó la siguiente curva de concentración: 1.25 μM , 2.5 μM y 5.0 μM . Las diferentes soluciones de trabajo se prepararon a partir de una solución madre de CFSE a 5 mM. Todo el proceso se realizó en condiciones de oscuridad.

El marcaje de las células con CFSE se realizó luego de dissociar las células con 1 mL de Tripsina-EDTA (0.25%-0.02%). Posteriormente, se realizó el conteo celular con azul tripano y se calculó el volumen necesario para sembrar 1.2×10^5 células/pozo. La suspensión celular, correspondiente al volumen calculado, fue centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5810 R) por cinco minutos a $125 \times g$, para retirar el medio. Adicionalmente, se realizaron tres lavados exhaustivos con PBS para eliminar restos de medio y SFB (el volumen de PBS, debe de ser 5 veces el volumen de la suspensión celular). Seguidamente, las células fueron resuspendidas en 1 mL de las soluciones de trabajo de CFSE (1.25 μM , 2.5 μM , 5.0 μM) e incubadas por 20 minutos a 37 °C sin CO₂, protegidas de la luz. Transcurrido el periodo de incubación, se añadieron 5 mL de medio de cultivo completo para detener la reacción de marcaje (5 veces el volumen de la solución de CFSE). Posteriormente, las células fueron sedimentadas (5 minutos a $125 \times g$), para retirar el sobrenadante y resuspendidas en medio completo precalentado (baño María a 37 °C). Finalmente, los fibroblastos teñidos se cultivaron en placas de 6 pozos (1.2×10^5 células/pozo) y se incubaron en condiciones estándar (37 °C, 5 % CO₂), protegidos de la luz con papel de aluminio, por 72 h y 96 h según el ensayo realizado.

Después del periodo de incubación, se retiró cuidadosamente el medio de cultivo de cada pozo. Las células se lavaron con 1 mL de PBS y posteriormente se tripsinizaron (150 μL de tripsina por 4 min sin CO₂). Seguidamente, las células se diluyeron con 450 μL de facs buffer (PBS suplementado con BSA 1%, EDTA 0.5 mM, azida de sodio 0.1 %). La suspensión celular, fue recuperada en microtubos de 1.5 mL, protegidos de la luz con papel de aluminio, adicionalmente, se añadió yoduro de propidio (PI) a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como marcador de viabilidad celular, para su posterior análisis por citometría de flujo (Attune, Applied Biosystems).

Una vez definida la concentración óptima de CFSE, se cultivaron fibroblastos marcados con este reactivo, para analizar el impacto de la D-galactosa a distintas concentraciones (150 mM, 175 mM, 200 mM, 300 mM y 450 mM). El protocolo de tratamiento incluyó una exposición de 96 h, con reemplazo de medio de cultivo con D-galactosa a las 48 h. Finalmente, las células fueron procesadas y preparadas para su análisis por citometría de flujo.

Los datos se obtuvieron en un citómetro de flujo, con el empleo de un láser de excitación a 488 nm y filtros

específicos para la detección de fluorescencia de CFSE (BL1, 530/30) y PI (BL3, 695/40). Los análisis incluyeron la exclusión de dobletes (FSC-H vs FSC-A), discriminación de células vivas/muertas (BL3-A), y evaluación de la proliferación (intensidad de CFSE en BL1-A), como se muestra en la Figura 13.

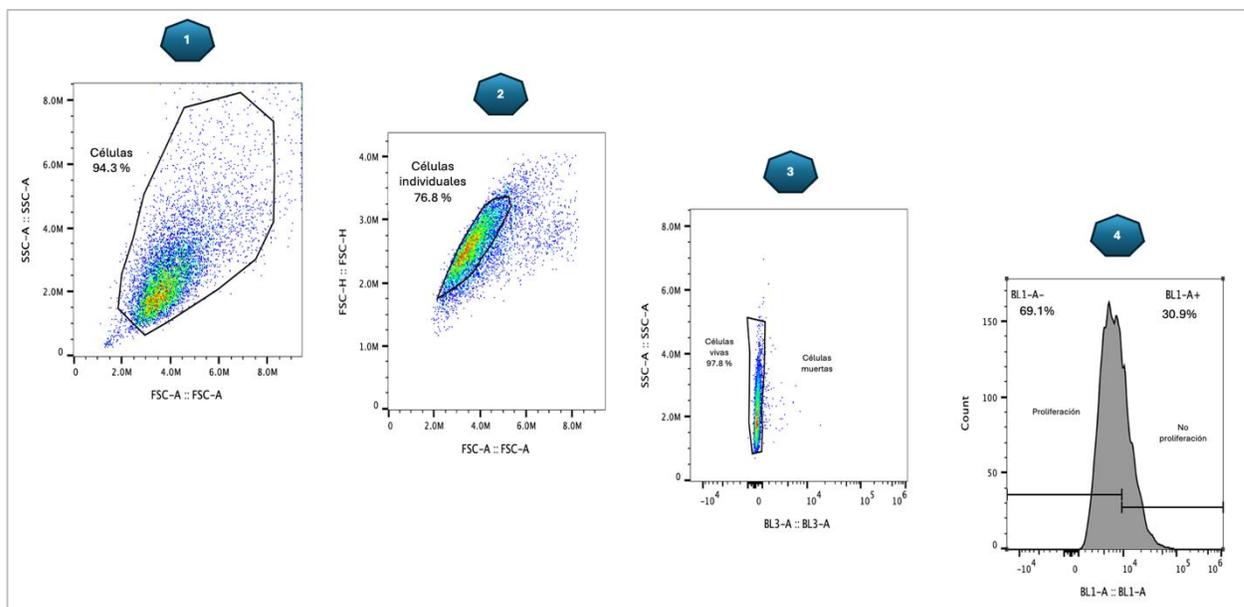


Figura 13. Análisis de viabilidad y proliferación celular por citometría de flujo. 1) Selección de células, 2) Exclusión de dobletes, 3) Discriminación de células vivas/muertas (PI) y 4) Evaluación de la proliferación celular (CFSE). Los porcentajes indicados corresponden a las subpoblaciones de interés.

2.6.2 Cuantificación de la enzima β -galactosidasa (SA- β -gal) mediante el kit "Beta-Glo[®] Assay System"

El ensayo Beta-Glo[®] (Promega) es un sistema para la detección de β -galactosidasa en células de mamífero, que consta de dos componentes que se combinan para formar el reactivo Beta-Glo[®]. Este reactivo proporciona una reacción enzimática acoplada al utilizar un sustrato de luciferina-galactósido (6-O- β -galactopiranosilluciferina) (Figura 14). Este sustrato es escindido por la SA- β -gal para formar luciferina y galactosa lo que genera luz.

La preparación del reactivo de ensayo Beta-Glo[®] se realizó según las indicaciones del fabricante. Se transfirió el contenido del tampón de ensayo Beta-Glo[®] al sustrato de ensayo Beta-Glo[®] y se mezcló suavemente por inversión, hasta que el sustrato se disolvió completamente. Posteriormente, se realizaron alícuotas del reactivo y se almacenó a -20 °C.

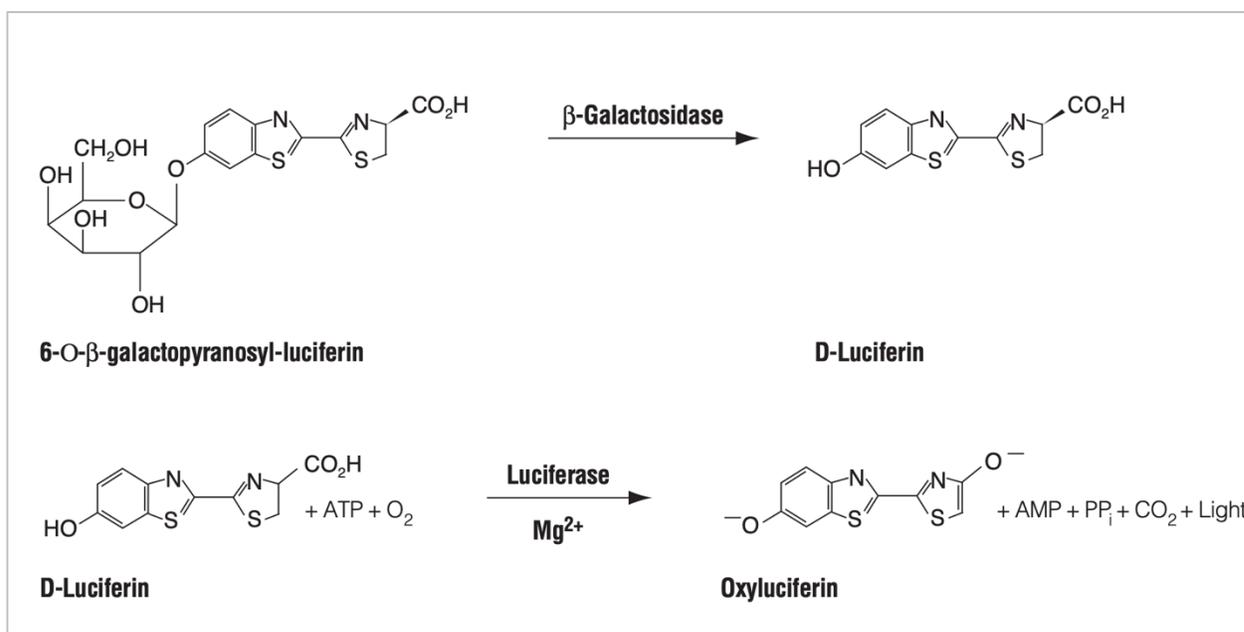


Figura 14. Reacción enzimática acoplada del sistema de ensayo Beta-Glo[®]. Tomado del manual del fabricante (Promega).

Los ensayos preliminares para la cuantificación de la actividad de la SA-β-gal se realizaron con el uso de un luminómetro (Cary Eclipse, Agilent). Sin embargo, estos experimentos no arrojaron resultados satisfactorios debido a la baja sensibilidad del equipo, lo que dificultó la detección de señales lumínicas en las muestras analizadas. Dada esta limitación, y con el objetivo de obtener datos más confiables, se decidió al final de la metodología, realizar una prueba adicional con un fotodocumentador de quimioluminiscencia. Para ello, se determinó la capacidad de este para detectar el rango óptimo de concentración de SA-β-gal, especificado para el reactivo Beta-Glo. Se realizó primeramente una curva estándar, cuyo control de SA-β-gal fue, tabletas de Lactasa 10.000 U/tableta (D-Lactase, HL&F), con 0.1 g de Lactasa por tableta. Para ello, se trituyó la tableta y se disolvió en PBS a una razón de 2 mg/mL de lactasa. Posteriormente, se prepararon las diluciones en PBS (2 μg, 20 ng, 200 μg, 2 μg, y 0.2 μg,) y se adicionaron 100 μL de dilución en una placa negra de 96 pozos. Seguidamente, se añadieron 100 μL/pozo del reactivo Beta-Glo[®], se mezcló el contenido de la muestra durante 30 segundos en un agitador de placas, para su posterior incubación durante 30 minutos a TA lo que permitió que la señal se estabilizara. Finalmente, se realizó el análisis de la placa en el fotodocumentador Chemidoc XRS+ (BioRad) con el sistema de detección de quimioluminiscencia “Chemi Hi Sensitivity” donde el modo de acumulación de señal fue (total: 5 minutos, 50 imágenes). La imagen de mayor señal con el menor error de fondo, fue analizada con ImageJ, para determinar el promedio por pozo de la intensidad de la señal en escala de grises.

Un vez determinada la capacidad de detección del fotodocumentador, se procedió a evaluar el efecto de la D-galactosa en fibroblastos. Tras 48 h, 72 h y 96 h de incubación de las células expuestas a D-galactosa (150 mM y 175 mM), se añadieron 100 μ L del reactivo Beta-Glo[®] y se homogenizó con la pipeta. Se transfirió el lisado celular a una placa negra de 96 pozos y se cubrió la placa con papel de aluminio. Seguidamente, se mezcló el contenido de la muestra durante 30 segundos con un agitador de placas. Posteriormente, se incubaron las muestras durante 30 minutos a TA lo que permitió que la señal se estabilizara. Finalmente, se realizó el análisis de la placa en el fotodocumentador.

Estos ensayos adicionales realizados con el fotodocumentador, confirmaron los resultados obtenidos por citometría de flujo al aportar evidencia consistente que validó la interpretación de los efectos relacionados con la senescencia celular.

2.6.3 Análisis de la expresión de genes

Para el análisis de la expresión génica de *IL6*, *CCN2*, *CDKN1A*, *COL1A1*, *TGFB1* y *MMP1*, se procedió a la preparación de placas de cultivo de 24 pozos, con 5×10^4 células/pozo, con triplicados para cada concentración de D-galactosa. La extracción de ARN y el subsecuente análisis de expresión génica se realizaron a las 24 h, 48 h y 96 h (en algunos casos) de exposición al agente inductor de senescencia. Para este análisis se empleó como gen endógeno a *ACTB*.

2.6.3.1 Extracción del ARN total

La extracción de ARN total se realizó luego de retirar el medio y añadir 200 μ L del reactivo Tri[®] (Sigma Aldrich) a cada pozo de la placa de 24 pozos. Se homogenizó con pipeta y se transfirió el lisado celular a un tubo de 1.5 mL. Este se incubó a TA por 5 minutos, se añadieron 20 μ L de 1-bromocloropropano (BCP), se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó nuevamente a TA por 5 minutos. Luego se centrifugó a $12,000 \times g$ (Eppendorf Centrifuge 5417 R) por 15 minutos a 4 °C y se colectó la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL. Se añadieron 100 μ L de isopropanol, se agitó de 5-10 segundos e incubó por 10 minutos a TA. Se sedimentó el ARN total por centrifugación a $12,000 \times g$ durante 8 minutos a 4 °C; se descartó el sobrenadante. La pastilla fue lavada con 200 μ L de etanol al 75 %. Posteriormente, se centrifugó a $7500 \times g$ durante 5 minutos a 4 °C y se decantó el etanol. La pastilla se dejó secar a TA y finalmente, se resuspendió en 16 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1 %.

Seguidamente, se hicieron diluciones 1:5 para su cuantificación por espectrofotometría en el rango de luz UV (Nanodrop 2000, Thermofisher Scientific). El material se cuantificó por lectura de absorbancia a 260 nm y se revisó su pureza, mediante la relación de absorbancia A260/280, cuyos valores óptimos se hayan en el rango de 1.8-2.2. La integridad del ARN obtenido se determinó mediante un gel de agarosa (1.6 %) donde se empleó bromuro de etidio para la observación de las bandas de las subunidades ribosomales 18S y 28S al iluminarlas con luz UV.

Posteriormente, se realizó la síntesis del ADN complementario (ADNc), por medio del kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, con el uso de hexámeros y el oligonucleótido dT20. La reacción se realizó para un volumen final de 10 µL y se emplearon 3 µL de ARN total por muestra (de acuerdo con el límite máximo de cantidad de ARN recomendado por el fabricante). El ADNc obtenido, se almacenó a -20 °C hasta su uso en qPCR.

2.6.3.2 PCR cuantitativa (qPCR)

Se seleccionó el gen endógeno *ACTB* como referencia interna y se validó su expresión en ADNc obtenido de fibroblastos de prepucio (CCD-112Sk), junto con los oligonucleótidos para *IL6*, *CCN2*, *CDKN1A*, *COL1A1*, *TGFβ1*, *MMP1*; cuyas secuencias fueron obtenidas de publicaciones previas, las cuales se muestran en la Tabla 1.

Table 1. Genes probados, secuencia y longitud del transcrito. F: Forward, R: Reverse, pb: pares de base

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón	Referencia
<i>IL6</i>	F: GGAGACTTGCCTGGTGA R: CTGGCTTGTTCCTCACTACTC	90 pb	Robinson et al., 2020
<i>CCN2</i>	F: GCTACCACATTTCTACCTAGAAATCA R: GACAGTCCGTCAAAACAGATTGTT	84 pb	Juárez et al., 2012
<i>CDKN1A</i>	F: GAGACTCTCAGGGTCGAAAA R: TTAGGGCTTCCTCTTGGAGA	92 pb	Chikenji et al., 2021
<i>COL1A1</i>	F: TGTTCACTTTGTGGACCTC R: TCTGTACGCAGGTGATTGGT	126 pb	Septembre-Malaterre et al., 2022
<i>TGFβ1</i>	F: ACACATCAGAGCTCCGAGAA R: GAGGTATCGCCAGGAATTGT	140 pb	Jiao et al., 2023
<i>MMP1</i>	F: CAAGAGCAGATGTGGACCA R: AAAGGAGAGTTGTCCCGATG	145 pb	Gasperin-Bulbarela et al., 2021
<i>ACTB</i>	F: GCGAGAAGATGACCCAGATC R: CCAGTGGTACGGCCAGAGG	103 pb	Kobayashi et al., 2014

Se utilizó el umbral de ciclos (Ct, por sus siglas en inglés) para calcular el número de copias iniciales de ADNc. El valor de Ct corresponde al número del ciclo en el que la señal fluorescente de la reacción atraviesa el umbral especificado (Thermo Fisher Scientific, 2012). Todas las reacciones se realizaron con el mix Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) y una concentración de oligos y ADNc de 250 nM y 2.5 ng/ μ L, respectivamente.

2.7 Co-cultivo celular de MSC precondicionadas con extractos herbales y fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk senescentes

Se realizó un co-cultivo celular para evaluar la capacidad de las MSC, previamente tratadas con extractos de Damiana y Triphala, para revertir el fenotipo de senescencia en fibroblastos, inducido por D-galactosa. Los fibroblastos fueron teñidos con 2 μ M de CFSE y posteriormenete fueron sembrados en placas de 24 pozos a una densidad de 5×10^4 células/pozo y expuestos a D-galactosa a una concentración de 150 mM durante 96 h bajo condiciones estándar de cultivo, con cambio de medio a las 48 h. Las MSC fueron sembradas en insertos para placas de 24 pozos, a una concentración de 1×10^4 células/pozo y tratadas con los extractos de Damiana y Triphala (50 μ g/mL y 100 μ g/mL) durante 24 h. Después de los periodos de incubación, los insertos que contenían a las MSC se transfirieron a los pozos con fibroblastos. Además, se colectó el medio de cultivo condicionado por las MSC, el cual fue transferido también a pozos con fibroblastos dérmicos senescentes. Las células en co-cultivo fueron incubadas por 48 h. Posteriormente, se procedió al análisis mediante citometría de flujo para evaluar los efectos de las MSC precondicionadas con extractos herbales, sobre la proliferación celular.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Obtención de extractos herbales de Triphala y Damiana

3.1.1 Preparación del extracto acuoso de Triphala

La obtención del extracto, se basó en la metodología descrita en la sección 2.1.1 (Figura 15). Las propiedades organolépticas que caracterizaron al extracto acuoso de Triphala fueron las siguientes: color marrón oscuro a amarillento, consistencia de polvo fino y seco, y un aroma intenso, donde predominaron las notas herbáceas y frutales características de los componentes de Triphala (Figura 15F).



Figura 15. Proceso de obtención del extracto acuoso de Triphala. A) Pesaje de 10 g de polvo de Triphala, B) Calentar agua hasta 75 °C, C) Baño María con temperatura entre 70-75 °C, D) Coloración y consistencia del extracto, E) Liofilización, F) Consistencia final del extracto.

El rendimiento del extracto se evaluó al considerar la cantidad inicial del polvo vegetal y el peso obtenido del extracto después de la liofilización, el cual fue de aproximadamente 36.1 % (Tabla 2).

Table 2. Rendimiento en % de los extractos acuoso (Triphala) e hidroalcohólico (Damiana)

Extractos	Tipo de extracto	Peso inicial del material vegetal (g)	Peso del extracto después de liofilizar (g)	Rendimiento (%)
Triphala	Acuoso	10	3.61	36.1
Damiana	Etanólico	5	0.39	7.8

3.1.2 Preparación del extracto hidroalcohólico de Damiana

Se siguió la metodología descrita en la sección 2.1.2. Algunas de las propiedades organolépticas que caracterizaron al extracto fueron: color verde oscuro, consistencia líquida, así como el fuerte aroma característico de plantas. Una vez eliminado el etanol mediante la rotavaporación, la consistencia cambió a tipo aceitosa y la coloración se tornó hacia un verde más intenso (Figura 16). Posteriormente, el extracto se sometió a un proceso de liofilización para retirar el exceso de agua. El extracto final mostró un rendimiento aproximado de 7.8 % (Tabla 2).

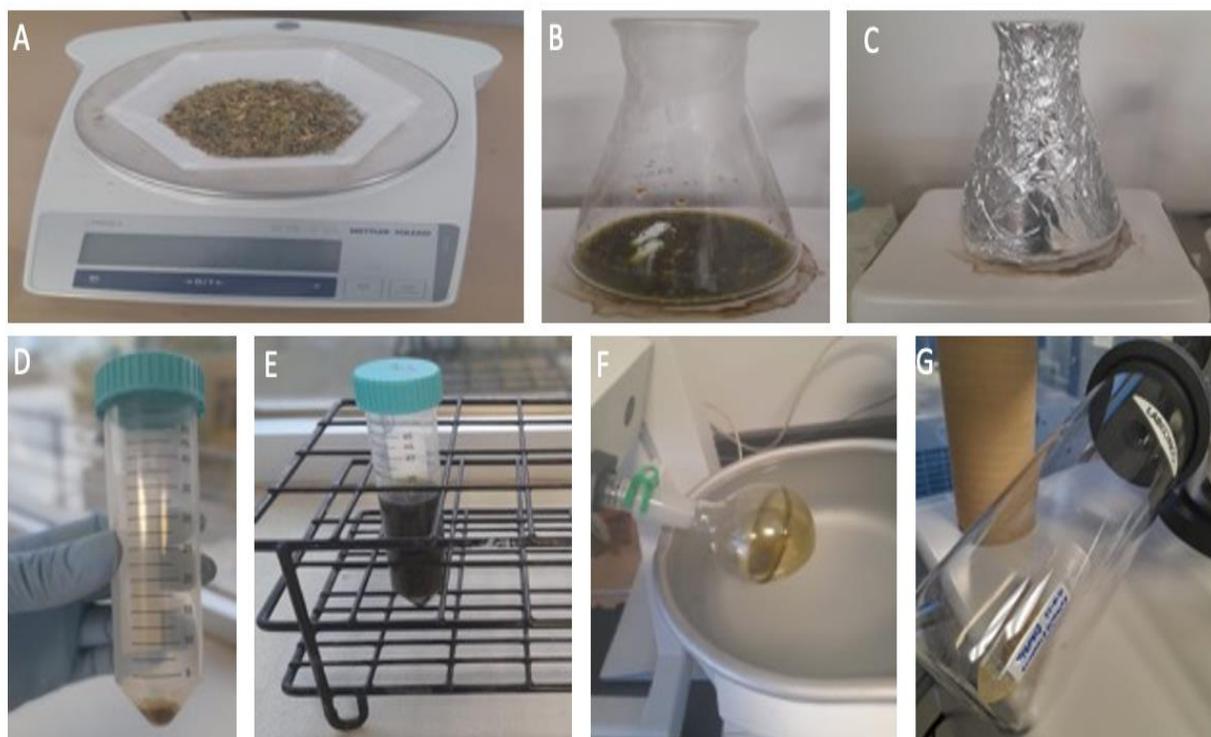


Figura 16. Proceso de obtención del extracto hidroalcohólico de Damiana. A) Pesaje de 5 g de hojas de Damiana B) y C) Agitación constante por 12 h, D) Eliminación del remanente sólido después del proceso de centrifugación, E) Volumen final luego del proceso de filtración, F) Rotavaporación, G) Liofilización.

3.2 Estandarización de las condiciones experimentales para ensayos de viabilidad celular

Se evaluaron distintas cantidades celulares (5×10^3 , 7.5×10^3 y 1×10^4 células/pozo) en fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk y en células madre mesenquimales (MSC), cultivadas en una placa de 96 pozos durante 24 h. La densidad de 7.5×10^3 células/pozo fue seleccionada para los experimentos posteriores en fibroblastos, ya que mostró la mejor confluencia entre las tres densidades evaluadas, lo que aseguró un crecimiento celular adecuado para los análisis posteriores. En el caso de las MSC, la densidad óptima determinada fue de 1×10^4 células/pozo, al mostrar resultados consistentes en términos de viabilidad y comportamiento celular.

3.3 Ensayo de viabilidad celular de fibroblastos CCD-1112Sk y MSC tratados con extractos de Triphala y Damiana

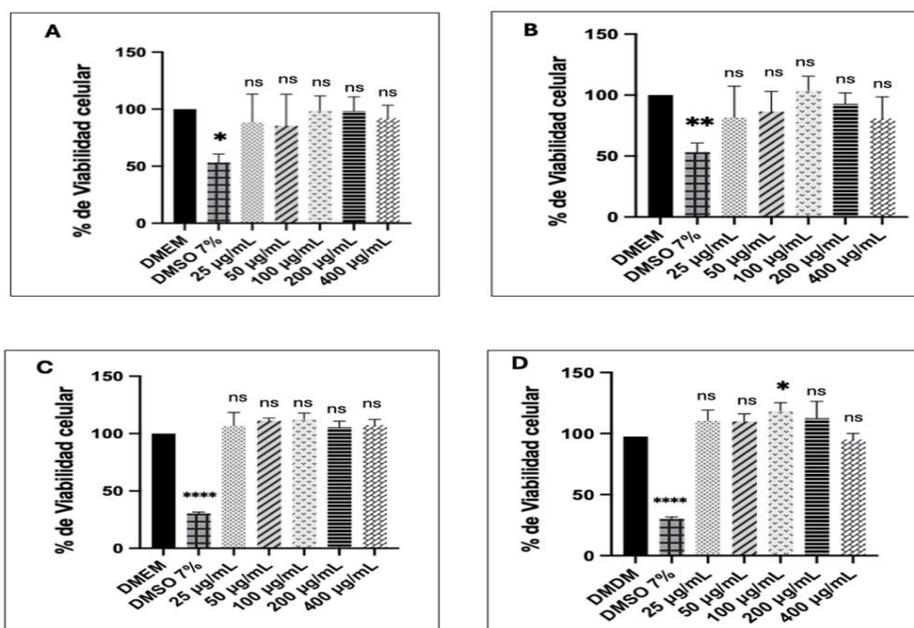


Figura 17. Viabilidad celular de fibroblastos CCD-1112Sk y MSC tratados con extractos de Triphala y Damiana. A) Viabilidad celular de fibroblastos CCD-1112Sk expuestos al extracto acuoso de Triphala, B) Viabilidad celular de fibroblastos CCD-1112Sk expuestos al extracto hidroalcohólico de Damiana, C) Viabilidad celular de las MSC expuestas al extracto acuoso de Triphala, D) Viabilidad celular de las MSC expuestas al extracto hidroalcohólico de Damiana. Gráficas de barras representativas de 3 réplicas por grupo. Control negativo de viabilidad: DMSO 7%, células sin tratamiento: control positivo de viabilidad (DMEM), Experimental: células tratadas con extracto de Triphala o Damiana [400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL]. Las barras corresponden al promedio de tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; ns: no significativo). ANOVA de una vía, post hoc de Dunnett.

Para seleccionar las concentraciones que resultaran ser más viables para las células, se realizó un ensayo de viabilidad celular con el reactivo MTS. Los resultados de estos experimentos no mostraron un efecto citotóxico de los extractos herbales de Triphala y Damiana a ninguna de las concentraciones ensayadas ni en fibroblastos ni en MSC (Figura 17).

3.4 Inducción de la senescencia en fibroblastos dérmicos humanos (CCD-1112Sk)

3.4.1 Evaluación de la proliferación celular

3.4.1.1 Curva de concentración de CFSE

La Figura 18 ilustra los resultados obtenidos mediante citometría de flujo para las diferentes concentraciones de CFSE evaluadas (0 μM , 1.25 μM , 2.5 μM y 5.0 μM).

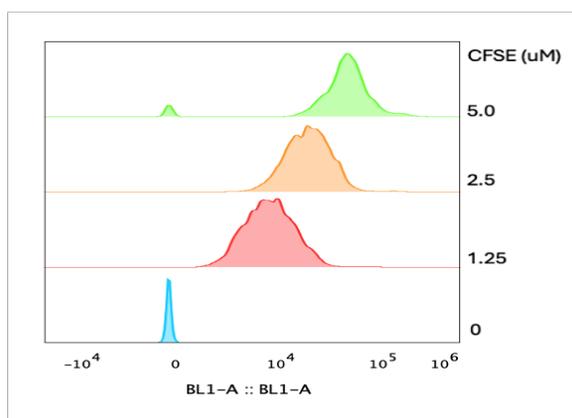


Figura 18. Histograma de la curva de concentración de CFSE en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk.

Se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia proporcional a la concentración de CFSE. El control no marcado (0 μM) presentó un pico estrecho cerca del origen, indicativo de la autofluorescencia basal de las células. Al aumentar la concentración de CFSE, se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia celular registrada en el canal BL1-A. La concentración más alta evaluada (5.0 μM) exhibió el pico con la mayor intensidad de fluorescencia, lo cual indica que las células asimilaron una mayor cantidad

de CFSE. La evidente separación entre los picos de las diferentes concentraciones indicó, que los niveles de marcaje celular fueron distinguibles entre sí, lo cual resultó crucial para la selección de la concentración de CFSE más adecuada para los siguientes experimentos.

Las observaciones por microfotografías (Figura 19) evidenciaron que las concentraciones más altas de CFSE, particularmente 5 μM , presentaron signos de citotoxicidad. Esto se manifestó en alteraciones morfológicas de los fibroblastos, lo cual puede ser apreciado por un aumento en el número de células no adheridas (células completamente redondas) y la pérdida de la morfología fusiforme, típica de los fibroblastos.

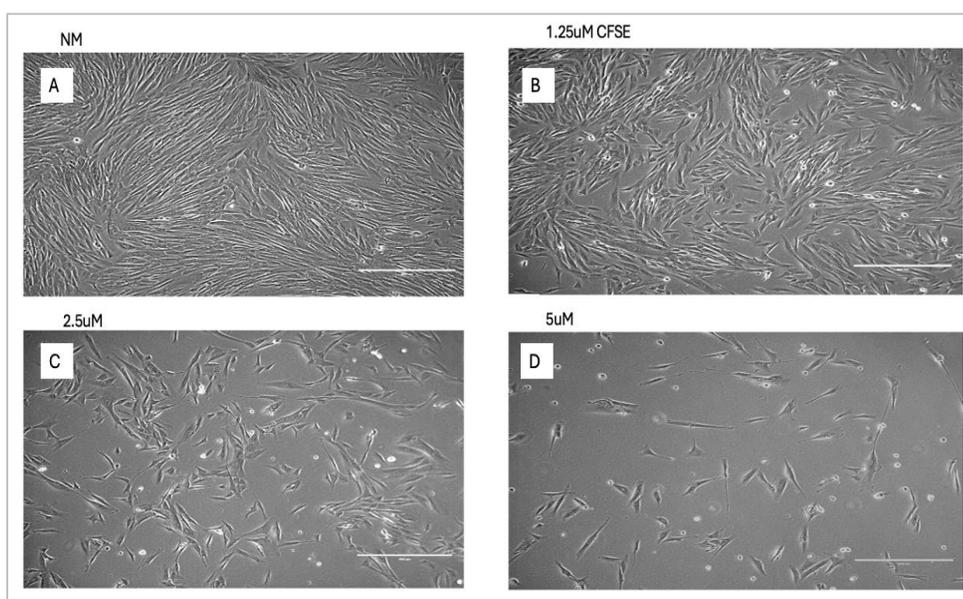


Figura 19. Microfotografía de campo claro de fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk marcados con CFSE. A) Células no marcadas con CFSE. B) Fibroblastos marcados con 1.25 μM de CFSE. C) Fibroblastos marcados con 2.5 μM de CFSE. D) Fibroblastos marcados con 5 μM de CFSE. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 10x donde la barra indica 400 μm .

Con base en estos resultados, se determinó que una concentración intermedia —2 μM de CFSE— podría proporcionar un equilibrio óptimo entre intensidad de señal y viabilidad celular donde se pueda obtener una detección clara de la fluorescencia sin inducir efectos citotóxicos significativos.

3.4.1.2 Efecto de la concentración de D-galactosa en la proliferación celular

Este ensayo permitió evaluar la capacidad de división celular de fibroblastos dérmicos humanos CCD-

1112Sk tratados con diferentes concentraciones de D-galactosa, al utilizar el CFSE como marcador de proliferación celular. Las placas se incubaron durante 96 h, para permitir al menos dos ciclos de duplicación celular. A las 48 h, se realizó un cambio de medio, el cual fue reemplazado por medio completo sin adición de D-galactosa.

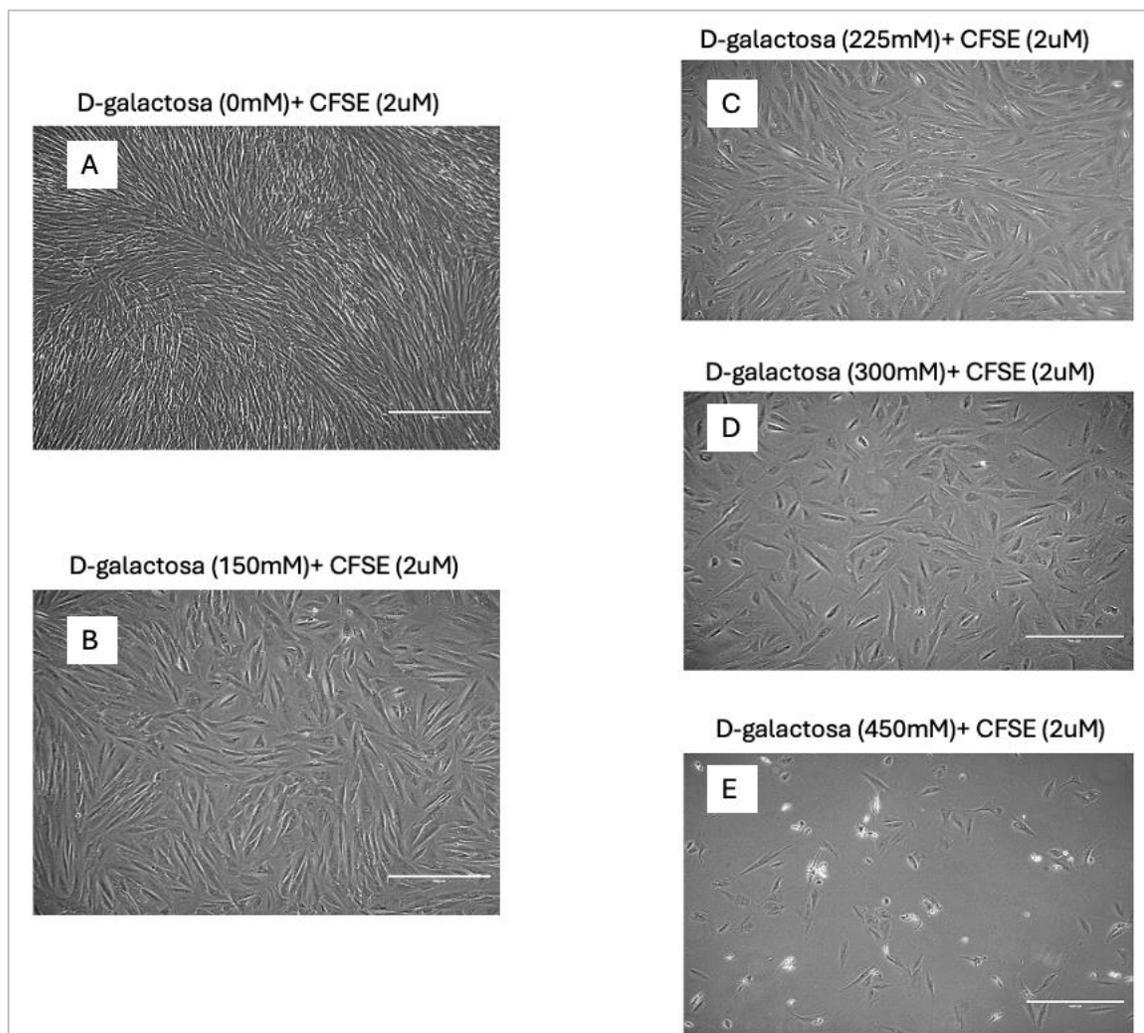


Figura 20. Fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk marcados con CFSE (2uM) y diferentes concentraciones de D-galactosa. A) Control (sin tratamiento); B) D-galactosa 150 mM; C) D-galactosa 225 mM; D) D-galactosa 300 mM; E) D-galactosa 450 mM. Las imágenes fueron tomadas después de 96 h de incubación en condiciones estándar (37°C con 5% de CO₂). Se observa una disminución progresiva en la densidad celular y cambios morfológicos a medida que aumenta la concentración de D-galactosa. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 10x donde la barra indica 400 µm.

Las observaciones microscópicas (Figura 20) revelaron un efecto dependiente de la concentración de D-galactosa sobre los fibroblastos. Mientras que el control mostró una proliferación y morfología normal, el aumento en la concentración de D-galactosa resultó en una disminución progresiva de la densidad celular y alteraciones morfológicas. A concentraciones más altas (300 mM y 450 mM), se observó una marcada

reducción en el número de células y cambios morfológicos significativos, indicativos de un severo estrés celular o muerte. Para los siguientes ensayos, fueron descartadas estas concentraciones.

Los resultados del histograma de citometría de flujo (Figura 21A) demostraron un efecto inhibitorio dosis-dependiente de la D-galactosa sobre la proliferación celular, evaluado mediante la dilución de CFSE. El grupo control (células sin D-galactosa) mostró el menor pico de fluorescencia, indicativo de la máxima proliferación celular. A medida que aumentó la concentración de D-galactosa (150 mM, 225 mM, 300 mM y 450 mM), se observó un menor desplazamiento hacia la izquierda en los picos de fluorescencia.

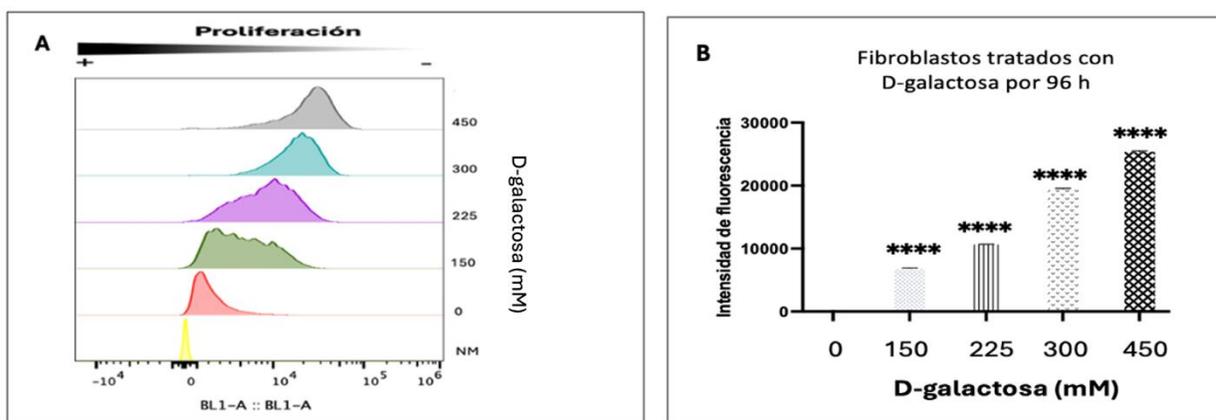


Figura 21. Efecto de la D-galactosa sobre la proliferación celular en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk. A) Efecto inhibitorio de D-galactosa sobre la proliferación celular en fibroblastos humanos CCD-1112Sk. B) Intensidad de fluorescencia media (MFI) del CFSE en relación con la concentración de D-galactosa. Las barras corresponden a la media ± error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (****p < 0.0001). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

La Figura 21B muestra el incremento de la intensidad de fluorescencia media (MFI) conforme aumenta la concentración de D-galactosa. Altos niveles de fluorescencia están relacionados con concentraciones más altas de D-galactosa, lo que refleja una menor tasa de proliferación celular, dado que la dilución de CFSE disminuye con cada división celular.

Estos resultados demuestran que la D-galactosa tiene un efecto inhibitorio dependiente de la concentración sobre la proliferación de fibroblastos CCD-1112Sk. También se realizaron ensayos preliminares con un rango de concentraciones más reducido (Figura 22), donde se descartaron las concentraciones más altas, con el objetivo de considerarse las concentraciones adecuadas que proporcionarían un equilibrio óptimo entre la inhibición de la proliferación celular, característico del estado de senescencia, y el mantenimiento de la viabilidad celular.

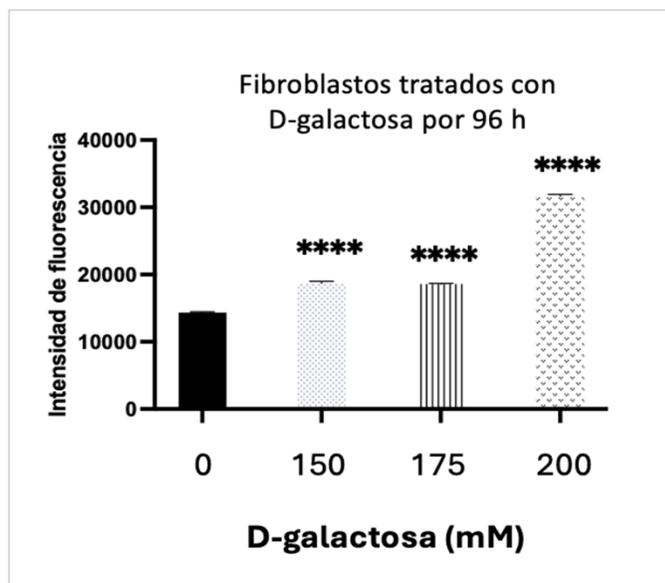


Figura 22. Intensidad de fluorescencia media (MFI) del CFSE con relación a la concentración de D-galactosa en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk. Las barras corresponden a la media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (**** $p < 0.0001$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

Para los siguientes ensayos, el efecto de la D-galactosa sobre la proliferación celular en fibroblastos dérmicos CCD-1112Sk, se representará mediante gráficos que relacionan la concentración de D-galactosa con la MFI. Este enfoque permite una representación más evidente de las diferencias entre los diversos tratamientos.

Para confirmar que el efecto de inhibición de la proliferación celular se mantenía después de una exposición inicial de 48 h a 150 mM y 175 mM de D-galactosa, seguida por 48 h adicionales sin el agente inductor de senescencia, se evaluaron las células a las 96 h totales desde el inicio del ensayo (Figura 23). Adicionalmente, se evaluó la viabilidad celular de las muestras mediante la adición de yoduro de propidio (PI) a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este análisis permitió descartar la presencia de células no viables que pudieran haber influido en los resultados, al asegurar que la disminución observada en la proliferación celular estuviera relacionada específicamente con el efecto de la D-galactosa. Para ambas concentraciones, la viabilidad celular fue superior al 93%.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la MFI con el aumento de la concentración de D-galactosa, lo que indica un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 150 mM y 175 mM respecto al grupo de células no tratadas. Dado que ambas concentraciones demostraron potencial para la inducción

de cambios celulares consistentes con un fenotipo senescente, la discriminación entre estas para los subsiguientes análisis se fundamentará en los resultados obtenidos mediante qPCR.

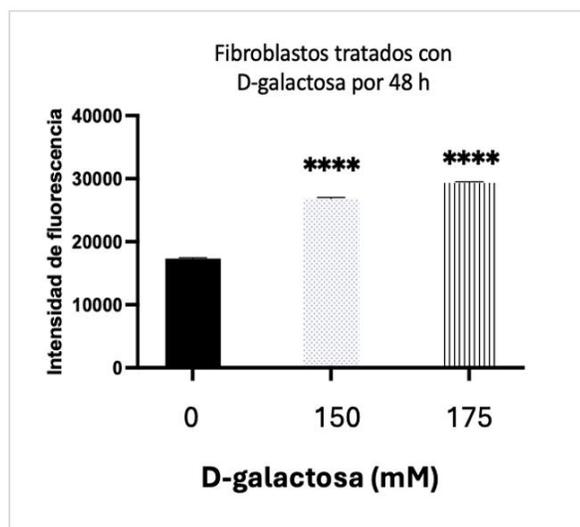


Figura 23. Evaluación de la fluorescencia de fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk expuestos a D-galactosa por 48 h y evaluados a las 96 h. Fueron considerados 1×10^4 eventos para cada muestra. Las barras corresponden a la media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (**** $p < 0.0001$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

3.4.2 Cuantificación de la enzima β -galactosidasa (SA- β -gal) mediante el kit "Beta-Glo® Assay System"

El sistema Beta-Glo® es un ensayo basado en la emisión de luminiscencia proporcional a la concentración de SA- β -gal, por lo que requiere de un luminómetro para la detección de la señal lumínica. Sin embargo, dado que no se encontró con un lector de placa capaz de detectar el rango óptimo estimulado para Beta-Glo®, se decidió evaluar la capacidad de un fotodocumentador para westernblot. Para ello, se creó una curva estándar con lactasa y se evaluó con el sistema de detección de quimioluminiscencia, donde se demostró su capacidad para detectar en el rango picomolar de enzima (Figura 24).

Se evaluó el impacto de diferentes concentraciones de D-galactosa en la inducción de senescencia celular en fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk, al cuantificar la actividad de SA- β -gal a las 48 h, 72 h y 96 h de exposición. Tras 48 h, el tratamiento con 175 mM de D-galactosa mostró un incremento significativamente mayor ($p < 0.01$) en la actividad de SA- β -gal en comparación con el control (células sin tratamiento), mientras que con 150 mM el aumento fue menos destacado ($p < 0.05$). A las 72 h y 96 h, todas las concentraciones de D-galactosa evaluadas mostraron niveles elevados de fluorescencia respecto

al grupo control ($p < 0.01$). Estos hallazgos sugieren que, bajo las condiciones experimentales establecidas, la D-galactosa produce un aumento dependiente de la concentración y el tiempo en la actividad de SA- β -gal (Figura 25).

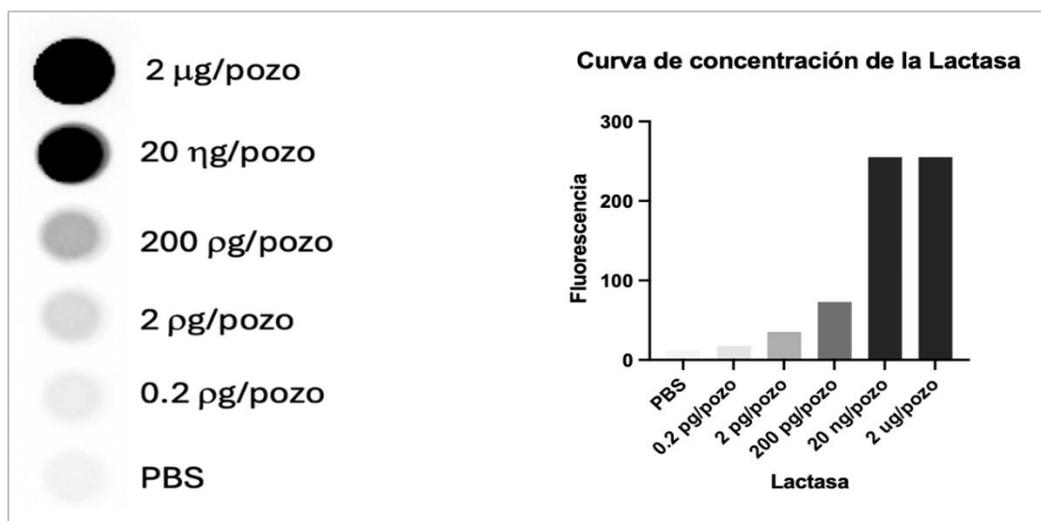


Figura 24. Curva de concentración de la lactasa. Las diluciones se realizaron en 100 μ L de PBS, y se transfirieron a una placa negra de 96 pozos. Seguidamente, se añadieron 100 μ L del reactivo Beta-Glo[®] y se incubó por 30 minutos para su posterior análisis.

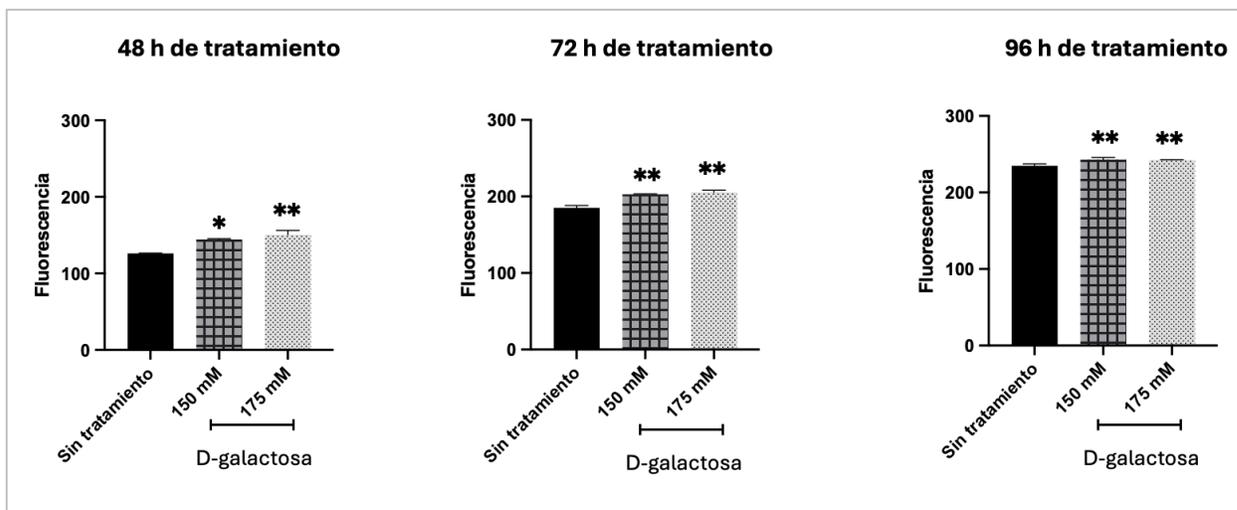


Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de D-galactosa en la actividad de SA- β -gal en fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk tras 48, 72 y 96 horas de tratamiento. Los datos se normalizaron respecto al grupo control (sin tratamiento). Las barras corresponden al promedio de dos ó tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

3.4.3 Análisis de la expresión de genes

3.4.3.1 Extracción de ARN total

La concentración de ARN total obtenido de fibroblastos dérmicos expuestos a diversas concentraciones de D-galactosa durante 24 h y 48 h, se presenta en las Figuras 26A y 27A, respectivamente. En todos los casos, la relación de absorbancia 260/280 nm estuvo entre 1.8 - 2.2. La integridad del ARN total se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.6 %. Como se observa en las Figuras 26B y 27B, todas las muestras exhiben bandas intactas y bien definidas, correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

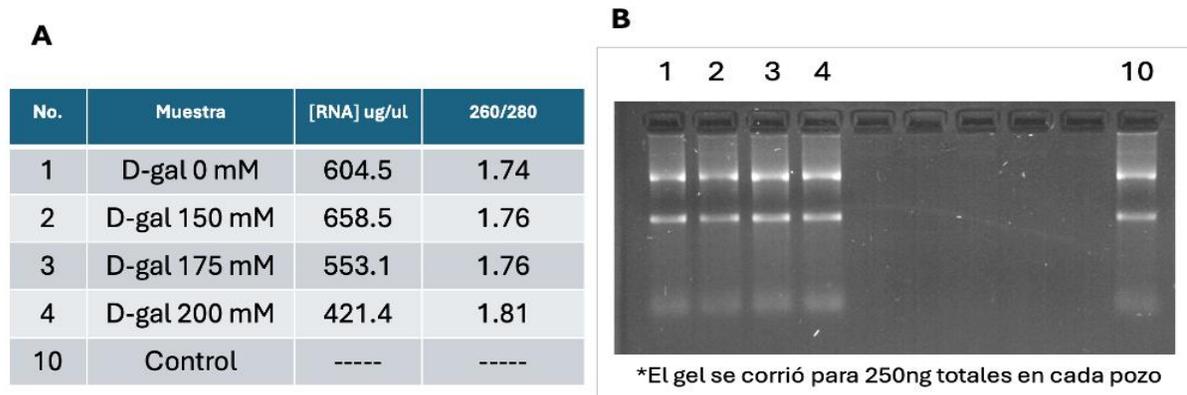


Figura 26. Evaluación de ARN de fibroblastos expuestos a D-galactosa (0 mM, 150 mM, 175 mM y 200 mM) por 24 h. A) Concentración de ARN total obtenida en la extracción con Tri Reagent®. B) Revisión de la integridad del ARN total en gel de agarosa al 1.6 %.

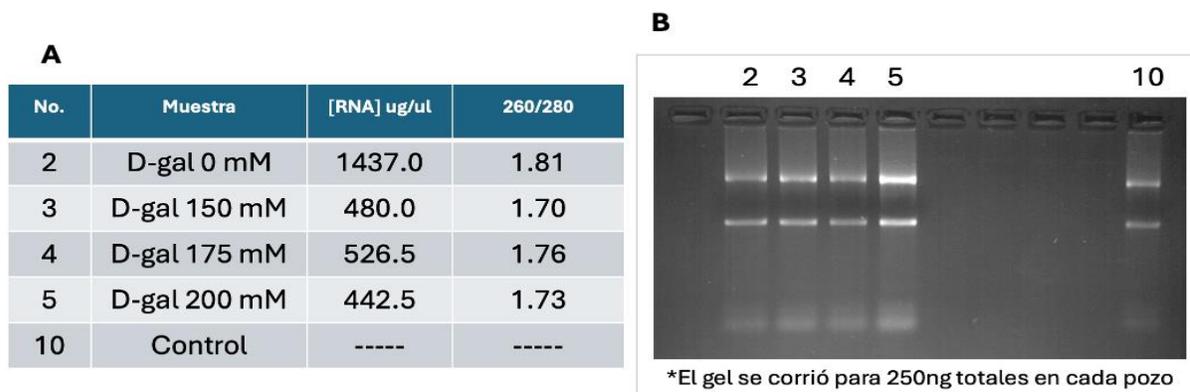


Figura 27. Evaluación de ARN de fibroblastos expuestos a D-galactosa (0 mM, 150 mM, 175 mM y 200 mM) por 48h. A) Concentración de ARN total obtenida en la extracción con Tri Reagent®. B) Revisión de la integridad del ARN total en gel de agarosa al 1.6 %.

3.4.3.1.1 Evaluación de la expresión de genes asociados a la senescencia celular en fibroblastos dérmicos senescentes

A las 24 h de exposición con D-galactosa, se observó una disminución significativa en la expresión de *COL1A1* proporcional con el aumento de la concentración de D-galactosa. Las células tratadas con 175 mM y 200 mM de D-galactosa mostraron una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en comparación con el control (células no tratadas). La expresión de *COL1A1* disminuyó aproximadamente un 50 % y 60 % respectivamente para estas concentraciones. A las 48 h, la inhibición en la expresión del gen de colágeno fue más evidente en todas las concentraciones evaluadas (Figura 28).

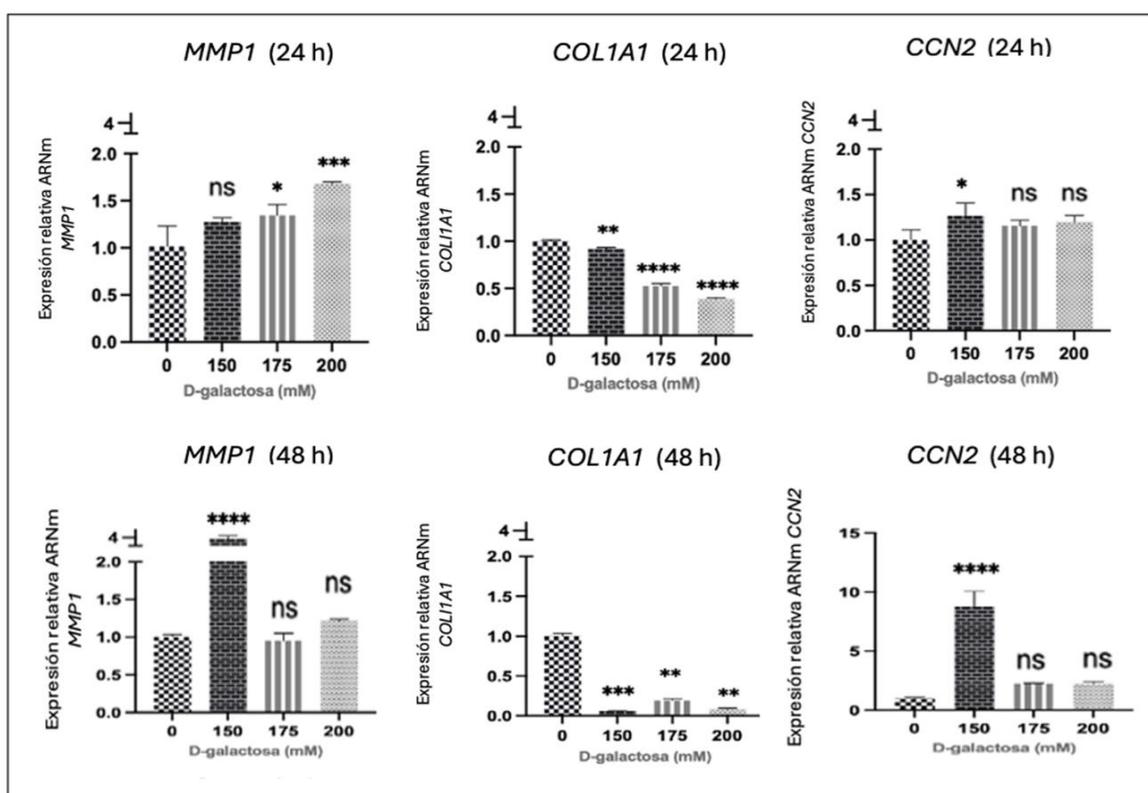


Figura 28. Niveles de expresión del ARNm de genes asociados con la matriz extracelular (*MMP1*, *COL1A1* y *CCN2*) a las 24 y 48 horas. La evaluación se realizó mediante RT-qPCR en fibroblastos dérmicos humanos tratados con D-galactosa (0, 150, 175 y 200 mM). Los datos se normalizaron respecto a la expresión del gen de referencia (*ACTB*) y se presentan como expresión relativa en comparación con el control sin tratamiento (0 mM). Las barras corresponden al promedio de tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; ns: no significativo). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

El tratamiento con 200 mM de D-galactosa indujo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de *MMP1* ($p < 0.001$) desde las 24 h en comparación con el control. A las 48 h, la exposición a 150 mM de D-galactosa resultó en un incremento estadísticamente significativo en la expresión de *MMP1*

($p < 0.0001$), al alcanzar aproximadamente 4 veces el nivel de las células sin tratamiento. En contraste, las concentraciones de 175 mM y 200 mM no mostraron diferencias estadísticamente significativas con este periodo de exposición (Figura 28).

CCN2 a las 24 h de exposición, tuvo un aumento significativo ($p < 0.05$) en su expresión en células tratadas con 150 mM de D-galactosa en comparación con el control. Las concentraciones de 175 mM y 200 mM también mostraron un ligero incremento, aunque no estadísticamente significativo. A las 48 h, se observó un aumento altamente significativo ($p < 0.0001$) en la expresión de *CCN2* en células tratadas con 150 mM de D-galactosa, con un incremento de aproximadamente 9 veces respecto al control. Las concentraciones de 175 mM y 200 mM también mostraron un ligero aumento, aunque no significativo estadísticamente (Figura 28). Estos resultados indican una fuerte inducción de *CCN2* en respuesta a la D-galactosa, especialmente a las 48 h de exposición.

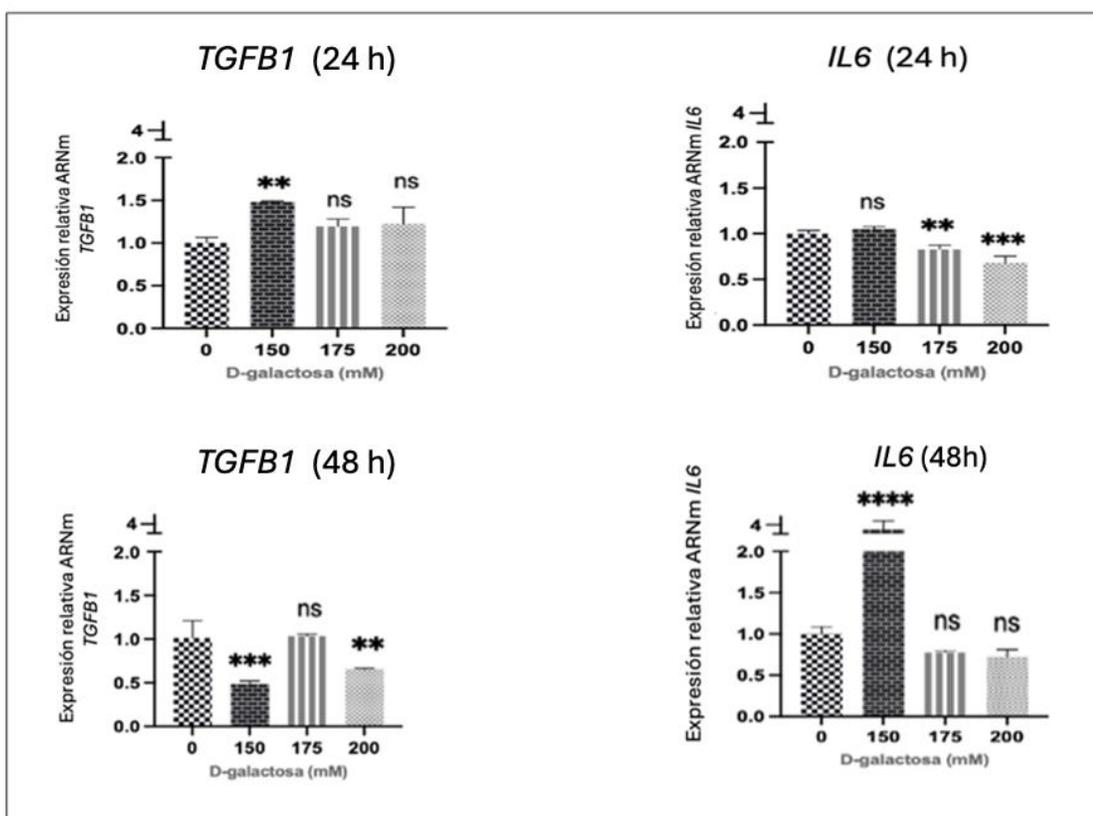


Figura 29. Niveles de expresión del ARNm de genes asociados a procesos inflamatorios (*IL6* y *TGFB1*) a las 24h y 48h. La evaluación se realizó mediante RT-qPCR en fibroblastos dérmicos humanos tratados con D-galactosa (0, 150, 175 y 200 mM). Los datos se normalizaron respecto a la expresión del gen de referencia (*ACTB*) y se presentan como expresión relativa en comparación con el control sin tratamiento (0 mM). Las barras corresponden al promedio de tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; ns: no significativo). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

La expresión relativa de *TGFB1* a las 24 h de exposición, mostró un aumento significativo ($p < 0.01$) en las células tratadas con 150 mM de D-galactosa en comparación con el control. Las concentraciones de 175 mM y 200 mM también mostraron un ligero incremento, aunque no estadísticamente significativo. Tras 48 h, se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) en la expresión de *TGFB1* en células tratadas con 150 mM de D-galactosa en comparación con el control. Además, se observó una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre el control y las células tratadas con 200 mM de D-galactosa, lo que también evidenció una reducción en la expresión (Figura 29).

La *IL6*, a las 24 h, mostró una disminución significativa en su expresión para las concentraciones de 175 mM y 200 mM con $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente. La expresión de *IL6* disminuyó aproximadamente un 20 % y 30 % respectivamente, para ambas concentraciones. A las 48 h, se observó un cambio drástico en el patrón de expresión. Las células tratadas con 150 mM de D-galactosa mostraron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) en la expresión de *IL6*, con un incremento de aproximadamente 4 veces respecto al control (Figura 29). Las concentraciones de 175 mM y 200 mM no mostraron diferencias significativas.

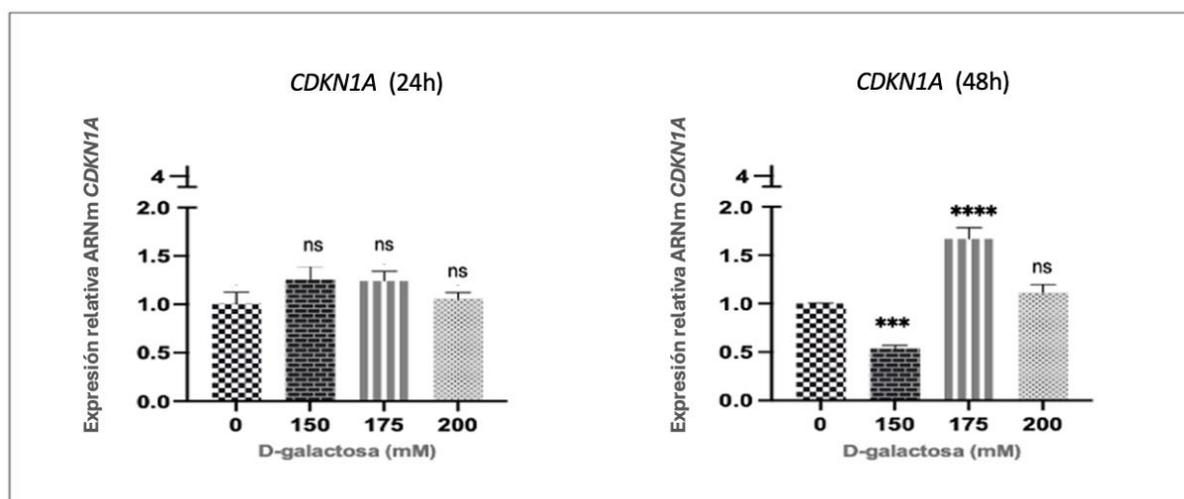


Figura 30. Niveles de expresión del ARNm de genes inhibidores del ciclo celular (*CDKN1A*) a las 24h y 48h. La evaluación se realizó mediante RT-qPCR en fibroblastos dérmicos humanos tratados con D-galactosa (0, 150, 175 y 200 mM). Los datos se normalizaron respecto a la expresión del gen de referencia (*ACTB*) y se presentan como expresión relativa en comparación con el control sin tratamiento (0 mM). Las barras corresponden al promedio de tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$; ns: no significativo). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

La expresión de *CDKN1A* a las 24 h de exposición a D-galactosa, no mostró cambios en los niveles de ARNm

para todas las concentraciones evaluadas (150 mM, 175 mM y 200 mM) en comparación con el control. A las 48 h, se observó un patrón de expresión más complejo, donde las células tratadas con 150 mM de D-galactosa mostraron una disminución significativa en la expresión de *CDKN1A* en comparación con el control. En contraste, las células expuestas a 175 mM de D-galactosa presentaron un aumento significativo en la expresión de *CDKN1A* (Figura 30), lo que se corresponde en mayor medida con el comportamiento esperado en células senescentes.

Dado que *CDKN1A* es un marcador tardío de senescencia, se evaluó su expresión a las 96 h. En la Figura 31 se observa una sobreexpresión de *CDKN1A* con 150 mM de D-galactosa en comparación con el control (0 mM). Estos resultados podrían indicar un efecto temporal del tratamiento con D-galactosa en la inducción del fenotipo senescente en los fibroblastos dérmicos.

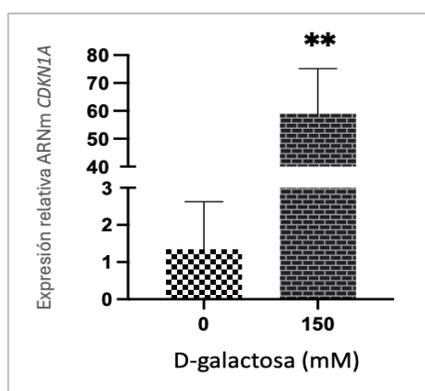


Figura 31. Niveles de expresión del ARNm de genes inhibidores del ciclo celular (*CDKN1A*) a las 96 h. La evaluación se realizó mediante RT-qPCR en fibroblastos dérmicos humanos tratados con D-galactosa (150 mM). Los datos se normalizaron respecto a la expresión del gen de referencia (*ACTB*) y se presentan como expresión relativa en comparación con el control sin tratamiento (0 mM). Las barras corresponden al promedio de tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control: (** $p < 0.01$). Prueba t-Student no pareada.

3.5 Co-cultivo celular de MSC precondicionadas con extractos herbales y fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk senescentes

Los fibroblastos senescentes expuestos a 150 mM de D-galactosa mostraron un aumento significativo ($p < 0.0001$) en la fluorescencia media de CFSE, lo que indica una reducción en su capacidad proliferativa y la presencia de un fenotipo senescente. Sin embargo, cuando estos fibroblastos fueron co-cultivados con MSC, se observó una reducción significativa en la MFI de CFSE en comparación con el grupo tratado únicamente con D-galactosa. Esto sugiere que las MSC fueron capaces de revertir parcialmente el fenotipo

senescente inducido en los fibroblastos por la D-galactosa. Por otro lado, el pretratamiento de las MSC con los extractos herbales de Triphala o Damiana no logró potenciar este efecto. En el caso del extracto de Tripala, se observó un aumento significativo en la MFI de CFSE en comparación con el grupo de fibroblastos co-cultivados solo con MSC, lo que podría indicar que este extracto afecta negativamente la actividad de las MSC, al reducir su capacidad para revertir el fenotipo senescente inducido en los fibroblastos.

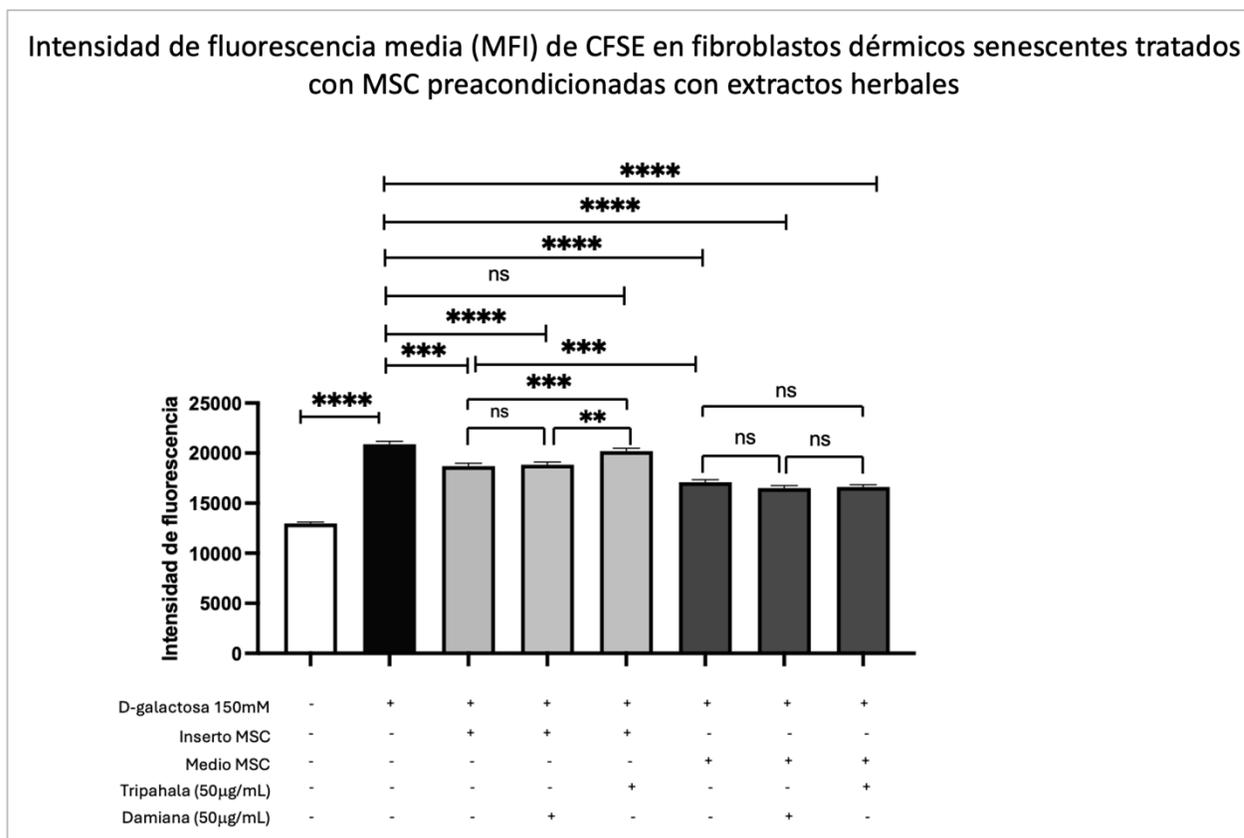


Figura 32. Intensidad de fluorescencia media (MFI) de CFSE en fibroblastos dérmicos tratados con D-galactosa y co-cultivado con MSC preconditionadas con extractos herbales. Las barras corresponden a la media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a las células tratadas únicamente con D-galactosa 150 mM: (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; ns: no significativo). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

3.5.1 Efecto de los extractos herbales en la expresión de genes de MSC

3.5.1.1 Extracción de ARN total

En la figura 33A, se muestra la concentración de ARN total de MSC expuestas a extractos herbales de

Damiana y Triphala a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (representado gráficamente por D50, D100, T50 y T100) por 24 h. En todos los casos, la relación de absorbancia 260/280 nm, indicativa de la pureza de las muestras, superó el valor de 1.80, lo cual es indicativo de una pureza aceptable de las mismas. La integridad del ARN total se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.6 %. Como se observa en la Figura 33B, todas las muestras exhiben bandas intactas y bien definidas, correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

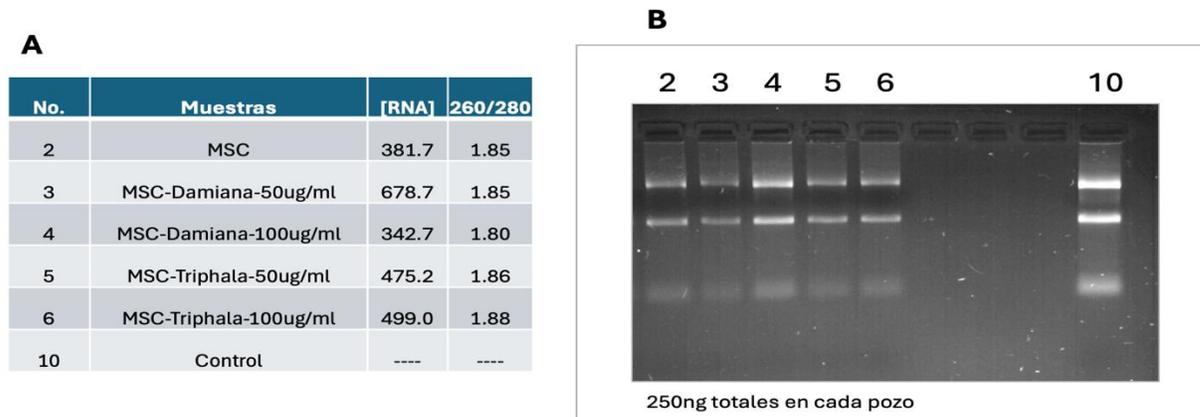


Figura 33. Extracción de ARN con Tri Reagent® en MSC expuestas a diferentes concentraciones de extractos herbales de Damiana y Triphala. A) Concentración de ARN total obtenida en la extracción con Tri Reagent®, de MSC, expuestas a diferentes concentraciones de extractos herbales de Damiana y Triphala a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B) Revisión de la integridad del ARN total en gel de agarosa al 1.6 %.

3.5.1.2 Evaluación de la expresión de genes asociados a senescencia celular en MSC

Dado que los resultados previos ponen en evidencia la limitada eficacia de los tratamientos con extractos de Damiana y Triphala en la modulación del fenotipo senescente inducido con la adición de D-galactosa, se evaluó el efecto de estos extractos sobre las MSC. Este ensayo se llevó a cabo mediante el análisis de la expresión de genes asociados a la senescencia celular (*IL6*, *CCN2*, *CDKN1A*, *COL1A1*, *TGFB1* y *MMP1*), los mismos genes que serían evaluados en el co-cultivo con fibroblastos senescentes. En este caso se consideró además una concentración mayor del extracto, para descartar que este fuera un factor de la no reversión del estado senescente.

Los resultados del análisis de expresión génica en MSC tratadas con extractos de Damiana y Triphala a concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D50, D100, T50 y T100, respectivamente) revelaron alteraciones estadísticamente significativas en genes asociados a la senescencia celular (Figura 34). En lo que respecta a los genes involucrados en la remodelación de la matriz extracelular, se observó una

reducción significativa de *MMP-1* en todos los tratamientos en comparación con el control MSC ($p < 0.01$ para MSC-D50 y $p < 0.001$ para los demás tratamientos). La expresión de *COL1A1* disminuyó pronunciadamente con los tratamientos de Damiana (D50 y D100, $p < 0.0001$), seguida de un incremento significativo con los tratamientos de Triphala (T50 y T100, $p < 0.001$). Asimismo, *CCN2* mostró una reducción significativa con los tratamientos D100 y T100 ($p < 0.01$). En cuanto a los genes relacionados con la respuesta inflamatoria, *IL6* presentó un aumento significativo en su expresión con el tratamiento T50 ($p < 0.01$). Por otro lado, *TGFB1* exhibió una disminución significativa con los tratamientos T50 ($p < 0.05$) y T100 ($p < 0.01$). Finalmente, la expresión del inhibidor del ciclo celular *CDKN1A*, un marcador clave de senescencia, mostró un incremento estadísticamente significativo con los tratamientos T50 y T100 ($p < 0.0001$).

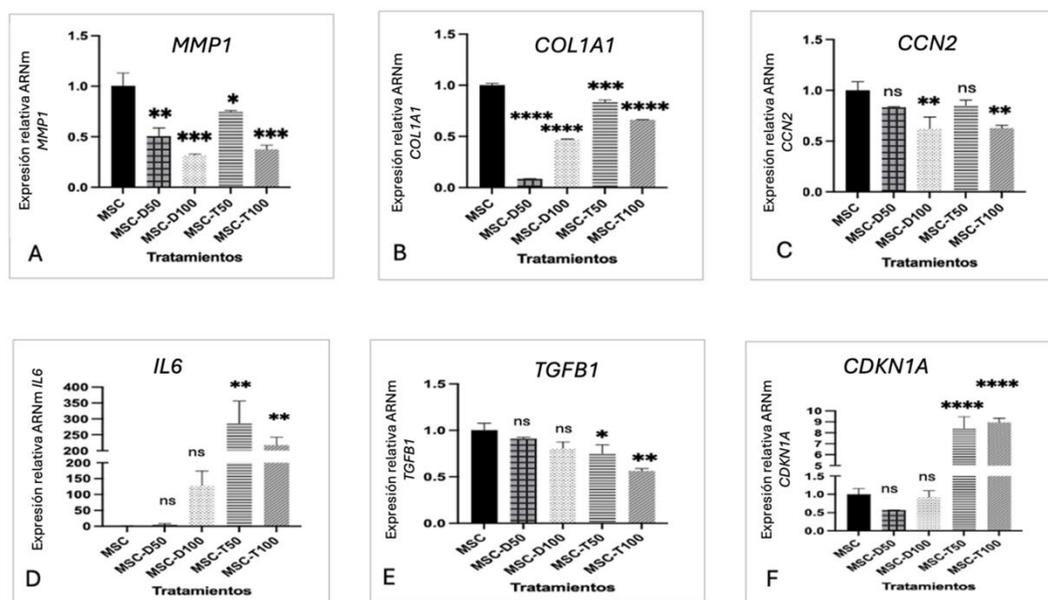


Figura 34. Niveles de expresión del ARNm de *MMP1*, *COL1A1*, *CCN2*, *IL6*, *TGFB1* y *CDKN1A* en MSC pretratadas con extractos herbales durante 24 h. La evaluación se realizó mediante RT-qPCR en MSC pretratadas con extractos herbales de Damiana y Triphala (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos se normalizaron respecto a la expresión del gen de referencia (*ACTB*) y se presentan como expresión relativa en comparación con el control sin tratamiento (MSC). Las barras corresponden al promedio de tres réplicas técnicas \pm desviación estándar. Genes asociados a la remodelación de la matriz extracelular (A-C), genes asociados a los procesos inflamatorios (D y E) y gen asociado con la inhibición del ciclo celular (F). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (MSC): (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; ns: no significativo). ANOVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett.

Capítulo 4. Discusión

El propósito de la presente investigación fue evaluar el potencial de extractos herbales para revertir la senescencia en fibroblastos dérmicos a través de la actividad de células madre mesenquimales. Los antecedentes bibliográficos han señalado la importancia de la utilización de extractos herbales como una estrategia prometedora coadyuvante a la terapia celular, debido a sus diversas propiedades bioactivas (Li et al., 2022). Estos extractos, ricos en compuestos fitoquímicos, han demostrado potencial para modular procesos celulares fundamentales que incluyen la proliferación, la diferenciación y la senescencia (Udalamaththa et al., 2016). La incorporación de estos agentes naturales en protocolos de terapia celular, ofrece la posibilidad de mejorar la eficacia de los tratamientos, mientras se minimizan los efectos secundarios asociados con terapias convencionales (Wang et al., 2023). En este contexto, la Damiana, conocida por sus efectos farmacológicos, especialmente por sus acciones antioxidantes y antibacterianas, ha demostrado ser una fuente potencial de compuestos antifotoenvejecimiento (Kim et al., 2022). Por otro lado, la Triphala, una formulación tradicional de la medicina ayurvédica, ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y rejuvenecedoras a nivel celular (Peterson et al., 2017). La investigación de estos extractos en el contexto de la terapia celular abre nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras, particularmente en el campo de la medicina regenerativa y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

La obtención de extractos mediante métodos acuosos (Triphala) e hidroalcohólicos (Damiana) reveló diferencias significativas en sus propiedades organolépticas y rendimientos, cuyas diferencias están en correspondencia con lo reportado para ambos métodos de extracción por Ghasemzadeh et al. (2018). El extracto acuoso mostró un rendimiento de 36.1 %; mientras que el extracto hidroalcohólico, presentó un rendimiento de 7.8 %. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Kim et al. (2022), los cuales obtuvieron un rendimiento de 7.38 % de su extracto hidroalcohólico de Damiana.

La variación en los rendimientos, así como, algunas propiedades organolépticas particulares entre ambos métodos de extracción, indica que cada técnica puede ser más efectiva para aislar compuestos bioactivos específicos en cada caso. Los extractos acuosos, suelen ser más ricos en compuestos polares (mayoritariamente hidrofílicos) como polifenoles (taninos y flavonoides), ácido gálico, carbohidratos, entre otros (Peterson et al., 2017); mientras que los extractos etanólicos pueden contener una mayor proporción de compuestos menos polares como algunos flavonoides y terpenos (Kim et al., 2022). De igual manera, la posible degradación o pérdida de algunos compuestos bioactivos durante el proceso de

extracción, pudo verse afectada por la temperatura empleada en cada caso, la cual puede influir en la composición química de la planta (Ran et al., 2021).

Aunque no se realizó un análisis bioquímico de los extractos en este estudio, es importante reconocer que esta caracterización es una perspectiva crucial para futuras investigaciones. El mayor rendimiento del extracto acuoso no implica necesariamente una concentración superior o diversidad de compuestos bioactivos específicos (Ocampo et al., 2014). La composición fitoquímica puede variar significativamente según el método de extracción, y ciertos compuestos podrían estar más concentrados en el extracto etanólico a pesar de su menor rendimiento. Por tal motivo, una caracterización fitoquímica exhaustiva y ensayos de actividad biológica para moléculas específicas en ambos extractos son esenciales para comprender plenamente su potencial terapéutico.

En los ensayos de viabilidad realizados con el reactivo MTS, tanto el extracto de Damiana como el de Triphala demostraron ser viables en todas las concentraciones evaluadas. Estos resultados son consistentes con los hallazgos reportados por otros investigadores, como Kim et al. (2022), quienes también observaron una alta viabilidad celular frente a extractos similares en diversos tipos celulares, lo que sugiere que estos extractos podrían ser seguros para su uso en diferentes aplicaciones terapéuticas.

La senescencia celular es un estado en el cual las células pierden permanentemente su capacidad de dividirse, principalmente debido a factores como el acortamiento de los telómeros o el daño acumulado en el ADN, lo que resulta en el arresto del ciclo celular (Campisi, 2014). El CFSE fue utilizado en nuestros ensayos como marcador fluorescente para evaluar la proliferación celular. Este compuesto se distribuye en el interior de las células durante la división, al reducir su intensidad de fluorescencia de forma proporcional en cada ciclo de replicación. Así, cada célula hija recibe aproximadamente la mitad del contenido de CFSE presente en la célula madre (Pereira et al., 2020). De este modo, el CFSE permitió evaluar la capacidad de división celular al evidenciar las diferencias en la tasa de proliferación entre las distintas condiciones experimentales.

Dada la relevancia de seleccionar una concentración óptima del CFSE, para evitar efectos adversos en la viabilidad celular, se estandarizó la concentración de este marcador mediante la evaluación de diferentes concentraciones por citometría de flujo y microscopía (0 μ M, 1.25 μ M, 2.5 μ M y 5.0 μ M). Como se observó, al aumentar la concentración de CFSE, también se incrementó la intensidad de fluorescencia, lo que generó señales más intensas a concentraciones elevadas. Sin embargo, concentraciones superiores o igual a 2.5 μ M mostraron una clara disminución en el porcentaje de células proliferantes, lo que sugiere que las

concentraciones más altas del marcador inducen citotoxicidad, al comprometer la viabilidad celular. Este fenómeno se ha reportado previamente en la literatura, donde el CFSE, al actuar como un marcador intracelular fluorescente, puede interferir con los procesos celulares cuando se utiliza en concentraciones elevadas, al disminuir la proliferación (Quah et al., 2007). Asimismo, Lašt'ovička et al. (2009) reportaron la disminución gradual de la viabilidad celular con el aumento de la concentración de CFSE, tanto en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), como en una línea celular de leucemia (L1210). Estos resultados subrayan un efecto citotóxico generalizado del CFSE a concentraciones altas, independientemente del tipo celular. Finalmente, 2.0 μM de CFSE fueron suficientes para marcar las células de manera efectiva, lo que permitió una clara discriminación en la proliferación celular, sin comprometer su morfología.

La D-galactosa es un monosacárido simple ampliamente utilizado en estudios para inducir senescencia celular debido a su capacidad de generar estrés oxidativo y productos de glicación avanzada (AGEs), lo que interfiere con la proliferación celular y compromete la integridad funcional de las células (Song et al., 1999; Cui et al., 2006). Diversas investigaciones han reportado cómo la administración crónica de D-galactosa provoca un envejecimiento acelerado en modelos animales al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectar las funciones mitocondriales (Ho et al., 2003; Cui et al., 2006).

El efecto mostrado de diferentes concentraciones de D-galactosa sobre fibroblastos dérmicos humanos CCD-112Sk se corresponden con la investigación realizada por Zhang et al. (2022), los cuales establecieron un modelo de senescencia celular mediante la inducción de estrés oxidativo en células de núcleo pulposo en los discos intervertebrales degenerativos. En esta investigación, se demostró que hubo un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia, así como, una disminución en el número de células a medida que aumenta la concentración de D-galactosa. Esto sugiere que la D-galactosa induce estrés oxidativo y compromete la viabilidad celular de manera dosis-dependiente. A pesar de las diferencias en los tipos celulares y las unidades de medida utilizadas, nuestras observaciones revelaron un efecto dependiente de la concentración de D-galactosa sobre la proliferación y morfología celular, con concentraciones óptimas de 150-175 mM (27-31.5 g/L) para inducir senescencia. Por otro lado, Zhang et al. (2022) observaron un aumento significativo en marcadores de estrés oxidativo y daño celular en concentraciones similares (25-50 g/L), lo que sugiere que la exposición a estos niveles puede comprometer la integridad celular y alterar diversas funciones metabólicas, al contribuir al daño tisular y exacerbar procesos degenerativos, lo cual puede estar relacionado con los resultados obtenidos en esta investigación. Estos hallazgos refuerzan la idea de que el equilibrio redox es crucial para mantener la homeostasis celular frente a factores estresantes (Sharifi-Rad et al., 2020). Los resultados obtenidos donde

observamos una reducción evidente en el número de células y cambios morfológicos significativos a concentraciones más altas (300-450 mM, 54-81 g/L), se corresponden con la disminución de la viabilidad celular mostrada por Sharifi-Rad et al. (2020) a una concentración de 100 g/L. De igual manera, García-Trejo et al. (2024), indicaron que el aumento en la concentración de D-galactosa se correlaciona directamente con un incremento del estrés oxidativo en células renales LLC-PK1 y HK-2. Este incremento del estrés oxidativo se manifiesta como un indicador clave de senescencia celular (Ho et al., 2003), lo que sugiere que la exposición a niveles elevados de D-galactosa puede acelerar el proceso de envejecimiento celular a través de la inducción de daño oxidativo.

La relación inversa de la concentración de D-galactosa con la viabilidad celular y la proliferación, también fue demostrado por Xu et al. (2020) en células de glioblastoma. Aunque los protocolos experimentales difieren, las concentraciones seleccionadas en nuestro estudio se alínean con el rango utilizado por estos autores, lo que respalda nuestra elección y sugiere una consistencia en los efectos de la D-galactosa sobre diferentes tipos celulares. La disminución gradual de la viabilidad y proliferación celular observada es característica de la inducción de un estado senescente, que respalda el uso de D-galactosa como un inductor efectivo de senescencia *in vitro* en fibroblastos. Estos hallazgos no solo proporcionan un modelo útil para el estudio de la senescencia, sino que también se corresponden con los resultados reportados en modelos de degeneración del disco intervertebral, al sugerir que el efecto de la D-galactosa sobre la viabilidad y proliferación celular puede ser un fenómeno común en diversos tipos de células del tejido conectivo (Pan et al., 2021; Zhang et al., 2022).

Se seleccionaron las concentraciones de 150 mM y 175 mM de D-galactosa para los ensayos posteriores, ya que fueron las concentraciones más bajas que mostraron un aumento significativo en el número de células que dejaron de proliferar en comparación con el control. Estas concentraciones son inferiores a los 222 mM empleados por Pan et al. (2021) en su estudio sobre senescencia de fibroblastos dérmicos adultos, pero dentro de un rango efectivo para inducir senescencia.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la expresión génica, indican que la inducción de senescencia mediante D-galactosa (150mM) tiene un impacto negativo significativo en la expresión de colágeno tipo I (*COL1A1*), al reducir la síntesis de matriz extracelular, consistente con los cambios observados en células senescentes (Varani et al., 2006). La respuesta más pronunciada a las 24 h podría interpretarse como una fase aguda de adaptación al estrés oxidativo inducido por D-galactosa (García-Trejo et al., 2024), mientras que la diferencia entre 24 h y 48 h podría indicar la activación de mecanismos compensatorios o adaptativos (Tominaga, 2015). Estos hallazgos son similares a los observados en otros modelos de

senescencia, como la inducida por radiación de luz UV o envejecimiento cronológico (Fisher et al., 2002), lo que sugiere que la D-galactosa podría activar vías de señalización comunes a diversos inductores de senescencia.

El aumento significativo en la expresión de *MMP1* en respuesta al tratamiento con D-galactosa, especialmente pronunciado a las 48 h, es consistente con el fenotipo senescente y sugiere una alteración importante en la homeostasis de la matriz extracelular. Este incremento, asociado al fenotipo secretor de la senescencia (SASP) (Freund et al., 2010), podría contribuir a la degradación del colágeno y a la remodelación de la matriz extracelular, procesos característicos del envejecimiento tisular (Quan et al., 2009). Es posible que la D-galactosa induzca la expresión de MMP, que son mediadoras clave de la degradación del colágeno observada en tejidos envejecidos (Fisher et al., 2002), de ahí que la sobreexpresión de *MMP1* tiene implicaciones en la integridad estructural de los tejidos, al contribuir con cambios fenotípicos del envejecimiento como la pérdida de elasticidad en la piel o la degeneración del cartílago articular (Pittayapruek et al., 2016). La respuesta prolongada sugiere un punto crítico en la progresión del fenotipo senescente inducido por D-galactosa, como indican observaciones previas de Quan et al. (2009) sobre la reducción en la expresión de genes relacionados con la matriz extracelular en piel envejecida.

En el caso de la expresión de *TGFB1* en células senescentes inducidas por D-galactosa muestran una regulación compleja y dependiente del tiempo. A las 24 h no se observan cambios significativos en la expresión de *TGFB1* en respuesta a diferentes concentraciones de D-galactosa, excepto para 150mM, lo que podría indicar una respuesta celular inicial que busca mantener la homeostasis. Sin embargo, a las 48 h, se evidencia una regulación a la baja significativa de *TGFB1* a concentraciones moderadas de D-galactosa (150 mM), efecto que no se mantiene a concentraciones más altas. Este patrón podría estar relacionado con la maduración de fibroblastos (Desmoulière et al., 1993) y como mecanismo protector contra la activación excesiva de vías profibróticas (Barrientos et al., 2008). La complejidad en la regulación de *TGFB1* en este contexto concuerda con sus roles conocidos en el ambiente tumoral donde el TGF β inhibe el desarrollo de los tumores al suprimir la progresión del ciclo celular y promover la apoptosis. Sin embargo, en las últimas etapas, el TGF β aumenta la invasividad y la metástasis del tumor, de este modo puede actuar tanto como factor pro-senescencia como componente del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (Massagué, 2008). La disminución observada a las 48 h podría ser un intento de mitigar los efectos pro-fibróticos y pro-inflamatorios de TGF- β 1 en el contexto del estrés celular inducido por D-galactosa. Una inhibición en la expresión del gen de TGF- β podría estar vinculado a la disminución en la expresión de

COL1A1, observada en esta investigación, ya que TGF- β juega un papel crucial en la regulación de su expresión (Quan et al., 2002).

La expresión dinámica de *IL6* en respuesta al tratamiento con D-galactosa revela un patrón complejo que refleja las diferentes fases de la respuesta celular a la senescencia. La disminución inicial a las 24 h podría representar un intento de la célula por mantener la homeostasis frente al estrés agudo, posiblemente a través de mecanismos de retroalimentación negativa (Maggio et al., 2006). Sin embargo, el aumento drástico observado a las 48 h, particularmente con 150 mM de D-galactosa, es consistente con el fenómeno de "*inflammaging*" característico del proceso de senescencia celular, como lo han descrito Franceschi y Campisi (2014). Este aumento significativo de *IL6* podría contribuir a la inflamación crónica asociada con el envejecimiento y jugar un papel crucial en el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (Coppé et al., 2010). Además, la sobreexpresión de *IL6* podría tener efectos paracrinos, al influir en las células vecinas y potencialmente propagar el fenotipo senescente en el tejido, como lo sugieren los estudios de Acosta et al. (2013). Esta respuesta inflamatoria sostenida podría contribuir a diversas patologías asociadas con la edad, como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Rea et al., 2018). Asimismo, en un estudio donde se indujo estrés celular mediante la privación de oxígeno y glucosa (OGD) se evidenció un aumento en la expresión de *IL6* y la producción de colágeno a través de IL11 (Song et al., 2022), mientras que nuestros resultados con D-galactosa revelan un patrón más complejo. *IL6* aumenta inicialmente, pero disminuye a concentraciones más altas, y *COL1A1* se reduce de manera dependiente de la dosis, lo que sugiere diferencias en cómo ambos estímulos modulan el SASP y la matriz extracelular.

El aumento significativo en la expresión de *CCN2*, especialmente a las 48 h de exposición a D-galactosa, sugiere una fuerte activación de vías profibróticas en células senescentes, consistente con estudios previos sobre envejecimiento y fibrosis (Leask et al., 2009). Este incremento sostenido podría indicar una respuesta adaptativa a largo plazo, potencialmente al contribuir a la fibrosis tisular característica de tejidos envejecidos (Jeon et al., 2018). Nuestros resultados difieren de Kim et al. (2004), quienes describieron una regulación positiva de *CCN2* mediada por *TGFB1* en senescencia replicativa. La falta de correlación directa entre *TGFB1* y *CCN2* en nuestro modelo de senescencia inducida por D-galactosa sugiere mecanismos regulatorios adicionales, posiblemente debido a la activación de vías de señalización alternativas o cambios en la sensibilidad celular a *TGFB1*. Estas diferencias podrían explicarse por la naturaleza distinta de la senescencia inducida por estrés frente a la replicativa, o por una respuesta bifásica donde la expresión inicial de *TGFB1* desencadena mecanismos de retroalimentación que regulan posteriormente tanto su propia expresión como la de *CCN2* de manera diferencial.

La expresión de *CDKN1A* en respuesta al tratamiento con D-galactosa subraya la complejidad de los mecanismos de regulación del ciclo celular durante la inducción de senescencia. El aumento leve y no significativo observado a las 24 h, podría reflejar una respuesta inicial al estrés celular, en la que las células activan mecanismos de control del ciclo celular como una medida de protección temprana, en línea con lo sugerido por Stein et al. (1999). Esto concuerda con el papel de *CDKN1A* como mediador clave en la respuesta al estrés celular y regulador del punto de control G1/S (Barnouin et al., 2002). A las 48 h el incremento significativo de *CDKN1A* observado con 175 mM de D-galactosa se ajusta a lo esperado en células senescentes, dado que *CDKN1A* actúa como un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (CDK), lo que facilita la detención del ciclo celular característica de la senescencia (Herbig et al., 2004). La variabilidad en la expresión de *CDKN1A*, en función de la concentración de D-galactosa y del tiempo de exposición, sugiere que la senescencia inducida por este tratamiento podría seguir una cinética compleja, probablemente al involucrar múltiples vías de señalización, como las vías p53/p21 y p16/pRb (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). Estos cambios en la expresión génica y en la dinámica de la matriz extracelular reflejan cómo la senescencia inducida por D-galactosa puede alterar la homeostasis tisular. Los resultados obtenidos en esta investigación, resaltan la necesidad de un análisis más profundo para comprender completamente los mecanismos subyacentes en la regulación del ciclo celular durante la senescencia inducida por D-galactosa.

En los ensayos para la evaluación de la actividad de SA- β -gal, desde las 48 h, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$, $p < 0.01$) en los fibroblastos tratados con D-galactosa en comparación con el grupo control (células sin tratamiento). A las 72 y 96 horas, las concentraciones evaluadas de D-galactosa (150 mM y 175 mM) exhibieron niveles elevados de fluorescencia, lo que refuerza la idea de que la senescencia celular aumenta con el tiempo y la concentración del compuesto. A las 96 h, se observó un aumento en el número de células senescentes en el grupo control, posiblemente debido a la proliferación celular en condiciones de cultivo prolongadas. Esto resalta la importancia de considerar el comportamiento celular en los controles. Los hallazgos obtenidos son consistentes con estudios previos que han demostrado que la D-galactosa puede inducir senescencia en fibroblastos y otras células (Xu et al., 2020; Liu et al., 2022). Si bien estos ensayos realizados al final de la metodología confirmaron los resultados obtenidos por citometría de flujo, será crucial repetirlos debido a las modificaciones realizadas en las especificaciones del reactivo del fabricante. Esto permitirá establecer rigurosamente todas las condiciones experimentales, para garantizar la reproducibilidad de los ensayos y obtener resultados consistentes que refuercen las conclusiones obtenidas en este estudio.

El co-cultivo con MSC tuvo un papel significativo ($p < 0.001$, $p < 0.0001$) en la reversión del fenotipo

senescente en fibroblastos expuestos a D-galactosa, evidenciado por la reducción de la MFI de CFSE en comparación con los fibroblastos tratados únicamente con D-galactosa. Esto concuerda con estudios que han destacado el potencial regenerativo de las MSC debido a su capacidad para modular el microambiente celular (Shi et al., 2018). Sin embargo, el acondicionamiento de las MSC con extractos herbales, como Triphala y Damiana, no mejoró su capacidad para revertir la senescencia en fibroblastos expuestos a D-galactosa, e incluso se observaron efectos adversos, como el aumento de la MFI de CFSE con Triphala. Aunque estudios previos han destacado las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antienviejimiento de estos extractos herbales (Kim et al., 2022; Wang et al., 2023), los resultados sugieren que la interacción de los compuestos bioactivos de los extractos herbales con las MSC podría afectar negativamente sus propiedades terapéuticas. Aunque los extractos crudos pueden mostrar beneficios, su eficacia puede disminuir durante su obtención, y el uso de diferentes disolventes para prepararlos puede generar efectos adversos, al reducir la efectividad de los compuestos activos. Esto resalta la importancia de estandarizar los procesos y evaluar cuidadosamente las interacciones antes de su uso en estrategias de acondicionamiento celular (Udalamaththa et al., 2016).

La viabilidad celular y las propiedades regenerativas de las MSC, se vieron afectadas al acondicionar estas células con extractos herbales de Damiana y Triphala, lo cual fue corroborado con la evaluación de la expresión de genes asociados a la senescencia celular. La reducción significativa de *MMP1* en todos los tratamientos indica una disminución en la capacidad de remodelación de la matriz extracelular, crucial para la función de las MSC (Almalki y Agrawal, 2016). La disminución de *COL1A1* con los tratamientos de Damiana, así como el incremento observado con Triphala, sugiere una alteración en la síntesis de colágeno, fundamental para la integridad del tejido (Varani et al., 2006). La reducción de *CCN2* con altas concentraciones de ambos extractos podría afectar la diferenciación y la respuesta a factores de crecimiento de las MSC (Li et al., 2012). Asimismo, el aumento de *IL6* y la disminución de *TGFβ1* con extracto de Triphala indican una modulación del perfil inflamatorio de las MSC, potencialmente al alterar su capacidad inmunomoduladora (Ma et al., 2014). Notablemente, el incremento altamente significativo de *CDKN1A* con Triphala sugiere una fuerte inducción de la detención del ciclo celular, característico de la senescencia (Herbig et al., 2004). Estos hallazgos en conjunto evidencian la incapacidad de los extractos herbales, particularmente Triphala, en el acondicionamiento de las MSC para la reversión de la senescencia en fibroblastos expuestos a 150 mM de D-galactosa. Además, resaltan los posibles efectos adversos que estos extractos herbales podrían tener sobre las propiedades terapéuticas de las MSC, al comprometer su capacidad para mitigar el fenotipo senescente en este modelo experimental.

Otro factor clave que podría influir en estos resultados, es el número de pasajes al que se someten las MSC

durante su cultivo *in vitro*, lo cual constituye es un aspecto crucial que afecta su capacidad terapéutica. En pases avanzados, las MSC experimentan senescencia replicativa, lo que se traduce en cambios significativos en su morfología, perfil de expresión génica y propiedades regenerativas (Wagner et al., 2008; Li et al., 2012). En contraste, en pases tempranos, las MSC mantienen su capacidad de secretar factores paracrinos, que tienen efectos regenerativos y antienvjecimiento, lo que las hace más efectivas en su aplicación (Bonab et al., 2006). Estos cambios subrayan la importancia de considerar el número de pases al utilizar MSC en tratamientos, ya que su efectividad puede disminuir considerablemente en pases avanzados debido a la senescencia celular (Turinetto et al., 2016).

Los resultados obtenidos en este estudio aunque no respaldan la hipótesis planteada, constituyen un primer acercamiento al establecimiento de un modelo *in vitro* de inducción de senescencia, mediante la adición controlada de D-galactosa en fibroblastos dérmicos.

Capítulo 5. Conclusiones

Los extractos acuoso e hidroalcohólico de Triphala y Damiana, respectivamente, en las concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no afectaron la viabilidad celular de MSC y fibroblastos, lo que permitió establecer un rango seguro de concentraciones para el acondicionamiento celular.

El modelo de senescencia propuesto en este proyecto, fue validado a través de parámetros, tales como: la expresión de genes asociados a la senescencia, la medición de la actividad de SA- β -gal, la reducción en la proliferación celular y los cambios morfológicos observados. Donde se demostró que una concentración de 150 mM de D-galactosa permitió observar los cambios relacionados con la senescencia.

Las MSC por sí solas demostraron su capacidad para revertir el fenotipo senescente en los fibroblastos tratados con 150 mM de D-galactosa, lo que confirmó su potencial terapéutico en la regeneración de tejidos como la piel, afectados por la senescencia celular.

Los extractos herbales de Triphala y Damiana no lograron potenciar el efecto protector de las MSC sobre los fibroblastos senescentes. Particularmente, el extracto de Triphala en las condiciones evaluadas, indujo modificaciones en las MSC que podrían promover mecanismos asociados al envejecimiento celular.

Estos hallazgos, aunque no respaldan el uso de dichos extractos para revertir la senescencia, constituyen un acercamiento al establecimiento de un modelo *in vitro* de inducción de senescencia mediante la adición controlada de D-galactosa, de utilidad para futuros estudios sobre modulación del envejecimiento celular.

Literatura citada

- Abdal Dayem, A., Lee, S. B., Kim, K., Lim, K. M., Jeon, T., Seok, J., & Cho, S-G. (2019). Production of mesenchymal stem cells through stem cell reprogramming. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1922. <https://doi.org/10.3390/ijms20081922>
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T-W., Lasitschka, F., Andrusis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longerich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., & Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, 15(8), 978-990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Alcaraz-Meléndez, L., Delgado-Rodríguez, J., & Real-Cosío, S. (2004). Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 75(7-8), 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.09.001>
- Alcaraz-Meléndez, L., Real-Cosío, S., & Bashan, Y. (1994). Domestication of micropropagated plants of the spice Damiana (*Turnera diffusa*). *Plant Cell Reports*, 13(12), 679-682. <https://doi.org/10.1007/BF00231623>
- Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7, 129. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0393-1>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184-189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonina, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L., & van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232-236. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
- Barnouin, K., Dubuisson, M. L., Child, E. S., Fernandez de Mattos, S., Glassford, J., Medema, R. H., Mann, D. J., & Lam, E. W-F. (2002). H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13761-13770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111123200>
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Perspective article: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585-601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506. <https://doi.org/10.1038/nrd2060>
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), 961-976. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.013>

- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., & Nikbin, B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology*, 7, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14>
- Bulbiantkova, D., Díaz-Puertas, R., Álvarez-Martínez, F. J., Herranz-López, M., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2023). Hallmarks and biomarkers of skin senescence: an updated review of skin senotherapeutics. *Antioxidants*, 12(2), 444. <https://doi.org/10.3390/antiox12020444>
- Campisi, J. (2014). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, 75, 685-705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729-740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Chandran, B., & Goel, A. (2012). A Randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phytotherapy Research*, 26(11), 1719-1725. <https://doi.org/10.1002/ptr.4639>
- Charles-de-Sá, L., Gontijo-de-Amorim, N. F., Maeda Takiya, C., Borojevic, R., Benati, D., Bernardi, P., Sbarbati, A., & Rigotti, G. (2015). Antiaging Treatment of the Facial Skin by Fat Graft and Adipose-Derived Stem Cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 135(4), 999-1009. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000001123>
- Chen, M., Feng, W., Cao, H., Zou, L., Chen, C., Baatrup, A., Nielsen, A. B., Li, H., Kassem, M., Zou, X., & Bünger, C. (2009). A traditional Chinese medicine formula extracts stimulate proliferation and inhibit mineralization of human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.013>
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., & Ames, B. N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4337-4341. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4337>
- Chikenji, T., Fujimiya, M., Saito, Y., Nakano, M., Konari, N., & Otani, M. (2021). *Cell sheet for vital transplantation and method for producing same* (EP3786280A1). European Patent Office. <https://patentimages.storage.googleapis.com/fc/45/ba/3b5d331d144cee/EP3786280A1.pdf>
- Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, 354(6311), 472-477. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6659>
- Chin, T., Lee, X. E., Ng, P. Y., Lee, Y., & Dreesen, O. (2023). The role of cellular senescence in skin aging and age-related skin pathologies. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1297637>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5, 99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of

- oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, 6(12), e301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J., Packer, L., & Liu, J. (2006). Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: Protective effects of R- α -lipoic acid. *Journal of Neuroscience Research*, 83(8), 1584-1590. <https://doi.org/10.1002/jnr.20845>
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J., & Toussaint, O. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- β 1 signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 118(4), 743-758. <https://doi.org/10.1242/jcs.01651>
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., & Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 122(1), 103-111. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.103>
- Di Giacomo, C., Vanella, L., Sorrenti, V., Santangelo, R., Barbagallo, I., Calabrese, G., Genovese, C., Mastrojeni, S., Ragusa, S., & Acquaviva, R. (2015). Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray extract on adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 10(4), e0122320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122320>
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75-95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2013). Characteristics of the aging skin. *Advances in Wound Care*, 2(1), 5-10. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0356>
- Fernández-Garza, L. E., Barrera-Barrera, S. A., & Barrera-Saldaña, H. A. (2023). Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World. *Pharmaceuticals*, 16(9), 1334. <https://doi.org/10.3390/ph16091334>
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., & Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of Dermatology*, 138(11), 1462-1470. <https://doi.org/10.1001/archderm.138.11.1462>
- Fisher, G. J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Cho, M. K., He, T., Varani, J., Kang, S., & Voorhees, J. J. (2009). Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin. *The American Journal of Pathology*, 174(1), 101-114. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080599>
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(Suppl 1), S4-S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>

- Franco, A. C., Aveleira, C., & Cavadas, C. (2022). Skin senescence: mechanisms and impact on whole-body aging. *Trends in Molecular Medicine*, 28(2), 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.12.003>
- Freund, A., Orjalo, A. v., Desprez, P-Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*, 16(5), 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>
- Fullard, N., Wordsworth, J., Welsh, C., Maltman, V., Bascom, C., Tasseff, R., Isfort, R., Costello, L., Scanlan, R.L., Przyborski, S., & Shanley, D. (2024). Cell senescence-independent changes of human skin fibroblasts with age. *Cells*, 13(8), 659. <https://doi.org/10.3390/cells13080659>
- García-Trejo, S. S., Gómez-Sierra, T., Eugenio-Pérez, D., Medina-Campos, O. N., & Pedraza-Chaverri, J. (2024). Protective effect of curcumin on D-galactose-induced senescence and oxidative stress in LLC-PK1 and HK-2 cells. *Antioxidants*, 13(4), 415. <https://doi.org/10.3390/antiox13040415>
- Gasperin-Bulbarela, J. (2021). Caracterización de la actividad antifibrótica de dominios vNAR neutralizantes de TGF- β en modelos dérmicos. [Tesis de Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional: https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3594/1/tesis_Jahaziel%20Gasperin%20Bulbarela_06%20%20ago%202021.pdf
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Bukhori, M. F. M., Rahmat, M. H., & Rahmat, A. (2018). Assessment and comparison of phytochemical constituents and biological activities of bitter bean (*Parkia speciosa* Hassk.) collected from different locations in Malaysia. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0377-6>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M., & Demaria, M. (2019). Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, 179(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Gunn, D. A., de Craen, A. J. M., Dick, J. L., Tomlin, C. C., van Heemst, D., Catt, S. D., Griffiths, T., Ogden, S., Maier, A. B., Murray, P. G., Griffiths, C. E. M., Slagboom, P. E., Westendorp, R. G. J., & Kritchevsky, S. (2013). Facial appearance reflects human familial longevity and cardiovascular disease risk in healthy individuals. *The Journals of Gerontology: Series A*, 68(2), 145-152. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls154>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular Cell*, 14(4), 501-513. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00256-4)

- Ho, S-C., Liu, J-H., & Wu, R-Y. (2003). Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology*, 4(1), 15-18. <https://doi.org/10.1023/A:1022417102206>
- Huang, S-H., Lin, C-M., & Chiang, B-H. (2008). Protective effects of angelica sinensis extract on amyloid β -peptide-induced neurotoxicity. *Phytomedicine*, 15(9), 710-721. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.02.022>
- Jeon, O. H., David, N., Campisi, J., & Elisseeff, J. H. (2018). Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1229-1237. <https://doi.org/10.1172/JCI95147>
- Jiao, T., Wang, Y., Lin, X., Song, W., Wang, L., Rahman, T. M. S., Xu, L., Nie, L., Zhang, Q., & Li, J. (2023). Axitinib targets cardiac fibrosis in pressure overload-induced heart failure through VEGFA-KDR pathway. *Frontiers in Medicine*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1256156>
- Jo, H., Brito, S., Kwak, B. M., Park, S., Lee, M-G., & Bin, B-H. (2021). Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2410. <https://doi.org/10.3390/ijms22052410>
- Juárez, P., Mohammad, K. S., Yin, J. J., Fournier, P. G. J., McKenna, R. C., Davis, H. W., Peng, X. H., Niewolna, M., Javelaud, D., Chirgwin, J. M., Mauviel, A., & Guise, T. A. (2012). Halofuginone Inhibits the Establishment and Progression of Melanoma Bone Metastases. *Cancer Research*, 72(23), 6247-6256. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1444>
- Kim, K-H., Park, G-T., Lim, Y-B., Rue, S-W., Jung, J-C., Sonn, J-K., Bae, Y-S., Park, J-W., & Lee, Y-S. (2004). Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor- β -mediated signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(4), 819-825. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.108>
- Kim, M., Ha, L-K., Oh, S., Fang, M., Zheng, S., Bellere, A. D., Jeong, J., & Yi, T-H. (2022). Antiphotaging effects of Damiana (*Turnera diffusa*) leaves extract via regulation AP-1 and Nrf2/ARE signaling pathways. *Plants*, 11(11), 1486. <https://doi.org/10.3390/plants11111486>
- Kim, Y-J., Seo, D. H., Lee, S. H., Lee, S-H., An, G-H., Ahn, H-J., Kwon, D., Seo, K-W., & Kang, K-S. (2018). Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 16, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.10.007>
- Kobayashi, D., Hirayama, M., Komohara, Y., Mizuguchi, S., Wilson Morifuji, M., Ihn, H., Takeya, M., Kuramochi, A., & Araki, N. (2014). Translationally Controlled Tumor Protein Is a Novel Biological Target for Neurofibromatosis Type 1-associated Tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26314-26326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.568253>
- Kongros, K., Bunyaratvej, A., Viyoch, J., & Sila-asna, M. (2012). The effects of seed extract of *Mucuna gigantea* on the expression of neural markers in mesenchymal stem cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7), 1297-1303. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1406>
- Kudlova, N., de Sanctis, J. B., & Hajduch, M. (2022). Cellular senescence: molecular targets, biomarkers, and senolytic drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4168. <https://doi.org/10.3390/ijms23084168>

- Lašťovička, J., Budinský, V., Špišek, R., & Bartůňková, J. (2009). Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cellular Immunology*, 256(1-2), 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.01.007>
- Leask, A., Parapuram, S. K., Shi-wen, X., & Abraham, D. J. (2009). Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(2), 89-94. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0037-7>
- Lee, J. H., Park, J., & Shin, D. W. (2022). The Molecular Mechanism of Polyphenols with Anti-Aging Activity in Aged Human Dermal Fibroblasts. *Molecules*, 27(14), 4351. <https://doi.org/10.3390/molecules27144351>
- Lee, Y. I., Choi, S., Roh, W. S., Lee, J. H., & Kim, T-G. (2021). Cellular senescence and inflammaging in the skin microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3849. <https://doi.org/10.3390/ijms22083849>
- Li, C., Cui, Z., Deng, S., Chen, P., Li, X., & Yang, H. (2022). The potential of plant extracts in cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 13, 472. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03152-z>
- Li, J., Liu, Y., Zhang, R., Yang, Q., Xiong, W., He, Y., & Ye, Q. (2024). Insights into the role of mesenchymal stem cells in cutaneous medical aesthetics: from basics to clinics. *Stem Cell Research & Therapy*, 15, 169. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03774-5>
- Li, X-Y., Ding, J., Zheng, Z-H., Li, X-Y., Wu, Z-B., & Zhu, P. (2012). Long-term culture in vitro impairs the immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells on T cells. *Molecular Medicine Reports*, 6(5), 1183-1189. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1039>
- Liu, Q., Song, S., Song, L., Bi, Y., Zhu, K., Qiao, X., Wang, H., Gao, C., Cai, H., & Ji, G. (2022). Mesenchymal stem cells alleviate aging in vitro and in vivo. *Annals of Translational Medicine*, 10(20), 1092. <https://doi.org/10.21037/atm-22-1206>
- Liu, Y-L., Liu, W-H., Sun, J., Hou, T-J., Liu, Y-M., Liu, H-R., Luo, Y-H., Zhao, N-N., Tang, Y., & Deng, F-M. (2014). Mesenchymal stem cell-mediated suppression of hypertrophic scarring is p53 dependent in a rabbit ear model. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(6), 136. <https://doi.org/10.1186/scrt526>
- Liu, Z., Hu, G-D., Luo, X-B., Yin, B., Shu, B., Guan, J-Z., & Jia, C-Y. (2017). Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in rejuvenation of the aged skin of rats. *Biomedical Reports*, 6(3), 279-284. <https://doi.org/10.3892/br.2017.842>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lu, R., Bian, F., Lin, J., Su, Z., Qu, Y., Pflugfelder, S. C., & Li, D-Q. (2012). Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. *PLoS ONE*, 7(6), e38825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038825>
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21(2), 216-225. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>
- Maggio, M., Guralnik, J. M., Longo, D. L., & Ferrucci, L. (2006). Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *The Journals of Gerontology: Series A*, 61(6), 575-584.

<https://doi.org/10.1093/gerona/61.6.575>

- Mahmoudi, Z., Soleimani, M., Saidi, A., Khamisipour, G., & Azizoltani, A. (2013). Effects of *Foeniculum vulgare* ethanol extract on osteogenesis in human mesenchymal stem cells. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(2), 135-142. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25050267/>
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), 215-230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65-77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>
- Minagawa, S., Araya, J., Numata, T., Nojiri, S., Hara, H., Yumino, Y., Kawaiishi, M., Odaka, M., Morikawa, T., Nishimura, S. L., Nakayama, K., & Kuwano, K. (2011). Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(3), L391-L401. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00097.2010>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- No+Vello Portugalete. (s. f.). Todo lo que debes saber sobre el funcionamiento de tu piel. Recuperado el 30 de octubre de 2024, de <https://nomasvelloportugalete.es/uncategorized/todo-lo-que-debes-saber-sobre-el-funcionamiento-de-tu-piel/>
- Ocampo, D. M., Valverde, C. L., Colmenares, A. J., & Isaza, J. H. (2014). Fenoles totales y actividad antioxidante en hojas de dos especies colombianas del género *Meriania* (melastomataceae). *Revista Colombiana de Química*, 43(2), 41-46. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n2.53124>
- Ogrodnik, M. (2021). Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Aging Cell*, 20(4), e13338. <https://doi.org/10.1111/accel.13338>
- Olennikov, D., Kashchenko, N., & Chirikova, N. (2015). In vitro bioaccessibility, human gut microbiota metabolites and hepatoprotective potential of chebulic ellagitannins: A case of Padma Hepaten® formulation. *Nutrients*, 7(10), 8456-8477. <https://doi.org/10.3390/nu7105406>
- Palmer, A. K., Xu, M., Zhu, Y., Pirtskhalava, T., Weivoda, M. M., Hachfeld, C. M., Prata, L. G., van Dijk, T. H., Verkade, E., Casacang-Verzosa, G., Johnson, K. O., Cubro, H., Doornebal, E. J., Ogrodnik, M., Jurk, D., Jensen, M. D., Chini, E. N., Miller, J. D., Matveyenko, A., Stout, M., Schafer, M., White, T., Hickson, L., Demaria, M., Garovic, V., Grande, J., Arriaga, E., Kuipers, F., von Zglinicki, T., LeBrasseur, N., Campisi, J., Tchkonja, T., Kirkland, J. L. (2019). Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell*, 18(3). <https://doi.org/10.1111/accel.12950>
- Pan, S., Gong, S., Zhang, J., Jia, S., Wang, M., Pan, Y., Wang, X., & Jiang, D. (2021). Anti-aging effects of fetal dermal mesenchymal stem cells in a D-galactose-induced aging model of adult dermal fibroblasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 57(8), 795-807. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00624-z>
- Papageorgis, P. (2017). Complex Interplay Between Aging and Cancer: Role of TGF- β Signaling. *Critical ReviewsTM in Oncogenesis*, 22(3-4), 313-321. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2017025134>

- Pereira, T. F., Levin, G., DeOcesano-Pereira, C., Caodaglio, A. S., Fujita, A., Tonso, A., & Sogayar, M. C. (2020). Fluorescence-based method is more accurate than counting-based methods for plotting growth curves of adherent cells. *BMC Research Notes*, *13*(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4914-8>
- Peterson, C. T., Denniston, K., & Chopra, D. (2017). Therapeutic uses of Triphala in ayurvedic medicine. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *23*(8), 607-614. <https://doi.org/10.1089/acm.2017.0083>
- Pittayapruerk, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2016). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 868. <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>
- Prakoeswa, C. R. S., Pratiwi, F. D., Herwanto, N., Citrashanty, I., Indramaya, D. M., Murtiastutik, D., Sukanto, H., & Rantam, F. A. (2019). The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on photoaging. *Journal of Dermatological Treatment*, *30*(5), 478-482. <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530438>
- Quah, B. J. C., & Parish, C. R. (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments*, *44*, 2259. <https://doi.org/10.3791/2259>
- Quah, B. J. C., Warren, H. S., & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*, *2*(9), 2049-2056. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.296>
- Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2002). Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor β /Smad pathway in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, *119*(2), 499-506. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01834.x>
- Quan, T., Qin, Z., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2012). Cysteine-rich protein 61 (CCN1) mediates replicative senescence-associated aberrant collagen homeostasis in human skin fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(9), 3011-3018. <https://doi.org/10.1002/jcb.24179>
- Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2009). Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, *14*(1), 20-24. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.8>
- Quesada-Gómez, J. M., Santiago-Mora, R. M., Casado-Díaz, A., & Luque de Castro, M. D. (2012). *Use of olive leaf extracts in a pharmaceutical composition for inducing angiogenesis and vasculogenesis* (Patente No. US 20120141435). Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos. <https://www.google.com/patents/US20120141435>
- Ran, F., Han, X., Deng, X., Wu, Z., Huang, H., Qiu, M., Song, J., Wei, X., Zhang, D., Wang, Y., Fan, S., Lin, J., & Han, L. (2021). High or low temperature extraction, which is more conducive to Triphala against chronic pharyngitis? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *140*, 111787. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111787>
- Rea, I. M., Gibson, D. S., McGilligan, V., McNerlan, S. E., Alexander, H. D., & Ross, O. A. (2018). Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. *Frontiers in Immunology*, *9*, 586 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00586>

- Reay, J. L., Kennedy, D. O., & Scholey, A. B. (2005). Single doses of Panax ginseng (G115) reduce blood glucose levels and improve cognitive performance during sustained mental activity. *Journal of Psychopharmacology*, 19(4), 357-365. <https://doi.org/10.1177/0269881105053286>
- Robinson, K. F., Narasipura, S. D., Wallace, J., Ritz, E. M., & Al-Harhi, L. (2020). β -Catenin and TCFs/LEF signaling discordantly regulate IL-6 expression in astrocytes. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00565-2>
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., & Castro-Ceseña, A. B. (2019). Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206, 455-467. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.027>
- Salehinejad, P., Moshrefi, M., & Eslaminejad, T. (2020). An Overview on mesenchymal stem cells derived from extraembryonic tissues: supplement sources and isolation methods. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 13, 57-65. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S248519>
- Salzer, M. C., Lafzi, A., Berenguer-Llargo, A., Youssif, C., Castellanos, A., Solanas, G., Peixoto, F. O., Stephan-Otto Attolini, C., Prats, N., Aguilera, M., Martín-Caballero, J., Heyn, H., & Benitah, S. A. (2018). Identity noise and adipogenic traits characterize dermal fibroblast aging. *Cell*, 175(6), 1575-1590.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.012>
- Semkova, M. E., & Hsuan, J. J. (2021). TGF β -1 Induced Cross-Linking of the Extracellular Matrix of Primary Human Dermal Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 984. <https://doi.org/10.3390/ijms22030984>
- Senturk, S., Mumcuoglu, M., Gursoy-Yuzugullu, O., Cingoz, B., Akcali, K. C., & Ozturk, M. (2010). Transforming Growth Factor-Beta Induces Senescence in Hepatocellular Carcinoma Cells and Inhibits Tumor Growth. *Hepatology*, 52(3), 966-974. <https://doi.org/10.1002/hep.23769>
- Septembre-Malaterre, A., Boina, C., Douanier, A., & Gasque, P. (2022). Deciphering the Antifibrotic Property of Metformin. *Cells*, 11(24), 4090. <https://doi.org/10.3390/cells11244090>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. v., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., el Rayess, Y., Beyrouthy, M. el, Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., Setzer, W.N., Calina, D., Cho, W.C., Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., Liu, K., Hou, J., Shao, C., & Wang, Y. (2018). Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 14(8), 493-507. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0023-5>
- Shin, J-W., Kwon, S-H., Choi, J-Y., Na, J-I., Huh, C-H., Choi, H-R., & Park, K-C. (2019). Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2126. <https://doi.org/10.3390/ijms20092126>
- Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(9), 653664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>

- Song, T., Gu, Y., Hui, W., Yang, X., Liu, Y., & Chen, X. (2022). Oxygen–glucose deprivation promoted fibroblast senescence and collagen expression via IL11. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12090. <https://doi.org/10.3390/ijms232012090>
- Song, X., Bao, M., Li, D., & Li, Y. M. (1999). Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mechanisms of Ageing and Development*, 108(3), 239-251. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(99\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00022-6)
- Song, Y. S., Lee, B. Y., & Hwang, E. S. (2005). Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(5), 580-590. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.11.008>
- Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplantation*, 25(5), 829-848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A., & Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 2109-2117. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.2109>
- Subash-Babu, P., & Alshatwi, A. A. (2012). Aloe-emodin inhibits adipocyte differentiation and maturation during in vitro human mesenchymal stem cell adipogenesis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(8), 291-300. <https://doi.org/10.1002/jbt.21415>
- Tamma, R., & Ribatti, D. (2017). Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 151. <https://doi.org/10.3390/ijms18010151>
- Tominaga, K. (2015). The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases*, 5(1), 27743. <https://doi.org/10.3402/pba.v5.27743>
- Turinetto, V., Vitale, E., & Giachino, C. (2016). Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1164. <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>
- Udalamattha, V. L., Jayasinghe, C. D., & Udagama, P. V. (2016). Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0366-4>
- van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439-446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
- Varani, J., Dame, M. K., Rittie, L., Fligiel, S. E. G., Kang, S., Fisher, G. J., & Voorhees, J. J. (2006). Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. *The American Journal of Pathology*, 168(6), 1861-1868. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051302>
- Varma, S. R., Sivaprakasam, T. O., Mishra, A., Kumar, L. M. S., Prakash, N. S., Prabhu, S., & Ramakrishnan, S. (2016). Protective Effects of Triphala on Dermal Fibroblasts and Human Keratinocytes. *PLoS ONE*, 11(1), e0145921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145921>

- von Zglinicki, T., Nilsson, E., Döcke, W. D., & Brunk, U. T. (1995). Lipofuscin accumulation and ageing of fibroblast. *Gerontology*, 41(Suppl 2), 95-108. <https://doi.org/10.1159/000213728>
- Waaijer, M. E. C., Parish, W. E., Strongitharm, B. H., van Heemst, D., Slagboom, P. E., de Craen, A. J. M., Sedivy, J. M., Westendorp, R. G. J., Gunn, D. A., & Maier, A. B. (2012). The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell*, 11(4), 722-725. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00837.x>
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., & Ho, A. D. (2008). Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE*, 3(5), e2213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002213>
- Wang, W., Ige, O. O., Ding, Y., He, M., Long, P., Wang, S., Zhang, Y., & Wen, X. (2023). Insights into the potential benefits of triphala polyphenols toward the promotion of resilience against stress-induced depression and cognitive impairment. *Current Research in Food Science*, 6, 100527. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100527>
- Watson, J. D. (1972). Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biology*, 239(94), 197-201. <https://doi.org/10.1038/newbio239197a0>
- Widowati, W., Sardjono, C. T., Wijaya, L., Laksmiawati, D. R., & Sandra, F. (2012). Extract of *Curcuma longa* L. and (-)-Epigallo Catechin-3-Gallate enhanced proliferation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) and differentiation of AD-MSCs into endothelial progenitor cells. *Journal of US-China Medical Science*, 9(1), 22-29. <https://www.davidpublisher.com/Public/uploads/Contribute/550b9b2fdf025.pdf>
- Wlaschek, M., Maity, P., Makrantonaki, E., & Scharffetter-Kochanek, K. (2021). Connective Tissue and Fibroblast Senescence in Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology*, 141(4), 985-992. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.11.010>
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., Inman, C. L., Ogrodnik, M. B., Hachfeld, C. M., Fraser, D. G., Onken, J. L., Johnson, K. O., Verzosa, G. C., Langhi, L. G. P., Weigl, M., Giorgadze, N., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Jurk, D., Singh, R., Allison, D., Ejima, k., Hubbard, G., Ikeno, Y., Cubro, H., Garovic, V., Hou, X., Weroha, S., Robbins, P., Niedernhofer, L., Khosla, S., Tchkonja, T., Kirkland, J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine*, 24(8), 1246-1256. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>
- Xu, X., Shen, X., Feng, W., Yang, D., Jin, L., Wang, J., Wang, M., Ting, Z., Xue, F., Zhang, J., Meng, C., Chen, R., Zheng, X., Du, L., Xuan, L., Wang, Y., Xie, T., & Huang, Z. (2020). D-galactose induces senescence of glioblastoma cells through YAP-CDK6 pathway. *Aging*, 12(18), 18501-18521. <https://doi.org/10.18632/aging.103819>
- Zargaran, D., Zoller, F., Zargaran, A., Weyrich, T., & Mosahebi, A. (2022). Facial skin ageing: Key concepts and overview of processes. *International Journal of Cosmetic Science*, 44(4), 414-420. <https://doi.org/10.1111/ics.12779>
- Zhang, S., Ma, Z., Sheng, W., & Wang, H. (2022). A novel *in vitro* senescent model of intervertebral disc degeneration induced by D-galactose (Preprint). *Research Square* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2151159/v1>

Zhang, Y., Alexander, P. B., & Wang, X-F. (2017). TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), a022145. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022145>