



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Medicina  
**Universidad** Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

# Estudio del efecto del ácido glicólico de los peeling químicos y la quercetina sobre fibroblastos

**Isabel Fernández Escribá**

**Director:** Dr. José Octavio Alda Torrubia

**Departamento:** Farmacología y Fisiología

**Facultad de Medicina**

**Zaragoza 2016**



# INDICE

---

INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 SISTEMA TEGUMENTARIO .....	1
1.1.1 Capas de la piel.....	1
1.1.1.1. Epidermis .....	1
1.1.1.2. Dermis .....	2
1.1.1.3. Tejido subcutáneo o fascia superficial .....	3
1.1.1.4. Fascia profunda .....	3
1.1.2. Clasificación de los tipos de piel.....	4
1.1.3. Lesiones, marcas y anomalías cutáneas frecuentes.....	4
1.1.3.1. Laceraciones, incisiones y heridas cutáneas .....	4
1.1.3.2. Estrías o marcas de estiramiento en la piel .....	5
1.1.3.3. Piel seca e hiperqueratinización .....	5
1.1.3.4. Acné facial .....	5
1.1.3.5. Melasma.....	5
1.1.3.6. Alteraciones de la pigmentación cutánea, fotoenvejecimiento y arrugas.....	6
1.1.3.7. Quemaduras.....	6
1.2. PEELING QUÍMICOS FACIALES .....	7
1.2.1. Indicaciones y contraindicaciones.....	7
1.2.2. Sistemas de protección y adecuación .....	8
1.2.3. Técnica.....	9
1.2.4. Posibles complicaciones .....	9
1.2.5. Tipos de peeling y agentes químicos.....	9
1.3. HIDROXIÁCIDOS.....	10
1.3.1. Tipos de hidroxiácidos (HAs).....	11
1.3.1.1. Beta-hidroxiácidos (BHAs) .....	11
1.3.1.2. Alfa-hidroxiácidos (AHAs) .....	12

1.4. ÁCIDO GLICÓLICO .....	12
1.4.1. Mecanismo de acción y propiedades del ácido glicólico .....	13
1.4.2. Quimioprevención, citotoxicidad y sinergias del ácido glicólico con otras sustancias .....	15
1.5. MUERTE CELULAR.....	17
1.5.1. Apoptosis o muerte celular programada .....	17
1.5.2. Necrosis o muerte celular regulada .....	17
1.5.3. Necroptosis .....	18
1.6. CÉLULAS SENESCENTES Y EFECTO SENOLÍTICO .....	18
1.7. QUERCETINA.....	19
1.8. CITÓMICA .....	20
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....	21
2.1 PLANTEAMIENTO.....	21
2.2 OBJETIVOS .....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
3.1. MATERIAL .....	23
3.1.1. Material biológico .....	23
3.1.2. Tratamientos y reactivos .....	23
3.1.3. Equipos.....	24
3.1.5. Material fungible.....	24
3.2. MÉTODOS .....	25
3.2.1. Cultivo de fibroblastos .....	25
3.2.2. Tratamiento “in vitro” con ácido glicólico y quercetina .....	25
3.2.3. Valoración de la viabilidad celular por MTT .....	26
3.2.4. Valoración de la viabilidad celular por citómetro de flujo .....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA .....	37

# **ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO GLICÓLICO DE LOS PEELING QUÍMICOS Y LA QUERCETINA SOBRE FIBROBLASTOS**

## **RESUMEN**

Los peeling químicos han visto incrementada su popularidad en los últimos años como tratamiento de múltiples afecciones de la piel y con el principal objetivo de producir un rejuvenecimiento cutáneo; aunque también se han descrito gran variedad de efectos adversos. El ácido glicólico es el agente químico más empleado en estos peeling, debido a su capacidad para penetrar hasta las capas más profundas de la piel.

Para valorar su efecto y posibles mecanismos de acción, se va a estudiar la modificación de la viabilidad celular a dosis crecientes de ácido glicólico sobre un cultivo primario de fibroblastos humanos. Se evaluará si existe algún efecto protector por quercetina, debido a su potencial antioxidante, y se determinarán los distintos tipos de muerte celular que expliquen el efecto del ácido glicólico en la piel humana.

Los resultados obtenidos muestran que el ácido glicólico induce una acción citotóxica sobre los fibroblastos de forma dosis-dependiente, con un IC50 aproximado de 100 mM, cursando su acción especialmente por un incremento de la apoptosis tardía. La quercetina por su parte disminuyó un 60% el efecto tóxico del ácido glicólico, produciendo un descenso localizado de un 50% en la apoptosis tardía.

## **PALABRAS CLAVE:**

- Fibroblastos
- Peeling químico
- Ácido Glicólico
- Quercetina
- Muerte celular
- MTT
- Citometría de flujo.



# **STUDY OF THE EFFECT OF CHEMICAL PEELING GLYCOLIC ACID AND QUERCETIN ON FIBROBLASTS**

## **ABSTRACT**

Chemical peels have increased popularity in recent years as a treatment for many skin conditions and with the main objective of producing skin rejuvenation, but they have also described a variety of adverse effects. Glycolic acid is the most used chemical agent in these peeling due to its ability to penetrate into the deeper skin layers.

To assess its effect and possible mechanisms of action, will study the modification of cell viability increasing doses of glycolic acid on a primary culture of human fibroblasts. Evaluated if there is protective effect by quercetin due to it's a potential antioxidant, and determined the different types of cell death that explains the effect of glycolic acid on human skin.

Results show that glycolic acid induces a cytotoxic action on fibroblasts dose-dependently with an estimated IC<sub>50</sub> of 100 mM, pursuing its action especially by an increase in late apoptosis. Meanwhile, Quercetin decreased by 60% the toxic effect of glycolic acid and produced a local decrease of 50% in late apoptosis.

## **KEY WORDS:**

- Fibroblasts
- Chemical peeling
- Glycolic acid
- Quercetin
- Cell death
- MTT
- Flow Cytometry





# INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 SISTEMA TEGUMENTARIO

La piel, el mayor órgano del cuerpo con sus 1.7 m<sup>2</sup> de superficie media, es fácilmente accesible y uno de los mejores indicadores de salud. Supone el 15-20% de la masa corporal y proporciona al cuerpo humano:

- Protección contra los efectos medioambientales como abrasiones, pérdida de líquido, sustancias nocivas, radiaciones ultravioletas y microorganismos invasores.
- Continencia de las estructuras del cuerpo (por ejemplo, tejidos y órganos) y sustancias vitales del cuerpo (especialmente líquidos extracelulares), previniendo la deshidratación, que puede ser severa cuando se producen lesiones graves y extensas en la piel.
- Termorregulación a través de las glándulas sudoríparas, vasos sanguíneos superficiales y depósitos de grasa.
- Sensibilidad (por ejemplo, al dolor) por medio de nervios superficiales y sus terminaciones sensitivas.
- Síntesis y almacenamiento de vitamina D.

Por ello, es importante su observación cuidadosa en la exploración física y su consideración como diagnóstico diferencial en casi todas las enfermedades .<sup>(1)</sup>

### 1.1.1 Capas de la piel

La piel está compuesta por una capa celular superficial, la epidermis, que crea una capa externa protectora resistente, y una capa basal (profunda) de tejido conectivo regenerador y pigmentado, la dermis. (Figura 1.2)

#### 1.1.1.1. Epidermis

Es un epitelio estratificado queratinizado, una superficie externa resistente compuesta de queratina (proteína fibrosa) superpuesta a una capa pigmentada y con capacidad regenerativa denominada capa basal o profunda. La capa externa se desprende continuamente o es eliminada por frotamiento, siendo reemplazada con

nuevas células desde la capa basal. Este proceso renueva la epidermis de todo el cuerpo cada 25-45 días. Es una capa avascular, no tiene vasos sanguíneos ni linfáticos, y se nutre a través de los vasos de la dermis subyacente.

La piel está inervada por terminaciones nerviosas aferentes que son sensibles al tacto, irritación (dolor) y temperatura. La mayoría de estos nervios se encuentran en la dermis, pero algunos penetran en la epidermis. <sup>(1)</sup>

#### 1.1.1.2. Dermis

Formada por una densa capa de fibras de colágeno y elastina entrelazadas. Estas fibras proporcionan el tono a la piel y son las responsables de la firmeza y resistencia de la misma. La distribución predominante de las fibras de colágeno determina las líneas de tensión características de la piel y las arrugas cutáneas. Las líneas de tensión, también llamadas “líneas de escisión” o “de Langer” (Figura 1.1), tienden a distribuirse de forma longitudinal y espiral en las extremidades mientras que en el tronco y cuello lo hacen de manera transversal. Las líneas de tensión en codos, rodillas, tobillos y muñecas son paralelas a los pliegues transversos que aparecen al flexionar las extremidades. Las líneas elásticas de la dermis se deterioran con la edad y no se regeneran; en consecuencia, en la



gente mayor la piel se arruga y cede conforme va perdiendo elasticidad. Las incisiones o laceraciones que corren paralelas a estas líneas de tensión tienen menos tendencia a abrirse que aquellas que cruzan dichas líneas.

La capa profunda de la dermis contiene folículos pilosos, junto con sus músculos lisos erectores del pelo y glándulas sebáceas. La contracción de los músculos erectores del pelo explica la erección capilar, provocando lo que conocemos como “piel de gallina”, comprimiendo así las glándulas sebáceas y ayudando a secretar su producto oleoso hacia la superficie cutánea.

Otras estructuras tegumentarias o derivadas incluyen el pelo, las uñas, las glándulas mamarias y el esmalte dental. <sup>(1)</sup>

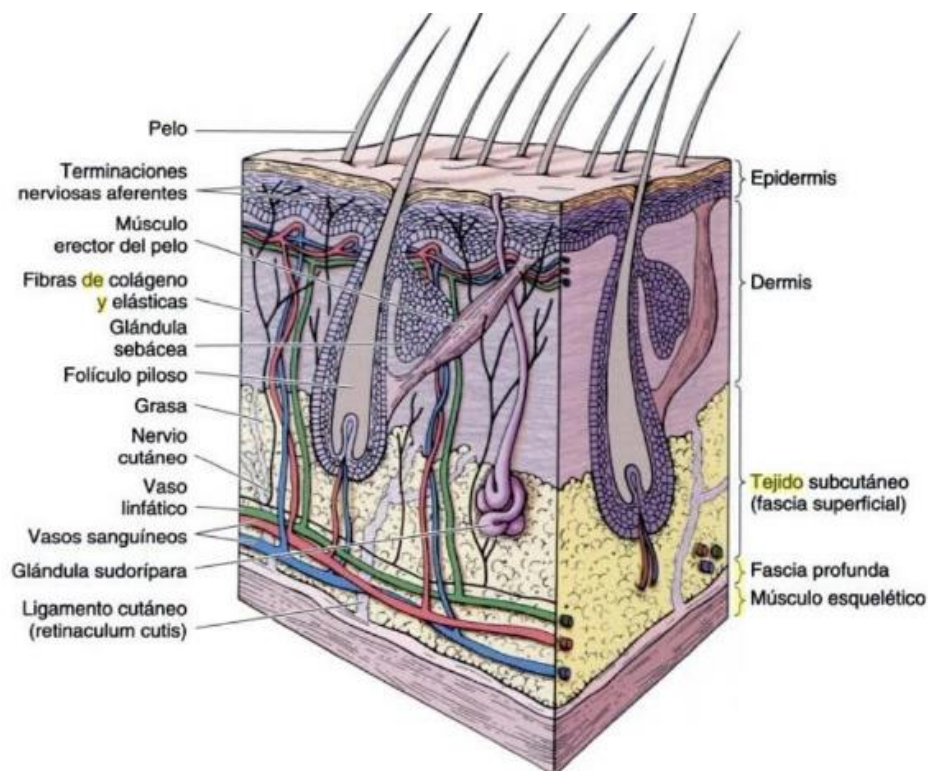
**Figura 1.1. Líneas de tensión de Langer en la piel. Las líneas punteadas indican la dirección predominante de los haces de fibras de colágeno en la dermis.**

### 1.1.1.3. Tejido subcutáneo o fascia superficial

Localizado entre la dermis y la fascia profunda subyacente, compuesto de tejido conectivo laxo y grasa. Contiene las porciones más profundas de las glándulas sudoríparas, los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y los nervios cutáneos. Constituye el principal almacén de grasa del cuerpo, por lo que su espesor puede variar mucho en función del estado nutricional y de las diferentes partes del cuerpo de un mismo individuo. Participa en la termorregulación, funciona como aislante reteniendo el calor en el centro del cuerpo. Proporciona también un relleno que protege la piel de las compresiones que sufre por las prominencias óseas, como sucede en las nalgas.<sup>(1)</sup>

### 1.1.1.4. Fascia profunda

Capa de tejido conectivo organizado y denso, desprovista de grasa, que envuelve la mayor parte del cuerpo, profunda a la piel y el tejido subcutáneo.<sup>(1)</sup>



**Figura 1.2. Estructura de la piel y del tejido subcutáneo.<sup>(1)</sup>**

### 1.1.2. Clasificación de los tipos de piel

Existen diversas formas de clasificar los diferentes tipos de piel. La más utilizada y reconocida internacionalmente es la Clasificación del Dr. T. Fitzpatrick, basada en fototipos cutáneos.<sup>(2, 3)</sup>

	<b>Acción del sol sobre la piel (no protegida)</b>	<b>Características pigmentarias</b>
<b>FOTOTIPO I</b>	Presenta intensas quemaduras solares, casi no se pigmenta nunca y se descama de forma ostensible.	Individuos de piel muy clara, ojos azules, pelirrojos y con pecas en la piel. Su piel, habitualmente, no está expuesta al sol y es de color blanco-lechoso.
<b>FOTOTIPO II</b>	Se quema fácil e intensamente, pigmenta ligeramente y descama de forma notoria.	Individuos de piel clara, pelo rubio, ojos azules y pecas, cuya piel, que no está expuesta habitualmente al sol, es blanca.
<b>FOTOTIPO III</b>	Se quema moderadamente y se pigmenta correctamente.	Razas caucásicas (europeas) de piel blanca que no está expuesta habitualmente al sol.
<b>FOTOTIPO IV</b>	Se quema moderada o mínimamente y pigmenta con bastante facilidad y de forma inmediata al exponerse al sol	Individuos de piel morena o ligeramente amarronada, con pelo y ojos oscuros (mediterráneos, mongólicos, orientales).
<b>FOTOTIPO V</b>	Raramente se quema, pigmenta con facilidad e intensidad (siempre presenta reacción de pigmentación inmediata)	Individuos de piel amarronada (amerindios, indostánicos, árabes e hispanos).
<b>FOTOTIPO VI</b>	No se quema nunca y pigmenta intensamente (siempre presentan reacción de pigmentación inmediata).	Razas negras.

**Tabla 1. Clasificación de los diferentes fototipos cutáneos de Fitzpatrick.**

### 1.1.3. Lesiones, marcas y anomalías cutáneas frecuentes

#### 1.1.3.1. Laceraciones, incisiones y heridas cutáneas

Las laceraciones o incisiones paralelas a las líneas de tensión (líneas de Langer) suelen curar bien y con una cicatriz pequeña porque se produce una disrupción mínima y las fibras intactas suelen retener los bordes del corte. Sin embargo, una laceración o incisión que cruce las líneas de tensión, interrumpe un mayor número de fibras de colágeno provocando que la herida se abra más y se produzca una cicatrización excesiva (queloide).<sup>(1)</sup>

### 1.1.3.2. Estrías o marcas de estiramiento en la piel

Las fibras de colágeno y elastina en la dermis forman una trama resistente y flexible, con gran capacidad para distenderse y crecer para acomodarse a incrementos sucesivos de tamaño. En procesos relativamente rápidos, como el que ocurre durante el embarazo o la obesidad, la piel se estira demasiado y se dañan las fibras de colágeno de la dermis, provocando la aparición de marcas de estiramiento o estrías. Se trata de bandas de piel delgada y arrugada, inicialmente rojas, que se vuelven púrpuras y más tarde, blancas.<sup>(1)</sup>



*Figura 1.3. Marcas de estiramiento o estrías rojas en abdomen, producidas por aumento del volumen abdominal.<sup>(1)</sup>*

### 1.1.3.3. Piel seca e hiperqueratinización

Uno de los problemas más frecuentes es la xerosis o piel seca. Se puede producir como una alteración momentánea que remita con la aplicación de hidratantes o sustancias retenedoras de agua como glicerina o propilenglicol; pero cuando persiste a pesar de tratamiento es porque la producción de corneocitos, la descamación y la capacidad de retención de agua no están funcionando de manera óptima<sup>(4)</sup>.

### 1.1.3.4. Acné facial

Es una de las enfermedades más comunes de la piel. Afecta a todas las edades y surge de varios mecanismos: la producción alta de sebo y la proliferación de queratinocitos en el epitelio folicular provocan la obstrucción y el desarrollo de lesiones no inflamatorias (microcomedones); y la activación de la respuesta inmune innata, como consecuencia de la colonización folicular por *Propionibacterium acnes*, origina las lesiones inflamatorias (pápulas o pústulas).<sup>(5)</sup>

### 1.1.3.5. Melasma

Es una hiperpigmentación progresiva simétrica de la piel de la cara que se produce en todas las razas, teniendo predilección por los fototipos IV-VI. Su aparición se asocia con el desequilibrio hormonal, el daño solar y la predisposición genética. Clínicamente se puede dividir en centofacial, malar y mandibular, en función de la distribución pigmentaria. Si lo examinamos con luz de Wood (luz ultravioleta emitida por una lámpara de mercurio a una longitud de onda de 320-400 nm), podemos clasificarlo en epidérmico, dérmico o mixto.<sup>(6)</sup>

### 1.1.3.6. Alteraciones de la pigmentación cutánea, fotoenvejecimiento y arrugas

Algunos de los cambios más evidentes de la piel fotoenvejecida son las variedades de hiperqueratosis y lesiones hiperpigmentadas, que incluyen la queratosis seborreica, queratosis actínica, léntigos, pigmentación moteada...reconocidos comúnmente como “manchas de la edad”.<sup>(4)</sup> La mayoría producidas por la exposición a la radiación UV a largo plazo, que causa una mayor cohesión entre corneocitos y el engrosamiento del estrato córneo. La radiación UV también degrada el colágeno de la dermis y la acumulación excesiva de fibras elásticas anormales en la dermis dañada (arrugas).<sup>(7)</sup> Estas lesiones y marcas localizan en la cara, las manos y los antebrazos.

### 1.1.3.7. Quemaduras

Son lesiones tisulares frecuentes, causadas por agentes térmicos, eléctricos, químicos y radiaciones iónicas o UV. Se clasifican según gravedad y profundidad en:

- **Quemadura de primer grado (superficial):** afecta a la epidermis y provoca eritema (piel caliente y roja), dolor y edema (tumefacción). Días más tarde se produce la descamación de la capa superficial; aunque es rápidamente repuesta por el estrato basal, sin que se produzca cicatrización significativa (ej.: las quemaduras solares).
- **Quemadura de segundo grado (espesor parcial):** se extiende por la epidermis hasta llegar a la dermis superficial; forman ampollas y lesiona las terminaciones nerviosas, haciendo de este grado el más doloroso. Las glándulas sudoríparas y folículos pilosos, salvo excepciones, no son dañados y pueden proporcionar la fuente de recambio celular para el estrato basal de la epidermis. La curación es lenta aunque suele ser completa en unos 21 días, dejando cicatriz y alguna contractura. (Figura 1.4)
- **Quemadura de tercer grado (espesor completo):** afecta toda la epidermis, la dermis y posiblemente el músculo subyacente. En los márgenes puede existir un cierto grado de curación, pero la región abierta y ulcerada de la piel requiere injerto cutáneo. El material necrosado (escara) debe ser extirpado y reemplazado por piel sana.<sup>(1)</sup>



**Figura 1.4. Quemadura de segundo grado superficial con ampollas o flictenas a nivel de antebrazo.**<sup>(1)</sup>

## 1.2. PEELING QUÍMICOS FACIALES

El concepto de “peeling” o exfoliación para mejorar la textura, suavizar y embellecer la piel se ha utilizado desde tiempos antiguos. Ésta práctica surge en las culturas antiguas de Egipto, Mesopotamia y África. En el antiguo Egipto, Cleopatra (considerada “madre del peeling químico”) ya suavizaba su piel bañándose en leche amarga, que ahora se sabe que contiene ácido láctico. Los egipcios se aplicaban alabastro y sal en la piel para rejuvenecerla.<sup>(3, 8)</sup> En Francia, las mujeres empleaban vino viejo, que contiene ácido tartárico.<sup>(3, 9)</sup> Pero no fue hasta la década de 1960 cuando Brown y colaboradores popularizaron por primera vez las técnicas de un peeling químico facial<sup>(10)</sup>.

Se trata de un procedimiento común que ha evolucionado con los años, resultado de siglos de experiencia e investigación, que se ha perfeccionado con el conocimiento científico de la cicatrización controlada de las lesiones de la piel y se ha mantenido como un procedimiento sencillo para rejuvenecer la piel.<sup>(8, 9)</sup>

En la actualidad, un peeling es la aplicación de un agente de naturaleza química sobre la piel con la intención de destruir, de forma controlada, parte o toda la epidermis, pudiendo llegar a la dermis, para eliminar las lesiones o marcas superficiales cutáneas y conseguir la regeneración de nuevo tejido epidérmico y dérmico.<sup>(3, 9)</sup>

Son tratamientos con intención terapéutica o estética, aplicados por médicos necesariamente cualificados, que hayan completado la formación en la especialidad de dermatología y adquirido la técnica durante la residencia o posteriormente, en un centro de educación y formación en cirugía dermatológica o máster oficiales enfocados para tal capacitación. El médico debe tener conocimiento de los diferentes agentes químicos que se utilizan, el proceso de cicatrización, la técnica así como la identificación y gestión de posibles complicaciones.<sup>(9)</sup>

### 1.2.1. Indicaciones y contraindicaciones

Las indicaciones de los peeling químicos se pueden clasificar ampliamente en casos de anomalías pigmentarias, fotoenvejecimiento y alteraciones en la textura de la piel. De los tratamientos más frecuentes podemos destacar los de melasma, hiperpigmentación postinflamatoria, melanosis facial, léntigos, pecas, acné (cicatrices de acné superficial, pigmentación postacné, comedones), los cambios de la piel por

fotoenvejecimiento, arrugas superficiales, poros dilatados, tumores epidérmicos benignos, queratosis (actínica o seborreica), verrugas y otras dermatosis. <sup>(3, 8, 9)</sup>

En los tipos de piel Fitzpatrick I y II, el peeling químico mejora considerablemente los cambios en la piel asociados con el fotoenvejecimiento; mientras que en los tipos III-VI responden mejor las alteraciones relacionadas con la pigmentación o discromías. <sup>(3, 8)</sup>

Las contraindicaciones son muy importantes de identificar, pues son la mejor forma de evitar posibles complicaciones; incluyen pacientes con infección bacteriana, viral, fúngica o herpética activa, historia de consumo de medicamentos fotosensibilizantes, pacientes con ocupaciones al aire libre o antecedentes de fotosensibilidad, con dermatosis inflamatorias, psoriasis, dermatitis atópica, piel seca, rojiza, etc.; aquellas con expectativas poco realistas o falta de cooperación, inquietos o psicológicamente inestables. <sup>(9, 11)</sup> El origen étnico y el tipo de piel Fitzpatrick pueden determinar una respuesta imprevisible a un peeling químico. <sup>(8)</sup>

Los peeling de profundidad media o alta están contraindicados en personas con historia de cicatrizaciones anormales, queloides, piel atrófica o que hayan usado isotretinoína en los últimos seis meses; pudiendo aplicarse un peeling superficial. <sup>(9)</sup>

### 1.2.2. Sistemas de protección y adecuación

El paciente debe firmar previamente un consentimiento informado que detalle el procedimiento, las limitaciones del mismo, las posibles complicaciones del agente que se le va a administrar y que mencione claramente si se necesitan más procedimientos para obtener resultados adecuados. <sup>(9, 11)</sup>

Se debe hacer énfasis en la importancia de realizar un correcto tratamiento pre- y post-peeling a base de la administración de protectores solares, cremas o emulsiones con hidroquinona y tretinoína (2-4 semanas previas al peeling hasta que el médico evalúe el reemplazo completo con epitelio nuevo y en perfectas condiciones. <sup>(9, 11)</sup>

Se puede repetir el tratamiento de forma semanal, quincenal o mensual, dependiendo de las características de la piel del paciente y del tipo y profundidad del peeling empleado. <sup>(9)</sup>



### 1.2.3. Técnica

Es muy importante seleccionar el agente químico y la concentración adecuados. Es mejor comenzar por peeling de profundidad media, evitando las zonas sensibles (pliegue nasolabial, párpados y cantos de los ojos). Se debe tener preparado un agente neutralizador para detener el peeling.<sup>(11)</sup> El tiempo de aplicación depende de cada sustancia<sup>(9)</sup>. Algunos ejemplos son:

- **Ácido glicólico:** Durante 3 minutos (piel eritematosa). Se neutraliza con  $\text{NaHCO}_3$ .
- **Ác. salicílico:** 35 minutos (cristalizado o “pseudofrost”). Neutralizar con agua.

### 1.2.4. Posibles complicaciones

La mejor manera de evitar complicaciones es identificar pacientes en riesgo y utilizar peeling muy superficiales. A mayor profundidad mayor riesgo de complicaciones:

- **Complicaciones inmediatas** (minutos u horas postpeeling): prurito, irritación, eritema persistente, edema, sensación de quemazón y/o molestias oculares.<sup>(11)</sup>
- **Complicaciones tardías** (días o semanas después): infecciones de origen bacteriano (S. Aureus, Streptococcus), viral (Herpes Simple) o fúngica<sup>(9, 11)</sup>, hiperpigmentación, hipopigmentación, líneas de demarcación<sup>(9, 11)</sup>, reacciones alérgicas, erupciones acneiformes, cambios de textura de la piel y reacciones de toxicidad<sup>(9, 11)</sup>

### 1.2.5. Tipos de peeling y agentes químicos

	Nivel A	Nivel B	Nivel C	Nivel D
Profundidad	Muy superficial	Superficial	Medio	Profundo
Necrosis celular	Hasta el estrato córneo (epidermis)	Epidermis completa hasta capa basal	Hasta dermis reticular superior	Epidermis y dermis
Agentes empleados	TCA* al 10%	TCA al 10-30%	TCA al 35-50%	Fórmula de Fenol
	Á.G.** al 30-50%	Á.G. al 50-70%	Á.G.70%+TCA35%	Baker-Gordon
	Á.S.*** al 20-30%		Fenol al 88%	
	Tretinoína 1-5% Solución Jessner 1-3 capas.	Solución Jessner 4-7 capas.	Sol. Jessner + TCA 35% CO <sub>2</sub> Sólido + TCA 35%	

**Tabla 2. Clasificación de los tipos de peeling químicos por niveles (A, B, C, D).** \*TCA=Ácido Tricloroacético / \*\*Á.G.= Ácido Glicólico/ \*\*\* Á.S.= Ácidos Salicílico.

Podemos distinguir los agentes químicos empleados para peeling en: <sup>(3, 9)</sup>

- **Hidroxiácidos:**
  - **Alfa-hidroxiácidos (AHAs) o ácidos monocarboxílicos:** como el ác. glicólico (A.G.), el ác. láctico, el ác. málico, el ác. cítrico y el ác. tartárico.
  - **Beta-hidroxiácidos (BHAs):** como el ácido salicílico (A.S.)
- **Ácido Bicarboxílico y tricarboxílico:** como ácido málico y cítrico.
- **Ácido tricloroacético (TCA).**
- **Alfa-cetoácidos:** como el ácido pirúvico.
- **Resinas de resorcinol.**
- **Solución de Jessner:** ác salicílico, ác láctico y resina de resorcinol en etanol.
- **Fenol o Fórmula de Fenol Baker-Gordon.**

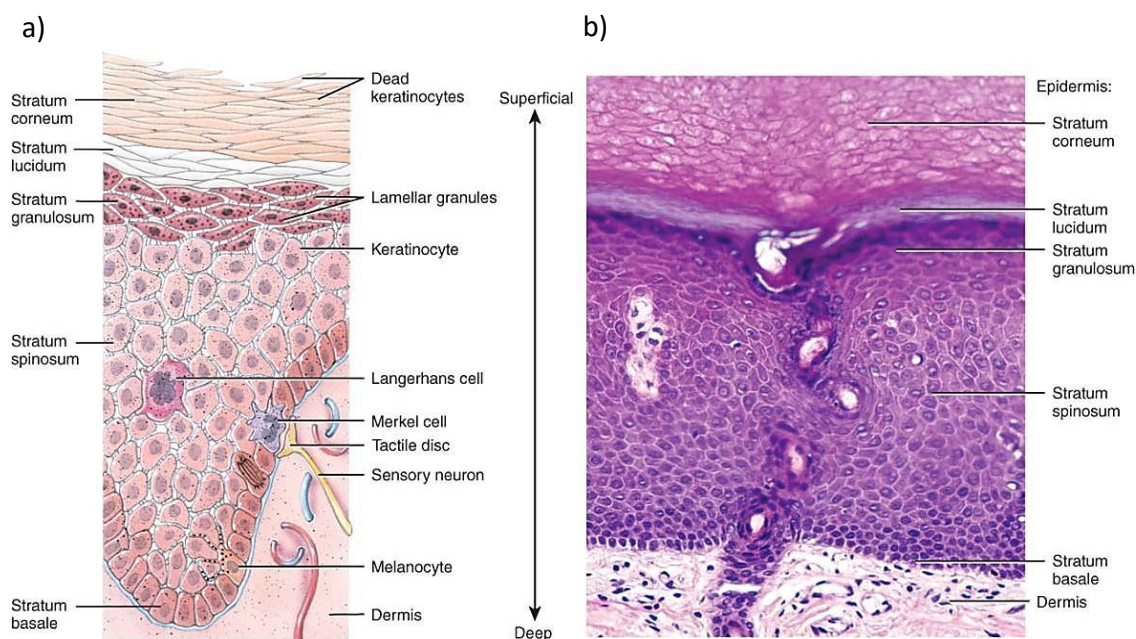
### 1.3. HIDROXIÁCIDOS

En nuestro milenario esfuerzo para revertir los signos clínicos del envejecimiento y mejorar la salud general de la piel, emergen una serie de compuestos en continuo estudio como ingredientes con beneficios importantes sobre la piel<sup>(4)</sup>. Los hidroxiácidos son conocidos por su capacidad de modificar la forma y la función de la piel, produciendo beneficios terapéuticos en alteraciones de la piel y el envejecimiento.<sup>(4)</sup>

Hace aproximadamente tres décadas, Van Scott y Yu encontraron que los hidroxiácidos (HAs) con un grupo hidroxilo en la posición  $\alpha$ - (alfa-hidroxiácidos) ó  $\beta$ - (beta-hidroxiácidos), cuando se aplican tópicamente, tienen un efecto muy específico sobre la hiperqueratinización. Este efecto se expresó clínicamente por un desprendimiento brusco inicial de la capa córnea hiperqueratósica en su nivel más interior, el estrato compacto, distal al estrato granuloso (Figura 1.5)<sup>(12)</sup>, proporcionando efectos beneficiosos para la ictiosis, la piel seca, la queratosis, las verrugas y la hiperqueratosis folicular, incluyendo la que se produce en el acné.<sup>(4)</sup>

Más tarde, Ditre et al<sup>(13)</sup> demostraron que las aplicaciones mantenidas de alfa-hidroxiácidos (AHA) y beta-hidroxiácidos (BHA) daban lugar a un aumento significativo del espesor total de la epidermis. Aunque se produjo algún engrosamiento epidérmico, el engrosamiento dérmico representó los efectos medibles sobre la piel, lo que parece estar relacionado con la síntesis aumentada de glicosaminoglicanos (GAG), colágeno, y

una mejor calidad de fibras elásticas. Además, también encontraron un inversión significativa de la atipia celular basal, la dispersión de la pigmentación de la melanina y un retorno a un patrón reticular más normal de la dermis. Estos cambios dérmicos se tradujeron en una mejora en las líneas de demarcación, estrías y arrugas de la piel. <sup>(4, 13)</sup>



**Figura 1.5. Estratos de la epidermis. a) Dibujo histológico de los diferentes estratos que forman la epidermis y el tipo de células del que se compone cada estrato. b) Corte histológico de epidermis con tinción de hematoxilina-eosina, visto al microscopio óptico.** <sup>(12)</sup>

### 1.3.1. Tipos de hidroxiácidos (HAs)

Los hidroxiácidos están representados por los beta-hidroxiácidos (BHAs), los alfa-hidroxiácidos (AHAs), los polihidroxiácidos y los ácidos biónicos. <sup>(4)</sup> Los más comúnmente empleados como agentes de peeling son los siguientes.

#### 1.3.1.1. Beta-hidroxiácidos (BHAs)

Los BHAs son ácidos carboxílicos orgánicos que tienen un grupo hidroxilo (OH) unido a la posición  $\beta$ - del grupo carboxilo (COOH). El grupo hidroxilo es neutral y el grupo carboxilo proporciona la propiedad ácida. Algunos BHA, como  $\beta$ -hidroxibutanoico, están presentes en los tejidos del cuerpo como intermediarios metabólicos y fuentes de energía. Algunas moléculas son tanto un AHA como un BHA, ya que contienen un grupo

hidroxilo (OH) en la posición  $\alpha$ - de un grupo carboxilo (COOH) y en la posición  $\beta$ - a otro grupo carboxilo, como el ácido málico o el ácido cítrico.<sup>(4)</sup>

El ácido salicílico o ácido orto-hidroxibenzoico es el máximo representante de los BHAs, derivado natural de la corteza de sauce. Es un agente lipofílico muy empleado en los peeling de las capas superiores de la epidermis.<sup>(3)</sup>

#### 1.3.1.2. Alfa-hidroxiácidos (AHAs)

Son ácidos carboxílicos orgánicos con un grupo hidroxilo (OH) unido a la posición  $\alpha$ - del grupo carboxilo (COOH). Los grupos hidroxilo y carboxilo están ambos unidos directamente a un átomo de carbono alifático o alicíclico. El grupo hidroxilo es neutral, y sólo el grupo carboxilo proporciona una propiedad ácida, igual que en los BHAs.<sup>(14)</sup>

Son conocidos como “ácidos de frutas” por estar presentes en estos alimentos (ác. glicólico en la caña de azúcar, ác. láctico en la leche agria, ác. tartárico en las uvas), aunque pueden ser generados sintéticamente.<sup>(3, 8)</sup>

Los peeling de alfa-hidroxiácidos son populares desde hace años en la práctica dermatológica y están bien establecidos como peeling de profundidad superficial o media, con beneficios tanto terapéuticos como cosméticos sobre la piel.<sup>(15)</sup> A concentraciones más altas (50-70%) los AHAs se utilizan para la descamación de la piel superficial, mientras que a concentraciones más bajas (8-30%) se ha informado de que actúan como agentes humectantes y pueden causar una disminución de la cohesión entre corneocitos (células del estrato córneo) o “epidermólisis”<sup>(8, 16, 17)</sup>

El ácido glicólico es el más pequeño de la AHA y el más utilizado en el cuidado de la piel, por ello será objeto de nuestro estudio.

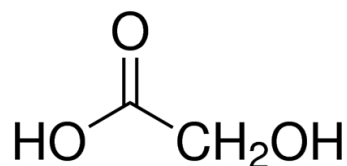
El ácido láctico, el inmediatamente inferior, también se usa ampliamente en formulaciones tópicas para exfoliar y proporcionar efectos antienvjecimiento.<sup>(4)</sup>

### 1.4. ÁCIDO GLICÓLICO

El ácido glicólico o ácido-2-hidroxi-etanoico deriva de frutas, azúcares de la leche y la caña de azúcar.<sup>(18)</sup>

Es el alfa-hidroxiácido de menor peso molecular (76.05 g/mol). Se presenta de forma incolora y sólido-cristalina a temperatura ambiente. Está formado por dos átomos de

carbono, unidos uno a un grupo carboxilo (COOH) y otro a un grupo hidroxilo (OH). Su fórmula química es C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>.



Es extremadamente hidrófilo. El pH de una solución de ácido glicólico no tamponada oscila entre 0.08-2.75.<sup>(8)</sup>

*Figura 1.6. Molécula de ácido glicólico.*

### 1.4.1. Mecanismo de acción y propiedades del ácido glicólico

El ácido glicólico es un magnífico exfoliante químico. Antiguamente se empleaba en la industria para la limpieza de metales y el galvanizado (proceso electroquímico por el que se obtiene el recubrimiento de un metal con otro).<sup>(7)</sup>

El ser el alfa-hidroxiácido de cadena molecular más pequeña le permite penetrar la piel con gran facilidad y rápidamente hasta los estratos más profundos, por lo que se ha convertido en el agente ideal y más popularmente usado en los peeling dermatológicos, con amplios objetivos cosméticos y terapéuticos.<sup>(19)</sup>

El ácido glicólico se dirige a la capa córnea de la epidermis disminuyendo la cohesión celular y provocando la descamación o exfoliación de las capas externas del estrato córneo.<sup>(7, 20)</sup> Se ha comprobado que, además, estimula la síntesis de colágeno, ácido hialurónico y fibroblastos (a concentraciones de 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> M).<sup>(21-23)</sup> Denda et al<sup>(24)</sup> demostraron que también induce la proliferación epidérmica mediante la proliferación de queratinocitos basales mediada por la activación de TRPV1 (receptor ionotrópico) y la liberación de ATP.

Fabbrocini, en 2009<sup>(25)</sup>, clasificó las exfoliaciones con ácido glicólico en:

- **Muy superficiales** (30% -50%, aplicado durante 1-2 minutos).
- **Superficiales** (50%-70%, aplicado durante 2-5 minutos).
- **Profundidad media** (70%, aplicado de 3-15 minutos).

La profundidad de la exfoliación con ácido glicólico depende de la concentración utilizada, el número de capas aplicadas, y el tiempo de aplicación.<sup>(8, 26)</sup> Están disponibles en varias concentraciones que van desde 20%-70%. Cuanto mayor sea la concentración y menor el pH, más intenso será el peeling.<sup>(27)</sup>

Este tipo de tratamientos necesitan ser neutralizados adecuadamente con el fin de detener la acidificación de la piel.<sup>(28)</sup> La mayoría de autores han recomendado el uso de un tampón (bicarbonato sódico al 10-15%)<sup>(9)</sup> o del ácido glicólico parcialmente neutralizado, que es más seguro que el ácido glicólico libre.<sup>(17)</sup> En general, las formulaciones en gel tienen un tiempo de penetración más lento y son más fáciles de controlar.<sup>(8, 25)</sup>

Son candidatos al tratamiento con ácido glicólico todos los fototipos de piel de Fitzpatrick y en casi cualquier área del cuerpo.<sup>(29)</sup>

Los peeling de ácido glicólico tienen propiedades antiinflamatorias, queratolíticas y efectos antioxidantes. Se han comprobado beneficios no sólo con la piel seca o xerosis (mejorando la hidratación y restaurando el estrato córneo clínica e histológicamente)<sup>(4)</sup>, sino también en casos de hiperpigmentación postinflamatoria<sup>(30)</sup>, queratosis seborreicas y actínicas<sup>(4)</sup>, melasma epidérmico y mixto<sup>(30)</sup>, verrugas e incluso en la recuperación de uñas estriadas, envejecidas o pigmentadas.<sup>(5-7, 31-36)</sup>

Las aplicaciones faciales repetidas y regulares de ácido glicólico han demostrado disminuir significativamente las arrugas faciales y los signos de envejecimiento, como discromías.<sup>(7)</sup>

Se ha estudiado recientemente sus propiedades bactericidas contra *Propionibacterium acnes*, teniendo un efecto antiinflamatorio en las lesiones del acné.<sup>(3)</sup> Wang et al obtuvieron resultados significativos a favor del ácido glicólico como tratamiento de otras lesiones acneiformes como pústulas, comedones, pápulas e incluso observaron en los pacientes una piel más brillante y fina al concluir el estudio.<sup>(37)</sup>

No obstante, es importante realizar una cuidadosa revisión de la historia clínica y el examen de la piel previos al peeling de la piel. La selección adecuada del paciente, el momento de exfoliar y la neutralización a tiempo asegurarán unos buenos resultados, con los mínimos efectos secundarios.<sup>(26)</sup> El período de tiempo que debe transcurrir y el número de aplicaciones que se deben realizar hasta ver beneficios significativos vienen determinados por las características de cada paciente.

Lejos de su principal utilidad, otros estudios sugieren el ácido glicólico como candidato perfecto para el desarrollo de inhibidores del envenenamiento por picadura de algunas serpientes.<sup>(38)</sup>

### 1.4.2. Quimioprevención, citotoxicidad y sinergias del ácido glicólico con otras sustancias

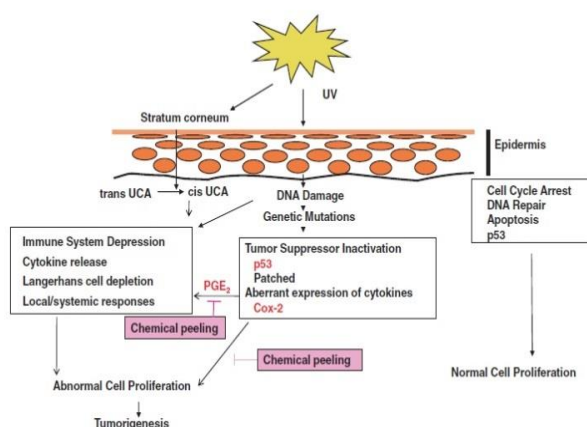
Como se menciona anteriormente, el pH de una solución de ácido glicólico no tamponada va desde 0.08 – 2.75. Se ha demostrado que un pH por debajo de 2.0 favorece un aumento de la necrosis de los tejidos y la destrucción cutánea sin realce del resultado. El tiempo es un factor muy importante a considerar al emplear el ácido glicólico; a menos que se neutralice con agua o solución de bicarbonato sódico, producirá un efecto de epidermólisis y descamación continuas.<sup>(8)</sup>

Para la eliminación de arrugas cutáneas, el ácido glicólico inicia un proceso agresivo de remodelación, inflamando y dañando el tejido de forma repetida, pudiendo estimular la carcinogénesis (efecto aún en estudio).<sup>(19)</sup>

El tratamiento con ácido glicólico exfolia la capa córnea, una de las barreras más poderosas contra la radiación UV, lo que aumenta la sensibilidad de la piel a la radiación UV (induciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, IL-1a), induce la formación de quemaduras mayores a nivel celular, reduciendo la dosis eritematosa mínima y aumentando los dímeros de pirimidina ciclobutano (fotocitotoxicidad). Esta hipersensibilidad a la radiación es reversible y se recupera generalmente tras una semana sin aplicación del tratamiento<sup>(19)</sup>.

En un estudio en piel de ratones, se concluyó que los peeling superficiales a base de ácido glicólico 35%, ácido salicílico 30% y TCA 10%, así como peeling medio-profundo con TCA 35%, podrían tener un efecto quimiopreventivo, eliminando las células dañadas por la radiación UV, que expresan p53 y COX-2. La eliminación de estas células fotodañadas se traduce en una disminución del nivel sérico de PGE<sub>2</sub> y por lo tanto,

podría tener lugar la recuperación de la inmunidad suprimida por la radiación UV y retrasar la aparición de tumores inducidos por ésta (Figura 1.7).<sup>(19)</sup>

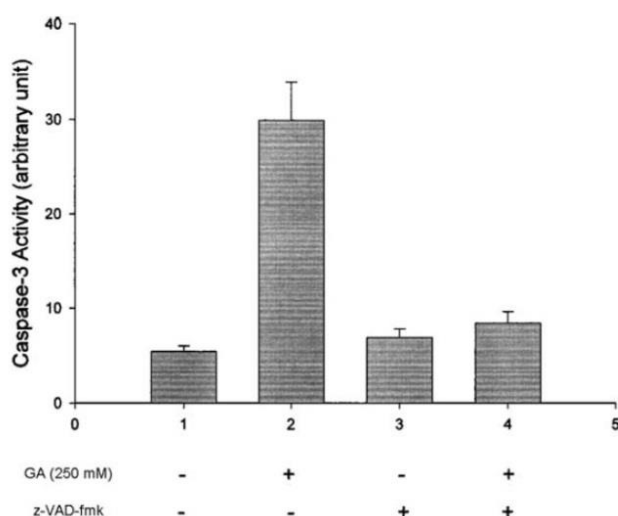


**Figura 1.7. Efecto preventivo de la exfoliación química en fotocarcinogénesis.**<sup>(19)</sup>

En la misma línea de investigación, se han estudiado los posibles mecanismos antitumorales del ácido glicólico frente a la inducción tumoral de la radiación UVB, y se ha demostrado que el tratamiento de ácido glicólico atenúa la citotoxicidad inducida por UVB, así como la apoptosis, también inhibe la expresión de c-fos, la activación del factor de transcripción AP-1 y los niveles del gen regulador de apoptosis (p53 y p21) en ARNm de queratinocitos humanos HaCaT; lo que sugiere que puede ejercer un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de cáncer de piel inducido por UVB.<sup>(18)</sup>

Otros estudios in vitro con cultivos de queratinocitos humanos, HaCaT, a los que se les administró conjuntamente ácido glicólico a una concentración 5mM y radiación UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>), han concluido que producen un efecto sinérgico en la detención de la proliferación de células en fase S, inducen la apoptosis celular (a través de la sobreexpresión de Bax, p53, p21, caspasas -3,-4 y -9, endonucleasa G y factor inductor de apoptosis (AIF)), disminuyen el potencial de membrana mitocondrial y aumentan la liberación de especies reactivas de oxígeno.<sup>(19)</sup>

Actualmente, la experimentación con ácido glicólico se centra en la señalización celular y el significado biológico de la apoptosis inducida por ácido glicólico sobre células tumorales (como HL-60, línea celular de leucemia humana), explorando potenciales mecanismos quimioterapéuticos. En estudios anteriores el uso de ácido glicólico (250mM) co-administrado con un inhibidor de amplio espectro de caspasas (z-VAD-fmk), demuestra mitigar la actividad de la caspasa-3. Lo que nos lleva a considerarla como una potencial vía de la apoptosis producida por el ácido glicólico (Figura 1.8).<sup>(39)</sup>



**Figura 1.8. Tratamiento de células HL-60 con ácido glicólico 250mM con y sin z-VAD-fmk. Inhibición de la actividad de la caspasa-3.**<sup>(39)</sup>



## 1.5. MUERTE CELULAR

En 1858, Virchow describe por primera vez los procesos de muerte celular, basándose únicamente en parámetros macroscópicos, y los definió como degeneración, mortificación o necrosis. Hoy en día conocemos que existen diferentes criterios y marcadores que definan muerte celular y tenemos a nuestro alcance diversas clasificaciones para organizarlos. Una de éstas es la de Galluzzi<sup>(40)</sup>, 2012, en la que se describen hasta trece tipos de muerte celular organizados en tres grupos: programada, regulada o accidental. Las más interesantes para nuestro estudio son:

### 1.5.1. Apoptosis o muerte celular programada

Proceso por el que las células inducen su propia muerte para mantener la integridad genómica. Está mediada por los propios componentes enzimáticos de la célula, que inician el “suicidio celular” con cambios bioquímicos y morfológicos de las estructuras celulares que provocarán la disminución del volumen celular, la condensación y fragmentación de la cromatina. La membrana plasmática mantendrá su integridad a pesar de las alteraciones fosfolipídicas. Es un proceso dependiente de la “ruta de las caspasas” y existen dos mecanismos principales de activación:

- **vía extrínseca:** relacionada con unión de ligandos a miembros de la superfamilia de receptores de muerte de la membrana plasmática<sup>(41)</sup>.
- **vía intrínseca o mitocondrial:** se activa en respuesta a una lesión celular y produce la liberación irreversible de proteínas de la matriz mitocondrial y de membrana al citosol iniciándose una cascada de caspasas ejecutoras de la apoptosis.<sup>(42)</sup>

### 1.5.2. Necrosis o muerte celular regulada

Muerte patológica de un conjunto de células o tejido que no se puede reparar. Es un proceso dependiente de caspasas, que comienza con la inhibición de la fosforilación oxidativa y activación de vías de transducción (p53, proteínas quinasas JNK y de la familia de bcl-2, proteasas, ROS, mitocondrias) dando lugar a la disminución del ATP y el calcio iónico y provocando la muerte celular con aumento del volumen celular y pérdida de integridad de membrana.<sup>(43)</sup>

### 1.5.3. Necroptosis

Tipo de muerte celular con disfunción mitocondrial, alteración apoptótica y rotura de membrana plasmática, asociada a especies reactivas de oxígeno y sin fragmentación del ADN. Dependiente de RIPK1 (proteínquinasa que determina si las células mueren por necroptosis o apoptosis, interaccionando con la caspasa 8).<sup>(44)</sup>

## 1.6. CÉLULAS SENESCENTES Y EFECTO SENOLÍTICO

La senescencia celular es un mecanismo de envejecimiento, basado en la detención del crecimiento de forma irreversible, que se produce cuando las células se someten a alteraciones agresivas o limitación de sus divisiones. Las células senescentes tienen respuestas activas al daño del ADN, el flujo metabólico elevado (comportamiento propio de células tumorales, a diferencia de que las células senescentes no se dividen) y secretan citoquinas, quimioquinas y proteasas pro-inflamatorias de la matriz extracelular, capaces de inducir la apoptosis en las células sanas circundantes. A pesar de sus duros microambientes internos y externos, las células senescentes son viables y con mayor capacidad de resistencia que las células no senescentes.

Se ha demostrado que la limpieza de parte de las células senescentes mejora notablemente los fenotipos relacionados con el envejecimiento, por lo que las intervenciones que reduzcan la carga de las células senescentes (efecto senolítico) podrían retrasar el envejecimiento del resto de poblaciones celulares y aliviar discapacidades y enfermedades asociadas a la edad.<sup>(45)</sup>

Baker y colaboradores, en 2011, demostraron que se podía conseguir una destrucción selectiva de las células senescentes utilizando un gen suicida transgénico.<sup>(46)</sup>

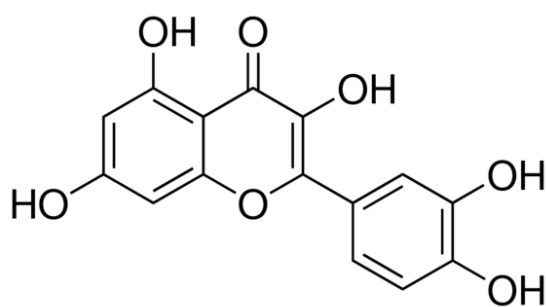
Otros estudios han demostrado que sustancias como el dasatinib (biológico), los tocotrienoles y la quercetina inducen selectivamente la muerte de células senescentes y dañadas.<sup>(47, 48)</sup>

## 1.7. QUERCETINA

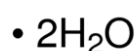
La quercetina o 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona es un flavonoide, un “barredor” de radicales libres (ROS) que protege frente a los daños oxidativos (por sus características estructurales, moleculares y conformacionales) y es capaz de regenerar otros antioxidantes.<sup>(49)</sup> Flavonoide procede del latín “Flavus”, que significa color dorado (como la miel o el oro), en referencia a un grupo aromático de pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno y son los responsables de la mayoría de colores amarillo, rojo o azul de los vegetales y frutas en los que están presentes.<sup>(50)</sup> La quercetina es el flavonoide más abundante en la dieta humana; se encuentra en frutas, verduras, té, aceite de oliva y vino tinto. Se metaboliza en el hígado o en las células del tracto gastrointestinal.<sup>(51)</sup> En plasma se encuentra en rango nanomolar, incrementándose a milimolar con suplementación debido a que su vida media es de 11-28 h.<sup>(52)</sup>

Ha demostrado tener diversos efectos farmacológicos, no solo como antioxidante<sup>(53)</sup> sino también como reductor de eventos cardiovasculares<sup>(54)</sup>, antialérgico<sup>(55)</sup> y como reductor del riesgo de formación de cataratas en diabéticos y conjuntivitis, por sus propiedades antiinflamatorias.<sup>(56)</sup>

Como flavonoide, la propiedad más destacada de la quercetina es su función protectora frente a la fotooxidación de la radiación UV, gracias a su capacidad de absorción, evitando la formación de ROS y el daño directo del ADN.



**Figura 1.9. Molécula de quercetina.**



## 1.8. CITÓMICA

La citómica o citometría es la disciplina científica de análisis celular que integra el conocimiento de la genómica y la proteómica con la dinámica de la función de los sistemas celulares complejos o citomas.<sup>(57)</sup> El objetivo es definir el fenotipo molecular de las células individuales, como resultado de la interacción entre el genotipo y la exposición a factores internos y externos. El desarrollo de la citómica ha sido posible gracias a las nuevas y potentes tecnologías basadas en los análisis de células individuales, es decir, citometría de flujo y citometría de imagen.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrica que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz inducidas por la iluminación apropiada de células o partículas microscópicas, a medida que éstas fluyen alineadas y focalizadas por un haz de luz láser, en un compartimento de detección o cámara de flujo. Esto permite cuantificar simultáneamente varios parámetros biológicos y, en algunos sistemas, separar físicamente las células o partículas de acuerdo a esos parámetros.

Aprovecha además el desarrollo de las moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos o modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas y permiten detectar y cuantificar estructuras y funciones de cada una de las células estudiadas.

La citometría de imagen es una técnica nacida de la fusión de la citometría y la microscopía confocal, que permite adquirir una gran cantidad de imágenes digitales y combina la información microscópica de cada una de las células con los numerosos parámetros estadísticos que ofrece la citometría de flujo convencional.

# PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

---

## 2.1 PLANTEAMIENTO

Los peeling faciales son actualmente muy comunes, teniendo cada día una importancia creciente a nivel médico, psicológico y social.

Los efectos indiscriminados de los peeling actuales, matan tanto a las células envejecidas como a las sanas viables.

Por ello, en este trabajo se ha planteado estudiar sus efectos reales a nivel celular. Así mismo, se pretende asociar el tratamiento del ácido glicólico con una sustancia como la quercetina, que es un potente agente antirradicales libres (protectores de células sanas) y a la vez, es un senolítico con capacidad de destruir las células envejecidas.

## 2.2 OBJETIVOS

- Establecer un modelo de células cultivadas que nos permita evaluar el efecto del peeling sobre la piel, en el que valorar mortalidad, tipos de mortalidad celular y sustancias protectoras.
- Encontrar y poner a punto una o varias técnicas que permitan realizar mediciones de vitalidad o mortalidad que sirvan para evaluar el modelo celular establecido.
- Encontrar el intervalo de concentraciones adecuado para poder evaluar el efecto del ácido glicólico, calculando su IC50.
- Valorar la posibilidad de establecer el tipo de muerte mayoritario producido por el ácido glicólico.
- Estudiar el efecto de la quercetina sobre la mortalidad inducida por ácido glicólico.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

El modelo de estudio para determinar los efectos del ácido glicólico y la quercetina en la piel utilizado en este trabajo consiste en la aplicación directa de ambas sustancias sobre fibroblastos humanos obtenidos por cultivo primario.

### 3.1. MATERIAL

#### 3.1.1. Material biológico

Cultivos de fibroblastos dérmicos procedentes de cultivos primarios de piel humana. Los fibroblastos fueron cultivados en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO) con un 10% de FBS (suero fetal bovino) y un 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma, P-3539) y antifúngico. Este medio de cultivo tiene la composición de sales minerales, vitaminas, glucosa, aminoácidos, factores de crecimiento y condiciones de esterilidad adecuadas que garantizan las condiciones mínimas para la supervivencia y proliferación celular.

#### 3.1.2. Tratamientos y reactivos

- Ácido Glicólico, 99% (Glycolic acid ReagentPlus®, 99%, Sigma-Aldrich, 124737-25G.  
HOCH<sub>2</sub>COOH)
- Quercetina ≥ 95% (Quercetin HPLC solid, Sigma-Aldrich, Q4951-10G, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>)
- Tris 1M (Trizma® Hydrochloride solution, Sigma-Aldrich, T2694, NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>·HCl)
- Fluorocromos: Kit Anexina V-IP (Alexa® Fluor 488 Annexin V and PI, ThermoFisher)
- Medio de cultivo a base de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + 10% FBS + 1% penicilina-estreptomicina.
- Tripsina 1X (Cultek, 91L0930-100) y Tampón fosfato salino (PBS)
- MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) e Isopropanol

### 3.1.3. Equipos

- Microscopio Invertido de Fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000 S
- Estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>
- Cabina de seguridad biológica clase II Telstar BioII A
- Espectrofotómetro de microplacas termostatzado Eon (Biotek, Vermont USA)
- Citómetro de flujo AMNIS ImageStream X (Seattle, WA, USA)



*Espectrofotómetro de microplacas termostatzado*



*Citómetro de flujo AMNIS ImageStream X. Combina la captura microscópica de imágenes a alta velocidad con la citometría de flujo (citometría de imagen)*

### 3.1.5. Material fungible

- Frascos plásticos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, tipo Falcon.
- Placas de cultivo de 96 pocillos.
- Placas de cultivo de 6 pocillos.
- Tubos Eppendorf y tubos de ensayo.
- Micropipetas de 2, 20, 200 y 1000 µL.
- Pipetas de 10 ml desechables.



## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Cultivo de fibroblastos

Se establece un cultivo primario de fibroblastos humanos que se habían mantenido en nitrógeno líquido (90% FBS, 10% DMSO). Se atemperan y siembran en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a razón de 10mL de medio DMEN completo. Mantener en estufa cambiando el medio cuando sea necesario hasta conseguir un 90-95% de confluencia celular. En ese momento, tripsinizar según el protocolo, que se deberá realizar en condiciones estériles:

1. Extraer el medio de cultivo y lavar con PBS hasta tres veces.
2. Retirar el PBS y añadir Tripsina 1X (40 µL) precalentada a 37°C, dejando los frascos en la estufa hasta que se observe, por medio del microscopio óptico, que las células están completamente despegadas.
3. Parar la reacción enzimática añadiendo SFB a 4°C.
4. Recoger el contenido de los frascos en un tubo de centrifuga. Centrifugar la muestra durante 5 minutos, a 800 rpm y a 5°C; con esto se obtiene la separación de la muestra en pellet (células) y sobrenadante.
5. Recoger y desechar el sobrenadante, resuspender el pellet en medio de cultivo DMEN completo y mezclar.

Tras esto, se distribuye la muestra en placas de 96 pocillos a una concentración aproximada de  $3 \times 10^6$  células/mL con medio DMEN completo (1 mL. por pocillo) en el que, tras unas 48 horas en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se podrá realizar el tratamiento y la medida de la viabilidad como se describe a continuación.

### 3.2.2. Tratamiento “in vitro” con ácido glicólico y quercetina

Se parte de un cultivo de fibroblastos en placas de 96 pocillos con medio DMEM completo previamente descrito.

1. Se cargan 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM y 300 mM de ácido glicólico y varios pocillos control para valorar el daño producido (solo medio de cultivo). Valorándolos tras 24 horas.
2. Tras obtener el IC50 en 100 mM se realiza la carga con quercetina 2.5 µM para valorar su efecto frente al daño producido.

### 3.2.3. Valoración de la viabilidad celular por MTT

Este método MTT fue desarrollado por Mosmann en 1983. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul, el formazán, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Es un método muy útil para medir supervivencia y proliferación celular, así como para determinar la posible citotoxicidad de una sustancia. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido<sup>(58)</sup>. El protocolo utilizado será:

1. Extraer medio de cultivo.
2. Echar en cada pocillo 1 mL DMEM (10%FBS + ATB).
3. Añadir 10 µL de solución MTT a una concentración de 5 mg/mL. en cada pocillo.
4. Conservar en estufa durante 4 horas.
5. Centrifugar a 3500 rpm a temperatura de 4°C durante 45 minutos.
6. Añadir 100 µL de isopropanol en cada pocillo.
7. Tras 15 minutos en el agitador, leer las placas en espectrofotómetro de microplacas termostatizado Eon.
8. Realizar la medida a 550 nm y a 690 nm; lo que permitirá medir la viabilidad y desechar interferencias respectivamente.

### 3.2.4. Valoración de la viabilidad celular por citómetro de flujo

Para valorar las distintas poblaciones de muerte celular por citometría de flujo se realiza el tratamiento con ácido glicólico 100 mM y con Quercetina 2.5 µM en placas de 6 pocillos durante 24 horas y, realizando una tripsinización, pasar a evaluarlo por el equipo.

Se ha utilizado en cada muestra un kit Anexina V-IP (ThermoFisher) que permitirá realizar las determinaciones de los distintos tipos de muerte celular.

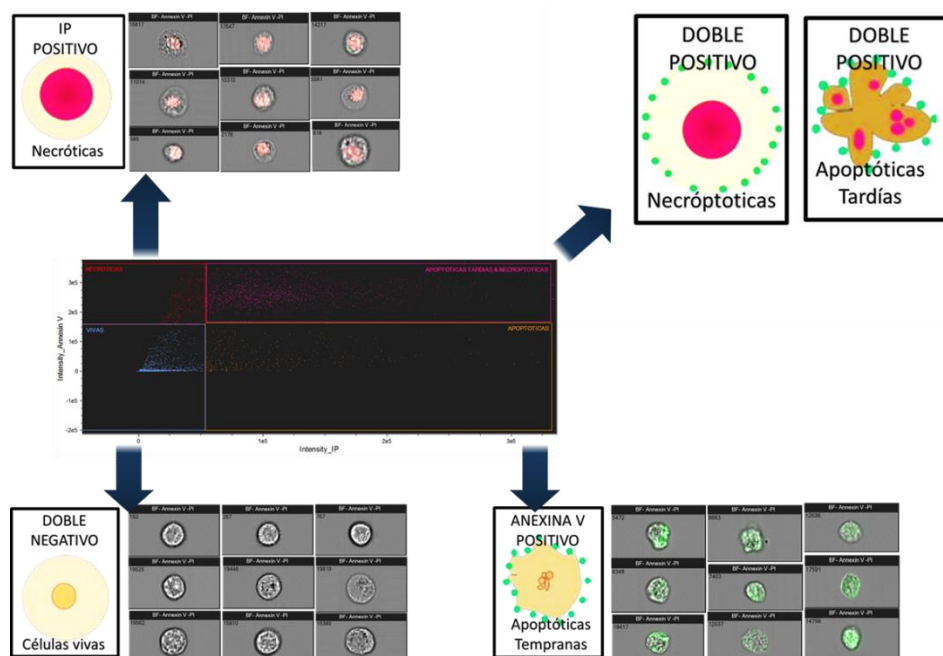
El Yoduro de Propidio (IP) es un fluorocromo que tiñe el ADN de las células que tienen la membrana celular dañada. Este fluorocromo nos permite valorar el número de células muertas y la forma del núcleo celular.

La fosfatidilserina es un fosfolípido que en células viables se mantiene en el interior de la membrana plasmática. En las fases tempranas de la apoptosis, se produce su

translocación, migrando a la capa externa, de forma que la Anexina V se va a unir específicamente marcando las células que mueren por apoptosis.

Se han diferenciado las siguientes poblaciones celulares:

- **Células vivas:** al tener la membrana celular intacta, el IP no las teñirá y al no ser apoptóticas, la Anexina V no será visible (doble negativo).
- **Células necróticas:** la membrana celular estará dañada, por lo que penetrará el IP, pero no se verá Anexina V porque no serán apoptóticas (IP positivo).
- **Células apoptóticas tempranas:** la fosfatidilserina se encontrará en la capa externa de la membrana citoplasmática indicando apoptosis, pero la membrana permanecerá todavía intacta evitando la tinción con IP (Anexina positivo).
- **Células apoptóticas tardías y necroptóticas:** Marcarán con IP y Anexina V (doble positivo). Se ha diferenciado entre estos dos tipos utilizando las características morfológicas proporcionadas por el citómetro de imagen, ya que las células apoptóticas tardías van a sufrir una fragmentación tanto nuclear como citoplasmática que las células necroptóticas no sufrirán, manteniendo su morfología intacta.

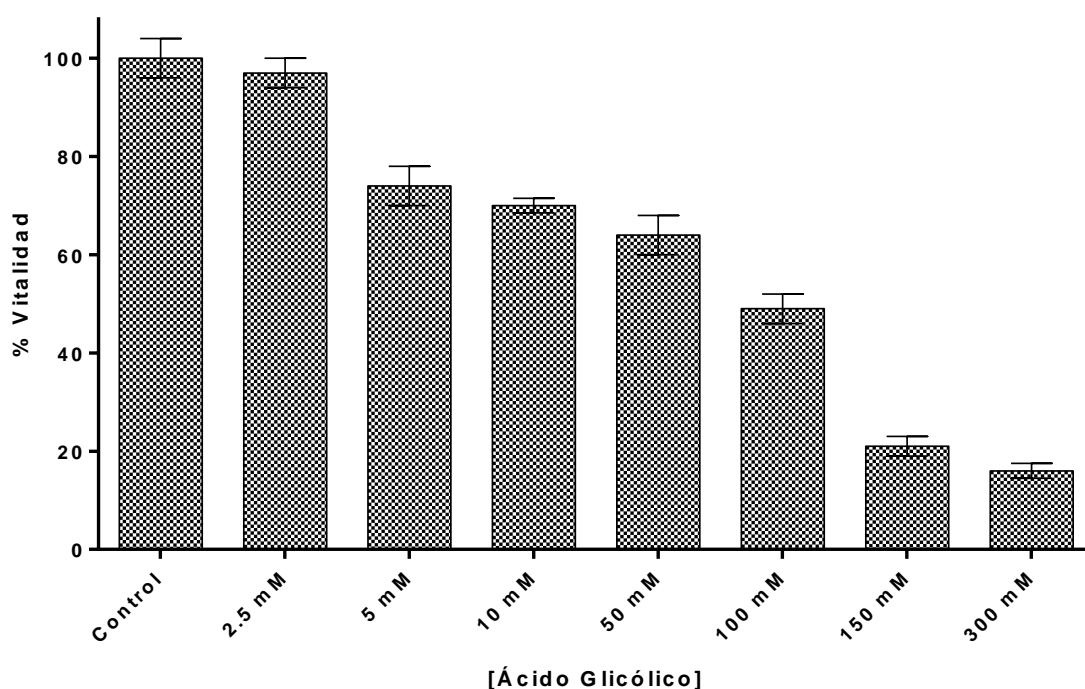


**Figura 2.1. Representación de la disminución de la viabilidad celular con dosis crecientes de ácido glicólico realizado por MTT.**



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto de la concentración de ácido glicólico, se ha tamponado la disolución con Tris 1 M, eliminando el efecto pH-dependiente, y empleado el test de MTT, realizando la medida con un  $n=8$  como mínimo y leyendo los resultados en un espectrofotómetro de microplacas termostatzado.



**Gráfica 1. Representación de la disminución de la viabilidad celular con dosis crecientes de ácido glicólico realizado por MTT.**

En la gráfica 1 se representan los valores del test de MTT tras 24 horas de tratamiento con diversas dosis de ácido glicólico frente a las células control (a las que no se les ha añadido ácido glicólico pero han sido sometidas a los mismos tiempos de cultivo e incubación) al cual se le da un valor de viabilidad del 100%. Se puede observar una disminución de la viabilidad de manera dosis-dependiente en todos los casos, con una pendiente más acusada en 5 mM y en las concentraciones de ácido glicólico más altas de 150-300 mM.

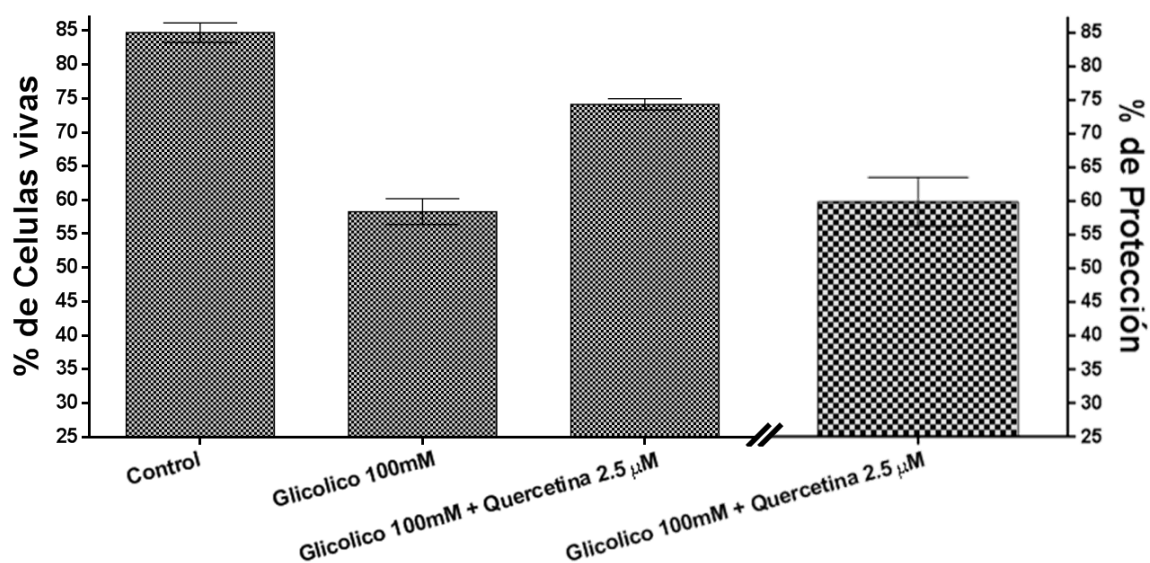
Los valores representados en la gráfica 1 permiten calcular el valor de la dosis de IC50 de aproximadamente 100 mM, teniendo en cuenta que el valor de citotoxicidad obtenida en la dosis de estudio de 100 mM es de  $49 \pm 2\%$ . Clínicamente, los tratamientos de peeling con ácido glicólico se emplean del 20 al 70% sobre piel con estrato córneo

íntegro. Según los resultados obtenidos, éstas concentraciones están muy por encima del IC50 calculado, teniendo en cuenta que se ha eliminado de las determinaciones el efecto tóxico del pH que, razonablemente, aumentaría la mortalidad celular. Se debe tener en cuenta que los resultados no son extrapolables porque la aplicación de los peeling químicos es sobre piel íntegra y no sobre células en cultivo.

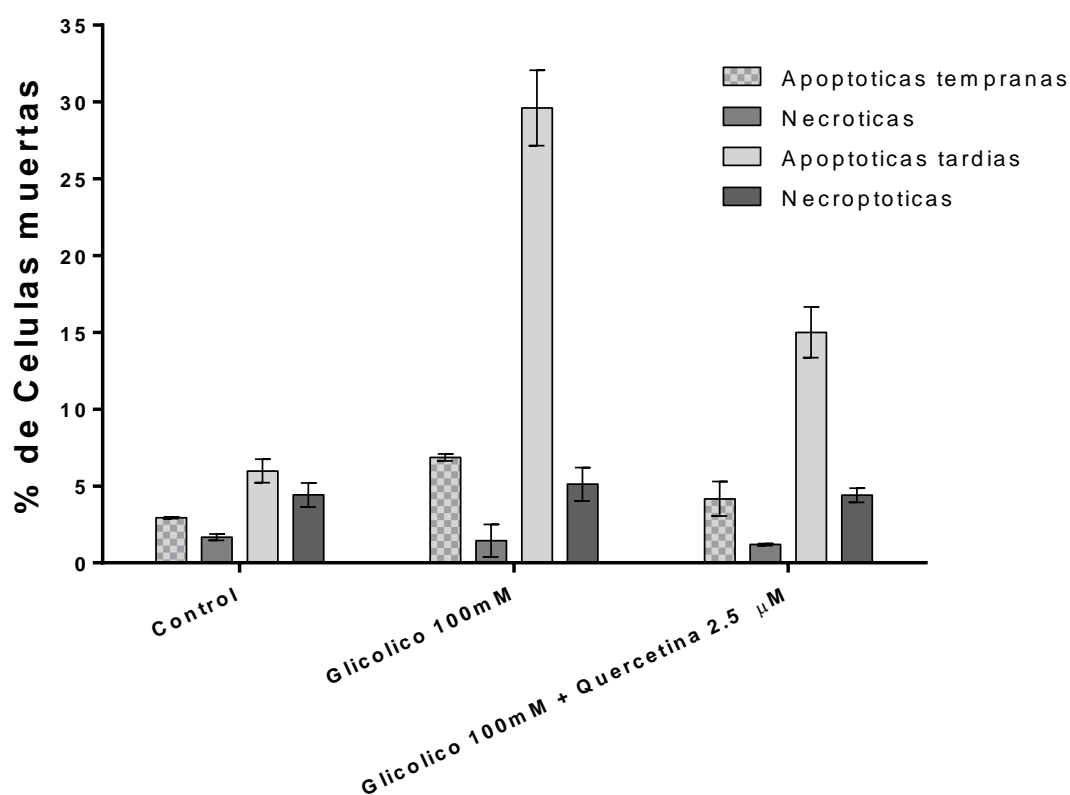
En un estudio sobre los efectos de la exposición a ácido glicólico sobre queratinocitos humanos, Lai y colaboradores<sup>(59)</sup>, utilizaron el ácido glicólico a dosis crecientes (1, 5, 10, 15, 20 y 25 mM) y evaluaron la viabilidad celular mediante MTT a las 24h de tratamiento, de manera análoga a éste estudio, pero cambiando el modelo celular de fibroblastos por queratinocitos (interesante debido a que, ambos tipos de células, son los más adecuados para valorar los efectos sobre la piel), leyendo la absorbancia mediante el lector de microplacas (570nm) y estableciendo un IC50 de 5 mM; lo que indicaría que los queratinocitos son, según este estudio, aproximadamente veinte veces más sensibles al daño por ácido glicólico en comparación con los resultados obtenidos. Además, emplearon un microscopio de contraste de fase para observar los cambios morfológicos celulares y realizaron determinaciones por citometría de flujo, tal y como se ha realizado en este trabajo, valorando la viabilidad celular en un intervalo menos amplio. Encontraron que el tratamiento a base de ácido glicólico tiene un efecto inhibidor de la proliferación celular (efecto citotóxico) e induce apoptosis y necrosis.

Sin embargo, otros estudios con ácido glicólico a concentraciones micromolares ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M) sobre cultivos de fibroblastos y empleando el mismo método que en este trabajo para valoración de viabilidad celular por MTT, han concluido que, a concentraciones muy bajas, el ácido glicólico podría estimular a los fibroblastos para que sintetizen colágeno y activen la proliferación de fibras elásticas, sin reportar daños.<sup>(21, 22, 60)</sup> En nuestros experimentos a concentraciones bajas, no hemos encontrado diferencias significativas, seguramente porque el tiempo de tratamiento con ácido glicólico era insuficiente para encontrar efectos estimulantes.

Con el IC<sub>50</sub> obtenido de 100 mM realizamos las determinaciones por citometría de flujo:



**Gráfica 2.** Representación de la viabilidad celular obtenida por citómetro de flujo para la dosis de ácido glicólico y la variación al añadir quercetina.



**Gráfica 3.** Representación de los diferentes tipos de muerte celular obtenidos por citometría de flujo tras la administración de ácido glicólico y su posterior tratamiento con quercetina.

En la gráfica 2, se puede ver la valoración de la viabilidad obtenida por citometría de flujo con el test Anexina V-IP. La determinación de células viables para la dosis de IC50 mediante este método es muy similar al valor obtenido por el test MTT (58% por citometría de imagen frente al 64% obtenido por MTT). Además, se ha valorado el efecto de la quercetina a dosis de 2.5  $\mu$ M sobre el daño, produciendo una protección de un  $59.87 \pm 3.61\%$  sobre la viabilidad por la adición de este fármaco.

Olson y colaboradores<sup>(61)</sup>, en 2010, realizaron un estudio de la quercetina “in vitro” en fibroblastos, en su caso frente a daños por irradiación con UVB, analizándolo por MTT. Al igual que en este trabajo, ellos demostraron que la quercetina reduce la mortalidad celular sobre el daño producido en los fibroblastos.

La gráfica 3 muestra los tipos de muerte celular producidos por el ácido glicólico y la consecuente protección por la administración posterior de quercetina. El ácido glicólico produce daño, como se observa en la gráfica, principalmente por medio de la apoptosis, duplicando la población de células apoptóticas tempranas desde un  $2.94 \pm 0.55\%$  hasta un  $6.85 \pm 0.23\%$ , pero observando un crecimiento mucho mayor de las células apoptóticas tardías, desde un  $5.97 \pm 0.76\%$  hasta un  $29.61 \pm 2.45\%$ . Para el resto de las poblaciones, las variaciones apenas son significativas.

Ahn y colaboradores<sup>(18)</sup> también estudiaron el efecto del ácido glicólico utilizando cultivos de queratinocitos humanos y demostraron que tiene un papel importante en la regulación de genes p53 y p21, rutas comúnmente conocidas por estar relacionadas en procesos de muerte celular por apoptosis.

En 2004, Yang y colaboradores<sup>(39)</sup> realizaron un estudio “in vitro” sobre el efecto apoptótico del ácido glicólico a concentraciones crecientes muy similares a este trabajo (10, 50, 100, 250 y 500 mM), pero en este caso utilizando la línea celular de leucemia humana (HL-60). Evaluaron los cambios morfológicos, la viabilidad celular, la inducción de apoptosis y la actividad de la caspasa-3 mediante microscopía de fase y citometría de flujo. Sus resultados demostraron una disminución significativa de la viabilidad celular para esas concentraciones y que el ácido glicólico incrementaba la actividad de las caspasas -3 y -9 (mecanismos de apoptosis celular).

Liu y colaboradores, en 2015, evaluaron las propiedades de un novedoso polímero de ácido láctico con ácido glicólico aplicándolo sobre células tumorales de osteosarcoma. Obtuvieron un aumento significativo de la apoptosis celular tras 48 h. de tratamiento “in



vitro”, observándose un aumento aproximado del 25% de células en apoptosis temprana en comparación con el 15% de la población control, y un 30% en apoptosis tardía con respecto al 8% de la población libre de tratamiento, resultados similares a los obtenidos en éste trabajo.<sup>(62)</sup>

En la gráfica 3, también se valora el efecto de la quercetina a dosis de 2.5  $\mu$ M frente al efecto del ácido glicólico a dosis de 100 mM en las diferentes muertes celulares. De nuevo, las poblaciones de células necróticas y necroptóticas en las que no se veían variaciones de significación demuestran no ser modificadas por el efecto de la quercetina. Sin embargo, la apoptosis temprana muestra una disminución desde el  $6.85 \pm 0.23\%$ , de las tratadas con ácido glicólico exclusivamente, hasta el  $4.17 \pm 1.12\%$  en las tratadas con ácido glicólico y quercetina, consiguiendo una protección de un 68.54%. Respecto a la apoptosis tardía, la disminución fue de un  $29.61 \pm 2.45\%$  hasta un  $15.07 \pm 1.65\%$ , con un 48.5% de protección.

Existen varios estudios sobre las propiedades proapoptóticas o antiapoptóticas de la quercetina. Chondrogianni, en 2010, realizó un estudio de los efectos de la quercetina y su derivado, caprilato de quercetina, sobre cultivo primario de fibroblastos humanos y concluyó que ambos tienen un efecto rejuvenecedor sobre fibroblastos senescentes.<sup>(63)</sup> En 2015, Zhu y colaboradores demostraron que la quercetina tiene un particular efecto de reducción selectiva en la viabilidad de las células senescentes o dañadas. La quercetina a dosis crecientes (5, 10, 20, 30, y 50  $\mu$ M) demostró tener un efecto senolítico a dosis superiores a 10  $\mu$ M, y de forma más intensa sobre los fibroblastos dañados.<sup>(47)</sup>

Recientemente, Malavolta y colaboradores han demostrado que la quercetina induce la senescencia y promueve la apoptosis en una multitud de líneas de cáncer. Por el contrario, en otros estudios, muestra actividad para retrasar la senescencia de las células primarias y tener efectos rejuvenecedores en células senescentes. Otros autores plantean que los efectos senolíticos de la quercetina probablemente son consecuencia de sus efectos inhibidores sobre genes anti-apoptóticos específicos (como PI3K y otras quinasas).<sup>(48)</sup>



## CONCLUSIONES

---

- El modelo para evaluar los efectos celulares del ácido glicólico en viabilidad y mortalidad ha dado resultados similares utilizando ambas técnicas (MTT y citometría de flujo).
- El ácido glicólico tamponado tiene un IC50 de aproximadamente 100 mM.
- El tipo de muerte celular inducida por el ácido glicólico se debe principalmente a un aumento de la apoptosis, duplicando la población de apoptóticas tempranas y multiplicando por cinco la población de células apoptóticas tardías frente al control. El resto de las poblaciones de células muertas apenas varían sus porcentajes.
- Dosis de quercetina de 2.5  $\mu$ M reducen la toxicidad producida por ácido glicólico, permitiéndonos obtener hasta un 60% de protección.
- La quercetina disminuye considerablemente la apoptosis temprana (protección de un 68.54%) y tardía (protección de un 48.50%) en fibroblastos tratados con ácido glicólico, efecto que podría explicarse por propiedades protectoras antirradicales libres.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1.Keith L. Moore AFD. Anatomía con orientación clínica. 5º ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2008. 12-6 p.
- 2.Marín D, Del Pozo A. Fototipos cutáneos. Conceptos generales. Conceptos básicos en dermofarmacia. OFFARM Elsevier. 2005;24(5):136.
- 3.Salam A, Dadzie OE, Galadari H. Chemical peeling in ethnic skin: an update. The British journal of dermatology. 2013;169 Suppl 3:82-90.
- 4.Green BA, Yu RJ, Van Scott EJ. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. Clinics in dermatology. 2009;27(5):495-501.
- 5.Kaminaka C, Uede M, Matsunaka H, Furukawa F, Yamamoto Y. Clinical evaluation of glycolic acid chemical peeling in patients with acne vulgaris: a randomized, double-blind, placebo-controlled, split-face comparative study. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 2014;40(3):314-22.
- 6.Puri N. Comparative study of 15% TCA peel versus 35% glycolic acid peel for the treatment of melasma. Indian dermatology online journal. 2012;3(2):109-13.
- 7.Bergfeld W, Tung R, Vidimos A, Vellanki L, Remzi B, Stanton-Hicks U. Improving the cosmetic appearance of photoaged skin with glycolic acid. Journal of the American Academy of Dermatology. 1997;36(6 Pt 1):1011-3.
- 8.Roberts WE. Chemical peeling in ethnic/dark skin. Dermatologic therapy. 2004;17(2):196-205.
- 9.Khunger N, Force IT. Standard guidelines of care for chemical peels. Indian journal of dermatology, venereology and leprology. 2008;74 Suppl:S5-12.
- 10.Brown AM, Kaplan LM, Brown ME. Phenol-induced histological skin changes: hazards, technique and uses. Br J Plast Surg. 1960;13:158-69.
- 11.Anitha B. Prevention of complications in chemical peeling. Journal of cutaneous and aesthetic surgery. 2010;3(3):186-8.
- 12.IQB. Medciclopedia. 2015 [updated Febrero 2014]; Available from: <http://www.iqb.es/>.
- 13.Ditre CM, Griffin TD, Murphy GF, Sueki H, Telegan B, Johnson WC, et al. Effects of alpha-hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. Journal of the American Academy of Dermatology. 1996;34(2 Pt 1):187-95.
- 14.Babilas P, Knie U, Abels C. Cosmetic and dermatologic use of alpha hydroxy acids. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG. 2012;10(7):488-91.
- 15.Tung RC, Bergfeld WF, Vidimos AT, Remzi BK. alpha-Hydroxy acid-based cosmetic procedures. Guidelines for patient management. American journal of clinical dermatology. 2000;1(2):81-8.
- 16.DiNardo JC, Grove GL, Moy LS. Clinical and histological effects of glycolic acid at different concentrations and pH levels. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 1996;22(5):421-4.
- 17.Becker FF, Langford FP, Rubin MG, Speelman P. A histological comparison of 50% and 70% glycolic acid peels using solutions with various pHs. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 1996;22(5):463-5.
- 18.Ahn KS, Park KS, Jung KM, Jung HK, Lee SH, Chung SY, et al. Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet B-induced c-fos expression, AP-1 activation and p53-p21 response in a human keratinocyte cell line. Cancer letters. 2002;186(2):125-35.
- 19.Funasaka Y, Abdel-Daim M, Kawana S, Nishigori C. Effect of chemical peeling on the skin in relation to UV irradiation. Experimental dermatology. 2012;21 Suppl 1:31-5.

- 20.Fartasch M, Teal J, Menon GK. Mode of action of glycolic acid on human stratum corneum: ultrastructural and functional evaluation of the epidermal barrier. *Archives of dermatological research*. 1997;289(7):404-9.
- 21.Kim SJ, Park JH, Kim DH, Won YH, Maibach HI. Increased in vivo collagen synthesis and in vitro cell proliferative effect of glycolic acid. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery* [et al]. 1998;24(10):1054-8.
- 22.Kim SJ, Won YH. The effect of glycolic acid on cultured human skin fibroblasts: cell proliferative effect and increased collagen synthesis. *The Journal of dermatology*. 1998;25(2):85-9.
- 23.Bernstein EF, Lee J, Brown DB, Yu R, Van Scott E. Glycolic acid treatment increases type I collagen mRNA and hyaluronic acid content of human skin. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery* [et al]. 2001;27(5):429-33.
- 24.Denda S, Denda M, Inoue K, Hibino T. Glycolic acid induces keratinocyte proliferation in a skin equivalent model via TRPV1 activation. *Journal of dermatological science*. 2010;57(2):108-13.
- 25.Fabbrocini G, De Padova MP, Tosti A. Chemical peels: what's new and what isn't new but still works well. *Facial plastic surgery : FPS*. 2009;25(5):329-36.
- 26.Sharad J. Glycolic acid peel therapy - a current review. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2013;6:281-8.
- 27.Fischer TC, Perosino E, Poli F, Viera MS, Dreno B, Cosmetic Dermatology European Expert G. Chemical peels in aesthetic dermatology: an update 2009. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2010;24(3):281-92.
- 28.Deprez P. *Superficial, Medium and Deep Peels in Cosmetic Practice*. London: Healthcare; 2007.
- 29.Murad H, Shamban AT, Premo PS. The use of glycolic acid as a peeling agent. *Dermatologic clinics*. 1995;13(2):285-307.
- 30.Burns RL, Prevost-Blank PL, Lawry MA, Lawry TB, Faria DT, Fivenson DP. Glycolic acid peels for postinflammatory hyperpigmentation in black patients. A comparative study. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery* [et al]. 1997;23(3):171-4; discussion 5.
- 31.Inan S, Oztukcan S, Vatansever S, Ermertcan AT, Zeybek D, Oksal A, et al. Histopathological and ultrastructural effects of glycolic acid on rat skin. *Acta histochemica*. 2006;108(1):37-47.
- 32.Funasaka Y, Sato H, Usuki A, Ohashi A, Kotoya H, Miyamoto K, et al. The efficacy of glycolic acid for treating wrinkles: analysis using newly developed facial imaging systems equipped with fluorescent illumination. *Journal of dermatological science*. 2001;27 Suppl 1:S53-9.
- 33.Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K. Effects of glycolic acid chemical peeling on facial pigment deposition: evaluation using novel computer analysis of digital-camera-captured images. *Journal of cosmetic dermatology*. 2013;12(4):281-6.
- 34.Kakudo N, Kushida S, Tanaka N, Minakata T, Suzuki K, Kusumoto K. A novel method to measure conspicuous facial pores using computer analysis of digital-camera-captured images: the effect of glycolic acid chemical peeling. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin*. 2011;17(4):427-33.
- 35.Berardesca E, Piero Vignoli G, Distante E, Rona C. Effects of glycolic acid on psoriasis. *Clinical and experimental dermatology*. 1998;23(4):190-1.
- 36.Atzori L, Brundu MA, Orru A, Biggio P. Glycolic acid peeling in the treatment of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 1999;12(2):119-22.
- 37.Wang CM, Huang CL, Hu CT, Chan HL. The effect of glycolic acid on the treatment of acne in Asian skin. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery* [et al]. 1997;23(1):23-9.
- 38.Pereanez JA, Patino AC, Rey-Suarez P, Nunez V, Henao Castaneda IC, Rucavado A. Glycolic acid inhibits enzymatic, hemorrhagic and edema-inducing activities of BaP1, a P-I

- metalloproteinase from Bothrops asper snake venom: insights from docking and molecular modeling. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;71:41-8.
39. Yang JH, Chou CC, Cheng YW, Sheen LY, Chou MC, Yu HS, et al. Effects of glycolic acid on the induction of apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia cell line (HL-60). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2004;42(11):1777-84.
40. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. 2012;19(1):107-20.
41. Schulze-Osthoff K. The Fas/APO-1 receptor and its deadly ligand. *Trends in cell biology*. 1994;4(12):421-6.
42. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
43. Mimeault M. New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS letters*. 2002;530(1-3):9-16.
44. Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science*. 2014;343(6177):1357-60.
45. Kirkland JL, Tchkonja T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Experimental gerontology*. 2015;68:19-25.
46. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479(7372):232-6.
47. Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging cell*. 2015;14(4):644-58.
48. Malavolta M, Pierpaoli E, Giacconi R, Costarelli L, Piacenza F, Basso A, et al. Pleiotropic Effects of Tocotrienols and Quercetin on Cellular Senescence: Introducing the Perspective of Senolytic Effects of Phytochemicals. *Current drug targets*. 2016;17(4):447-59.
49. Bors W, Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;957:57-69. Epub 2002/06/21.
50. NI S, L.R. Diccionario de química y de productos químicos. Hawley. 1993;2ª Ed.(Barcelona: Omega).
51. Murota K, Mitsukuni Y, Ichikawa M, Tsushida T, Miyamoto S, Terao J. Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(7):1907-12.
52. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(1 Suppl):230S-42S. Epub 2005/01/11.
53. Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*. 2013;72:35-45.
54. Panchal SK, Poudyal H, Brown L. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *The Journal of nutrition*. 2012;142(6):1026-32. Epub 2012/04/27.
55. Sakai-Kashiwabara M, Asano K. Inhibitory action of quercetin on eosinophil activation in vitro. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013;2013:127105. Epub 2013/07/11.
56. Stefek M. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdisciplinary toxicology*. 2011;4(2):69-77.
57. Valet G, Leary JF, Tarnok A. Cytomics--new technologies: towards a human cytome project. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004;59(2):167-71.

- 58.Pardo CC. Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT Test. International Union of Pure and Applied Chemistry. 2006.
- 59.Lai WW, Hsiao YP, Chung JG, Wei YH, Cheng YW, Yang JH. Synergistic phototoxic effects of glycolic acid in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *Journal of dermatological science*. 2011;64(3):191-8.
- 60.Moy LS, Howe K, Moy RL. Glycolic acid modulation of collagen production in human skin fibroblast cultures in vitro. *Dermatologic surgery* : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 1996;22(5):439-41.
- 61.Olson ER, Melton T, Dickinson SE, Dong Z, Alberts DS, Bowden GT. Quercetin potentiates UVB-Induced c-Fos expression: implications for its use as a chemopreventive agent. *Cancer prevention research*. 2010;3(7):876-84. Epub 2010/06/17.
- 62.Liu P, Sun L, Zhou DS, Zhang P, Wang YH, Li D, et al. Development of Alendronate-conjugated Poly (lactic-co-glycolic acid)-Dextran Nanoparticles for Active Targeting of Cisplatin in Osteosarcoma. *Scientific reports*. 2015;5:17387.
- 63.Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Experimental gerontology*. 2010;45(10):763-71.