

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOPROTECTOR  
Y REPARADOR DE LOS CAROTENOIDES  
(LUTEÍNA, ZEAXANTINA Y  $\beta$ -CAROTENO)  
FRENTE AL DAÑO CAUSADO POR RADIACIÓN  
UV EN QUERATINOCITOS DE PIEL HUMANA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JUDITH GUADALUPE SANTOS CESEÑA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2025.**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

## DEDICATORIAS

Dedicada a:

Mi amada familia, mis padres Aurelio Domingo Santos Vives y María Patricia Ceseña Bañaga, y mis hermanos Ana Ruth Santos Ceseña y Aurelio José Santos Ceseña por su apoyo, amor y paciencia durante la realización de este trabajo.

En memoria a mi abuela paterna Josefina Vives Romero y en agradecimiento a su cariño, sus atenciones y cuidados incondicionales.

Mis tíos María Josefina Santos Vives, Roberto Gastón Santos Vives y familia Santos Ayala por su apoyo, aprecio y hospitalidad.

Mi abuela materna Juana Bañaga Ruíz por sus constantes oraciones, cariño y apoyo.

Mi tía Noemi Ceseña Bañaga y familia Avilés Bañaga por su aprecio.

Mi madrina Sonia Ceseña Marrón por todo su cariño y aprecio a lo largo de los años.

La familia Lizárraga Méndez por su atención y beca durante la licenciatura.

Alex y mis mejores amigos Kimberlin, Carmen, Natalia, Alondra, Juan José y Juan Carlos por su apoyo, cariño y comprensión a mi compromiso con el presente trabajo.

Mis amigos de laboratorio Alex, Dulce, Ana Mayra, Maricarmen, Karla Andrea, Karla Denise, Irasema, Liz, Hiram, Valeria, Paloma, Cesar, Diana, Uriel y Mayra por su cariño y el apoyo mutuo para la culminación de nuestros trabajos.

Gracias por ser mi red de apoyo y por el abrazo constante.

En memoria a mis compañeros de carrera los Químicos: Alicia Guzmán Adán, Gustavo Sánchez García y Alex Gutiérrez Alvarado.

## **AGRADECIMIENTOS**

En agradecimiento a:

Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro y a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por la beca otorgada por el “Programa de Nuevos Talentos Científicos y Tecnológicos 2024” CONCYTEQ - UAQ NTCT 2024-FQU-005.

Al Laboratorio de Inmunología Aplicada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por la donación de la línea celular de queratinocitos HaCaT.

Al equipo de trabajo del Dr. Eloy Rodríguez de León por su trabajo en la extracción y semisíntesis de los compuestos utilizados en este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	12
I. La piel	12
I.1. Generalidades	12
I.2. Patologías de la piel	14
I.3. Consecuencias de la exposición a radiación UV	18
I.4. Prevención	20
II. Carotenoides	22
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	24
V. METODOLOGÍA	24
V.1. Materiales	24
V.2. Cultivo y caracterización de la línea celular de queratinocitos de piel humana	25

V.3. Diseño Experimental	25
V.3.1. Toxicidad	27
V.3.2. Fotoprotección	27
V.3.3. Reparación	28
V.4. Ensayo MTT	29
V.5. Análisis estadístico	30
V.6. Disposición de residuos	30
VI. RESULTADOS	30
VI.1. Evaluación de modelo de daño UV	30
VI.2. Evaluación de fotoprotección	31
VI.3. Evaluación de toxicidad	33
VI.4. Evaluación de reparación	35
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
VII.1. Evaluación de modelo de daño UV	38
VII.2. Evaluación de fotoprotección	39
VII.3. Evaluación de toxicidad	40
VII.4. Evaluación de reparación	42
VIII. CONCLUSIONES	44
IX. BIBLIOGRAFÍA	45
X. ANEXOS	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Grupos experimentales.	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estratos de la epidermis.	14
2. Sitios de cáncer en ranking de incidencia.	16
3. Sitios de cáncer en ranking de mortalidad.	17
4. Estructura de zeaxantina, luteína y $\beta$ -caroteno.	23
5. Diseño experimental de la prueba de toxicidad.	27
6. Diseño experimental de la prueba de fotoprotección.	28
7. Diseño experimental de la prueba de reparación.	29
8. Evaluación del modelo de daño UV a las 0, 24, 48 y 72 horas post irradiación en células HaCaT utilizando ensayo MTT.	31
9. Evaluación del efecto fotoprotector de $\beta$ -caroteno 20 y 40 $\mu$ M, zeaxantina 10 y 20 $\mu$ M y luteína 5, 20, 50 $\mu$ M a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.	32
10. Evaluación del efecto fotoprotector de la concentración 3600 $\mu$ M de los grupos experimentales a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.	33
11. Evaluación de la toxicidad de $\beta$ -caroteno 20 y 40 $\mu$ M, zeaxantina 10 y 20 $\mu$ M y luteína 5, 20, 50 $\mu$ M a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.	34

12. Evaluación de la toxicidad de la concentración 3600 $\mu$ M de los grupos experimentales a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.	35
13. Evaluación del efecto reparador $\beta$ -caroteno 20 y 40 $\mu$ M, zeaxantina 10 y 20 $\mu$ M y luteína 5, 20, 50 $\mu$ M a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.	36
14. Evaluación del efecto reparador de la concentración 3600 $\mu$ M de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.	37
15. Fotomicrografías representativas de fotoprotección de tratamiento con 3600 $\mu$ M durante la irradiación por 4.5 horas de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT durante ensayo MTT (primer grupo control – no irradiado).	53
16. Fotomicrografías representativas de toxicidad de tratamiento continuo con 3600 $\mu$ M de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT durante ensayo MTT.	53
17. Fotomicrografías representativas de reparación de tratamiento continuo con 3600 $\mu$ M tras la irradiación de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT durante ensayo MTT (primer grupo control – no irradiado).	54

## ABREVIATURAS

UVR – Radiación Ultravioleta

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno

FPS – Factor de Protección Solar

NMSC – Cáncer de piel no melanoma

CCB – Carcinoma de Células Basales

CCE – Carcinoma de Células Escamosas

PABA – Ácido *p*-aminobenzóico

MTC – Medicina Tradicional China

Nrf2 – Factor Nuclear Tipo Eritroide 2

ARE – Elemento de Respuesta Antioxidante

SIP – Polisacárido de *Saussurea involucrata*

CPD – Dímeros de Pirimidina de Ciclobutano

$\alpha$ -MSH – Hormona Estimulante de los Melanocitos  $\alpha$

DMEM – Medio Dulbecco Modificado de Eagle

SFB – Suero Fetal Bovino

DMSO – Dimetilsulfóxido

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

PBS – Solución Salina Tamponada con Fosfato

T. amb. – Temperatura Ambiente

DOX – Doxorubicina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrógeno

GFP – Canal de Proteína Fluorescente Verde

ANOVA – Análisis de Varianza

RPBI – Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos

BCO1 –  $\beta$ -caroteno 15,15'-monooxigenasa

SOD – Superóxido Dismutasa

## RESUMEN

El cáncer de piel es un problema de salud pública a nivel mundial debido al aumento de su incidencia en la población adulta. En 2020, se reportaron 1,234,533 de casos de cáncer de piel no melanoma, lo que posicionó este tipo de cáncer en el quinto lugar a nivel mundial.

La exposición a los rayos UV generan daños en la piel que originan especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de dañar moléculas biológicas. Como el ADN y proteínas que derivan en la alteración a las condiciones de la piel promoviendo la carcinogénesis. La fotoprotección tiene como objetivo prevenir el daño que ocurre en la piel impidiendo la inflamación de la epidermis, el fotoenvejecimiento y la carcinogénesis causada por la exposición a la UV. Este proyecto busca estudiar el efecto fotoprotector y reparador de los carotenoides (luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno) *in vitro* contra el daño causado por luz UV, en una línea celular de queratinocitos de piel humana (HaCaT) y comparar la actividad fotoprotectora de cada uno de ellos. El objetivo de este trabajo fue: evaluar la toxicidad de los tratamientos de luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno mediante ensayo MTT en células de queratinocitos humanos *in vitro*; así como, evaluar el efecto fotoprotector y reparador de los tratamientos con luteína, zeaxantina,  $\beta$ -caroteno ante el daño causado por UVR en células HaCaT mediante el ensayo MTT *in vitro*. El estudio del efecto fotoprotector de los carotenoides contribuirá al entendimiento de la carcinogénesis en piel humana, el diseño de formas potenciales de prevención para este tipo de cáncer y a mediano plazo el desarrollo de un producto con capacidad fotoprotectora a base de estos carotenoides.

Los resultados llevan a la conclusión de que  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y luteína a 3600  $\mu$ M tienen un efecto fotoprotector desde las 24 horas *post* irradiación. Además, la luteína a 3600  $\mu$ M podría estar promoviendo la proliferación de las células HaCaT. Por otra parte, se concluyó que ninguno de los grupos tiene efecto reparador en estas condiciones de irradiación. Este trabajo es la base para continuar realizando otros estudios que le permitan a nuestro grupo de trabajo corroborar el efecto del  $\beta$ -caroteno y luteína a 3600  $\mu$ M, así como evaluar los mecanismos moleculares implicados en los efectos probados.

### Palabras clave:

Fotoprotección; reparación; carotenoides; zeaxantina; luteína;  $\beta$ -caroteno.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La piel, como el órgano más extenso del cuerpo humano, desempeña un papel vital en la protección y mantenimiento de la salud del organismo. Constituyendo aproximadamente el 15 % del peso corporal y almacenando el 30 % del volumen total de sangre, la piel se compone de varias capas, como la epidermis, dermis e hipodermis, cada una con funciones específicas que contribuyen a la complejidad y versatilidad de este órgano. Las múltiples funciones de la piel son la termorregulación, barrera inmunitaria, la protección solar, la sensibilidad táctil y la retención de agua.

Sin embargo, la piel no está exenta de sufrir daños, ya sea debido a condiciones extremas o a factores genéticos. Diversos trastornos dermatológicos, como la urticaria, prurito, eczema, y otros, pueden afectar su integridad. Además, la exposición prolongada a condiciones extremas puede desencadenar fotoenvejecimiento o cáncer de piel. Este tipo de cáncer se clasifica en melanoma y no melanoma, este último con carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas como los subtipos más comunes.

Si bien la radiación ultravioleta (UVR) proveniente del sol tiene beneficios para la salud, como la síntesis de vitamina D, es también uno de los factores ambientales más perjudiciales, ya que una exposición excesiva puede causar daños, desde quemaduras hasta enfermedades crónicas, como las ya mencionadas. Los daños causados por la UVR incluyen alteraciones directas al ADN y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que conducen al estrés oxidativo promoviendo la muerte celular.

La prevención de estos daños es esencial, y una de las barreras más efectivas es el uso de bloqueadores solares. Estos productos, ya sean orgánicos o inorgánicos, protegen contra los rayos UVA y UVB, con su eficacia generalmente evaluada mediante el factor de protección solar (SPF). A pesar de estos esfuerzos preventivos, la búsqueda de alternativas para proteger la piel contra la UVR continúa.

Los carotenoides han demostrado tener propiedades fotoprotectoras y antioxidantes (Cantrell y col., 2003; Baswan y col., 2020); su capacidad para absorber luz visible y actuar como agentes de transporte de electrones contribuye a su efectividad en la

protección contra los daños cutáneos causados por la exposición prolongada a la UVR.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto fotoprotector y reparador de los carotenoides administrados de forma tópica para proteger y preservar la salud de la piel.

## **II. ANTECEDENTES**

### **I. La piel**

#### **I.1. Generalidades**

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano que representa aproximadamente el 15 % del peso corporal, almacenando el 30 % del volumen total de sangre del cuerpo. Además, tiene la importante función de proteger al organismo de agresiones externas (Deniz y col., 2020).

Este órgano está formado por diferentes capas: epidermis, dermis e hipodermis; la diferencia entre ellas radica en su función y en la composición. La suma de estas capas brinda un sistema armonizado que da origen a la gran variedad de funciones de la piel, dentro de las cuales se encuentran la termorregulación, regulación inmunológica, barrera protectora, protección solar, receptor de sensibilidad y almacenamiento de agua (Amado, 2015; Council y col., 2016; Nguyen y Soulika, 2019).

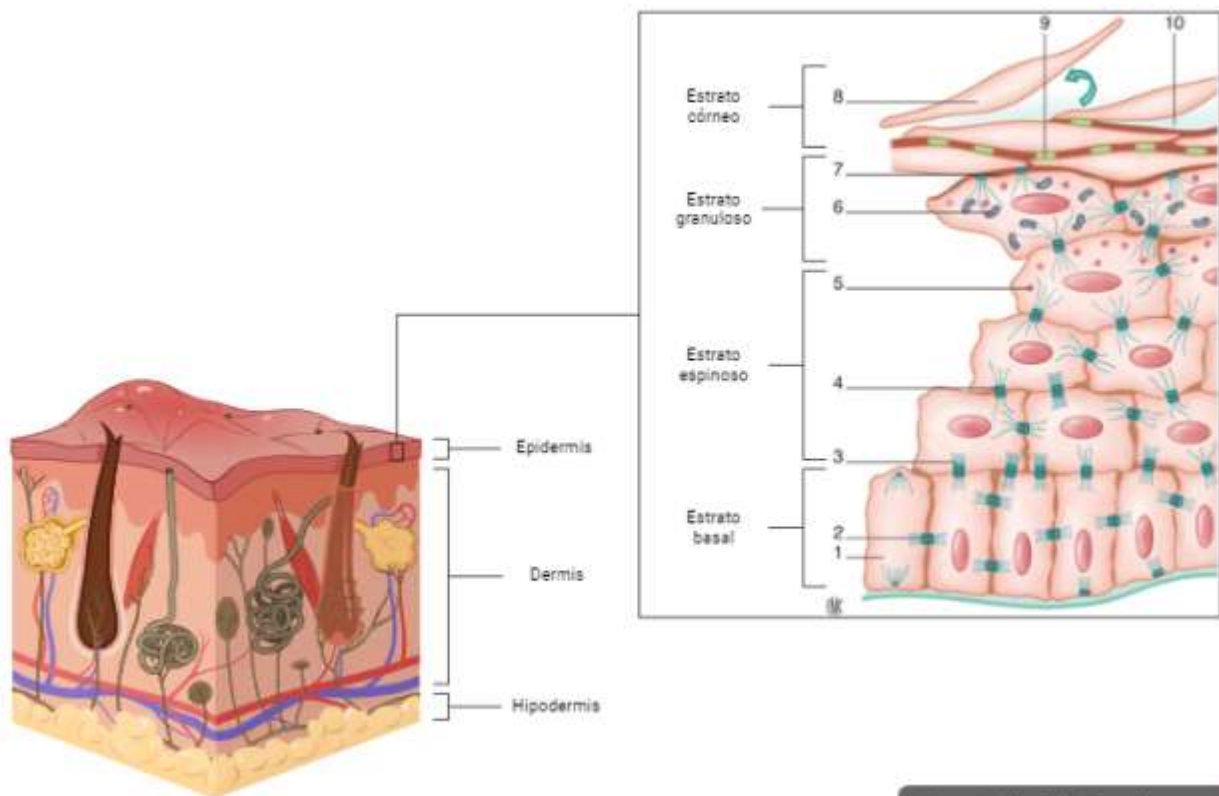
La epidermis está constituida por cuatro estratos (figura 1): el estrato más profundo es el estrato basal, también conocido como germinativo, está conformado por algunos melanocitos y por células madre cúbicas o columnares que tienen la propiedad de producir constantemente queratinocitos gracias a su actividad mitótica. Estos queratinocitos sufren constantemente transformaciones a lo largo de los diferentes estratos de la epidermis, otorgando la regeneración, reparación y mantenimiento de la piel: este proceso de transformación que sufren los queratinocitos se le conoce como diferenciación epidérmica o proceso de queratinización. La transformación de los queratinocitos es acompañada por cambios en la expresión de las queratinas; en el caso del estrato basal las queratinas que forman parte del citoesqueleto de los queratinocitos son las queratinas K5 y K14. Los queratinocitos migran al siguiente

estrato conocido como estrato espinoso, aquí los queratinocitos se vuelven de mayor tamaño y las queratinas K5 y K14 son reemplazadas por las queratinas K1 y K10 formando haces de filamentos bien organizados. Este estrato está integrado por 8 o 10 capas de células poliédricas irregulares, conocidas como células espinosas. En dicho estrato también se observa, con mayor evidencia, la presencia de desmosomas que son conexiones entre células que brinda la cohesión a la epidermis. El penúltimo estrato está constituido por 3 a 5 capas de células en forma de diamante que poseen gránulos de queratohialina y gránulos lamelares (también llamados queratinosomas), gracias a los cuales se le otorga el nombre de estrato granuloso, a este tercer nivel de la epidermis. Los gránulos de queratohialina están formados por profilagrina, que es el precursor de la filagrina. La filagrina tiene el propósito de incorporarse a la envoltura córnea, capa protectora que rodea a cada corneocito (mencionado en el último estrato de la epidermis). Mientras tanto, los gránulos lamelares contienen glicolípidos, los cuales, al secretarse, contribuyen a la unión entre células. La última capa de la epidermis es el estrato córneo, la formación de este estrato está acompañado de la autólisis de los núcleos y los orgánulos celulares, así como de la sustitución de la membrana celular por un complejo proteico estable e insoluble conocido como envoltura córnea. Las células resultantes de estos cambios se conocen como corneocitos, son células alargadas unidas a través de los corneodesmosomas que al encontrarse en la capa superficial del estrato córneo se degradan, ocasionando la descamación de la piel (Haftek y Simon, 2020; Yousef y col., 2024; Amado, 2015).

El límite entre la epidermis y la dermis se conoce como membrana basal. La dermis está formada por tejido conectivo que se agrupa en dos capas. La primera capa y la que tiene contacto con la epidermis es la capa papilar, está compuesta por tejido laxo y es una capa delgada. La segunda capa, denominada reticular, está compuesta por tejido conectivo denso, siendo una capa más gruesa y menos celular. En la dermis se encuentran los folículos pilosos, las neuronas sensoriales, el cabello, los músculos, los vasos sanguíneos y las glándulas sudoríparas (Yousef y col., 2024).

Por otra parte, la hipodermis es la capa más profunda de la piel que está formada por algunos apéndices cutáneos como los folículos pilosos, las neuronas sensoriales, los vasos sanguíneos y principalmente por adipocitos, los cuales no solo tienen una función amortiguadora, también tienen funciones endócrinas, de comunicación

neurológica y como inductoras de células madre pluripotenciales (Yousef y col., 2024; Amado, 2015).



Created in BioRender.com bio

Figura 1. Estratos de la epidermis. (1) Células madre. (2) Filamentos de queratina K5 y K14. (3) Las queratinas K1 y K10. (4) Desmosomas. (5) Cuerpos lamelares o queratinosomas. (6) Granos de queratohialina. (7) Envoltura córnea. (8) Corneocitos. (9) Corneodesmosomas. (10) Espacios intercorneocíticos. (Hafték y Simon, 2020).

## I.2. Patologías de la piel

Si bien la piel es el órgano que nos protege de los agentes externos, no está exenta de sufrir daños, esto debido a las condiciones extremas entre las que se encuentra el individuo o a la herencia genética propia del individuo. Los síndromes dermatológicos más frecuentes y comunes son la urticaria, prurito, eccema, dermatitis crónica, eritema polimorfo, eritema nudoso, púrpura, eritrodermia, entre otros (Amado, 2015). Aunque la mayoría de las afecciones enlistadas anteriormente tienden a desaparecer por sí solas, la exposición prolongada a las condiciones extremas favorece el desarrollo de enfermedades como el cáncer. En general, las formas de cáncer de piel

se pueden clasificar como cáncer de piel no melanoma y melanoma, dependiendo de que tipo de célula se vea involucrada en el padecimiento.

El cáncer de piel no melanoma (NMSC) es el cáncer de piel que se diagnostica con mayor frecuencia. En el año 2020, según lo reportado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, el cáncer de piel no melanoma se encontraba en el quinto lugar de incidencias con 1,234,533 número de casos (figura 2) y en el lugar número 22 de mortalidad con 69,416 muertes (figura 3) a nivel mundial en todas las edades y en ambos sexos (Ferlay y col., 2024). Este grupo de cáncer tiene 82 tipos de tumores que se diagnostican por diferentes métodos; sin embargo, muchos de ellos son difíciles de detectar y diagnosticar. Existen varios tipos de cáncer en este grupo, los más comunes son el Carcinoma de Células Basales o basaloideas (CCB) y el Carcinoma de Células Escamosas (CCE) (Souto y col., 2022).

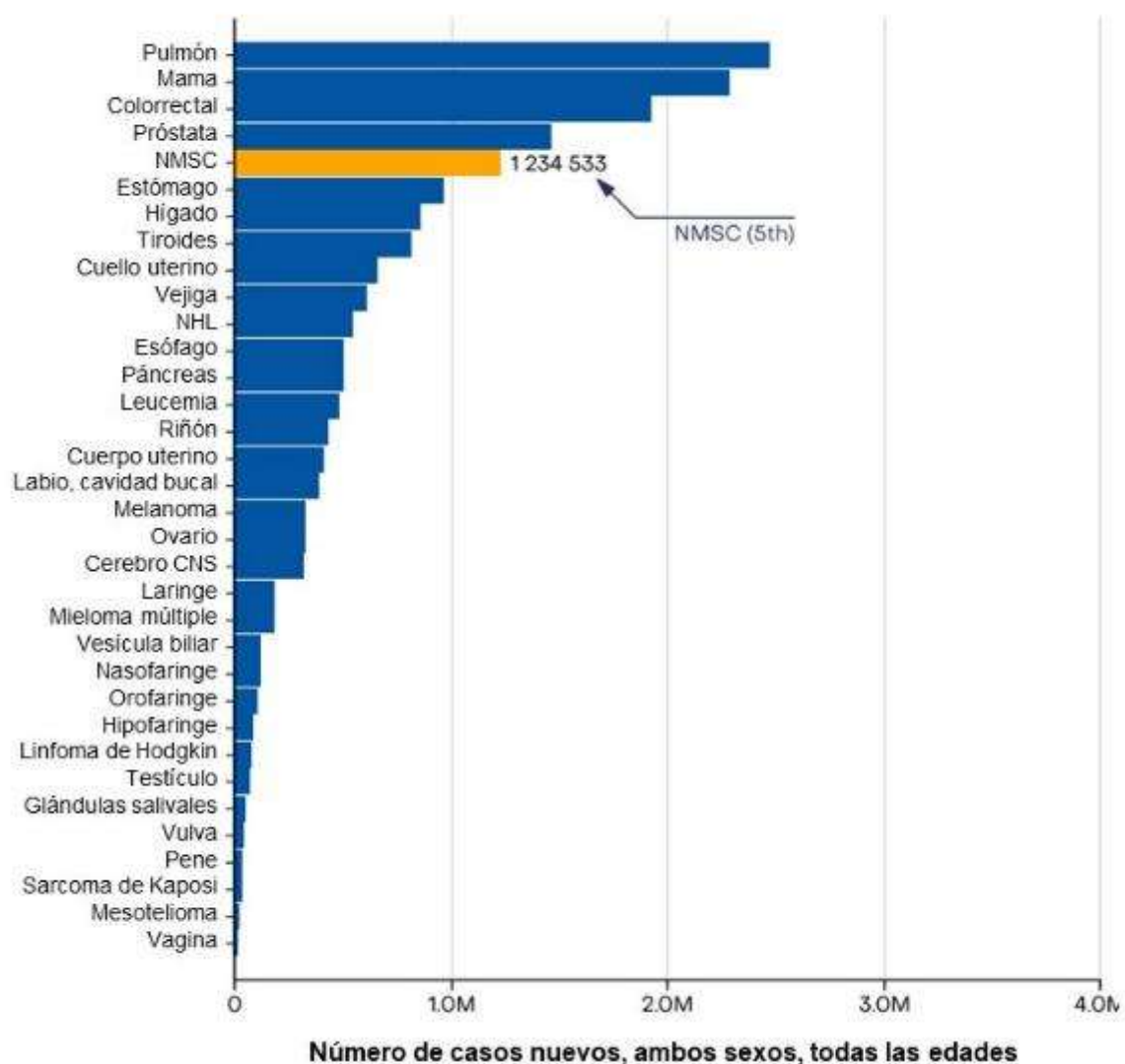


Figura 2. Sitios de cáncer en ranking de incidencia. El cáncer de piel no melanoma (NMSC) se encontraba en el quinto lugar de incidencias en el año 2020 con 1,234,533 número de casos en ambos sexos y en todas las edades (Ferlay y col., 2024).

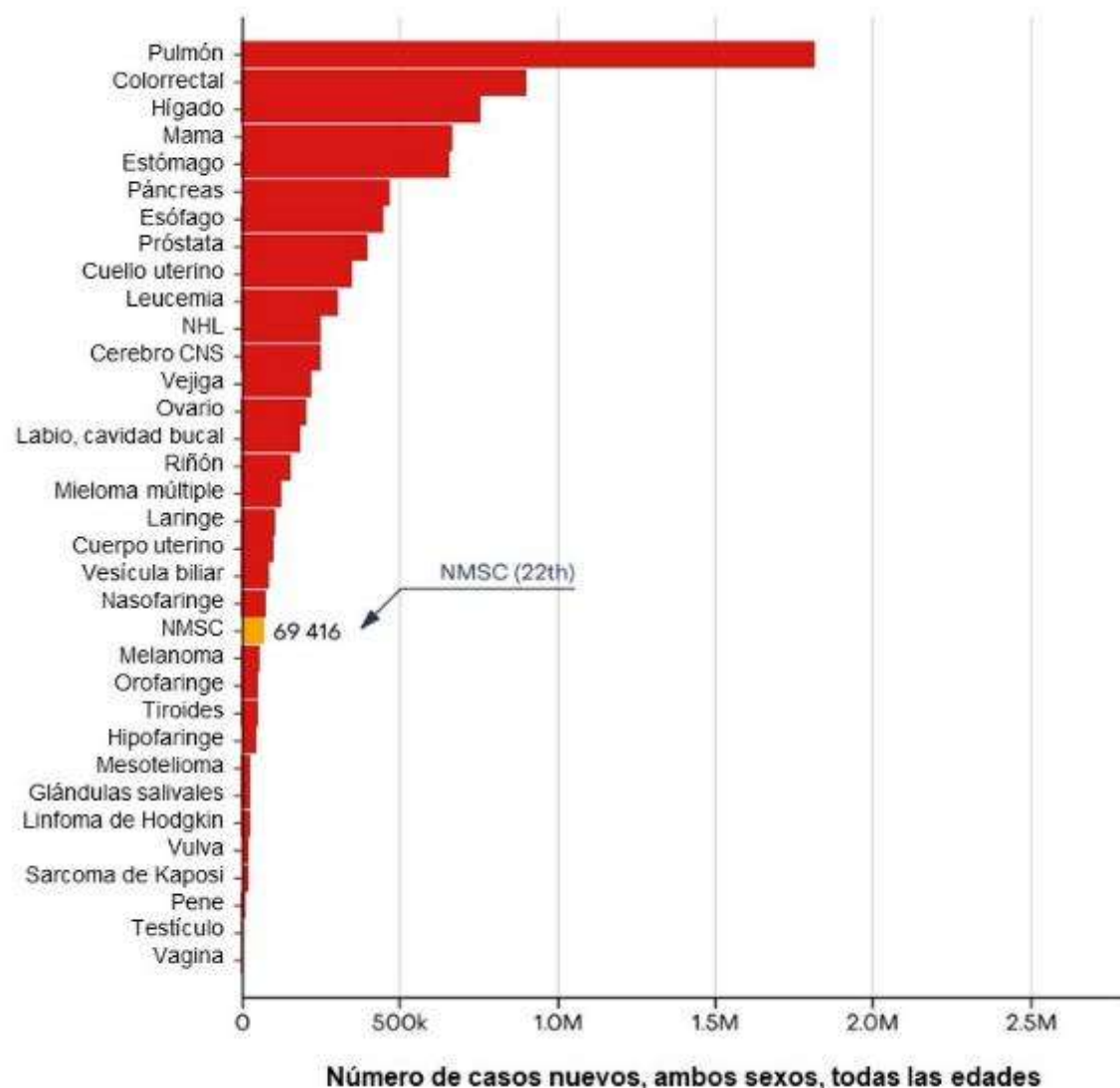


Figura 3. Sitios de cáncer en ranking de mortalidad. El cáncer de piel no melanoma (NMSC) se encontraba en el lugar número 22 de mortalidad con 69,416 muertes en ambos sexos y en todas las edades en el año 2020 (Ferlay J. y col., 2024).

El CCB es el cáncer de piel que a menudo presenta ausencia de lesiones precancerosas. Normalmente se desarrolla en las regiones de la cabeza y el cuello de los pacientes. Este carcinoma se compone de células no queratinizantes provenientes de la capa de células basales de la epidermis y rara vez hace metástasis. Por otro lado, el CCE está compuesto por queratinocitos mutados; sus tumores son más malignos que los del CCB, variando en cuanto al potencial de crecimiento, invasión y metástasis. Dicho carcinoma puede surgir de una queratosis actínica, también causada por daños solares (Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU., 2023; Yousef y col., 2024).

Los tratamientos que se utilizan mayoritariamente para algunos tipos de cáncer de piel no melanoma consisten en técnicas que pueden resultar en casos de mutilación del paciente, debido a que estas comprenden cirugías y/o radio terapias (Hooiveld-Noeken y col., 2022).

Por otra parte, si bien el envejecimiento de la piel no es una patología, se ha implicado que la función de barrera de la piel se ve deteriorada conforme envejece, lo que en consecuencia aumenta el riesgo de trastornos cutáneos, así como un mayor riesgo de neoplasias malignas. Es importante considerar que el envejecimiento de la piel es estimulado por la suma de factores intrínsecos y extrínsecos. El principal factor intrínseco del envejecimiento son las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas como producto secundario en la cadena de transporte de electrones del metabolismo aeróbico en las mitocondrias. Otro factor intrínsecos que aportan al envejecimiento es la disminución de la capacidad replicativa de las células, conocido como senescencia; esto debido a que los telómeros, cuya función es proteger los cromosomas, se acortan cada vez que las células somáticas se dividen, lo que da como resultado después de cierto número de replicaciones que los telómeros se vuelven extremadamente cortos, desembocando en la pérdida de genes esenciales y, por lo tanto, en la pérdida de funciones de estas células. Por lo que se refiere al envejecimiento extrínseco, es causado por factores ambientales oxidativos, como son el humo del cigarro y la contaminación ambiental, pero el factor extrínseco clave es la exposición a la radiación solar, específicamente a la radiación UV. El deterioro en la piel a causa de este factor extrínseco se conoce como fotoenvejecimiento, es un proceso acumulativo y es dependiente de la frecuencia, duración e intensidad de la exposición solar (Kammeyer y Luiten, 2015).

### I.3. Consecuencias de la exposición a radiación UV

Uno de los principales factores ambientales que perjudican la salud de la piel es la radiación ultravioleta (UVR) proveniente de la luz solar. La UVR tiene efectos beneficiosos para la salud como la síntesis natural de vitamina D, melanina y varios péptidos en la piel. La exposición excesiva a esta radiación causa daños, como quemaduras en la piel o daños acumulativos crónicos como el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel melanoma y no melanoma (Chaiprasongsuk y Panich, 2022; Fang y col., 2021).

La UVR se puede subdividir principalmente en tres: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm). La energía de los fotones es inversamente proporcional a la longitud de onda, por lo que es de suponer que la gran parte de los daños causados por la UVR es debido a la radiación UVC. A pesar de ello, la mayor parte de la radiación UVC se pierde en la atmósfera, donde los subtipos UVA y UVB son los que logran llegar a la Tierra en su mayoría con una proporción de 20:1. Si bien las proporciones de la UVR que logran llegar a la Tierra son muy diferentes, la radiación UVB tiene mayor energía de fotones lo cual, como ya se planteó, representa un mayor daño para la salud. Los rayos UVB están relacionados con los daños inmediatos y directos al ADN dentro de la epidermis, sin embargo, se ha observado que las lesiones causadas por los rayos UVA son en las capas más profundas de la epidermis, lo cual indica la capacidad de estos para penetrar en la epidermis (Smith y col., 2023).

Los daños causados en la piel por la UVR que es absorbida de la luz solar pueden actuar mediante varios mecanismos, ya sea por daños directos al ADN o la acumulación de ROS que desencadenan en estrés oxidativo. Los fotones de la UVR inducen transiciones de GC a TA y la formación de dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD) y fotoproductos de pirimidina, donde la formación de una de estas lesiones está influenciada por el estado de condensación del ADN en el núcleo celular. Por su parte, los ROS son oxidantes muy fuertes que reaccionan con las biomoléculas, por lo que el cuerpo posee un mecanismo antioxidante para combatirlo. Este mecanismo está constituido por varias enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) o por compuestos no enzimáticos (vitamina E, ascorbato, glutatión, transferrina, ceruloplasmina, entre otros) (Carvajal, 2019; Brand y col., 2018). Sin embargo, cuando la cantidad de ROS supera los mecanismos antioxidantes, la integridad de las células se ve afectada por daño indirecto al ADN, peroxidación de lípidos (genera aldehídos insaturados que causan la alquilación de bases en el ADN) y proteínas (lo que bloquea la replicación del ADN), y desregulación inmune, desembocando en muerte o disfunción celular. Los daños indirectos que pueden producir los ROS al ADN se deben a moléculas que tienen la capacidad de absorber fotones de UV, lo cual genera cambios transitorios en la molécula dando la formación de estados intermedios fotoexcitados, con la capacidad de transferir energía desde los donantes de electrones de energía en estado triplete a moléculas

sustrato como el ADN y el oxígeno molecular (Brand y col., 2018; Markiewicz y Idowu, 2019).

#### I.4. Prevención

Una de las principales barreras para prevenir daños debido a la UVR es utilizar bloqueadores solares que protegen contra los rayos UVA y UVB. Usualmente se relaciona la eficacia de los protectores solares con su factor de protección solar (FPS); para determinar este factor se calcula la dosis mínima de luz solar necesaria para causar eritema después de aplicar el producto considerando principalmente la UVB. Dependiendo de su naturaleza podemos clasificar los bloqueadores solares en orgánicos e inorgánicos.

Los bloqueadores orgánicos son considerados menos adaptables que los productos inorgánicos debido a su falta de capacidad para dispersar o reflejar los rayos UV. De igual forma, se ha observado que los bloqueadores orgánicos son susceptibles a la fotodegradación y tienen la desventaja que son capaces de generar radicales libres dañinos. Un ejemplo de bloqueador solar orgánico es el ácido *p*-aminobenzóico (PABA), utilizado en los primeros protectores solares, cuya acción se basa en la deslocalización de electrones aromáticos. Un ejemplo de bloqueador solar inorgánico es el dióxido de titanio, que tiene la capacidad de agregarse cuando se utiliza en una formulación, además tiene un alto índice de reflexión, lo que le permite reflejar y dispersar la radiación ultravioleta (Smith y col., 2023).

Debido a la importancia de la piel y a la gran exposición a la UVR en los últimos años se han estado buscando alternativas para la prevención de daños causados por la UVR. En 2022, Zhu y colaboradores decidieron investigar el efecto protector de la fórmula Qing'e modificada (formulación de la medicina tradicional china (MTC) que comprende tres hierbas: *Eucommia ulmoides* Oliv., *Psoralea corylifolia* L., *Salvia miltiorrhiza* Bunge) sobre el daño oxidativo de la piel inducido por los rayos UV y sus mecanismos moleculares. Descubrieron que la fórmula Qing'e modificada es un posible candidato para prevenir el fotoenvejecimiento inducido por los rayos UV mediante la restauración de la homeostasis redox. Para ello utilizaron células HaCaT irradiadas con UV como modelo *in vitro*, y se utilizó la piel dorsal de ratones irradiada con UV como modelo *in vivo* de fotoenvejecimiento de la piel. Observaron que al

aplicar la fórmula Qing'e modificada en ratones fotoenvejecidos aumentó el contenido de humedad y la elasticidad de la piel, disminuyó la sensibilidad de la piel e inhibió la aparición de pigmentación y arrugas, mejorando así significativamente el estado patológico de la piel. A su vez, se observó que el tratamiento con fórmula Qing'e modificada en el modelo *in vitro* durante 24 horas aumentó la expresión de Nrf2. De igual forma, se observó en el modelo *in vivo* que el tratamiento durante 9 semanas con la fórmula Qing'e modificada aumentó la expresión de la proteína Nrf2 en la piel del ratón. La proteína Nrf2 es un regulador del estrés oxidativo; este al ser activado se transfiere al núcleo y se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés), que posteriormente regula la expresión de genes antioxidantes. Por esta razón la activación Nrf2 se considera una estrategia molecular para la fotoprotección de la piel (Zhu y col., 2022).

Por otra parte, Umar y colaboradores observaron que la autofagia ofrece una protección significativa contra el daño inducido por la radiación UV. Cabe mencionar que la autofagia ayuda a mantener la homeostasis tisular, protege a las células de las agresiones externas que perturban su integridad y se ha observado que previene el daño genómico al eliminar los restos celulares provocados. De igual forma, se ha relacionado el desequilibrio en este proceso con diversas patologías humanas, como enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas y cáncer; por ello se está buscando utilizar la autofagia como intervención terapéutica selectiva para múltiples enfermedades, esto mediante el mejoramiento de la autofagia químicamente. En consecuencia, Umar y colaboradores se plantearon investigar la importancia biológica de la respuesta autofágica a la radiación UV; por consiguiente, utilizaron como modelo las células A549 y H1299 a las cuales le suprimieron los genes de Beclin-1 y Atg5 (genes que codifican proteínas importantes para la autofagia); ellos observaron que, al inhibir la autofagia mediante la supresión de estos genes, aumentó la apoptosis generada por la radiación UV en comparación con las células sin modificar. La conclusión de los investigadores fue que la autofagia actúa como un mecanismo citoprotector contra la apoptosis inducida por UV (Umar y col., 2021).

Wang y colaboradores descubrieron que el polisacárido de *Saussurea involucreta* (SIP) reduce el estrés oxidativo y el daño al ADN inducidos por los rayos UVB. El grado del daño al ADN lo evaluaron al medir el nivel de CPD (principal producto del

daño del ADN inducido por UVB) y  $\gamma$ -H2AX (molécula sensora de daño del ADN) presente en la piel de ratones macho irradiados con radiación UVB. Observaron que al utilizar un hidrogel hecho con SIP estos marcadores se redujeron significativamente en comparación con los ratones irradiados sin hidrogel, lo que indicó la reducción del daño al ADN. Además, dichos autores estudiaron el estrés oxidativo en células HaCaT irradiadas con UVB mediante citometría de flujo, donde observaron una reducción de los ROS después del tratamiento con SIP, por lo que concluyeron que este podría reducir el daño inducido por UVB en queratinocitos (Wang y col., 2023). En ese mismo año, Li y colaboradores revelaron que la leche de burra tiene un potente efecto inhibidor sobre la síntesis de melanina, además que tiene efecto sobre el daño de la barrera cutánea inducido por la radiación UVB, indicando que la leche de burra inhibe la lesión inducida por los UVB y restablece la función de la barrera cutánea mediante la regulación positiva de la expresión de filagrina. Esto lo observaron al incubar células HaCaT con diversas concentraciones de la leche de burra durante 24 horas, para posteriormente (después de una serie de pasos para extraer las proteínas de las células) sondear la filagrina mediante la incubación con anticuerpos, mientras que para evaluar el efecto sobre la melanina, optaron por incubar las células con concentraciones crecientes de leche de burra durante 48 horas en presencia o ausencia de hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH) (Li y col., 2023).

La amplia variedad de investigaciones que se están realizando para prevenir el daño causado por la radiación UV, indican la preocupación que existe por este fenómeno y fomenta la búsqueda de alternativas.

## II. Carotenoides

Entre las moléculas con efecto fotoprotector se encuentran los carotenoides. Los carotenoides son compuestos muy coloridos y liposolubles sintetizados naturalmente por las plantas, bacterias, algas y hongos. El cuerpo humano obtiene los carotenoides por medio de la dieta, estos se encuentran comúnmente en frutas y verduras tales como zanahorias, tomates, maíz, pimientos, algunas algas marinas, entre otras. En las plantas, los carotenoides tienen funciones de fotoprotección importantes para la fotosíntesis, y participan como precursores de fitohormonas como el ácido abscísico y las estrigolactonas; se ha descubierto que dichos compuestos tienen funciones potenciales para el ser humano tales como antioxidante, actividad antitumoral, mejora

de la función inmune, protección de la visión, protección de la piel y participación en la reproducción (Cheng y col., 2022; Xiao y col., 2022).

Los carotenoides se pueden clasificar dependiendo de su estructura en dos grupos, como carotenos que son hidrocarburos sin oxígeno, por ejemplo,  $\beta$ -caroteno; y xantófila que son hidrocarburos con oxígeno, por ejemplo, luteína y zeaxantina (figura 4). Las xantófilas tienen la estructura base de los carotenoides, un esqueleto de polieno C40 con un anillo de ionona al final, y gracias a ello estas moléculas son capaces de absorber luz visible de longitudes de onda cortas que van de 400 a 550 nm (Xiao y col., 2022).

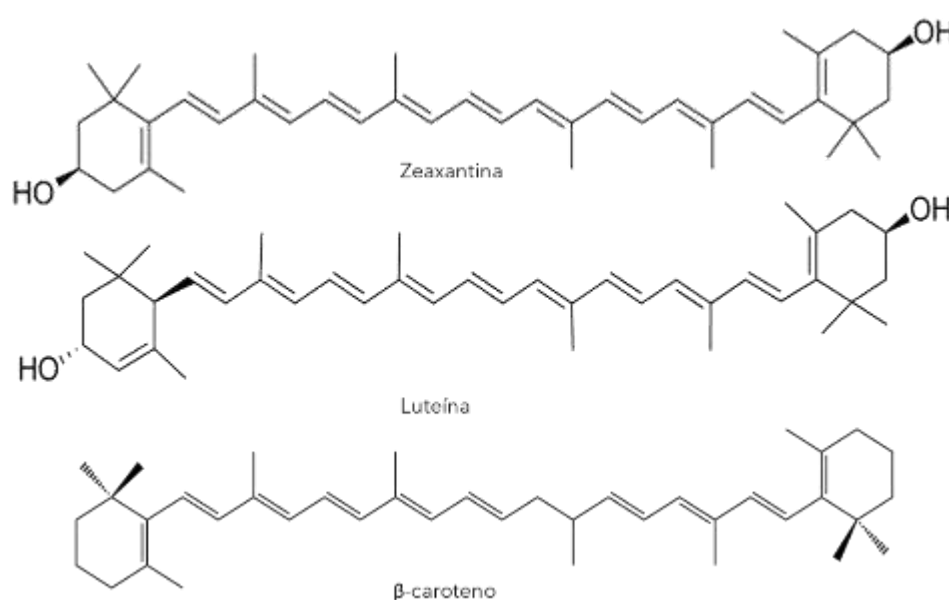


Figura 4. Estructura de zeaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno. Zeaxantina y luteína son xantófilas, es decir, poseen oxígeno en su estructura.

Se ha observado que los carotenoides actúan como agentes de transporte de electrones y desempeñan funciones críticas en la protección de órganos, tejidos y células de la acción dañina de los ROS (Zhuang y col., 2022).

Diversos estudios han sugerido que los carotenoides tienen un efecto fotoprotector, no solo al absorber directamente la radiación ultravioleta, sino también al eliminar las especies reactivas de oxígeno y radicales libre de oxígeno en la piel (Grether-Beck y col., 2017; Rodríguez-Luna y col., 2018).

Este estudio busca evaluar el efecto fotoprotector y posible efecto reparador de los carotenoides administrados por vía tópica, a su vez que contribuirá al entendimiento del daño y reparación de la piel humana, el diseño de formas potenciales de prevención para el fotoenvejecimiento y/o el cáncer de piel y a mediano plazo el desarrollo de productos con capacidad fotoprotectora a base de estos compuestos.

### **III. HIPÓTESIS**

Los carotenoides luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, presentarán un efecto fotoprotector y reparador contra la radiación UV en la línea celular de queratinocitos de piel humana.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **IV.1. Objetivo general**

Estudiar en la línea celular de queratinocitos de piel humana HaCaT, el potencial efecto fotoprotector y reparador de los carotenoides (luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno) contra el daño causado por la radiación UV, mediante un ensayo de citotoxicidad.

#### **IV.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la viabilidad celular de las células HaCaT con los tratamientos de luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno mediante ensayo MTT.
- Evaluar el efecto fotoprotector y reparador de los tratamientos con luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno mediante ensayo de MTT en células HaCaT frente al daño generado por radiación UVB.

### **V. METODOLOGÍA**

#### **V.1. Materiales**

La luteína fue extraída a partir de la oleorresina de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L) y la zeaxantina fue obtenida mediante semisíntesis a partir de la luteína extraída siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-de León y colaboradores en 2019 (Rodríguez-deLeón y col., 2019). Se utilizó  $\beta$ -caroteno de Sigma-Aldrich. En

lo referente al cultivo celular, la línea celular de queratinocitos de piel humana (HaCaT) fue amablemente donada por el Laboratorio de Inmunología Aplicada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológica del Instituto Politécnico Nacional. Se utilizó medio Dulbecco Modificado de Eagle (DMEM) marca Biowest, suero fetal bovino (SFB) marca Biowest, estreptomicina y penicilina de Gibco y dimetilsulfóxido (DMSO) marca Sigma-Aldrich.

Por otro lado, para el ensayo MTT se utilizó el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de la marca Sigma-Aldrich, y se preparó la solución solubilizadora con 5 mL de Tritón-X100, 45 mL de isopropanol y 1 gota de ácido clorhídrico al 37 %.

## V.2. Cultivo y caracterización de la línea celular de queratinocitos de piel humana

El cultivo se llevó a cabo en una campana de flujo laminar tipo A II. Todo el material utilizado fue sometido a un proceso de esterilización, y los reactivos estuvieron debidamente etiquetados.

Como modelo de estudio, se utilizó la línea celular HaCaT, la cual se cultivó en DMEM suplementado con 10 % (v/v) de SFB, con una mezcla de 2 % de penicilina/estreptomicina, al cual se le denominó medio DMEM completo. Los cultivos celulares se incubaron a una temperatura de 37°C, en condiciones de alta humedad y con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en aire. El medio se renovó cada 2 a 3 días, según lo requirió el crecimiento de las células.

Posteriormente, una vez que el cultivo alcanzó el 80 % de confluencia, las células se disgregaron con tripsina, para su propagación o siembra de tratamientos.

## V.3. Diseño Experimental

Se realizaron soluciones stock de cada uno de los compuestos en DMSO a una concentración de 20 mM, como se ha reportado previamente (Li y col., 2015; Roldán-Fidalgo y col., 2016; Ying y col., 2017; Juin y col., 2018; Antunes y col., 2022; Kondo y col., 2022).

Posteriormente se prepararon soluciones de trabajo diluyendo las soluciones stock con medio DMEM completo hasta alcanzar las siguientes concentraciones

individualmente: luteína 5, 20 y 50  $\mu\text{M}$ , zeaxantina 10 y 20  $\mu\text{M}$ , y  $\beta$ -caroteno 20 y 40  $\mu\text{M}$ . Estas soluciones están basadas en experimentos reportados previamente indicados en el cuadro 1. Sumado a esto, se agregó la concentración 3600  $\mu\text{M}$  para cada compuesto:  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y luteína. Esta concentración está calculada de acuerdo con la necesidad diaria de algunos carotenoides en el cuerpo humano (Kumar y col., 2024).

A estas soluciones se les denominarán grupos experimentales en los siguientes apartados (cuadro 1).

Cuadro 1. Grupos experimentales.

Grupos experimentales		Referencia
Soluciones de trabajo	Disolución 5 μM de luteína	Keegan y col., 2020; Pap y col., 2021; Roldán-Fidalgo y col. 2016; Li y col., 2015; Rafi y col., 2015.
	Disolución 20 μM de luteína	
	Disolución 50 μM de luteína	
	Disolución 10 μM de zeaxantina	Liu y col., 2023; Lou y col., 2024; Juin y col., 2018; Ying y col., 2017.
	Disolución 20 μM de zeaxantina	
	Disolución 20 μM de β-caroteno	Antunes y col., 2022; Kondo y col., 2022; Lee y col., 2020; Lohan col., 2018.
	Disolución 40 μM de β-caroteno	
	Disolución 3600 μM de luteína	Kumar y col., 2024.
	Disolución 3600 μM de zeaxantina	
	Disolución 3600 μM de β-caroteno	
Control	Medio DMEM completo	

Los métodos descritos en las siguientes secciones tuvieron un procedimiento previo para poder realizar la evaluación del efecto fotoprotector, reparador y toxicidad de los grupos experimentales en las células HaCaT.

Primero se sembraron el número de células especificado en el ensayo y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa y que alcanzaran la fase logarítmica.

### V.3.1. Toxicidad

Para la evaluación de la toxicidad, después de las 24 horas de incubación se lavaron cada uno de los pozos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1x y se adicionaron las soluciones de cada grupo experimental en los volúmenes requeridos para cada ensayo para cada tiempo de evaluación (24, 48 y 72 horas), como se muestra en la figura 5.

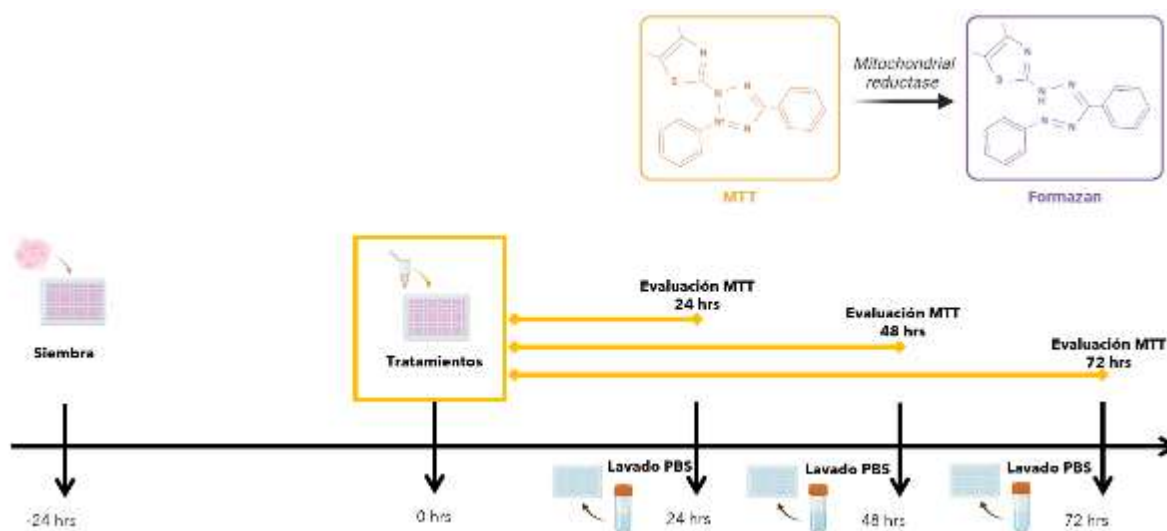


Figura 5. Diseño experimental de la prueba de toxicidad.

### V.3.2. Fotoprotección

Por su parte, para evaluar el efecto fotoprotector después de las 24 horas de adaptación, se reemplazó el medio de siembra con tratamiento conforme a cada grupo experimental descrito en el cuadro 1. Posteriormente, se incubó durante 4 horas. Una vez se cumplió este tiempo, se irradiaron las células en cultivo durante 30 minutos con una lámpara de radiación UVB (290-320 nm). Terminado el tiempo de irradiación se removieron los tratamientos y se lavó 4 veces con PBS 1x para finalmente agregar medio DMEM completo y proceder con el ensayo (figura 6).

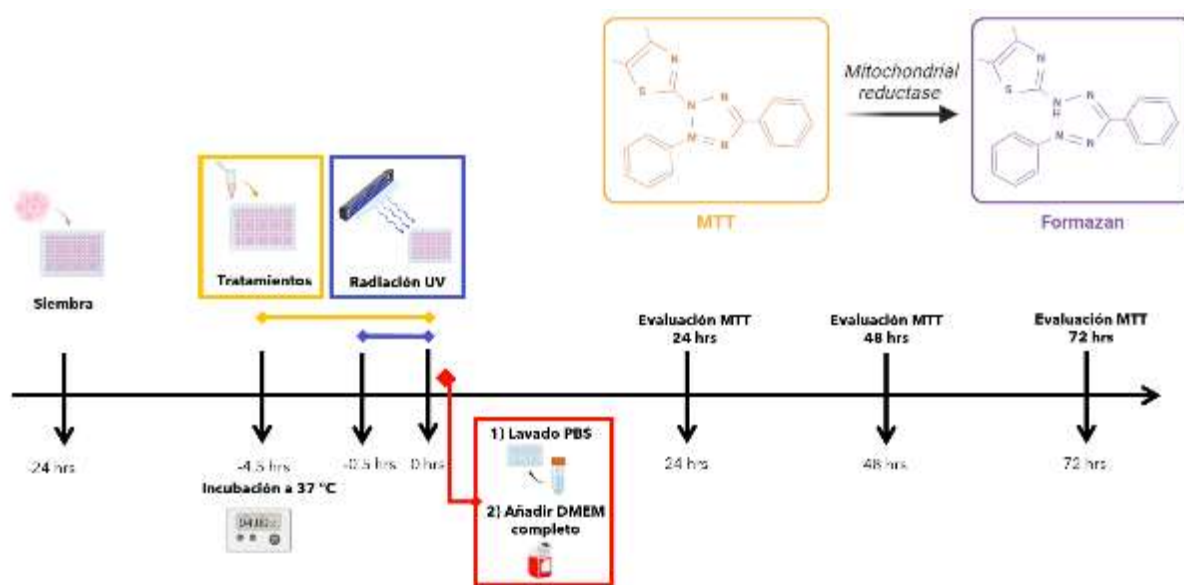


Figura 6. Diseño experimental de la prueba de fotoprotección.

### V.3.3. Reparación

Mientras que, para la evaluación del efecto reparador, 28 horas después de la siembra se irradiaron las células en cultivo durante 30 minutos con la lámpara de radiación UVB (290-320 nm). Después se lavó 4 veces con PBS 1x cada uno de los pozos y se añadieron los tratamientos conforme a cada grupo experimental descrito en el cuadro 1 (figura 7).

Durante el período en el que se irradiaron las células, estas se colocaron en una habitación aislada como medida de precaución para las personas.

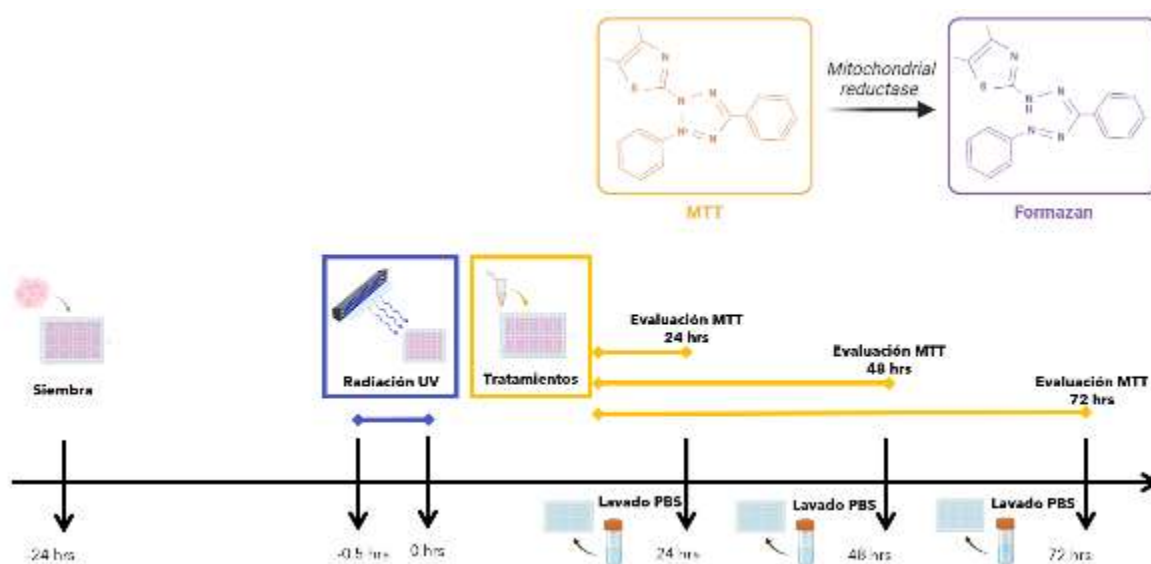


Figura 7. Diseño experimental de la prueba de reparación.

#### V.4. Ensayo MTT

La evaluación de la toxicidad, fotoprotección y reparación de los grupos experimentales se realizó con el ensayo de viabilidad (MTT). Para dicho ensayo, se realizó una curva de los grupos experimentales a distintos tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas). La toxicidad, fotoprotección y reparación de los grupos experimentales se determinó de manera indirecta, al cuantificar la viabilidad celular por medio de la actividad de la enzima reductasa presente en la mitocondria, esto mediante la determinación de la transformación de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, de color amarillo, a una especie reducida de MTT (azul).

En una placa de 96 pozos se sembraron  $1 \times 10^4$  células por cada pozo, y se procedió con el diseño experimental antes mencionado para toxicidad, fotoprotección y reparación. Posteriormente, las células se incubaron con 10  $\mu$ L de solución MTT (5 mg/mL) por pozo a 37 °C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 100  $\mu$ L de solución solubilizadora, para diluir los cristales de formazán producidos en cada pozo. Después de adicionar la solución, la placa se agitó por 30 segundos a temperatura ambiente (t.amb.); finalmente, se midió la absorbancia en un lector de ELISA (Bio-Rad 680) a longitud de onda 570 nm (Tada y col., 1986).

## V.5. Análisis estadístico

Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado. Se graficaron las medias de los experimentos  $\pm$  error estándar (SE). Para analizar los datos grupales se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett como prueba *post-hoc*. Un valor  $p < 0.05$  indica una diferencia estadísticamente significativa.

## V.6. Disposición de residuos

Todo el material que entró en contacto con las células fue sometido a un proceso de inactivación con cloro antes de ser desechado, con el fin de prevenir cualquier riesgo de contaminación. Los residuos biológicos se colocaron en una bolsa roja destinado para Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI). El material de desecho producido y los residuos fueron recogidos y enviados a compañías especializadas, que cuentan con la autorización de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, para su tratamiento de acuerdo con las normativas de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

# VI. RESULTADOS

## VI.1. Evaluación de modelo de daño UV

Con la finalidad de evaluar el modelo de daño utilizado en este proyecto se irradiaron células HaCaT durante 30 min con UVB, posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT inmediatamente después de irradiar, más las 4 horas de incubación del MTT, y a las 24, 48 y 72 horas *post* irradiación. Estos resultados fueron comparados con células HaCaT sembradas a la vez que las células irradiadas para realizar la comparación contra el modelo de daño en cada uno de los tiempos mencionados. Esto dio como resultado que a partir de las 24 horas *post* irradiación el grupo control de daño UV es significativamente diferente a las células sin irradiar, es decir, el control (figura 8).

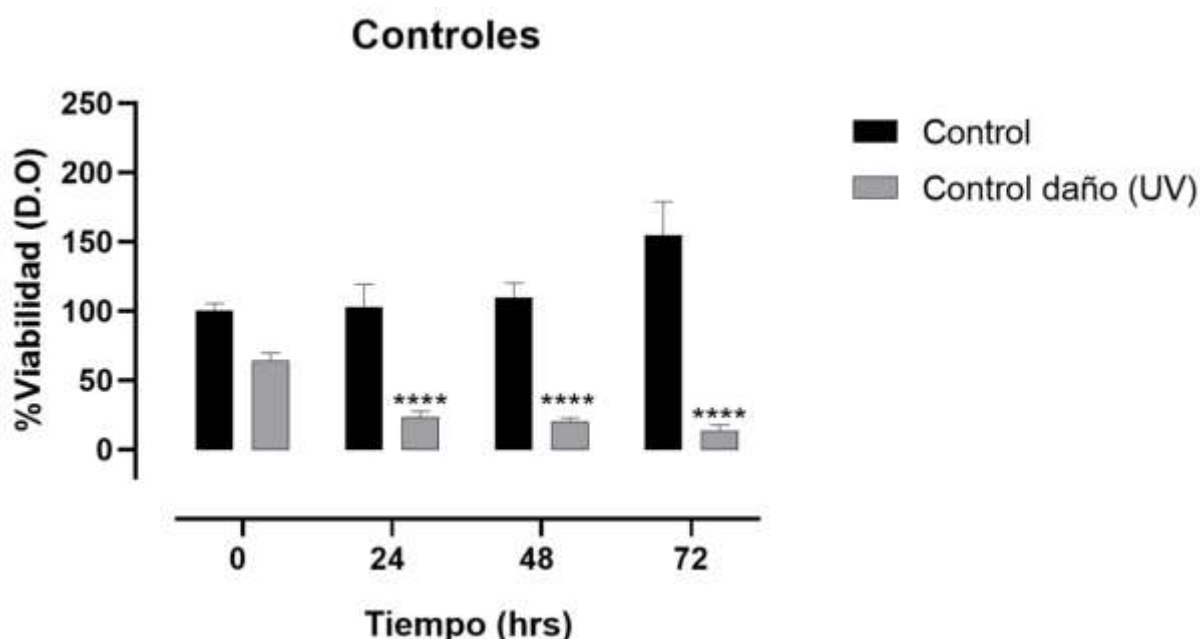


Figura 8. Evaluación del modelo de daño UV a las 0, 24, 48 y 72 horas *post* irradiación en células HaCaT utilizando ensayo MTT.  $n=3$ , los experimentos se realizaron por triplicado, se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Se utilizó ANOVA de dos vías y Sidak's como prueba *post-hoc*,  $*p < 0.05$  *versus* control.

## VI.2. Evaluación de fotoprotección

Con el propósito de evaluar el efecto fotoprotector, se colocaron cada una de las concentraciones a evaluar ( $\beta$ -caroteno 20, 40  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ , zeaxantina 10, 20  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$  y luteína 5, 20, 50  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ ) 4 horas antes a la exposición a radiación UV. Después del período de radiación se retiraron los carotenoides, se lavaron los pozos y se reemplazaron con medio DMEM completo para la incubación de los diferentes tiempos de evaluación (24, 48 y 72 horas).

Se observó que no hay diferencias significativas de viabilidad con ninguno de los tratamientos ( $\beta$ -caroteno 20 y 40  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ , zeaxantina 10, 20  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$  y luteína 5, 20, 50  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control de daño UV (células sin protección) a ninguno de los tiempos evaluados, a excepción de luteína 20 y 50  $\mu\text{M}$  a las 0 horas *post* irradiación (figura 9).

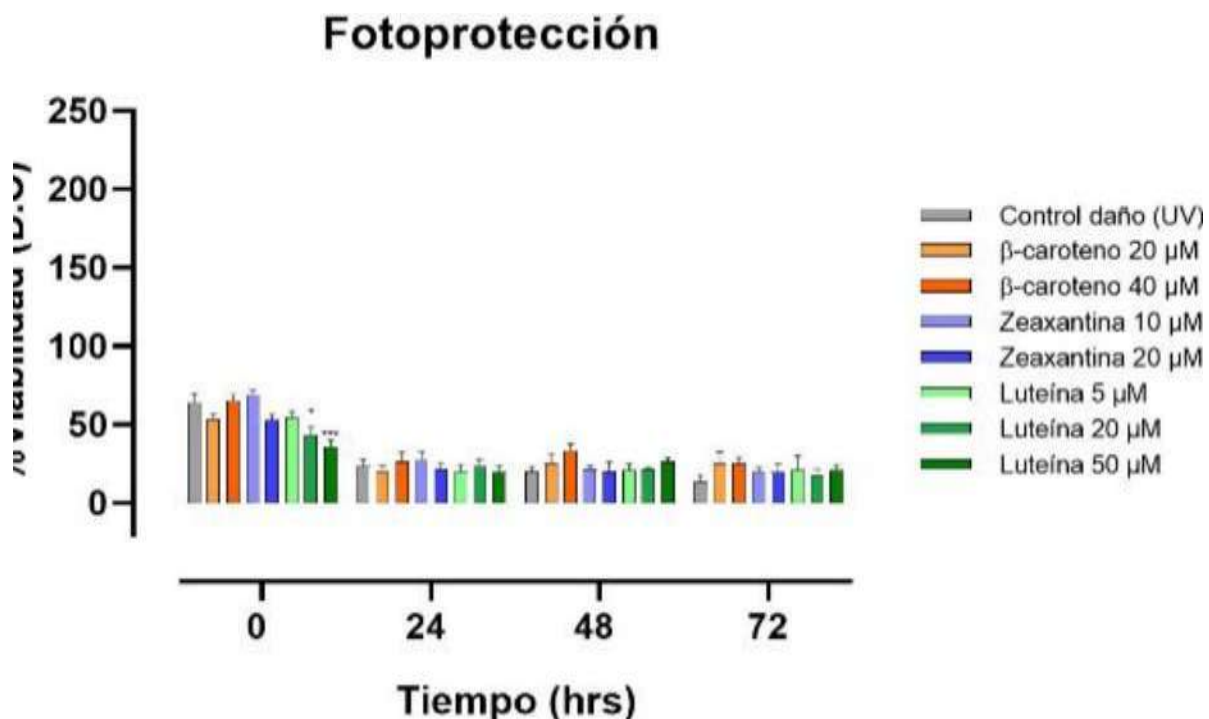


Figura 9. Evaluación del efecto fotoprotector de  $\beta$ -caroteno 20 y 40  $\mu$ M, zeaxantina 10 y 20  $\mu$ M y luteína 5, 20, 50  $\mu$ M a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.  $n=3$ , los experimentos se realizaron por triplicado, se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Datos normalizados respecto a control sin irradiar a las 0 horas. Se utilizó ANOVA de dos vías y Dunnett como prueba *post-hoc*, \* $p < 0.05$  versus control de daño (UV). ND= no detectable.

Para la evaluación del efecto fotoprotector de los carotenoides a 3600  $\mu$ M, las células estuvieron en contacto con los compuestos 4 horas y media (tiempo de irradiación) para posteriormente ser lavadas y sustituir los compuestos con medio DMEM completo. Se observó que los compuestos a esta concentración *versus* el control de daño UV tienen un porcentaje de viabilidad menor a las 0 horas; sin embargo, únicamente  $\beta$ -caroteno es estadísticamente menor (\*) que el control de daño UV. A partir de las 24 horas de irradiación todos los grupos tratados con esta concentración presentaron un mayor porcentaje de viabilidad en comparación con el control de daño UV. Sin embargo, solamente zeaxantina y luteína a 3600  $\mu$ M presentan un aumento estadísticamente significativo (\*), este resultado se mantiene hasta las 72 horas de tratamiento, tal como se aprecia en la figura 10.

Al observar la figura 9 resaltan los porcentajes de viabilidad de luteína a 3600  $\mu$ M en todos sus tiempos a partir de las 24 horas *post* irradiación, Donde a las 24 horas luteína a 3600  $\mu$ M tiene una viabilidad de 163.11% mientras a este mismo tiempo de evaluación el control tiene una viabilidad de 102.74% en la figura 8. Este resultado es

consistente con las fotomicrografías tomadas durante la realización del ensayo MTT (ver figura 10 y figura 15 de anexo).

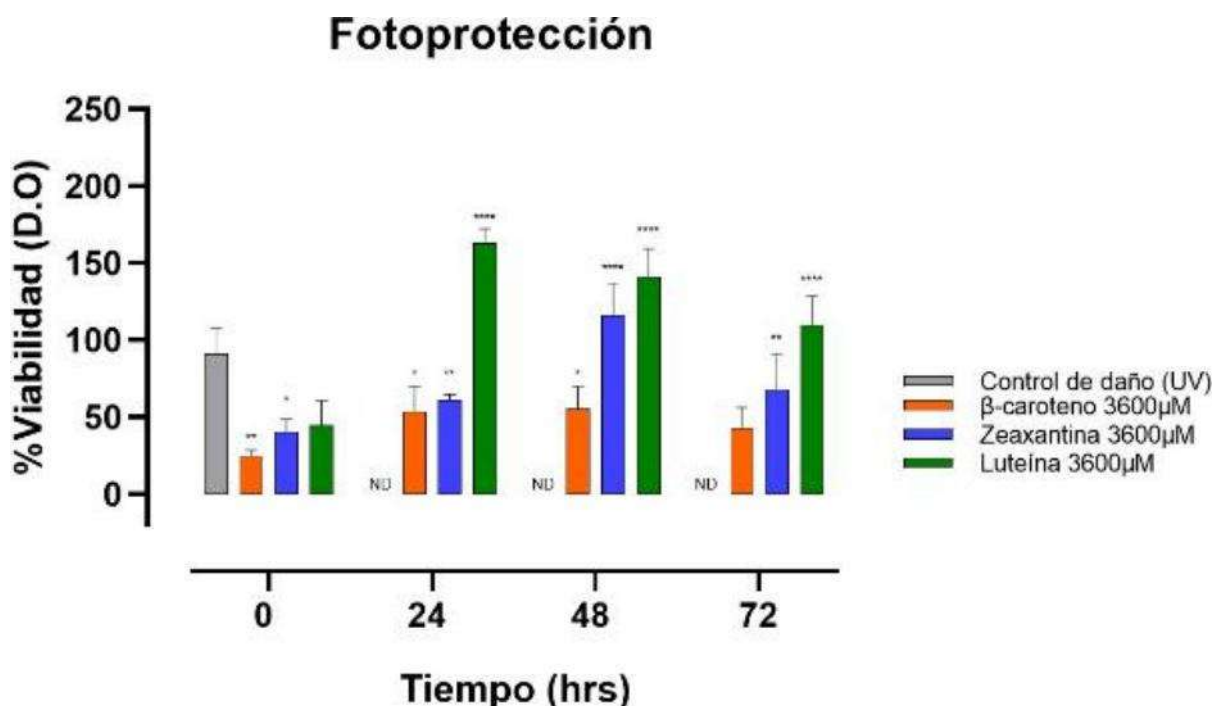


Figura 10. Evaluación del efecto fotoprotector de la concentración 3600  $\mu\text{M}$  de los grupos experimentales a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.  $n=3$ , los experimentos se realizaron por triplicado, se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Datos normalizados respecto a control sin irradiar a las 0 horas. Se utilizó ANOVA de dos vías y Dunnett como prueba *post-hoc*,  $*p < 0.05$  versus control de daño (UV). ND= no detectable.

### VI.3. Evaluación de toxicidad

Para evaluar la toxicidad de los compuestos las células HaCaT fueron incubadas de 24 a 72 horas con cada una de las concentraciones de trabajo ( $\beta$ -caroteno 20, 40  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ , zeaxantina 10, 20  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$  y luteína 5, 20, 50  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ ). Para este procedimiento, los carotenoides estuvieron en contacto con las células HaCaT durante toda la incubación de los diferentes tiempos de evaluación (24, 48 y 72 horas); los compuestos se retiraron previo a la realización del ensayo de MTT, primero se retiraron los compuestos, se lavaron los pozos, se agregó medio DMEM completo e inmediatamente se procedió con la evaluación de MTT.

Ninguno de los grupos experimentales  $\beta$ -caroteno 20 y 40  $\mu\text{M}$ , zeaxantina 10 y 20  $\mu\text{M}$  y luteína 5, 20 y 50  $\mu\text{M}$  presentaron una diferencia significativa del porcentaje de

viabilidad, en comparación con el control de viabilidad (células sin carotenoides) a ninguno de los tiempos de exposición probados, como se observa en la figura 11 (figura 11).

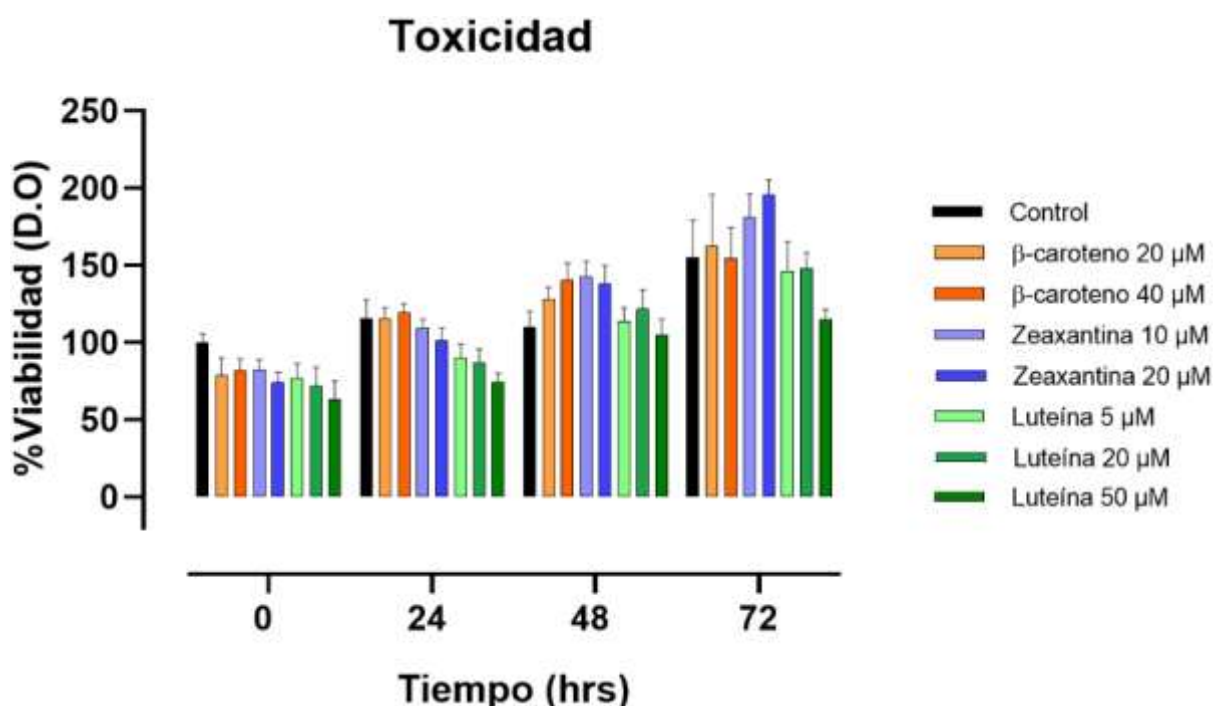


Figura 11. Evaluación de la toxicidad de  $\beta$ -caroteno 20 y 40  $\mu$ M, zeaxantina 10 y 20  $\mu$ M y luteína 5, 20, 50  $\mu$ M a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.  $n=3$ , los experimentos se realizaron por triplicado, se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Datos normalizados respecto a control sin irradiar a las 0 horas. Se utilizó ANOVA de dos vías y Dunnett como prueba *post-hoc*, \*  $p < 0.05$  versus control. ND= no detectable.

En el caso de la concentración 3600  $\mu$ M (figura 12): todos los tratamientos con carotenoides promovieron una disminución significativa (\*) contra su control (sin carotenoides) sobre el porcentaje de viabilidad a partir de las 48 horas de exposición constante a dicha concentración. Adicionalmente podemos observar que  $\beta$ -caroteno abate la señal de MTT a partir de las 24 horas, esto contrasta con las imágenes obtenidas por microscopia durante la realización de la técnica, ya que se observa la presencia de las células adheridas a la placa, similares a las células pretratamiento y con la membrana integra, pero con una baja formación de cristales de formazán por lo que no se estaría produciendo la reducción del reactivo MTT (ver figura 12 y figura 16 de anexo).

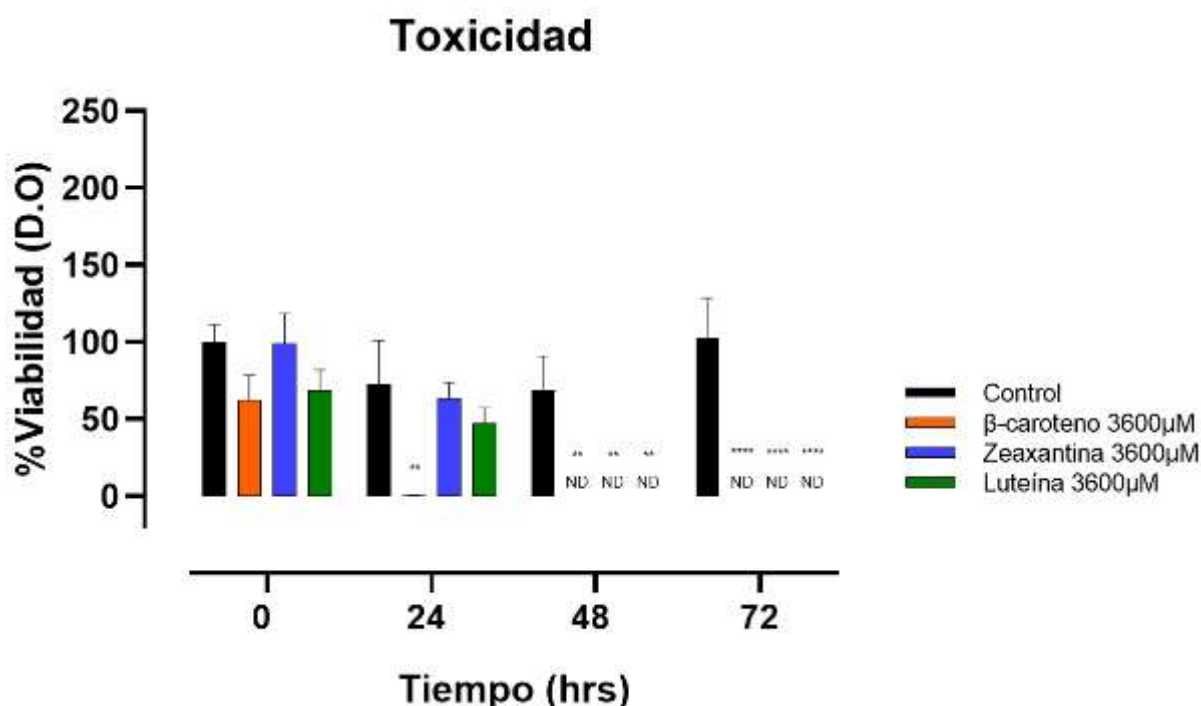


Figura 12. Evaluación de la toxicidad de la concentración 3600  $\mu\text{M}$  de los grupos experimentales a las 0, 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.  $n = 3$ , los experimentos se realizaron por triplicado, se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Datos normalizados respecto a control sin irradiar a las 0 horas. Se utilizó ANOVA de dos vías y Dunnett como prueba *post-hoc*,  $*p < 0.05$  versus control. ND= no detectable.

#### VI.4. Evaluación de reparación

Para evaluar el efecto reparador de los carotenoides sobre el daño con UV sobre las células HaCaT. Todos los grupos de células HaCaT se irradiaron por 30 min con UVB, y posteriormente se lavaron y se colocaron los carotenoides en todas sus concentraciones ( $\beta$ -caroteno 20, 40  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ , zeaxantina 10, 20  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$  y luteína 5, 20, 50  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ ), para posteriormente ser incubadas en presencia de los carotenoides desde 0 a 72 h.

En la figura 13 y 14, no se observan diferencias significativas de viabilidad con ninguno de los tratamientos ( $\beta$ -caroteno 20 y 40  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ , zeaxantina 10, 20  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$  y luteína 5, 20, 50  $\mu\text{M}$  y 3600  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control de daño UV (células sin protección) a ninguno de los tiempos evaluados (figura 12 y 13). A pesar de ello, nuevamente en las fotomicrografías tomadas durante la realización del ensayo MTT, las células tratadas con  $\beta$ -caroteno (3600  $\mu\text{M}$ ) presentaron una

morfología similar a las células pretratamiento con una presencia reducida de cristales de formazán (figura 14 y figura 17 de anexo).

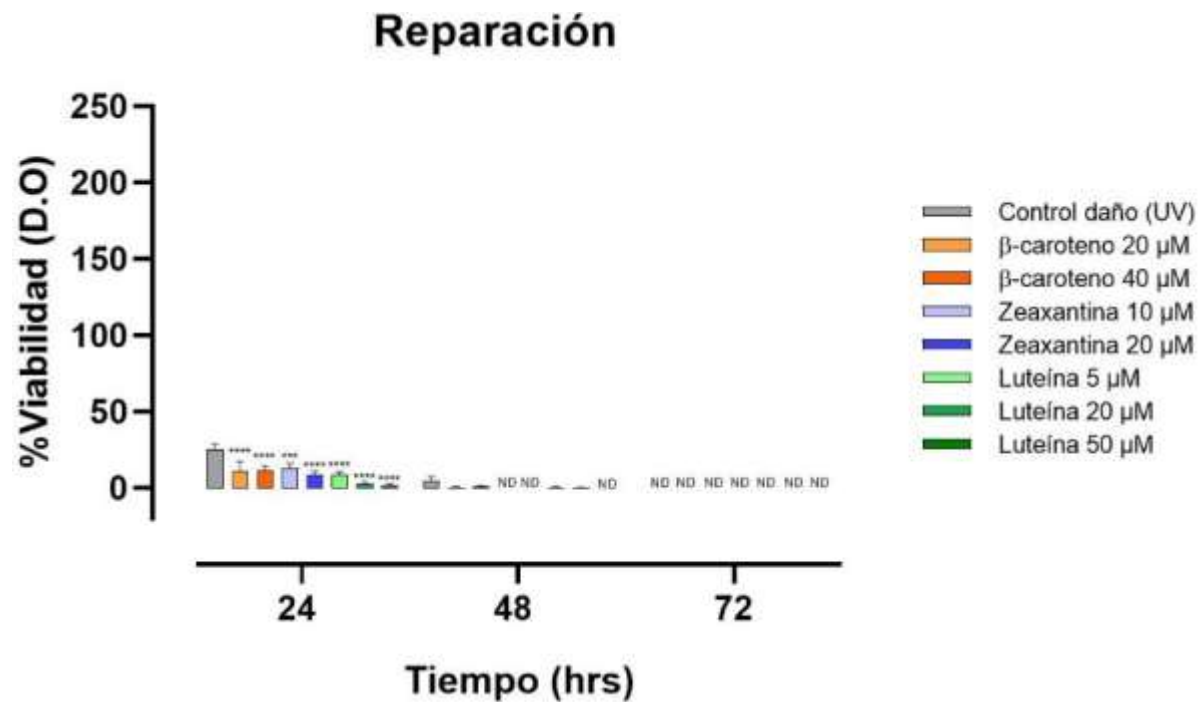


Figura 13. Evaluación del efecto reparador  $\beta$ -caroteno 20 y 40  $\mu$ M, zeaxantina 10 y 20  $\mu$ M y luteína 5, 20, 50  $\mu$ M a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.  $n=3$ , los experimentos se realizaron por triplicado, se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Datos normalizados respecto a control sin irradiar a las 0 horas. Se utilizó ANOVA de dos vías y Dunnett como prueba *post-hoc*,  $*p < 0.05$  *versus* control de daño (UV). ND= no detectable.

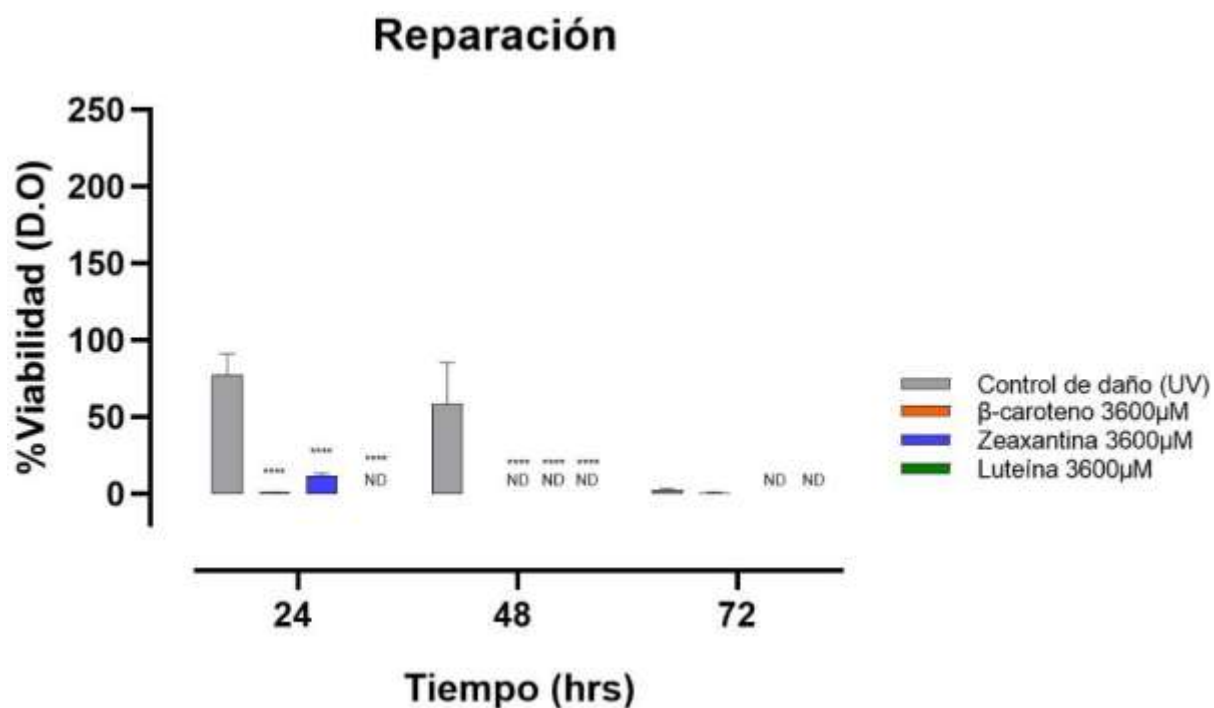


Figura 14. Evaluación del efecto reparador de la concentración 3600  $\mu$ M de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT utilizando ensayo MTT.  $n=3$ , los experimentos se realizaron por triplicado, se graficaron las medias  $\pm$  error estándar. Datos normalizados respecto a control sin irradiar a las 0 horas. Se utilizó ANOVA de dos vías y Dunnett como prueba *post-hoc*,  $*p < 0.05$  versus control de daño (UV). ND= no detectable.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### VII.1. Evaluación de modelo de daño UV

Para evaluar el efecto fotoprotector de los compuestos, se generó un grupo de células HaCaT irradiadas durante 30 minutos con una lámpara de radiación UVB (290-320 nm). El grupo denominado “control de daño UV” mostró una disminución significativa del porcentaje de viabilidad contra el control (células sin irradiar) desde las 24 horas. Este resultado sugiere que el procedimiento utilizado está generando un efecto positivo de daño celular, que se conserva hasta las 72 horas de evaluación.

La irradiación UV provoca lesiones en el ADN mediante reacciones fotoquímicas directas dentro de los sitios de dipirimidina (dos residuos de citosina o timina adyacentes) formando dímeros en la misma hebra. Las lesiones al ADN inducidas por rayos UV más comunes son la formación de los dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD), y la segunda son los fotoproductos de pirimidina (6–4PP), que se generan mediante la formación de enlaces covalentes entre los carbonos 6 y 4 de pirimidinas adyacentes. La radiación UV también activa la vía ATR, que puede detener la formación de las horquillas de replicación al bloquear la ADN polimerasa; mientras que, la ADN helicasa continúa desenrollando el ADN bicatenario. El daño al ADN inducido por los rayos UV también bloquea la transcripción (Lee y col., 2020).

En queratinocitos humanos, evaluados 1 hora después de la exposición a los rayos UV, se detectaron una variedad de citoqueratinas sobre expresadas; 6 horas después de la exposición a los rayos UV, se mostró una expresión alterada de genes relacionados con la proliferación ( $p21^{WAF1}$ , notch4, y SMO), apoptosis (caspasa 10, hTRIP, y CRAF1), reparación de ADN (ERCC1, XRCC1), citocinas (IL-6, IL-13, TGF- $\beta$ , y endotelina 2) y adhesión celular (RhoE, and RhoGDI) (Murakami y col., 2001).

La matriz extracelular de la piel es un fotosensibilizador potencialmente importante para producir ROS tras la exposición a los rayos UV; entre las especies de ROS generadas se incluyen el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Las ROS son eliminadas por antioxidantes intracelulares como el glutatión (GSH); sin embargo, la radiación ultravioleta produce cantidades excesivas de ROS que saturan a las enzimas antioxidantes. Estos altos niveles de ROS contribuyen a la formación de células anormales, activando mecanismos de

señalización de proliferación, alteraciones epigenéticas y formación de lesiones en el ADN, que conducen a estados patológicos como la inflamación y el cáncer (Lee y col., 2020).

Por lo tanto, en este modelo de 72 h se estarían observando las reacciones fotoquímicas, los cambios génicos y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Según lo reportado por la literatura los compuestos utilizados se destacan por promover un efecto antioxidante y fotoprotector, por lo que sería uno de los mecanismos de los cuales esperamos ver efecto.

## VII.2. Evaluación de fotoprotección

Al colocar las concentraciones de los grupos experimentales:  $\beta$ -caroteno a 20 y 40  $\mu$ M, zeaxantina a 10 y 20  $\mu$ M, y luteína a 5, 20 y 50  $\mu$ M (Li y col., 2015; Roldán-Fidalgo y col., 2016; Ying y col., 2017; Juin y col., 2018; Antunes y col., 2022; Kondo y col., 2022) durante el período de radiación con UVB, se evaluó el efecto fotoprotector de los compuestos en estas condiciones (específicamente, su capacidad de proteger a las células durante la radiación); los resultados no mostraron una diferencia significativa con respecto al control de daño UV (células irradiadas). Por lo tanto, en estas condiciones las concentraciones de  $\beta$ -caroteno a 20 y 40  $\mu$ M, zeaxantina a 10 y 20  $\mu$ M, y luteína a 5, 20 y 50  $\mu$ M no fueron capaces de disminuir el efecto citotóxico de la radiación UVB. Este resultado puede sugerir un daño excesivo a las células HaCaT, que es difícil de evitar con las concentraciones anteriormente planteadas.

Estudios previos han indicado que una hora de luz solar genera una temperatura sorprendentemente alta, con gran número de lesiones del ADN; se estima que se forman entre 100,000 y 200,000 lesiones de ADN en células diploides humanas con 6 mil millones de pares de bases (Lee y col., 2020). Resultaría interesante probar otros protocolos de irradiación como los utilizados por otros grupos de investigación, como Nuryana y colaboradores con un tiempo de radiación de 5.5 minutos (Nuryana y col., 2020) o el grupo Słabicka-Jakubczyk donde evaluaron la viabilidad de células HaCaT al irradiarlas 4 y 20 min con radiación UV con y sin protección solar con FPS 50 (Słabicka-Jakubczyk y col., 2023)

De manera interesante, los grupos experimentales tratados con  $\beta$ -caroteno 3600  $\mu$ M, zeaxantina 3600  $\mu$ M y luteína 3600  $\mu$ M (Kumar y col., 2024) tienen un comportamiento

distinto. Observamos que a las 24 horas los grupos tratados durante 4.5 horas (el tiempo de incubación previo a la radiación y durante esta) con  $\beta$ -caroteno y zeaxantina 3600  $\mu$ M, tienen un aumento de viabilidad con respecto al grupo control de daño UV (control positivo de daño), indicando un efecto fotoprotector de estos compuestos. Este aumento de viabilidad se mantiene hasta las 72 h con excepción de  $\beta$ -caroteno 3600  $\mu$ M.

Es importante destacar que, además, el porcentaje de viabilidad de luteína a 3600  $\mu$ M aumentó drásticamente desde las 24 hasta las 72 horas. Esto concuerda con las fotomicrografías tomadas durante el ensayo MTT, que muestran una gran cantidad de cristales de formazán, por efecto de la reducción de MTT generada por la acción de enzimas mitocondriales. Dichos resultados nos sugieren que la luteína, en estas condiciones, tiene un efecto fotoprotector sobre las células y, no solo eso, sino que también podría promover la viabilidad y/o proliferación de los queratinocitos sólo en condiciones de daño o exposición a UV. Lo antedicho es consistente, con estudios previos que han mostrado que la expresión genética de la epidermis humana *in vivo* y la de los queratinocitos cultivados *in vitro* son diferentes con y sin exposición a los rayos UV, que ocurren dentro de las 24 h posteriores a la exposición a los rayos UVB. Aunque las funciones de estos genes después de la irradiación UVB aún no se han dilucidado, estos reflejan las diferencias en los entornos celulares (Lee y col., 2020).

Por otro lado, estos hallazgos coinciden con lo señalado por Kumar y sus colaboradores en 2024, quienes afirman que tanto la luteína como la zeaxantina desempeñan un papel importante en la protección contra la fotooxidación causada por la luz azul y los rayos UV en los pigmentos de la retina (Kumar y col., 2024). De manera similar, Kamoshita y colaboradores, observaron que la luteína actúa como activador del superóxido dismutasa (SOD) de manera independiente a la activación por ROS (Kamoshita y col., 2016). Por lo tanto, se sugiere que estos compuestos también podrían aumentar la viabilidad de los queratinocitos a través de la inhibición de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  generados por la radiación UV.

### VII.3. Evaluación de toxicidad

Para evaluar la toxicidad de los grupos experimentales:  $\beta$ -caroteno a 20 y 40  $\mu$ M, zeaxantina a 10 y 20  $\mu$ M, y luteína a 5, 20 y 50  $\mu$ M (Li y col., 2015; Roldán-Fidalgo y col., 2016; Ying y col., 2017; Juin y col., 2018; Antunes y col., 2022; Kondo y col.,

2022), se incubaron las células HaCaT con cada uno de estos grupos desde 0 hasta 72 horas. Debe destacarse que los carotenoides estuvieron en contacto con las células durante todos los tiempos de evaluación a diferencia de fotoprotección que únicamente estuvieron en presencia de los carotenoides durante 4 horas y media. Los resultados mostraron que no hay una disminución significativa de viabilidad en los grupos de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina en comparación con el control negativo (células con medio DMEM completo) a ninguna concentración, ni tiempo de incubación probado.

Por su parte, al evaluar la toxicidad de  $\beta$ -caroteno 3600  $\mu$ M, zeaxantina 3600  $\mu$ M y luteína 3600  $\mu$ M (Kumar y col., 2024), se observó una disminución significativa de la viabilidad celular en zeaxantina y luteína a partir de las 48 horas. Este protocolo difiere del protocolo de fotoprotección ya que ahí las células HaCaT estuvieron en contacto con los tratamientos por un máximo de 4 horas y media.

Por otro lado, las células tratadas con  $\beta$ -caroteno a 3600  $\mu$ M tienen un porcentaje de viabilidad menor que el control desde las 0 horas. Esto contrasta con las fotomicrografías obtenidas durante la realización del ensayo MTT (ver figura 15 en el anexo); en ellas se evidencia la presencia de células adheridas a la placa con la morfología normal de esta línea celular y con poca producción de cristales de formazán, generada por la reducción de MTT por enzimas mitocondriales; a diferencia de los resultados de fotoprotección (las células en contacto con carotenoides por 4.5 horas) donde se observa la formación de cristales de formazán proporcionales a la actividad de las enzimas mitocondriales de las células. Es posible que esto se deba a la exposición prolongada de las células a la concentración tan alta de  $\beta$ -caroteno, esta diferencia entre los resultados de la densidad óptica del MTT y las fotomicrografías nos podría indicar que el  $\beta$ -caroteno a 3600  $\mu$ M no tiene un efecto citotóxico, sino de inhibición de las enzimas reductasas mitocondriales, por lo cual se requiere otra técnica de evaluación de la toxicidad del  $\beta$ -caroteno con este protocolo de tratamiento. Este resultado es relevante porque nos sugiere que  $\beta$ -caroteno no es citotóxico a altas concentraciones y podría tener una ventana de concentración de uso más amplia que las xantófilas, ya que como se verá más adelante esta concentración podría también tener un efecto sobre la reparación ante el daño con UV.

Este resultado estaría indicando que las mitocondrias de las células HaCaT no están funcionando correctamente en presencia de  $\beta$ -caroteno a 3600  $\mu$ M. Es posible que la alta concentración del carotenoide esté generando estrés en la célula, ya que se ha demostrado que en células HaCaT sometidas a un estrés moderado  $\beta$ -caroteno tiene un efecto prooxidativo que podría promover la disfunción mitocondrial (Lohan y col., 2018). Además, Wiley y colaboradores en 2016 demostraron que la disfunción mitocondrial induce una respuesta de senescencia que incluye la inhibición del ciclo celular (Wiley y col., 2016). Podría sugerirse que las células observadas son células senescentes, se requieren más experimentos para confirmar.

Otra posible explicación para la alta confluencia celular y la morfología normal de las células con  $\beta$ -caroteno a 3600  $\mu$ M en la evaluación de toxicidad y reparación, podría ser el metabolismo de este compuesto en el cuerpo humano. El  $\beta$ -caroteno se descompone por acción de la enzima  $\beta$ -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCO1) en la mucosa intestinal, produciendo retinol. Aunque este proceso ocurre principalmente en el intestino, Lindqvist y colaboradores demostraron, mediante detección inmunohistoquímica, que la enzima BCO1, también puede expresarse en queratinocitos (Lindqvist A. y col., 2004). Por lo tanto,  $\beta$ -caroteno podría descomponerse a retinol en las células de la piel (Kafi y col., 2007). Es importante destacar esta parte del metabolismo del carotenoide porque el retinol es una molécula ampliamente estudiada en los tratamientos dermatológicos. Se ha demostrado que el retinol estimula el crecimiento de queratinocitos a través de potenciar la actividad del factor de transcripción c-Jun (Quan, 2023). Por ende, es posible que  $\beta$ -caroteno sea metabolizado por células HaCaT, obteniendo retinol y promoviendo el crecimiento celular. Se requieren más experimentos que puedan confirmar la formación de retinol en células HaCaT estimuladas por  $\beta$ -caroteno.

#### VII.4. Evaluación de reparación

Para evaluar el efecto reparador, acción de los carotenoides una vez hecho el daño, se agregaron a los grupos experimentales  $\beta$ -caroteno a 20 y 40  $\mu$ M, zeaxantina a 10 y 20  $\mu$ M, y luteína a 5, 20 y 50  $\mu$ M (Li y col., 2015; Roldán-Fidalgo y col., 2016; Ying y col., 2017; Juin y col., 2018; Antunes y col., 2022; Kondo y col., 2022) posterior al protocolo de daño con UV y se mantuvieron en contacto con las células desde 0 hasta 72 h. Ya que anteriormente se había observado que los carotenoides tienen la

capacidad de activar vías de señalización que promueven reparación celular como PPAR- $\alpha$  (Choi, 2015). Nuestros resultados indican que ninguna de las concentraciones probadas tiene un efecto reparador contra el daño generado por UV, a ninguno de los tiempos probados. Esto nos indica que en estas condiciones los compuestos no tienen la capacidad de revertir el daño causado por la radiación UV. Esto se puede deber al protocolo de daño de los experimentos (tiempo de exposición a radiación UVB), mencionado anteriormente. Posteriormente, sería sugerido evaluar otros tiempos de exposición a UV para generar un daño más ligero y posteriormente evaluar este efecto.

Por su parte, al evaluar este efecto con la concentración 3600  $\mu$ M de los grupos experimentales (Kumar y col., 2024), nos percatamos de que, nuevamente, las células con los compuestos muestran una gran disminución en el porcentaje de viabilidad celular. Sin embargo, tal como se observó en las fotomicrografías de  $\beta$ -caroteno a 3600  $\mu$ M en la evaluación de toxicidad, también se puede ver que las células poseen una morfología similar a las células pretratadas según se discutió en el apartado anterior (figura 16 en el anexo). Esto podría indicar un posible efecto de reparación para este grupo experimental con  $\beta$ -caroteno a 3600  $\mu$ M. Sin embargo, de igual manera, se requiere otra técnica experimental para probar esta aseveración.

## VIII. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que en las condiciones evaluadas:

- Los tratamientos con 3600  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina durante un intervalo de 4 horas, prolongado hasta el momento *post* irradiación (30 min) tienen un efecto fotoprotector de las células HaCaT desde 24 hasta 72 horas.
- La luteína a 3600  $\mu\text{M}$  aplicada durante un intervalo de 4 horas, prolongado hasta el momento *post* irradiación (30 min) tiene un efecto fotoprotector desde 24 hasta 72 horas y promueve la proliferación de las células HaCaT desde 24 hasta 48 horas. Todos los grupos experimentales con la concentración 3600  $\mu\text{M}$  son tóxicas para las células HaCaT a partir de las 24 horas de exposición continua.
- Los grupos experimentales  $\beta$ -caroteno a 20 y 40  $\mu\text{M}$ , zeaxantina a 10 y 20  $\mu\text{M}$ , y luteína a 5, 20 y 50  $\mu\text{M}$  presentaron toxicidad hasta por 72 horas de exposición continua.
- Ninguno de los grupos experimentales presentó un efecto reparador de manera significativa.

Es necesario realizar otros ensayos para corroborar el efecto del grupo de  $\beta$ -caroteno a 3600  $\mu\text{M}$ , así como evaluar los mecanismos moleculares implicados en los efectos probados.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Amado S. (2015). Lecciones de Dermatología. 16° ed. McGRAW-HILL Interamericana Editores, S.A. de C.V. México.
- Antunes, A., Carmo, F., Pinto, S., Andrade, N., & Martel, F. (2022). The anti-proliferative effect of  $\beta$ -carotene against a triple-negative breast cancer cell line is cancer cell-specific and JNK-dependent. *PharmaNutrition*, 22, 100320. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100320>
- Baswan, S. M., Marini, A., Klosner, A. E., Jaenicke, T., Leverett, J., Murray, M., Gellenbeck, K. W., & Krutmann, J. (2020). Orally administered mixed carotenoids protect human skin against ultraviolet A-induced skin pigmentation: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 36(3), 219-225. <https://doi.org/10.1111/phpp.12541>
- Brand, R. M., Wipf, P., Durham, A. C., Epperly, M. W., Greenberger, J. S., & Faló, L. D. (2018). Targeting Mitochondrial Oxidative Stress to Mitigate UV-Induced Skin Damage. *Frontiers In Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00920>
- Cantrell, A., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., Rancan, F., & Böhm, F. (2003). Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Archives of biochemistry and biophysics*, 412(1), 47–54. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00014-6)
- Carvajal, C. C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1002562>
- Chaiprasongsuk, A., & Panich, U. (2022). Role of Phytochemicals in Skin Photoprotection via Regulation of Nrf2. *Frontiers In Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.823881>
- Cheng, B., Wu, X., Li, R., Tu, J., Lin, S., Zhang, X., Mo, X., & Xie, T. (2022). Associations of serum carotenoids with the severity of sunburn and the risk of cancer: A cross-sectional analysis of 1999–2018 NHANES data. *Frontiers In Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1051351>
- Choi C. I. (2019). Astaxanthin as a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Modulator: Its Therapeutic Implications. *Marine drugs*, 17(4), 242. <https://doi.org/10.3390/md17040242>

Council, L., Sheinbein, D. M., Cornelius, L. A. (2016). The Washington Manual of Dermatológico Diagnostics. Editorial Wolters Kluwer.

Deniz AAH, Abdik EA, Abdik H, Aydın S, Şahin F, Taşlı PN. (2020). Zooming in across the Skin: A Macro-to-Molecular Panorama. *Adv Exp Med Biol*; 1247:157-200. doi: 10.1007/5584\_2019\_442. PMID: 31953808.

Fang, Y., Liu, Y., Yan, Y., Shen, Y., Li, Z., Li, X., Zhang, Y., Xue, Z., Peng, C., Chen, X., Cao, K., & Zhou, J. (2021). Differential Expression Profiles and Function Predictions for tRFs & tiRNAs in Skin Injury Induced by Ultraviolet Irradiation. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.707572>

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>

Florento, L., Matias, R., Tuaño, E., Santiago, K., Dela Cruz, F., & Tuazon, A. (2012). Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using *In Vitro* Cell-Based Approach. *International journal of biomedical science : IJBS*, 8(1), 76–80.

Grether-Beck, S., Marini, A., Jaenicke, T., Stahl, W., & Krutmann, J. (2017). Molecular evidence that oral supplementation with lycopene or lutein protects human skin against ultraviolet radiation: results from a double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *British Journal of Dermatology*, 176(5), 1231–1240. <https://doi.org/10.1111/bjd.15080>

Hafttek, M., y Simon, M. (2020). Diferenciación epidérmica. Proceso de formación de la capa córnea. *EMC - Dermatología*, 54(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/s1761-2896\(20\)43358-8](https://doi.org/10.1016/s1761-2896(20)43358-8)

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology*, 28(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>

Hooiveld-Noeken, J. S., Eggen, A. C., Rácz, E., De Vries, E. G., Reyners, A. K., & Jalving, M. (2022). Towards less mutilating treatments in patients with advanced non-melanoma skin cancers by earlier use of immune checkpoint inhibitors. *Critical*

Reviews in Oncology/Hematology, 2022, 180, 103855.  
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103855>

Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. (2023). Tratamiento del cáncer de piel (PDQ®)—Versión para profesionales de salud publicada originalmente por el Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado de.  
<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/pro/tratamiento-piel-pdq#top>

International Organization for Standardization. (2009). ISO 10993-5:2009: Evaluación biológica de dispositivos médicos Parte 5: Pruebas de citotoxicidad *in vitro* (Norma ISO 10993-5:2009). <https://www.iso.org/standard/36406.html>

Juin, C., De Oliveira, R. G., Junior, Fleury, A., Oudinet, C., Pytowski, L., Bérard, J., Nicolau, E., Thiéry, V., Lanneluc, I., Beaugeard, L., Prunier, G., Da Silva Almeida, J. R. G., & Picot, L. (2018). Zeaxanthin from *Porphyridium purpureum* induces apoptosis in human melanoma cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and sensitizes them to the BRAF inhibitor vemurafenib. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(4), 457-467. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.05.009>

Kafi, R., Kwak, H. S., Schumacher, W. E., Cho, S., Hanft, V. N., Hamilton, T. A., King, A. L., Neal, J. D., Varani, J., Fisher, G. J., Voorhees, J. J., & Kang, S. (2007). Improvement of naturally aged skin with vitamin A (retinol). *Archives of dermatology*, 143(5), 606–612. <https://doi.org/10.1001/archderm.143.5.606>

Kammeyer, A., & Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.001>

Kamoshita, M., Toda, E., Osada, H., Narimatsu, T., Kobayashi, S., Tsubota, K., & Ozawa, Y. (2016). Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina. *Scientific reports*, 6, 30226. <https://doi.org/10.1038/srep30226>.

Keegan, G., Pardhan, S., & Chichger, H. (2020). Lutein and zeaxanthin attenuates VEGF-induced neovascularisation in human retinal microvascular endothelial cells through a Nox4-dependent pathway. *Experimental eye research*, 197, 108104. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108104>

Kondo, S., Suzuki, R., Nakashima, Y., & Mochizuki, K. (2022).  $\beta$ -Carotene enhances the expression of inflammation-related genes and histone H3 K9 acetylation, K4 dimethylation, and K36 trimethylation around these genes in juvenile macrophage-like THP-1 cells. *Biochemistry And Biophysics Reports*, 31, 101325. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101325>

Kumar, P., Banik, S. P., Ohia, S. E., Moriyama, H., Chakraborty, S., Wang, C. K., Song, Y. S., Goel, A., Bagchi, M., & Bagchi, D. (2024). Current Insights on the Photoprotective Mechanism of the Macular Carotenoids, Lutein and Zeaxanthin: Safety, Efficacy and Bio-Delivery. *Journal of the American Nutrition Association*, 43(6), 505–518. <https://doi.org/10.1080/27697061.2024.2319090>.

Lee, N. Y., Kim, Y., Kim, Y. S., Shin, J., Rubin, L. P., & Kim, Y. (2020).  $\beta$ -Carotene exerts anti-colon cancer effects by regulating M2 macrophages and activated fibroblasts. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 82, 108402. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108402>

Lee, J. W., Ratnakumar, K., Hung, K. F., Rokunohe, D., & Kawasumi, M. (2020). Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer. *Photochemistry and photobiology*, 96(3), 478–499. <https://doi.org/10.1111/php.13245>

Li, A., He, H., Chen, Y., Li, F., Tang, J., Li, L., Fan, Y., Li, L., & Xiong, L. (2023). Effects of donkey milk on UVB-induced skin barrier damage and melanin pigmentation: A network pharmacology and experimental validation study. *Frontiers In Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1121498>

Li, R., Turner, S. D., Brautigan, D. L. Xanthophylls lutein and zeaxanthin modify gene expression and induce synthesis of hyaluronan in keratinocyte model of human skin. *Biochem Biophys Rep.* 2015 Aug 21;4:52-58. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.08.012. PMID: 29124187; PMCID: PMC5668877.

Lindqvist, A., & Andersson, S. (2004). Cell type-specific expression of beta-carotene 15,15'-mono-oxygenase in human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 52(4), 491–499. <https://doi.org/10.1177/002215540405200407>

Liu, H., Yan, J., Guan, F., Jin, Z., Xie, J., Wang, C., Liu, M., & Liu, J. (2023). Zeaxanthin prevents ferroptosis by promoting mitochondrial function and inhibiting the p53 pathway in free fatty acid-induced HepG2 cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1868(4), 159287. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2023.159287>

Lohan, S. B., Vitt, K., Scholz, P., Keck, C. M., & Meinke, M. C. (2018). ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of  $\beta$ -

carotene and VIS/NIR irradiation. *Chemico-Biological Interactions*, 280, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.002>

Lou, X., Li, H., Alharbi, S. A., Rengarajan, T., & Wang, J. (2024). Natural pigment zeaxanthin ameliorates Lipopolysaccharides induced acute lung inflammation in both *in vitro* and *in vivo* models. *Arabian Journal Of Chemistry*, 17(3), 105569. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105569>

Markiewicz E, Idowu OC. (2019). DNA damage in human skin and the capacities of natural compounds to modulate the bystander signalling. *Open Biol.* 9(12):190208. doi: 10.1098/rsob.190208. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31847786; PMCID: PMC6936251.

Murakami T, Fujimoto M, Ohtsuki M and Nakagawa H (2001). Expression profiling of cancer related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci* 27, 121–129

Nguyen, A. V., & Soulika, A. M. (2019). The Dynamics of the Skin's Immune System. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(8), 1811. <https://doi.org/10.3390/ijms20081811>

Nuryana, C. T., Haryana, S. M., Wirohadidjojo, Y. W., & Arfian, N. (2020). Achatina fulica mucous improves cell viability and increases collagen deposition in UVB-irradiated human fibroblast culture. *Journal of stem cells & regenerative medicine*, 16(1), 26–31. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1601005>

Pap, R., Pandur, E., Jánosa, G., Sipos, K., Agócs, A., & Deli, J. (2021). Lutein Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects and Influences Iron Utilization of BV-2 Microglia. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(3), 363. <https://doi.org/10.3390/antiox10030363>

Quan T. (2023). Human Skin Aging and the Anti-Aging Properties of Retinol. *Biomolecules*, 13(11), 1614. <https://doi.org/10.3390/biom13111614>

Rafi, M. M., Kanakasabai, S., Gokarn, S. V., Krueger, E. G., & Bright, J. J. (2015). Dietary lutein modulates growth and survival genes in prostate cancer cells. *Journal of medicinal food*, 18(2), 173–181. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0003>

Roldán-Fidalgo, A., Saldaña, S. M., Trinidad, A., Olmedilla-Alonso, B., Rodríguez-Valiente, A., García-Berrocal, J., & Ramírez-Camacho, R. (2016). *In vitro* and *in vivo* effects of lutein against cisplatin-induced ototoxicity. *Experimental And Toxicologic Pathology*, 68(4), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.01.003>

Rodríguez-deLeón, E., Jiménez-Halla, J. O. C., Báez, J. E., & Bah, M. M. (2019). A Simple and Efficient Method for the Partial Synthesis of Pure (3R,3'S)-Astaxanthin from (3R,3'R,6'R)-Lutein and Lutein Esters via (3R,3'S)-Zeaxanthin and Theoretical Study of Their Formation Mechanisms. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(7), 1386. <https://doi.org/10.3390/molecules24071386>

Rodríguez-Luna, A., Ávila-Román, J., González-Rodríguez, M. L., Cózar, M. J., Rabasco, A. M., Motilva, V., & Talero, E. (2018). Fucoxanthin-containing cream prevents epidermal hyperplasia and UVB-induced skin erythema in mice. *Marine Drugs*, 16(10). <https://doi.org/10.3390/md16100378>

Słabicka-Jakubczyk, A., Lewandowski, M., Pastuszak, P., Barańska-Rybak, W., & Górka-Ponikowska, M. (2023). Influence of UV nail lamps radiation on human keratinocytes viability. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49814-7>

Smith, M., O'Neill, C., Dickinson, M., Chavan, B., & McBain, A. J. (2023). Exploring associations between skin, the dermal microbiome, and ultraviolet radiation: advancing possibilities for next-generation sunscreens. *Frontiers In Microbiomes*, 2. <https://doi.org/10.3389/frmbi.2023.1102315>

Souto, E. B., Da Ana, R., Vieira, V., Fanguero, J. F., Dias-Ferreira, J., Cano, A., Zielińska, A., Silva, A. M., Staszewski, R., & Karczewski, J. (2022). Non-melanoma skin cancers: Physio-pathology and role of lipid delivery systems in new chemotherapeutic treatments. *Neoplasia*, 2022, 30, 100810. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100810>

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2, *J.Immunol.Methods* 93: 157-165

Umar, S. A., Shahid, N. H., Nazir, L. A., Tanveer, M. A., Divya, G., Archoo, S., Raghu, S. R., & Tasduq, S. A. (2021). Pharmacological Activation of Autophagy Restores Cellular Homeostasis in Ultraviolet-(B)-Induced Skin Photodamage. *Frontiers in oncology*, 11, 726066. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.726066>

Wang, L., Yang, K., Jing, R., Zhao, W., Guo, K., Hu, Z., Liu, G., Xu, N., Zhao, J., Li, L., & Gao, S. (2023). Protective effect of *Saussurea involucri* polysaccharide against skin dryness induced by ultraviolet radiation. *Frontiers In Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1089537>

- Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., & Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell metabolism*, 23(2), 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>
- Xiao, Q., Zhu, Y., Cui, G., Zhang, X., Hu, R., Deng, Z., Lei, L., Wu, L., & Mei, L. (2022). A Comparative Study of Flavonoids and Carotenoids Revealed Metabolite Responses for Various Flower Colorations Between *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Frontiers In Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.828042>
- Ying, C., Chen, L., Wang, S., Mao, Y., Ling, H., Li, W., & Zhou, X. (2017). Zeaxanthin ameliorates high glucose-induced mesangial cell apoptosis through inhibiting oxidative stress via activating AKT signalling-pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy=Biomedecine & pharmacotherapie*, 90, 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.013>
- Yousef H, Alhajj M, Sharma S. (2024). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 29262154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Zhu, S., Qin, W., Liu, T., Liu, T., Ma, H., Hu, C., Yue, X., Yan, Y., Lv, Y., Wang, Z., Zhao, Z., Wang, X., Liu, Y., Xia, Q., Zhang, H., & Li, N. (2022). Modified Qing'e Formula protects against UV-induced skin oxidative damage via the activation of Nrf2/ARE defensive pathway. *Frontiers In Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.976473>
- Zhuang, C., Yuan, J., Du, Y., Zeng, J., Sun, Y., Wu, Y., Gao, X., & Chen, H. (2022). Effects of Oral Carotenoids on Oxidative Stress: A Systematic Review and Meta-Analysis of Studies in the Recent 20 Years. *Frontiers In Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.754707>

## X. ANEXOS

### Dictamen Comité de Bioética



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
**FACULTAD DE QUÍMICA**



C.U., Querétaro, septiembre 18, 2024  
No. de oficio, CBQ24/098

**Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo**  
Investigadora responsable

**Judith Guadalupe Santos Ceseña**  
Estudiante responsable

**Dr. Eloy Rodríguez de León**  
**Dra. María Guadalupe García Alcocer**  
**Dra. Laura Cristina Berumen Segura**  
Colaboradores

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **"Evaluación del efecto fotoprotector y reparador de los carotenoides (luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno) frente al daño causado por radiación UV en queratinocitos de piel humana"**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento de dictamen ético** debido a que el proyecto no incluye estudios con animales de experimentación ni sujetos humanos.

Cabe mencionar que ningún integrante del Comité declaró conflicto de interés para la evaluación del protocolo de investigación. Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

**Iza Fernanda Pérez Ramírez**  
Presidente  
Comité de Bioética de la Facultad de Química  
Universidad Autónoma de Querétaro

## Fotoprotección concentraciones altas

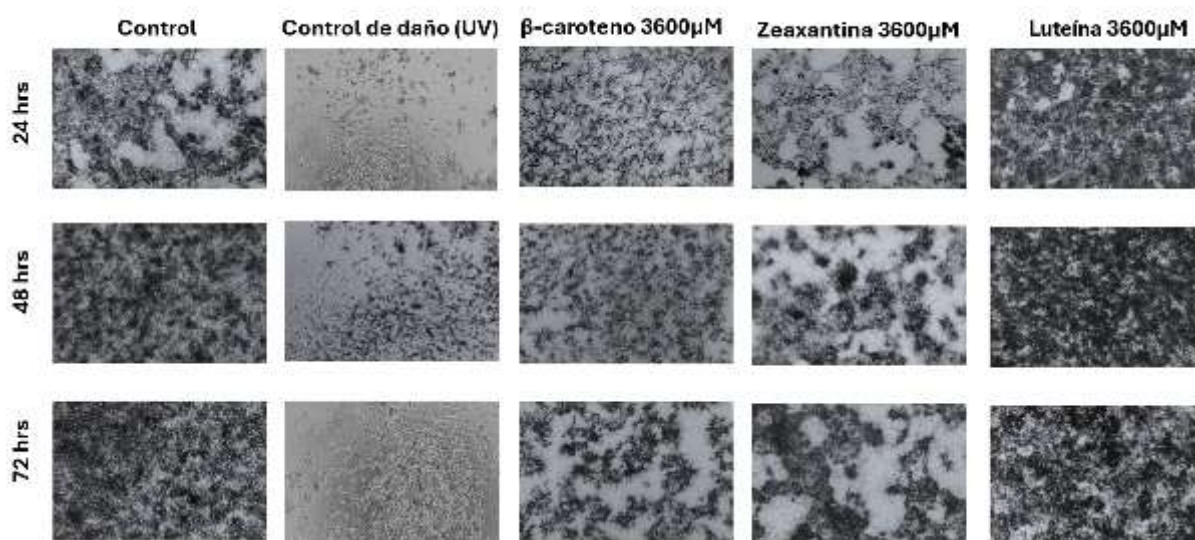


Figura 15. Fotomicrografías representativas de fotoprotección de tratamiento con 3600  $\mu$ M durante la irradiación por 4.5 horas de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT durante ensayo MTT (primer grupo control – no irradiado).

## Toxicidad concentraciones altas

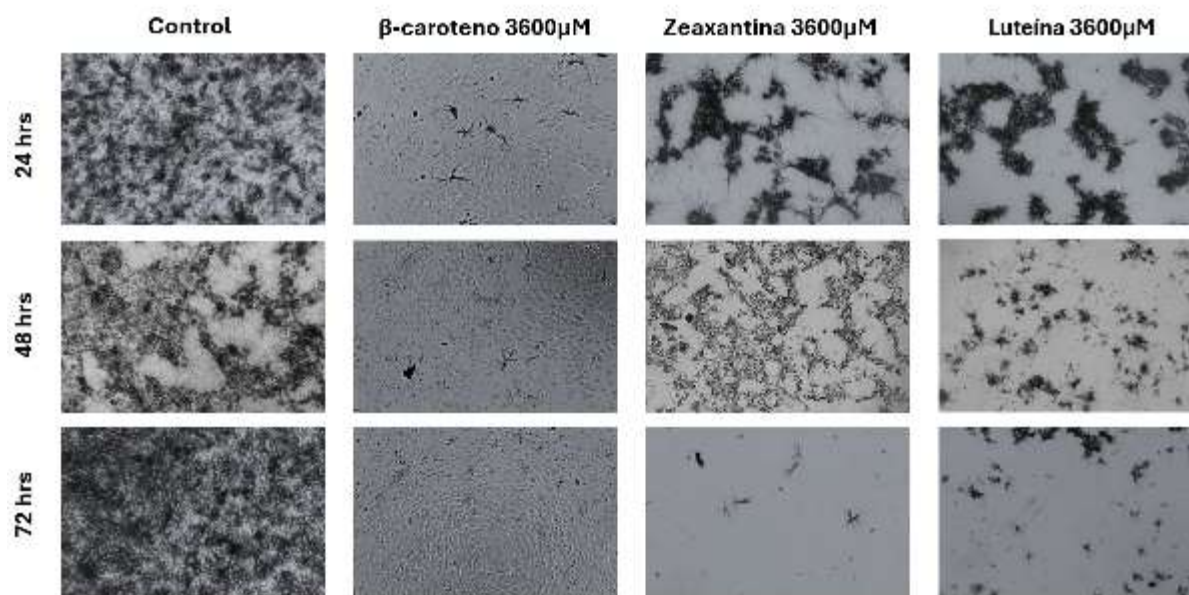


Figura 16. Fotomicrografías representativas de toxicidad de tratamiento continuo con 3600  $\mu$ M de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT durante ensayo MTT.

## Reparación concentraciones altas

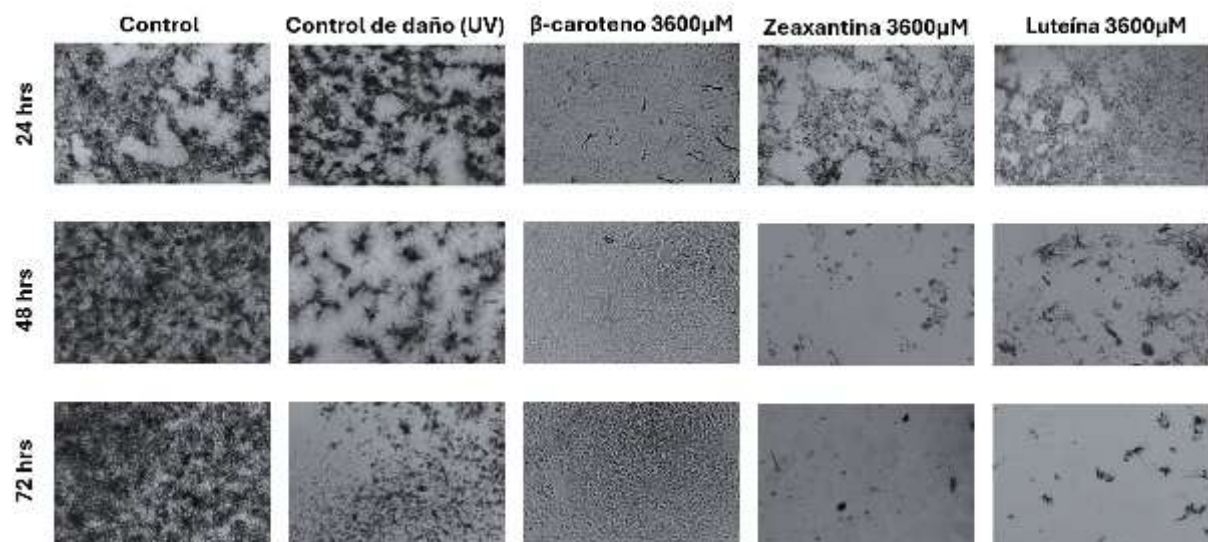


Figura 17. Fotomicrografías representativas de reparación de tratamiento continuo con 3600  $\mu$ M tras la irradiación de los grupos experimentales a las 24, 48 y 72 horas en células HaCaT durante ensayo MTT (primer grupo control – no irradiado).