



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO DE LOS EFECTOS CELULARES DEL ÁCIDO GLICÓLICO SOBRE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Autora

Sara Gómez Redrado

Directores

José Octavio Alda Torrubia y Álvaro Casanova Flor de Lis

Departamento de Farmacología y Fisiología. Área de Fisiología Humana. Facultad
de Medicina.

Zaragoza 2017

ABREVIATURAS

AG	Ácido glicólico
AHA	Alfa-hidroxiácido
ATC	Ácido tricloroacético
ATP	Adenosín trifosfato
DL50	Dosis letal 50
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
GA	Glycolic acid
IL-1 α	Interleuquina 1 α
LD50	Median lethal dose
MMP	Metaloproteinasas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death (Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular)
PBS	Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino)
PI	Ioduro de propidio
REDOX	Reducción-oxidación
RIP1	Ribosome Inactivating Protein 1 (Proteína inactivadora de ribosomas 1)
RIP3	Ribosome Inactivating Protein 3 (Proteína inactivadora de ribosomas 3)
SFB	Suero fetal bovino
TCA	Trichloroacetic acid
TNF	Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1 (Receptor del factor de necrosis tumoral 1)
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1 (Receptor de potencial transitorio vaniloide 1)

ÍNDICE

RESUMEN	1
PALABRAS CLAVE	1
ABSTRACT	2
KEYWORDS	2
INTRODUCCIÓN	3
PIEL	3
PEELINGS QUÍMICOS	4
ÁCIDO GLICÓLICO	4
PEELING DE ÁCIDO GLICÓLICO	4
EFFECTO DEL ÁCIDO GLICÓLICO SOBRE LA PIEL	6
EFFECTO DEL ÁCIDO GLICÓLICO SOBRE CÉLULAS EN CULTIVO	6
QUERCETINA	7
MUERTE CELULAR	8
APOPTOSIS	8
NECROSIS	9
NECROPTOSIS	10
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	11
PLANTEAMIENTO	11
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
MATERIAL	12
MATERIAL BIOLÓGICO	12
TRATAMIENTOS	12
OTROS REACTIVOS	12
EQUIPOS	12
MÉTODOS	13
MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR	13
ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR ALAMARBLUE	13
ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE IMAGEN	14
ESTADÍSTICA	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
EFFECTO DEL ÁCIDO GLICÓLICO	16
ÁCIDO GLICÓLICO Y QUERCETINA	18
CONCLUSIONES	21
CONCLUSIONS	22
BIBLIOGRAFÍA	23
RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMEN

Los peelings químicos son procedimientos cosméticos que consisten en el uso de sustancias químicas para provocar lesiones en la piel de forma controlada con el objetivo de mejorar la textura y apariencia de la superficie de la piel. El ácido glicólico (AG) es un alfa-hidroxiácido (AHA) ampliamente utilizado como peeling químico.

Con el propósito de estudiar *in vitro* los efectos del AG y otras sustancias, se ha utilizado un modelo celular de fibroblastos humanos en cultivo. Realizando valoraciones de viabilidad con el reactivo alamarBlue se observó que el AG tamponado ($\text{pH}\approx 7$) no reduce la viabilidad de los fibroblastos hasta que se utilizan dosis elevadas (100-200 mM), que ya son tóxicas por hiperosmolaridad. Además, no se pueden diferenciar los efectos sobre la viabilidad de los fibroblastos del AG y el ácido tricloroacético (ATC), si se aplican a pHs cercanos. Estos resultados sugieren que la capacidad de los peelings de AG para promover la exfoliación cutánea es debida esencialmente a la elevada acidez y presión osmótica de las soluciones empleadas en estos procedimientos.

A pesar de las numerosas mejoras cutáneas que diversos autores atribuyen al uso del peeling de AG, se trata de un procedimiento que mata las células de la piel de manera indiscriminada. Por eso, se ha propuesto un nuevo sistema de peeling químico basado en la acción sinérgica de AG y quercetina, un flavonoide con actividad senolítica que podría aportar selectividad al tratamiento para que actúe preferentemente sobre las células senescentes. Mediante citometría de imagen se vió que al aplicar un tratamiento de AG parcialmente tamponado ($\text{pH}\approx 6$) sobre fibroblastos, se induce mayoritariamente la muerte celular por necrosis, mientras que al añadir al tratamiento distintas dosis de quercetina (200-600 μM) se ve reducida la población en células necróticas y necroptóticas y aumenta la de células apoptóticas tempranas.

PALABRAS CLAVE

Peeling químico

Ácido glicólico

Quercetina

Fibroblastos

Muerte celular

ABSTRACT

Chemical peels are cosmetic procedures which consist in the use of chemical compounds that cause injuries in skin cells in a controlled manner, with the aim of improving the texture and appearance of the skin's surface. Glycolic acid (GA) is an alpha hydroxy acid (AHA) widely used in chemical peels.

In order to study the effects of GA and other substances *in vitro*, human fibroblasts in culture were used as a cellular model. When viability assays were carried out using the alamarBlue reagent it was observed that neutralized GA (pH \approx 7) does not reduce fibroblast viability until higher concentrations are tested (100-200 mM), which are already toxic due to hyperosmolarity. Furthermore, the effects on the viability of the fibroblasts cannot be distinguished from those of trichloroacetic acid (TCA), if they are applied at similar pH values. These results suggest that the skin removal ability of GA peels is due essentially to the elevated acidity and osmotic pressure of the solutions used in these procedures.

Despite the many cutaneous improvements that several authors attribute to the use of GA peel, it has been proved to be a process that kills skin cells indiscriminately. For this reason, a new exfoliation treatment has been proposed based on the synergistic action of GA and quercetin, a flavonoid with senolytic activity which could provide selectivity by acting upon senescent cells. By means of image cytometry it was observed that when a partially neutralized GA treatment (pH \approx 6) is applied on the fibroblasts, cellular death is mainly induced by necrosis, whereas the addition of different doses of quercetin (200-600 μ M) decreases the necrotic and necroptotic cell population and increases early apoptotic cells.

KEYWORDS

Chemical peel

Glycolic acid

Quercetin

Fibroblasts

Cellular death

INTRODUCCIÓN

Piel

Es un órgano que separa al organismo del ambiente externo. Es una estructura compleja, integrada por células, tejidos y elementos de la matriz extracelular que median una gran variedad de funciones: actúa como barrera protegiendo al cuerpo contra agresiones mecánicas, químicas, tóxicos, calor, frío, radiación ultravioleta, microorganismos patógenos..., pero también evita la deshidratación, mantiene el equilibrio térmico y participa en la transmisión de una gran cantidad de información externa (tacto, presión, temperatura, dolor). Además, puede almacenar agua, productos metabólicos y producir hormonas. Tiene tres capas principales: epidermis, dermis y tejido subcutáneo o hipodermis (Fig. 1).

Epidermis: Estructura estratificada que se renueva continuamente y actúa como barrera principal de la piel (Fig. 1). Las células mayoritarias son los queratinocitos, se originan a partir de las células basales proliferativas adheridas a la lámina basal epidérmica, desplazándose y diferenciándose hasta las escamas aplanadas sin vida del estrato córneo queratinizado, los corneocitos, hasta producirse la descamación. Intercalados entre los queratinocitos, también hay melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

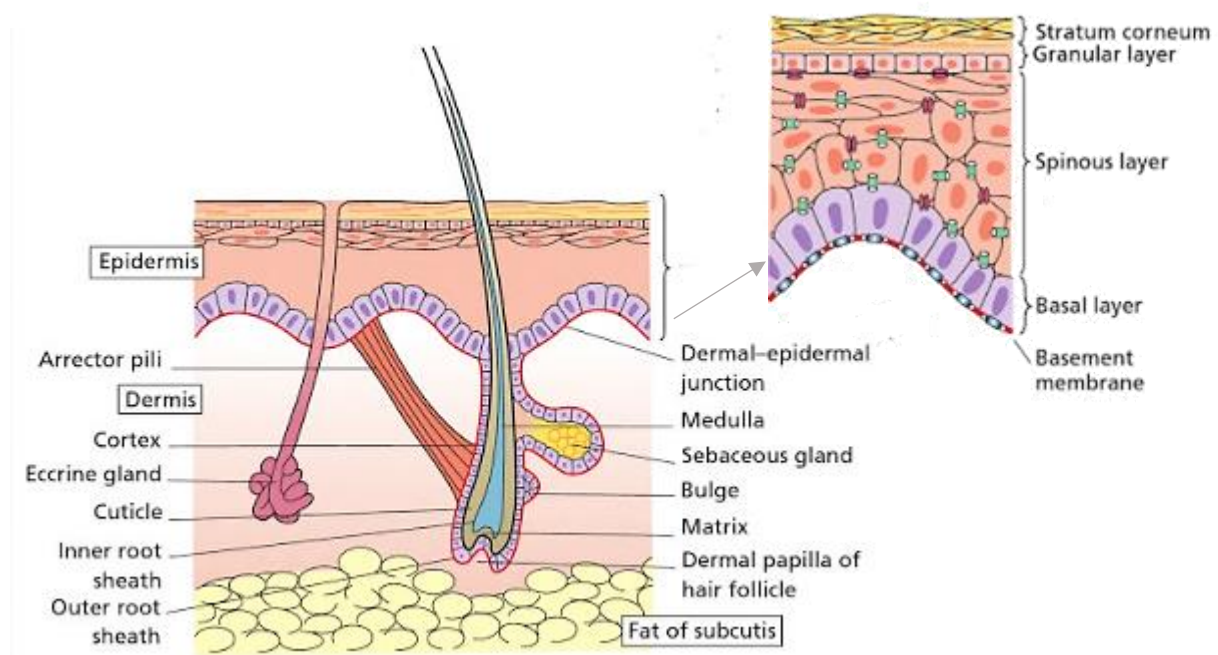


Fig. 1. Esquema de las regiones principales de la piel y la epidermis. Tomada de *Structure and Function of the Skin*.(1)

Dermis: Sistema integrado de elementos fibrosos, filamentosos, difusos y celulares del tejido conjuntivo que confiere flexibilidad, elasticidad y fuerza tensil a la piel. Tiene varios tipos de células residentes: fibroblastos, macrófagos, células mastoideas, células del sistema inmune... Los fibroblastos son células derivadas del mesénquima que migran a través de los tejidos y sintetizan componentes de la matriz extracelular (colágeno, glucosaminoglucanos..) y diferentes factores solubles. En este trabajo se utilizaron como modelo de estudio fibroblastos humanos en cultivo.

Hipodermis: Tejido subcutáneo fundamentalmente adiposo que aísla el cuerpo y sirve como suplemento de reserva energética, acolchado y protección de la piel. Las células más numerosas de la epidermis son los adipocitos, células con un alto contenido lipídico.(2)

Peelings químicos

Son procedimientos cosméticos no quirúrgicos ampliamente utilizados para el rejuvenecimiento facial. Se basan en el uso de sustancias químicas, a las que también se les denomina utilizando el término peeling, que provocan lesiones en la piel de forma controlada. De esta manera se promueve la exfoliación cutánea, la despigmentación y la regeneración del tejido mediante la proliferación de glucosaminoglicanos, fibroblastos, así como la remodelación de fibras de elastina y colágeno. Estos procedimientos tienen como objetivo la mejora de la textura y superficie de la piel.

La profundidad del peeling depende del agente químico, su concentración, el modo de aplicación, la duración del tratamiento, así como el tipo de piel del paciente. Según el nivel de actuación pueden clasificarse en:

- superficiales, produciendo lesión a nivel de epidermis.
- de profundidad media, cuando la lesión se extiende a través de la epidermis hasta las capas más superficiales de la dermis.
- profundos, porque la lesión llega hasta capas más profundas de la dermis.

Los tipos de moléculas utilizados son alcoholes que contienen grupos carboxilo (-COOH) e hidroxilo (-OH) o ácidos. Algunos de los más utilizados son los alfa-hidroxiácidos, el ácido salicílico, el ácido tricloroacético, el fenol, la tretinoína...(3-5)

Ácido glicólico

El ácido glicólico (AG) o ácido 2-hidroxiacético, con fórmula química $C_2H_4O_3$ y un peso molecular de 76.051 g/mol, es el AHA más pequeño. Se produce naturalmente en las uvas, caña de azúcar, remolacha azucarera y hojas de la enredadera de Virginia. Tiene dos átomos de carbono, uno de ellos unido a un grupo hidroxilo (-OH) y el otro formando un grupo carboxilo (-COOH).

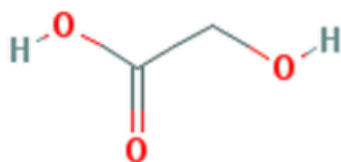


Fig. 2. Estructura química del ácido glicólico.(6)



Fig. 3. Fuentes naturales de ácido glicólico.

En su forma pura, el AG se presenta como un sólido cristalino incoloro, translúcido e inodoro extremadamente hidrofílico. El pka es de 3.83 y el pH en una disolución saturada de aproximadamente 0.6. (6, 7) Gracias a sus propiedades químicas tiene la capacidad de penetrar fácilmente a través de la piel, lo que le convierte en un buen candidato para los peelings químicos.(5)

Peeling de ácido glicólico

También denominado peeling de fruta, es el más utilizado de los peelings químicos por su eficacia y precio económico. (8) Se utiliza, como todos los peelings, para rejuvenecer la piel, pues al provocar la exfoliación de la epidermis, los tejidos se regeneran. Tras el tratamiento, los pacientes evalúan su piel como más resistente, firme, lisa y joven.(5) Además, muchos autores lo consideran como un remedio milagroso para eliminar alteraciones cutáneas epidérmicas y se utiliza para el tratamiento de queratosis seborreicas o actínicas, lentiginosis seniles, verrugas vulgares, xerosis, acné,

estrías de distensión, hiperpigmentación postinflamatoria, melasma, papilomatosis reticulada, psoriasis y verrugas planas.(5, 8, 9)

En cuanto a los efectos secundarios, dependen de la piel del paciente, del producto utilizado y del tiempo de aplicación.

Cuando se aplican productos cosméticos sobre la piel de un paciente y hay que seleccionar un tipo de peeling u otro, los dermatólogos tienen en cuenta la clasificación del Dr. T. Fitzpatrick basada en los distintos fototipos cutáneos (Tabla I). (10)

	Acción del sol sobre la piel (no protegida)	Características pigmentarias
Fototipo I	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
Fototipo II	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
Fototipo III	Se quema moderadamente y se pigmenta correctamente	Razas caucásicas (europeas) de piel blanca que no está expuesta habitualmente al sol
Fototipo IV	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)
Fototipo V	Raramente se quema, pigmenta con facilidad e intensidad (siempre presenta reacción de pigmentación inmediata)	Individuos de piel amarronada (amerindios, indostánicos, árabes e hispanos)
Fototipo VI	No se quema nunca y pigmenta intensamente (siempre presentan reacción de pigmentación inmediata)	Razas negras

Tabla I. Clasificación de los fototipos cutáneos del Dr. T. Fitzpatrick. Tabla publicada por Marín D y Del Pozo, A. (10)

El peeling de ácido glicólico se utiliza en todos los fototipos de piel en concentraciones que oscilan entre 20% y 70% y está comercialmente disponible como ácido libre o como soluciones parcialmente neutralizadas (pH más alto), tamponadas o esterificadas. Cuanto mayor es la concentración y menor el pH, mayor es la intensidad del tratamiento.(8) Becker y cols. en 1996 demostraron que soluciones de AG al 70% a pH < 2 producen más necrosis y destrucción de tejidos que esas soluciones parcialmente neutralizadas a un pH > 2. Sin embargo, estos autores confirman que por el hecho de producir más necrosis celular no significa que sean mejores peelings. Por lo tanto, el uso de soluciones de AG tamponado o parcialmente neutralizadas parece la mejor opción, por ser más seguras que las soluciones de ácido AG libre, con pH más bajo y por tanto más agresivo para la piel.(11)

Los efectos secundarios de los productos a concentraciones bajas pueden ser irritaciones leves, escozor, dolor y eritema. Cuando se utilizan productos de mayor concentración, estos efectos se vuelven más frecuentes y pueden darse otros más severos como formación de ampollas, púrpura, costras, hipopigmentación, hiperpigmentación, atrofia, ulceración, cicatrización hipertrófica o formación de queloides, así como riesgo de infección.(5, 8)

Además de la concentración y el pH, otro factor muy importante a considerar es el tiempo de aplicación del tratamiento. Aplicar ácido en la piel satura la capacidad de las células para resistir a la acidificación, por lo tanto, los peelings de AG tienen que ser correctamente neutralizados para detener la acidificación de la piel. Si no se neutralizan a tiempo se daña la piel ya que continúa la queratolisis y la descamación. Según la revisión bibliográfica de Sharad La neutralización puede realizarse diluyendo con agua o con soluciones básicas como sales de amonio, bicarbonato de sodio o hidróxido de sodio.(8)

La selección del tratamiento a aplicar para cada paciente y la correcta neutralización en el tiempo adecuado son esenciales para asegurar buenos resultados con los menores efectos secundarios.

Fabbrocini, en 2009, clasificó los diferentes peelings de AG en función de estos parámetros: muy superficiales (30%–50% AG, aplicado durante 1–2 minutos); superficiales (50%–70% AG, aplicado durante 2–5 minutos); y de profundidad media (70% AG, aplicado durante 3–15 minutos).(12)

Efecto del ácido glicólico sobre la piel

Estudios muy antiguos realizados por Van Scott en 1974 y 1984 revelaban la capacidad de diversos AHAs, entre los cuales, el AG, para disminuir la cohesión de los corneocitos, e inducir descamación, influenciando así el proceso de queratinización.(13, 14)

Un estudio realizado por Ditre y cols. en 1996 demostró que cuando se aplicaba un tratamiento tópico con 25% de AG sobre piel fotoenvejecida se producían cambios histológicos importantes: la epidermis aumentaba en espesor al engrosar su capa basal, se producía dispersión de la pigmentación de melanina y disminuía la agregación de los tonofilamentos en el citoplasma. Este aumento del grosor de la piel parecía ser causado por una mayor síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno, y no por formación de edema.(15) Posteriormente Kim y cols. en 1998 y Bernstein y cols. en 2001, afirmaban que la expresión génica de colágeno y ácido hialurónico aumenta en piel tratada con AG. Los ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos realizados por Inan en 2006 en piel de ratas también demuestran que el tratamiento con AG aumenta el grosor de la epidermis, el número de fibroblastos activos y de fibras de colágeno.(16, 17)

Sin embargo, los efectos del AG son muy diversos, y dependen de la concentración y pH utilizados, así como del modo de aplicación y estado previo de la piel a tratar. Estudios realizados con individuos con alteraciones cutáneas como la xerosis han mostrado que el tratamiento con ácido glicólico disminuye el grosor del estrato corneo y mejora la hidratación de la piel (13), mientras que otros autores demuestran que el efecto en la hidratación y el grosor del estrato córneo en individuos con piel normal es mínimo. (18)

El AG puede presentar efectos adversos para la piel. Los resultados obtenidos en el estudio realizado por Park y cols. en 2002 con cobayas, indican que el AG causa un aumento en el nivel de daño cutáneo de forma dependiente de la dosis y del tiempo. Las dosis más altas (5 y 7 mg/cm²; pH=3) causan en las cobayas edema, corrosión, ulceración y destrucción de la organización de estrato córneo y capa epidérmica, mientras que dosis menores (1 y 3 mg/cm²; pH=3) sólo provocan eritema y descamación de la piel. Estas dosis más bajas provocan el aumento del número de células epidérmicas y del espesor de la piel y una menor integridad del estrato córneo. (19)

Podemos concluir que, aunque el AG puede dar lugar a efectos beneficiosos en diversas condiciones dermatológicas, es esencial seleccionar el tratamiento adecuado para cada paciente en función de su piel para evitar efectos adversos y garantizar la seguridad del tratamiento.

Efecto del ácido glicólico sobre células en cultivo

Moy y cols. en 1996 realizaron un experimento para estudiar los efectos del AG sobre fibroblastos humanos en cultivo. Consistía en medir la tasa de producción de colágeno tras incubar las células durante 24 horas en medio de cultivo a una concentración fisiológica de AG (50 µg/mL). En estas condiciones el AG provoca un aumento en la producción de colágeno por los fibroblastos sin efectos tóxicos, que podría explicar algunos de los beneficios de su uso clínico.(20)

En 1998, Kim y cols., realizaron un estudio similar. Trataron fibroblastos humanos en cultivo durante 24 horas con diferentes concentraciones de AG (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M). Al realizar la conversión a $\mu\text{g/mL}$ (7,6, 0,76 y 0,076 $\mu\text{g/mL}$) observamos que son inferiores a la utilizada en el artículo anterior y los resultados obtenidos también indican un aumento de la producción de colágeno por el AG. Los ensayos de MTT revelaron además que el AG provocaba proliferación celular de fibroblastos. (17)

Okano y cols., en 2003, investigaron conjuntamente el papel de los queratinocitos y los fibroblastos en la remodelación de la piel fotodañada inducida por el AG. En la figura 4 se pueden observar los dos mecanismos de acción del AG: una vía es la síntesis de colágeno por fibroblastos tanto directa como indirectamente a través de la liberación de citoquinas por queratinocitos; la otra vía es la producción de metaloproteinasas (MMP) por fibroblastos y la degradación de la matriz mediada por interleuquina 1 α (IL-1 α). (21)

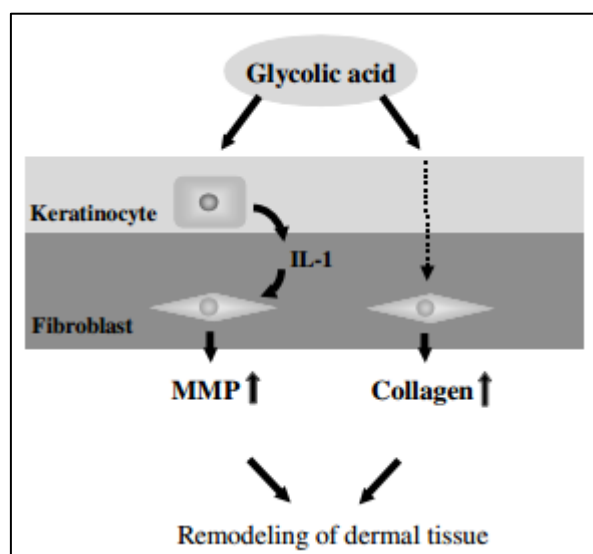


Fig 4. Esquema de los mecanismos inducidos por el AG que llevan a la regeneración de la piel fotodañada. Propuesto por Okano y cols. (21)

A pesar de haberse realizado diversos estudios sobre los efectos del AG sobre la piel, se sabe poco sobre el mecanismo molecular que induce. Por eso, Denda y cols. en 2009 utilizaron un modelo de piel para investigar los efectos de la aplicación tópica de AG en la proliferación celular y examinar los mecanismos moleculares implicados. Detectaron, 24 horas tras la aplicación de AG, un aumento significativo de la proliferación de queratinocitos de forma pH dependiente así como una liberación transitoria de ATP en los medios de cultivo. Ambos efectos se inhibían por antagonistas del canal iónico TRPV1, lo que sugiere que la activación dicho canal podría tener un papel relevante en los efectos del AG sobre la piel. (22)

Quercetina

La quercetina, con fórmula química $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ y peso molecular de 302.238 g/mol, es un flavonoide, perteneciente al subgrupo de los flavonoles. Los flavonoles (polifenoles C6-C3-C6) poseen dos anillos de benceno hidroxilados, A y B, y difieren en el número y tipo de sustituciones en el anillo B. La quercetina está dihidroxilada en las posiciones 3' y 4'.(23, 24)

Ampliamente distribuida en plantas, está presente en diversos tipos de vegetales (cebollas, brócoli, pimientos), frutas (manzanas, bayas, uvas), hierbas (eneldo), algunos tipos de té, miel, vino...(24)

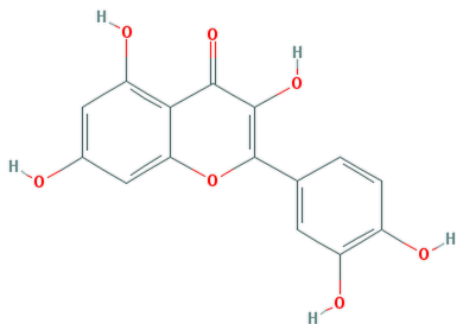


Fig. 5. Estructura química de la quercetina.(23)



Fig. 6. Alimentos ricos en quercetina.

Tiene diferentes propiedades biológicas, incluyendo actividades anticarcinógenas, antiinflamatorias, antivirales, antioxidantes y psicoestimulantes, así como la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, la agregación plaquetaria y la permeabilidad capilar y estimular la biogénesis mitocondrial.(25) Además actúa como agente senolítico, es decir, es capaz de matar selectivamente las células senescentes al bloquear vías de supervivencia que confieren a estas células resistencia a la apoptosis.(26, 27)

Muerte celular

La muerte celular es el proceso que lleva a la terminación de las funciones celulares normales, incluyendo la respiración, el metabolismo, el crecimiento y la proliferación. Este proceso es reversible hasta que se traspasa un punto de “no retorno”.

Debido a la ausencia de un evento bioquímico definido que pueda considerarse como el punto de “no retorno”, el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD) propone que una célula se considere muerta cuando se cumple cualquiera de los siguientes criterios moleculares o morfológicos:

- la célula ha perdido la integridad de su membrana plasmática
- la célula, incluyendo su núcleo, ha sufrido una fragmentación completa en cuerpos discretos o apoptóticos.
- su cadáver (o sus fragmentos) ha sido engullido por una célula adyacente in vivo.

La muerte celular puede clasificarse en función de diferentes criterios: apariencia morfológica, enzimas que participan, aspectos funcionales, características inmunológicas... En 2009, el NCCD propuso unos criterios para la definición de las distintas modalidades de muerte celular. (28) Partiendo de estas definiciones y teniendo en cuenta avances posteriores en la investigación sobre la muerte celular, el NCCD propuso en 2012 una nueva clasificación sistemática de la muerte celular que define 13 modalidades de muerte celular. (29)

A continuación, paso a describir los tipos de muerte celular más relevantes para este trabajo, es decir, aquellos que se han podido analizar por citometría de flujo de imagen: apoptosis temprana, apoptosis tardía, necrosis y necroptosis.

Apoptosis

Muerte celular programada que manifiesta algunas de las siguientes características: redondeo de la célula, retracción de los pseudópodos, reducción del volumen celular, deformación de la membrana plasmática, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, fragmentación nuclear, pérdida de

la integridad de membrana en las etapas finales del proceso con el desprendimiento de cuerpos apoptóticos. Los términos apoptosis temprana y apoptosis tardía hacen referencia a distintas etapas de la muerte celular apoptótica.

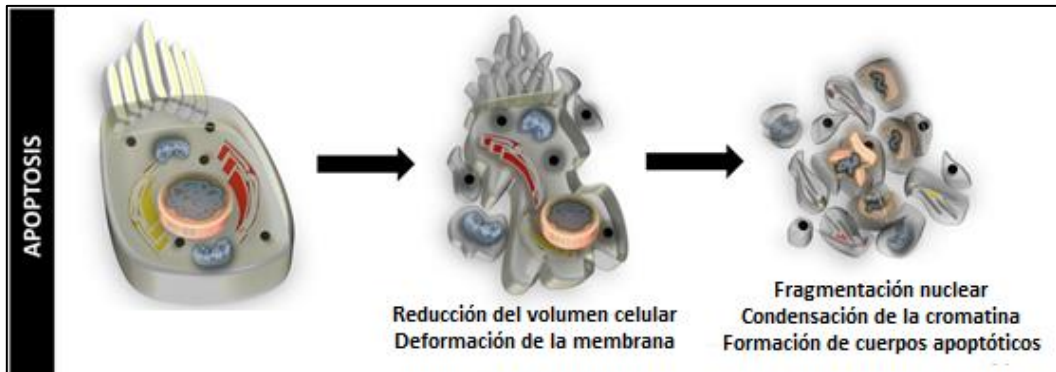


Fig. 7. Representación de los eventos celulares típicos de la muerte celular apoptótica. Imagen publicada por Dinh y cols. en 2015 modificada.(30)

Según la vía de señalización que desencadene la apoptosis hablamos de:

- Apoptosis extrínseca: apoptosis dependiente de caspasas que presenta una cascada de señalización letal desencadenada por la unión de ligandos a proteínas de membrana que transducen señales de muerte.

- Apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas: apoptosis mediada por permeabilización de la membrana externa mitocondrial. En respuesta a diferentes condiciones de estrés intracelular (por ejemplo, daño del ADN, falta de nutrientes, sobrecarga de Ca^{2+} citosólica), se generan señales de supervivencia y de muerte que convergen a un mecanismo de control mitocondrial. Cuando las señales letales prevalecen, se da la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Esto conlleva múltiples consecuencias letales: alteración del potencial de membrana mitocondrial, liberación en el citosol de proteínas tóxicas del espacio intermembrana e inhibición de la cadena respiratoria.

Necrosis

Muerte celular accidental no controlada caracterizada morfológicamente por aumento de volumen celular, hinchazón de los orgánulos, rotura de la membrana plasmática y posterior pérdida del contenido intracelular. Puede ser causada por perturbaciones importantes en el entorno, como anoxia o condiciones físicas muy duras como la congelación.

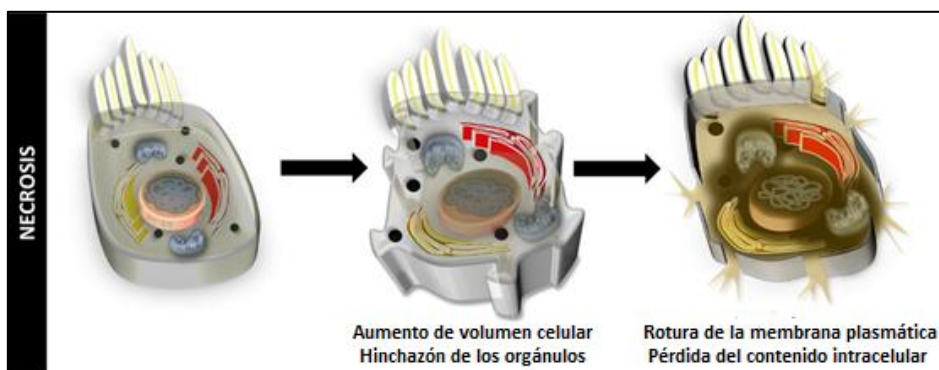


Fig. 8. Representación de los eventos celulares típicos de la muerte celular necrótica. Imagen publicada por Dinh y cols. en 2015 modificada.(30)

Necroptosis

Muerte celular programada que presenta características muy similares a la necrosis. Es una muerte necrótica regulada por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos. Puede ser inducida por distintos desencadenantes como daño alquilante del ADN, excitotoxinas y la unión de ligandos a receptores de muerte en determinadas condiciones. Suele darse en condiciones deficientes para dar apoptosis. Por ejemplo, cuando las caspasas son inhibidas, TNF activa TNFR1 que induce la activación de las proteínas RIP1 y RIP3. Estas últimas participan en interacciones físicas y funcionales que llevan a la ejecución de la muerte celular necrótica.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Planteamiento

En este trabajo se ha planteado estudiar los efectos del ácido glicólico, ampliamente utilizado como peeling químico, sobre un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos que actúe como modelo de piel y proponer un nuevo sistema de peeling químico basado en la acción sinérgica del ácido glicólico y quercetina, un flavonoide con actividad senolítica que podría aportar selectividad al tratamiento para que actúe preferentemente sobre las células senescentes.

Objetivos

1. Establecer un modelo celular *in vitro* que nos permita evaluar el efecto del AG sobre la piel, independientemente del pH y la presión osmótica.
2. Utilizar una técnica de determinación de viabilidad celular basada en el reactivo alamarBlue para establecer si existe una dosis letal 50 (DL50) del AG tamponado sobre un cultivo de fibroblastos humanos para un tratamiento de 30 minutos.
3. Estudiar el efecto de tratamientos mixtos de AG y quercetina sobre la viabilidad celular de un cultivo de fibroblastos humanos.
4. Analizar por citometría de imagen el tipo de muerte celular inducida tanto por el AG como por el nuevo sistema de peeling químico propuesto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Material biológico

Fibroblastos dérmicos procedentes de cultivo primario de piel humana (Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina).

Mantenimiento de las células en medio de cultivo DMEM completo: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4,5 g/L Glucose, with L-Glutamine, Lonza, BioWhittaker®, BE12-604F) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina).

El medio DMEM utilizado contiene todo lo necesario para mantener las células y promover su desarrollo (proteínas, lípidos, minerales...), así como un sistema tampón y un indicador de pH. Además, es complementado con SFB, que promueve la proliferación *in vitro* de células, y antibióticos, que evitan las contaminaciones bacterianas.

Tratamientos

- Ácido Glicólico (Glycolic acid, ReagentPlus®, 99%, SIGMA-ALDRICH®, 124737-25G, HOCH₂COOH).

- Tris (Trizma BASE + Trizma HCl, SIGMA®, No. T-1503, NH₂C(CH₂OH)₃·HCl)

- Ácido tricloroacético (Trichloroacetic acid GR, 99,5%, MERCK, 3638129, CCl₃COOH)

- Quercetina (Quercetin dihydrate, SIGMA®, Q-0125, C₁₅H₁₀O₇·2H₂O)

Otros reactivos

- Tampón fosfato salino estéril para cultivo celular (PBS, 0.0067M (PO₄), Lonza, BioWhittaker®, BE17-516Q)

- Tripsina 1X (Cultek, 91L0930-100)

- AlamarBlue.

- Solución de calibración para OSMOMAT (Calibration solution 300mOsmol/kg NaCl/H₂O, Gonotec, 3393C41)

- Fluorocromos: Kit Anexina V-IP (Alexa® Fluor 488 Annexin V and IP, ThermoFisher).

Equipos

- Estufa de cultivo (BINDER): 37°C y 5% de CO₂

- Microscopio Invertido de Fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000 S

- Cámara de Neubauer

- Cabina de seguridad biológica clase II (Telstar Bio-II-A)

- Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5810 R)

- Balanza electrónica AND HR-120

- Baño termostático (Nahita)
- pHmetro (CRISON, micropH 2002)
- Osmómetro (Osmomat 030)
- Agitador de placas
- Espectrofotómetro de microplacas termostático (Eon (Biotek, Vermont USA)): Lector de absorbancia de placas de 6 a 384 pocillos.
- Citómetro de imagen (AMNIS ImageStream X (Seattle, WA, USA)): equipo que combina un método de seguimiento electrónico de células en movimiento (citometría de flujo) con un sistema de imagen de alta resolución con ópticas de microscopio de 20, 40 y 60 aumentos. De esta forma permite adquirir múltiples imágenes de cada célula: una de dispersión lateral (campo oscuro), una de luz transmitida (campo claro) y hasta doce canales de fluorescencia. Este sistema amplía el alcance de la citometría de flujo ofreciendo nuevas aplicaciones de análisis celular.(31)

Métodos

Mantenimiento del cultivo celular

La puesta en marcha del cultivo se realizó a partir de muestras congeladas de fibroblastos humanos (90% SFB +10% DMSO) en nitrógeno líquido.

Las células eran mantenidas en frascos de cultivo de 75 cm², a 37° C y 5% de CO₂. El medio era cambiado cada dos o tres días. Cuando se llegaba al 90-95% de confluencia celular, se tripsinizaba y se subcultivaba, bien en otros frascos de cultivo (10 mL) o bien en placas de 6 (2 mL/pocillo) ó 96 pocillos (100 µL/pocillo) a una concentración aproximada de 100 células/mL. El trabajo con las células se realizaba en todo momento bajo condiciones de esterilidad en la cabina de seguridad biológica.

Protocolo de tripsinización: eliminar medio de cultivo, lavar con PBS, añadir 4 mL de tripsina previamente atemperada a 37° C, dejar actuar la tripsina en la estufa durante unos minutos controlando al microscopio si se han despegado las células, añadir SFB para paralizar la reacción enzimática, trasvasar las células a un tubo Falcon y centrifugar 5 minutos a 800 rpm, retirar el sobrenadante. Tras dos lavados con PBS resuspender el pellet en DMEM completo.

Estudios de viabilidad celular alamarBlue

El alamarBlue es un ensayo que permite medir cuantitativamente la viabilidad celular según la actividad enzimática mitocondrial en diversas líneas celulares de manera rápida, sensible y económica. Se basa en la resazurina; la cuál es reducida a resorufina durante la respiración celular. El indicador REDOX cambia de una forma oxidada no fluorescente y azul a forma reducida fluorescente y roja y esta conversión es proporcional al número de células metabólicamente activas, pudiendo evaluarse cuantitativamente por fluorescencia o absorbancia. Además es soluble en agua y no es tóxico para las células, por lo que no interfiere con el metabolismo celular y permite el uso de las células en pruebas posteriores.(32)

Protocolo de lectura de la viabilidad celular: añadir AlamarBlue a los cultivos (0.015 mg/mL), incubar 3 horas en la estufa y leer la absorbancia a 570 y 600 nm en el espectrofotómetro de microplacas.

Los tratamientos (Tabla II) se aplicaban 30 minutos antes de realizar la lectura; partiendo de un cultivo con un 90-95% de confluencia celular en placa de 96 pocillos y se añadía nuevo medio con el tratamiento correspondiente. Según el diseño del experimento, en algunas muestras para valorar la apoptosis, se realizaba un cambio de medio tras los 30 minutos de tratamiento y se guardaba el cultivo 24 horas en estufa antes de proceder a la lectura.

AG tamponado a concentraciones de 25, 50, 100 o 200 mM.
AG o tricloroacético 50 mM a pH aproximados de 1, 4 o 7.
Glucosa a aproximadamente 350, 380, 500 y 600 mOsm/Kg.
AG 200 mM, pH \cong 6 y quercetina a 0, 200, 400 o 600 μ M.

Tabla II. Tratamientos aplicados en los experimentos de estudio de la viabilidad celular por alamarBlue.

Estudios de viabilidad celular por citometría de flujo de imagen

Se utilizó la citometría de imagen para determinar la viabilidad celular y analizar los distintos tipos de muerte celular inducidos por distintos tratamientos en cultivos de fibroblastos humanos. La determinación se realizó utilizando un marcaje con fluorocromos (Ioduro de Propidio (IP) y Anexina V). Este doble marcaje, junto a las características morfológicas, permite diferenciar 4 poblaciones celulares que recogen cinco estados celulares asociados a distintos tipos de muerte celular.

El IP es un agente intercalante que se une al ADN y cuando se excita con una longitud de onda de 488 nm, emite una fluorescencia roja. No puede penetrar a través de la membrana plasmática, de tal forma que nos permite diferenciar entre células con membrana intacta y células con membrana dañada, ya que solo estas últimas emitirán fluorescencia. La Anexina V tiene afinidad específica por la fosfatidilserina, que en las células normales se localiza en la cara citosólica de la membrana, pero cuando la célula sufre apoptosis queda expuesta en la superficie, donde actúa como señal para que la célula sea eliminada por los fagocitos. La unión de Anexina V es pues un marcador de apoptosis.

En función del marcaje con fluorocromos se obtienen las siguientes poblaciones:

- **Doble negativo:** células no apoptóticas con la membrana intacta (células vivas).
- **IP positivo:** células no apoptóticas con la membrana dañada (células necróticas).
- **Anexina positivo:** células apoptóticas con la membrana intacta (células en las primeras etapas de apoptosis; células apoptóticas tempranas).
- **Doble positivo:** Las células de esta población pueden ser tanto apoptóticas tardías como necroptóticas. Para diferenciar estos dos estados celulares hay que basarse en las características morfológicas que caracterizan cada uno. Las células apoptóticas tardías han sufrido una fragmentación tanto nuclear como citoplasmática que no han sufrido las necroptóticas. (Células apoptóticas tardías y necroptóticas).

Protocolo de citometría de imagen: tripsinizar el cultivo siguiendo la técnica descrita previamente (apartado Métodos: mantenimiento del cultivo celular) pero adaptando los volúmenes. Tras dos lavados, resuspender en 100 μ L de tampón. Añadir, 5 μ L de ioduro de propidio, 5 μ L de Anexina V y analizar la muestra por el citómetro de imagen AMNIS.

La lectura se realizaba 24 horas después de haber aplicado al cultivo el tratamiento correspondiente durante 30 minutos: partiendo de un cultivo en placa de 6 pocillos al 90-95% de confluencia celular se aplicaba en cada pocillo uno de los siguientes tratamientos, AG 200 mM parcialmente tamponado + quercetina a concentraciones de 0, 200 ó 600 μ M.

Estadística

El análisis estadístico de los datos y las gráficas fueron realizados utilizando Excell y el software de bioestadística “GradhPad Prism”.

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de los resultados obteniendo la media y desviación estándar para cada grupo. Después, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnof para ver si las variables seguían una distribución normal. Como los datos no se ajustaban a este tipo de distribución, para el análisis estadístico diferencial se escogió la prueba U de Mann-Whitney, la cual valora las diferencias significativas entre dos muestras cuantitativas con distribución no paramétrica. En los casos en los que se debían comparar más de dos grupos se realizó primero la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente la U de Mann-Whitney para cada pareja de muestras. En todos los contrastes de hipótesis se fijó el nivel de significación estadística en 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del ácido glicólico

Con el propósito de observar el efecto del AG sobre fibroblastos humanos se realizaron ensayos de viabilidad celular alamarBlue tras tratar las células con diferentes concentraciones de AG tamponado. Al tamponar el pH en torno a la neutralidad se elimina el efecto tóxico debido a la acidez, pudiendo así atribuir todos los efectos observados a nuestro compuesto de interés y diferenciarlos de los que podrían inducir otros ácidos utilizados en los peelings químicos.

El interés de este estudio es poder relacionar los resultados obtenidos con el efecto del AG cuando es utilizado como cosmético, por esta razón, frente a los estudios revisados que testaban el efecto del AG en células tras un tratamiento de 24 horas (16, 17), se eligió una duración de 30 minutos, ya que sería inviable un tiempo de aplicación tan largo para un procedimiento cosmético.

Tras realizar múltiples ensayos testando diferentes concentraciones, y tratar estadísticamente los datos obtenidos por espectrofotometría, se realizó la siguiente gráfica que recoge los resultados obtenidos:

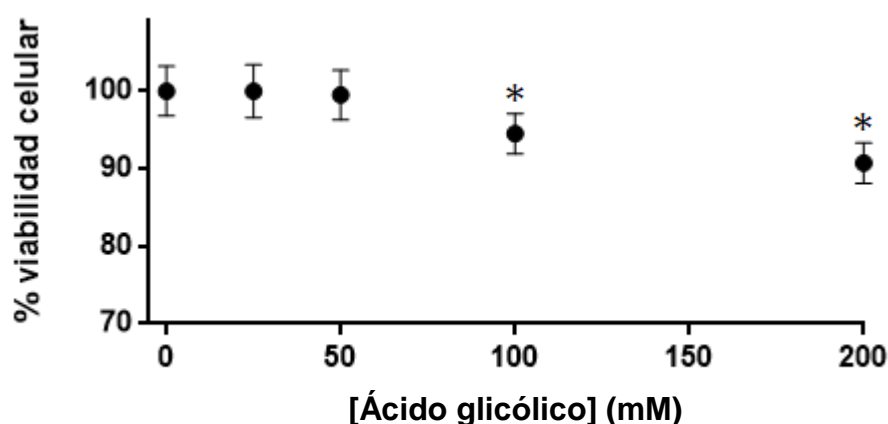


Fig. 9. Efecto del ácido glicólico tamponado (pH≈7) sobre la viabilidad celular de un cultivo de fibroblastos humanos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=16 por grupo). Un asterisco () indica la existencia de diferencias significativas respecto al control ([Ácido glicólico]=0) con un nivel de significación de 0,05.*

Como puede observarse en la figura 9, la viabilidad celular apenas desciende conforme aumenta la concentración de ácido glicólico. Solo se observa un descenso significativo para las dosis más altas testadas (100 y 200 mM).

Tamponando el AG se evitó el efecto del pH sobre la viabilidad celular, sin embargo, al usar dosis tan altas de AG hay otra variable que puede afectar a la viabilidad, la osmolaridad. Si es demasiado elevada puede ser nociva para las células al inducir la deshidratación celular, por esta razón se midió la osmolaridad de cada una de las soluciones utilizadas como tratamiento. Luh y cols. en 1996 estudiaron los efectos de medios de osmolaridad creciente sobre células endoteliales *in vitro*, y determinaron que toleran la hiperosmolaridad del medio hasta 460 mOsm/litro sin disminución de la viabilidad celular.(33) La tolerancia de los fibroblastos podría ser algo diferente, pero no se encontró un estudio similar con fibroblastos en la bibliografía, por lo que se tomó este valor como referencia.

Uno de los objetivos del trabajo era determinar la DL50 del AG en estas condiciones (tamponado y aplicado durante 30 minutos). Además, según la intensidad del tratamiento deseada, el AG se utiliza en concentraciones que oscilan entre 20% y 70%, es decir entre 2,6 y 9,2 M, mucho superiores a las testadas en los experimentos realizados. Sin embargo, no se testaron concentraciones más altas de 200 mM intencionadamente, pues a dicha concentración la osmolaridad ya es demasiado elevada (aprox. 620 mosm/Kg). Por lo tanto, no pudo llevarse a cabo la determinación al haber un factor, la hiperosmolaridad, que podía influir en los resultados y cuyo efecto no se estaba controlando.

Los resultados obtenidos (figura 9) parecen indicar que el efecto tóxico descrito en la bibliografía del AG sobre los fibroblastos es, en esencia, debido a la acidez y la hiperosmolaridad. Por lo que se llevaron a cabo dos experimentos para estudiar el efecto de estos factores independientemente.

Por un lado, se testaron soluciones de la misma concentración (50 mM) a distintos pHs tanto de AG como de ATC durante 30 minutos pudiendo comparar los efectos sobre la viabilidad de los fibroblastos de ambos ácidos en estas condiciones.

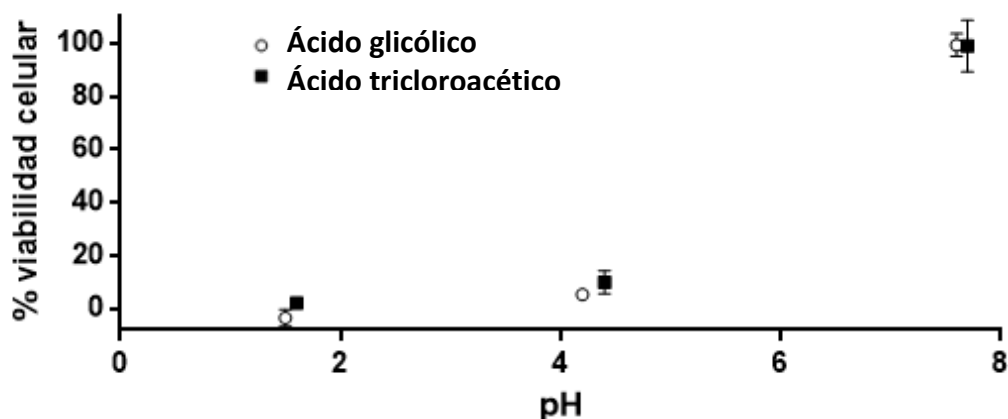


Fig.10. Efecto del pH sobre la viabilidad en fibroblastos humanos tratados con ácido glicólico y ácido tricloroacético. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=16 por grupo).

Como se puede ver en la figura 10, en las condiciones del experimento, las soluciones tamponadas en torno a pH 7 apenas tienen efecto, mientras que la viabilidad desciende pronunciadamente cuando se tratan las células con las soluciones de mayor acidez hasta llegar a una viabilidad de en torno al 0% con las soluciones de pH 1. Además, a ningún pH se observan diferencias significativas entre ambos ácidos, por lo que ambas sustancias tienen un efecto similar sobre la viabilidad de los fibroblastos.

Vemos que el pH de la solución utilizada tiene una gran importancia en el efecto del AG sobre la viabilidad celular de un cultivo de fibroblastos humanos. Esta observación concuerda con las realizadas previamente por distintos autores: los resultados obtenidos por Becker y cols. en 1996 sugieren que una solución de AG 70% de pH bajo causa mayor daño tisular que una solución de AG 70% de pH mayor o parcialmente tamponada, Hood y cols. en 1999 en sus experimentos con cobayas sin pelo observaron que al aplicar una solución de pH 3 con y sin AG se daba un efecto similar y que por tanto el pH ácido es importante para mejorar la descamación del estrato córneo que se produce con el uso de AHAs.(11, 34)

Por otro lado, se testaron soluciones de glucosa (una sustancia no tóxica para los fibroblastos) de distintas concentraciones de forma que la osmolaridad fuese muy cercana a las de las soluciones de AG testadas previamente (figura 9).

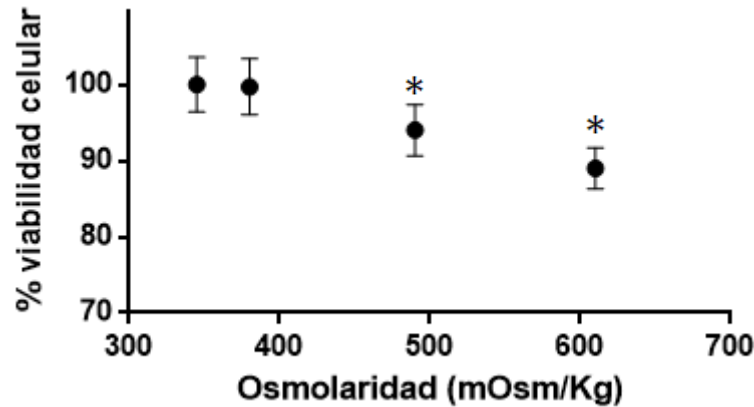


Fig.11. Efecto de la osmolaridad sobre la viabilidad celular de un cultivo de fibroblastos humanos tratados con glucosa. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=16 por grupo). Un asterisco () indica la existencia de diferencias significativas respecto al control (osmolaridad≈350 mOsm/Kg) con un nivel de significación de 0,05.*

El efecto de la osmolaridad sobre la viabilidad de los fibroblastos (figura 11) es muy similar al provocado por el AG tamponado (figura 9). A la dosis más baja de glucosa no hay diferencias significativas respecto al control, sin embargo a las dosis más altas testadas, en las cuales la osmolaridad es mayor (490 y 620 mOsm/Kg), sí que hay diferencias significativas: conforme aumenta la osmolaridad disminuye ligeramente la viabilidad celular del cultivo de fibroblastos. Al igual que ocurría con las células endoteliales, en el estudio realizado por Luh y cols. en 1996, cuando se utilizaban medios de osmolaridades superiores a 460 mOsm/litro.(33)

Estos resultados parecen indicar que el efecto del AG sobre la viabilidad celular observado en la figura 9, es únicamente debido a la hiperosmolaridad del medio, que disminuye la viabilidad celular al inducir su deshidratación.

Como se ha comentado en la introducción, muchos autores consideran el AG uno de los mejores candidatos para los peelings químicos. Sin embargo, basándonos en los experimentos realizados en este trabajo, no podemos diferenciar, para un tratamiento de 30 minutos, el efecto del AG sobre la viabilidad de los fibroblastos respecto al de soluciones de otros compuestos que proporcionen una acidez u osmolaridad similar.

Ácido glicólico y quercetina

En base a lo encontrado en la literatura sobre el efecto senolítico de la quercetina, resulta interesante proponer un nuevo sistema de peeling que combine AG y quercetina y estudiar su efecto sobre fibroblastos humanos en cultivo ya que podría tratarse de un tratamiento más selectivo que actuara preferentemente sobre las células senescentes.

En primer lugar se realizaron ensayos de viabilidad celular alamarBlue tras tratar las células durante 30 minutos con AG parcialmente tamponado ($\text{pH}\approx 6$) a concentración 200 mM y concentraciones crecientes de quercetina, obteniéndose los siguientes resultados.

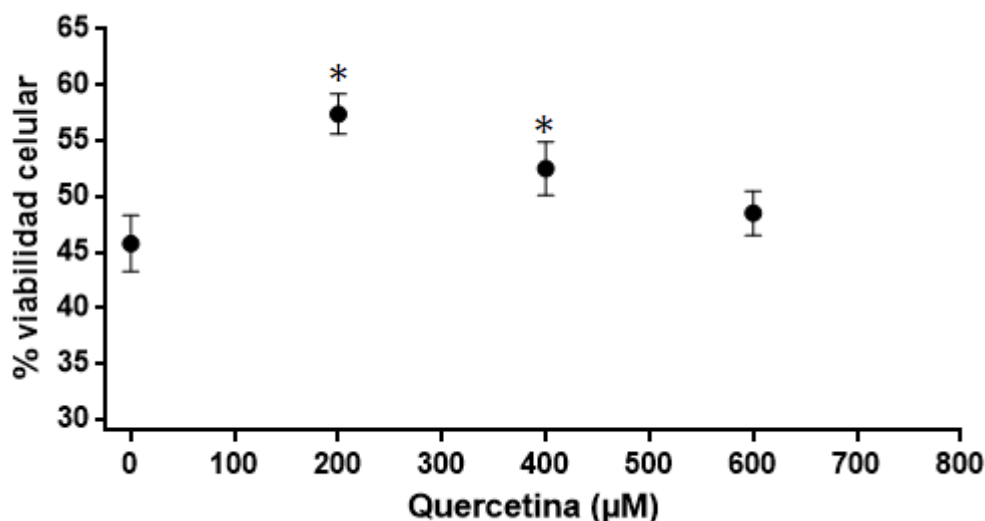


Fig.12. Efecto de la de la quercetina sobre la viabilidad celular de un cultivo de fibroblastos humanos tratados con ácido glicólico 200 mM parcialmente tamponado ($\text{pH}\approx 6$). Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n=16$ por grupo). Un asterisco () indica la existencia de diferencias significativas respecto al control ($[\text{ácido glicólico}]=200 \text{ mM}$, $[\text{quercetina}]=0$) con un nivel de significación de 0,05.*

Se utilizó AG parcialmente tamponado con un pH intermedio entre 4 y 7, testados previamente (figura 10) con el objetivo de encontrar un tratamiento que supusiera un fuerte estrés para las células sin matar a un porcentaje tan alto como lo hacían las soluciones de pH cercano a 4. Se obtuvo el efecto deseado observándose una viabilidad celular de en torno al 45% tras el tratamiento con AG parcialmente tamponado (figura 12).

En cuanto a la quercetina, debido a sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales y antioxidantes, numerosos autores han estudiado sus numerosos efectos farmacológicos: reducir la oxidación y generación de radicales libres, disminuir el riesgo cardiovascular, obtener beneficios dermatológicos, hematológicos, ópticos... (35) Sin embargo, lo que se busca en este trabajo es estudiar su posible aplicación como peeling por lo que interesa testar dosis que tengan un efecto tóxico sobre los fibroblastos.

No se encontró ninguna referencia bibliográfica sobre la utilización de dosis tóxicas de quercetina en fibroblastos, pero sí trabajos de diversos autores que la han utilizado como protector a dosis más bajas. Cabe destacar el estudio realizado por Maramaldi y cols. en 2016, en el que se evaluó la capacidad de la quercetina para reducir el daño inducido en la piel por diferentes estímulos, incluyendo el contacto con AG. Sus resultados mostraron que el tratamiento con quercetina 1% crema 2 mg/cm^2 era capaz de reducir el enrojecimiento, picazón e inflamación de la piel dañada previamente por contacto con AG, además de ayudar a restaurar la función de barrera cutánea, aumentar la hidratación y reducir la pérdida de agua. (36)

Finalmente, con el objetivo de observar posibles diferencias entre el efecto producido por el AG independientemente, y por el nuevo sistema de peeling propuesto se analizó por citometría de imagen el tipo de muerte celular inducida en cada caso.

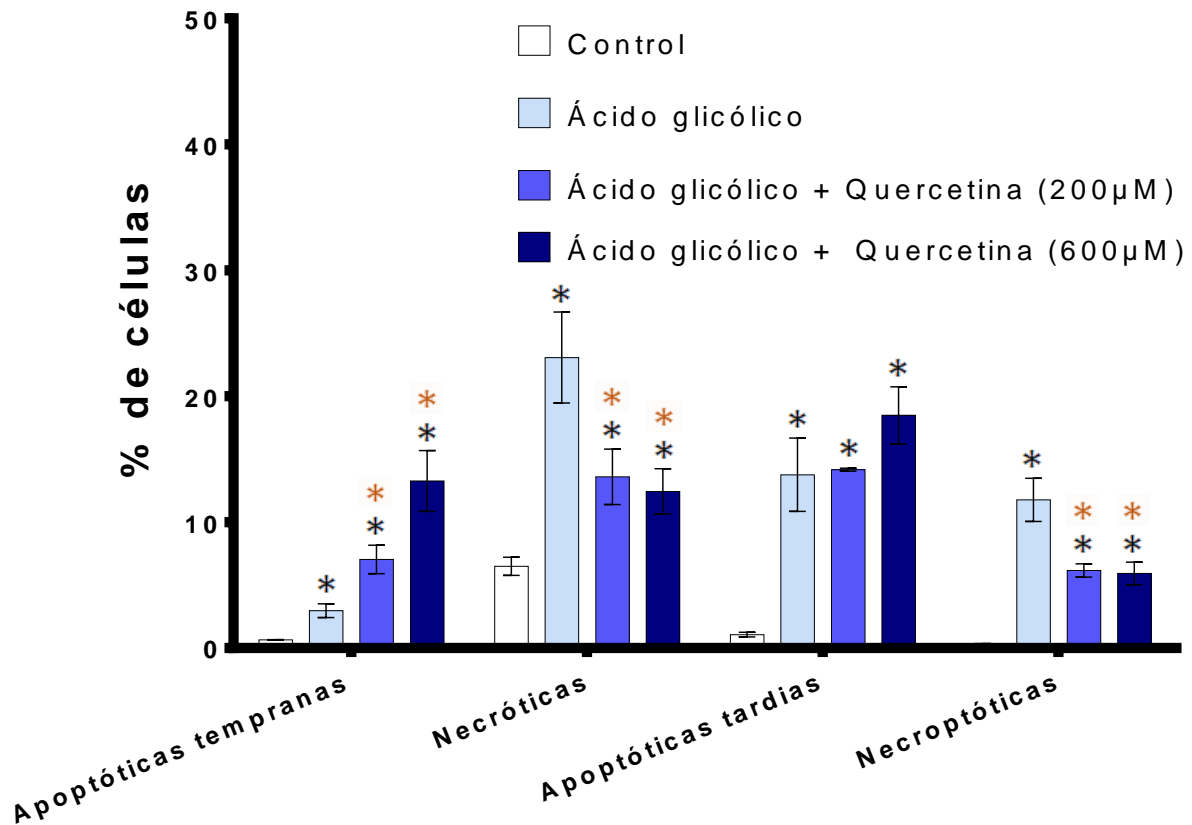


Fig.13. Tipos de muerte celular inducida por el ácido glicólico parcialmente tamponado (pH≈6) y la quercetina sobre cultivo de fibroblastos humanos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3 por grupo). Un asterisco negro () indica la existencia de diferencias significativas respecto al control con un nivel de significación de 0,05. Un asterisco rojo (*) indica la existencia de diferencias significativas respecto al tratamiento con ácido glicólico con un nivel de significación de 0,05.*

Los resultados obtenidos por citometría (figura 13) indican que el tratamiento de AG parcialmente tamponado mata esencialmente por necrosis, como cabía esperar pues el pH ácido desnatura las proteínas de membrana, se desestabilizan las membranas y las células mueren por necrosis. Al complementar el tratamiento con altas dosis de quercetina aumenta significativamente el porcentaje de células apoptóticas tempranas y disminuyen los de células necróticas y necroptóticas. El aumento de células apoptóticas tempranas sugiere que la quercetina a altas dosis podría activar alguna ruta de las caspasas que desencadenan la apoptosis. En cuanto a la disminución de células necróticas y necroptóticas, así como el aumento de viabilidad celular observado para el tratamiento de AG + quercetina (200 µM) en la figura 12, podrían explicarse por el efecto protector de la quercetina descrito en la literatura, aunque, como ya se ha comentado, en este trabajo se han utilizado dosis tóxicas, no como en los estudios en los que se ha observado dicho efecto protector.

Hemos visto que un tratamiento combinado de AG y quercetina tiene un efecto notablemente diferente sobre fibroblastos en cultivo, tanto sobre la viabilidad celular como sobre el tipo de muerte inducida, al de un tratamiento con sólo AG. Sin embargo, habría que continuar investigando para comprobar si la quercetina tendría en estos tratamientos mixtos la actividad senolítica que se le atribuye en la literatura, y si por lo tanto, el nuevo sistema de peeling propuesto podría ser una mejor opción que los tratamientos actuales, al actuar sobre las células senescentes y conservando las jóvenes.

CONCLUSIONES

1. La capacidad de los tratamientos de AG para promover la exfoliación cutánea es debida principalmente a la gran acidez y la elevada presión osmótica de las soluciones empleadas.
2. No existe una dosis letal 50 (DL50) del AG tamponado sobre cultivo de fibroblastos humanos para un tratamiento de 30 minutos, pues no se observa mortalidad hasta que las concentraciones son tan elevadas que tienen un efecto tóxico por hiperosmolaridad.
3. Un tratamiento de 30 minutos con AG parcialmente tamponado ($\text{pH}\approx 6$) descende la viabilidad celular de un cultivo de fibroblastos humanos en torno al 45%. Al añadir al tratamiento quercetina a concentración 200 μM , se reduce la mortalidad (viabilidad en torno al 58%). Sin embargo, al aumentar la dosis de quercetina a 400 y 600 μM la mortalidad vuelve a ascender.
4. El principal tipo de muerte celular que induce el AG parcialmente tamponado ($\text{pH}\approx 6$) sobre los fibroblastos humanos en cultivo es la necrosis. Al combinar el tratamiento de AG con altas dosis de quercetina (200-600 μM) disminuye significativamente el porcentaje de células necróticas y aumenta de forma dosis dependiente el porcentaje de células apoptóticas tempranas.
5. Los resultados obtenidos sugieren que la utilización mixta de AG, como estresante celular, y quercetina, como agente senolítico, podría ser una mejor opción que los tratamientos actuales, pero habría que continuar investigando para comprobarlo.

CONCLUSIONS

1. The ability of GA treatments to promote cutaneous exfoliation is due mainly to the great acidity and elevated osmotic pressure of the used solutions.
2. There exists no median lethal dose (LD50) of neutralised GA on the human fibroblasts in culture for a 30 minute treatment, as no mortality is observed until the concentration used is high and has a toxic effect by hyperosmolarity.
3. A 30 minute treatment with partially neutralised GA (pH \approx 6) decreases cellular viability on a human fibroblast culture to approximately 45%. When quercetin is added to the treatment at a concentration of 200 μ M, mortality drops (the viability is approximately 58%). However, when quercetin concentration is increased to 400 and 600 μ M mortality rises again.
4. The main type of cellular death induced by partially neutralised GA (pH \approx 6) upon human fibroblasts is necrosis. When GA treatment is combined with high concentrations of quercetin (200-600 μ M), the percentage of necrotic cells drops significantly, whereas the percentage of early apoptotic cells increases in a dose-dependent manner.
5. The results obtained suggest that the combined use of AG, as a cellular stress factor, and quercetin, as a senolytic agent, may be a better option than current treatments, but further research is necessary to reach a conclusion.

BIBLIOGRAFÍA

Recursos bibliográficos

Ha sido fundamental para el trabajo realizar una revisión bibliográfica. La mayoría de referencias corresponden a publicaciones buscadas en la base de datos PubMed, también cabe destacar la base de datos PubChem. Se han revisado especialmente las publicaciones más recientes para conocer el estado actual del tema de investigación. Para citar en el texto las referencias se ha utilizado el gestor bibliográfico EndNote.

Referencias bibliográficas

1. McGrath J, Uitto, J. Structure and Function of the Skin. Rook's Textbook of Dermatology. 1. 9 ed. West Sussex: Wiley Blackwell; 2016. p. 2.
2. Wolff K, Goldsmith, L., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A., Leffell, D. Fitzpatrick Dermatología en medicina general. 1. 7 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. p. 57-66, 387.
3. Jackson A. Chemical peels. Facial plastic surgery : FPS. 2014;30(1):26-34.
4. Grajčevci-Kotori M, Kocinaj A. Exfoliative Skin-peeling, Benefits from This Procedure and Our Experience. Medical archives. 2015;69(6):414-6.
5. Landau M. Chemical peels. Clinics in dermatology. 2008;26(2):200-8.
6. Glycolic acid: PubChem Compound Database. National Center for Biotechnology Information; [cited 2017]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/757>.
7. 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.
8. Sharad J. Glycolic acid peel therapy - a current review. Clinical, cosmetic and investigational dermatology. 2013;6(1):281-8.
9. Ramos-e-Silva M, de Castro MC, da Silva Carneiro SC, Lambert WC. Alpha-hydroxy acids: unapproved uses or indications. Skinmed. 2004;3(3):141-8.
10. Marín D, Del Pozo, A. Fototipos cutáneos. Conceptos generales. Offarm. 2005;24:136-7.
11. 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.
12. 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.
13. Van Scott EJ, Yu RJ. Control of keratinization with alpha-hydroxy acids and related compounds. I. Topical treatment of ichthyotic disorders. Archives of dermatology. 1974;110(4):586-90.
14. Van Scott EJ, Yu RJ. Hyperkeratinization, corneocyte cohesion, and alpha hydroxy acids. Journal of the American Academy of Dermatology. 1984;11(5 Pt 1):867-79.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

18. 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.
19. Park KS, Kim HJ, Kim EJ, Nam KT, Oh JH, Song CW, et al. Effect of glycolic acid on UVB-induced skin damage and inflammation in guinea pigs. *Skin pharmacology and applied skin physiology*. 2002;15(4):236-45.
20. 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.
21. Okano Y, Abe Y, Masaki H, Santhanam U, Ichihashi M, Funasaka Y. Biological effects of glycolic acid on dermal matrix metabolism mediated by dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Experimental dermatology*. 2003;12 Suppl 2:57-63.
22. 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.
23. Quercetin: PubChem Compound Database. National Center for Biotechnology Information; [cited 2017]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>.
24. Mlcek J, Jurikova T, Skrovankova S, Sochor J. Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. *Molecules*. 2016;21(5).
25. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*. 2016;8(3):167.
26. Zhu Y, Tchkonina 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.
27. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging cell*. 2016;15(3):428-35.
28. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009;16(1):3-11.
29. 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.
30. Dinh CT, Goncalves S, Bas E, Van De Water TR, Zine A. Molecular regulation of auditory hair cell death and approaches to protect sensory receptor cells and/or stimulate repair following acoustic trauma. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:96.
31. Basiji DA, Ortyn WE, Liang L, Venkatachalam V, Morrissey P. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clinics in laboratory medicine*. 2007;27(3):653-70, viii.
32. Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2015;71:1-7.
33. Luh EH, Shackford SR, Shatos MA, Pietropaoli JA. The effects of hyperosmolarity on the viability and function of endothelial cells. *The Journal of surgical research*. 1996;60(1):122-8.
34. Hood HL, Kraeling ME, Robl MG, Bronaugh RL. The effects of an alpha hydroxy acid (glycolic acid) on hairless guinea pig skin permeability. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1999;37(11):1105-11.
35. Casanova A. Estudio del efecto de la radiación ultravioleta sobre fibroblastos y su protección por quercetina: Universidad de Zaragoza; 2015.
36. Maramaldi G, Togni S, Pagin I, Giacomelli L, Cattaneo R, Eggenhoffner R, et al. Soothing and anti-itch effect of quercetin phytosome in human subjects: a single-blind study. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2016;9:55-62.