



Universidad
Zaragoza

Estudio del mecanismo de protección antitóxico de la quercetina

Trabajo de Fin de Grado

Cristina Cardenal Peralta

Curso 2016-2017

Directora: Dra. Pereboom Maicas

Director: Dr. Alda Torrubia



Departamento de
Farmacología y Fisiología
Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	
1.1 Precedentes	3
1.2 Naturaleza y propiedades químicas	3
1.2.1 Propiedades ácido base	4
1.3 Papel biológico	4
1.4 Propiedades	4 y 5
1.5 Efecto antioxidativo y antiinflamatorio	5
1.5.1 Incremento de los niveles de VEGF y TGF- β 1	5
1.5.2 Disminución de la expresión de ICAM-1	5
1.5.3 Inducción de metaloproteinasa -1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	6
1.5.4 Inhibición de la expresión de moléculas de adhesión inducidas por LPS	6
1.5.5 Efectos del pre y post tratamiento con quercetina	6
1.5.6 Efectos de la quercetina en la expresión enzimática de fase II	6 y 7
1.6 Efecto prooxidativo y proapoptótico, papel de la quercetina como anticancerígeno	7 y 8
1.6.1 Regulación transcripcional en el cáncer	8 y 9
1.7 Tipos de muerte celular	9
1.7.1 Apoptosis	9 y 10
1.7.2 Necrosis	10
1.7.3 Necroptosis	11
1.8 Utilización actual y forma de administración	11 y 12
2. Planteamiento	13
3. Objetivos	13
4. Materiales y Métodos	15
4.1 Materiales	15
4.1.1 Reactivos	15
4.1.2 Equipos	15
4.1.3 Material Fungible	16
4.2 Métodos	16
4.2.1 Mantenimiento de los cultivos	16
4.2.2 Medida de la viabilidad	16
4.2.2.1 Tratamiento con Alamar Blue	16 y 17
4.2.2.2 Medida con citometría de flujo	17
4.2.3 Contaje de células	18

5. Resultados y Discusión	19
5.1 Medidas de viabilidad Alamar Blue	19
5.1.1 Tratamiento con 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M	19
5.1.2 Tratamiento con 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M y 100 μ M	20
5.1.3 IC50, tratamiento con 400 μ M, 600 μ M, 800 μ M y 1000 μ M	20 y 21
5.2 Medida de la proliferación	21 y 22
5.3 Medida de la viabilidad con citómetro de imagen	22
5.3.1 Control	22
5.3.2 Tratamiento con 800 μ M de quercetina	22 y 23
5.3.3 Tratamiento con 1000 μ M de quercetina	23 y 24
5.3.4 Comparativa del aumento de muerte celular	24
6. Conclusiones	25
7. Bibliografía	27 y 28
8. Anexos	29, 30, 31 y 32

RESUMEN

La quercetina es un flavonoide con un gran efecto antioxidante y antiinflamatorio, por lo que se ha propuesto como tratamiento para gran cantidad de dolencias relacionadas con el estrés oxidativo y fenómenos inflamatorios. Ésta molécula presenta una doble actividad: es capaz de provocar la muerte de células senescentes mientras que protege e incluso parece que estimula la proliferación de las células sanas.

El órgano que más expuesto se ve a radicales libres y moléculas dañinas es la piel, y por ello nuestro modelo de estudio son fibroblastos humanos procedentes muestras de piel. Estas células se tratan con concentraciones crecientes de quercetina a 24 horas de exposición y se evalúa si realmente existe efecto proliferativo a concentraciones bajas. Además se precisa el IC50 de la molécula mediante la determinación con Alamar Blue®, analizando las distintas poblaciones que se dan en cuanto a muerte celular mediante citometría de imagen tras la exposición a concentraciones de 800 μM y 1000 μM de quercetina.

Los resultados obtenidos muestran que la quercetina tiene su máximo efecto proliferativo a una concentración de 5 μM y su IC50 es de aproximadamente 800 μM , mostrando un aumento de células apoptóticas (35,5% de aumento en cuanto células apoptóticas tempranas).

Palabras clave: quercetina, fibroblastos humanos, muerte celular, Alamar Blue®, proliferación celular y citometría de imagen.

ABSTRACT:

Quercetin is a flavonoid with an extraordinary antioxidant and antiinflammatory activity that has been proposed as a treatment for many inflammatory diseases. This molecule has two differential activities as it provokes the cell death of senescent cells whereas protects and stimulates the growth of the healthy ones. The most exposed organ to free radicals and harmful chemicals of the human body is the skin, therefore our experiments use human skin fibroblast cells.

These cells are to be treated with growing doses of quercetin, measuring the effect after 24 hours of exposure. Low-dose dependant growth effect will be tested and IC50 will be determined using Alamar Blue® test. In addition, cell population after 800 μM and 1000 μM quercetin exposure will be analyzed with an image cytometer.

Quercetin shows maximum growth effect when applied in a 5 μM dose and its IC50 is 800 μM , with an increase of the early apoptotic population (35,5%) compared to that in the non-treated cells.

Key words: quercetin, human skin fibroblasts, cell death, Alamar Blue®, cell growth and image cytometry.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Precedentes:

La quercetina es una molécula perteneciente a la familia de los flavonoides. Suponen la mayor parte de la producción del metabolismo secundario de compuestos fenólicos en el reino vegetal, siendo la quercetina en forma glicosilada (rutina) el compuesto mayoritario de dicha producción [1].

Fue descubierta por J.Rigaud en 1854, sin embargo se tiene constancia de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los flavonoides desde hace mucho más tiempo. El germoplasma de la mayoría de las frutas, entre las que destacan las frambuesas, los frutos rojos y otras plantas como la cebolla, también productos manufacturados como el vino y el té contienen gran cantidad de flavonoides cuyo contenido en quercetina es mayoritario.

Se estima que el consumo diario humano en flavonoides es de 20 a 70 mg (suponiendo la quercetina 16 mg en algunos casos), llegando a ser de hasta 500 mg en aquellas personas cuya alimentación está basada principalmente en frutas y té [2].

1.2 Naturaleza y propiedades químicas:

La quercetina es un compuesto de bajo peso molecular que comparte un esqueleto común de difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (fig. 1). Su actividad como antioxidante depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química.

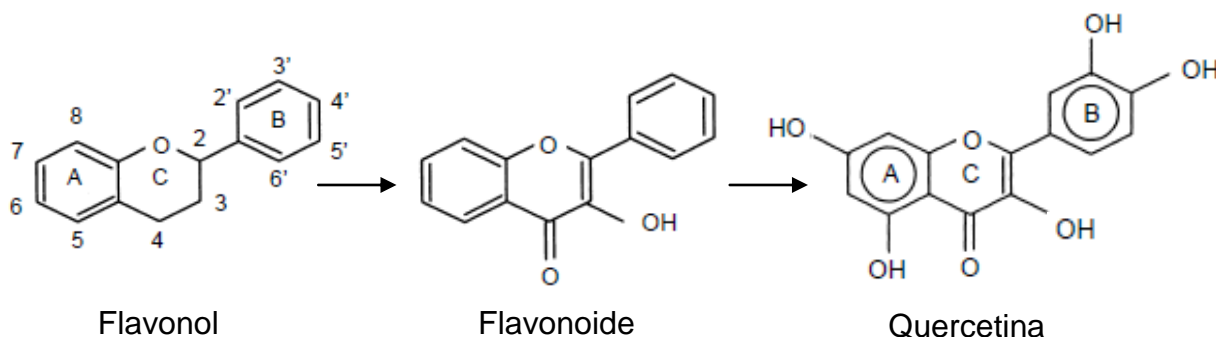


Figura 1: esqueleto y fórmula química de flavonoles, flavonoides y quercetina.

Los flavonoides deben cumplir tres requisitos estructurales para poder llevar a cabo su función de manera óptima y la quercetina los cumple todos:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi.
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3.
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5.

1.2.1 Propiedades ácido-base:

Los flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7. Estas propiedades ácido-base explican la poca disponibilidad que tiene la quercetina en medio acuoso. Su carga negativa a pH fisiológico impide el paso a través de las membranas plasmáticas. Por otra parte, esta misma membrana posee cargas negativas debidas a los fosfolípidos que contiene, lo que supone un impedimento adicional en el paso de quercetina a través de membrana [3].

1.3 Papel biológico:

La quercetina tiene muchas funciones en la bioquímica, fisiología y ecología de las plantas. Su papel principal es proteger contra las radiaciones ultravioleta, de microorganismos patógenos, participa en la fertilidad y germinación del polen, en la nodulación bacteriana y en la regulación del crecimiento de la planta así como de la regulación de su actividad enzimática.

De todas estas funciones es la protección frente a los rayos UV la que más llama la atención. Esta función es debida a sus propiedades antioxidantes, tanto en eliminación activa de radicales libres y especies reactivas de oxígeno como en regulación transcripcional de genes que codifican proteínas antioxidantes. [4]

Las plantas knock-out que no poseen los genes de la ruta biosintética de la quercetina, no están protegidas frente a la radiación de los rayos UV por lo que presentan mayor producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y por tanto crecen menos que en el caso de las plantas wild-type [5].

Por otra parte, estudios en distintos organismos modelo han demostrado un aumento de la esperanza de vida al aumentar la ingesta de quercetina. En el caso de *C.elegans* se pone de manifiesto incluso en mutantes para genes implicados en la prevención oxidativa como *mev-1*, lo que evidencia su gran capacidad antioxidante.

Sin embargo, en experimentos con *Mus musculus* se observaron discrepancias en cuanto al aumento de la esperanza de vida, ya que se vieron casos positivos y otros negativos; de manera que estos estudios se calificaron como inconcluyentes. En cuanto a los efectos nocivos por alta ingesta de quercetina, no se han encontrado efectos adversos salvo una pérdida de peso leve a las 52 semanas de tratamiento [1].

1.4 Propiedades:

La quercetina tiene funciones antioxidantes y antiinflamatorias, debido a ellas se le atribuyen propiedades anticancerígenas, disminución de la incidencia de enfermedades coronarias, capacidad antidiabética, antihistamínica, antimicrobiana, antimutagénica, neuroprotectora, vasoprotectora, entre otras muchas [6].

En concreto el presente trabajo se centra en las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de la quercetina, así como el efecto que tiene en su aplicación en fibroblastos humanos procedentes de piel como modelo in vitro.

1.5 Efecto antioxidativo y antiinflamatorio:

Las propiedades intrínsecas de la molécula de quercetina vienen dadas por la presencia de grupos hidroxilo en su estructura [7]. Se ha demostrado que la quercetina inhibe la peroxidación lipídica, protegiendo a su vez la integridad de la membrana plasmática y proporcionando fluidez de la misma [8]. Otros autores alegan que las propiedades antioxidantes de la quercetina son una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres [9].

La propia estructura de la quercetina explica algunas de sus propiedades antioxidantes anteriormente mencionadas. Presenta dos sitios de quelación de metales bivalentes, el grupo 5-OH y el grupo 4-oxo [10]. Por otra parte la actividad antilipoperoxidativa se debe a la gran afinidad de sus anillos aromáticos por los compuestos lipídicos, presentando la quercetina un rendimiento del 65,6% de actividad antilipoperoxidativa en su forma cruda (sin glicosilar) [11].

A continuación se presentan los efectos relacionados con las propiedades antiinflamatorias de la quercetina relacionados con la regulación transcripcional que esta molécula es capaz de ejercer. Entre ellos se encuentran como resultado la inhibición de la expresión de enzimas relacionadas con la generación de ROS: oxidasas, lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa, evitando la generación de especies reactivas del oxígeno in vivo, así como de hidroperóxidos orgánicos [9].

1.5.1 Incremento de los niveles de VEGF y TGF- β 1:

Este estudio se realizó en ratones a los que se les habían infligido heridas de un determinado tamaño. Al aplicar quercetina se observó una disminución de las células inflamatorias, mayor proliferación de fibroblastos, mayor densidad microvascular, mayor reepitelización y más depósito de colágeno.

El mecanismo se debe a la activación del factor inducible por hipoxia HIF-1 α , que aumenta la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1). Se vio además una disminución de TNF- α por inhibición del factor de transcripción NF κ B [12].

1.5.2 Disminución de la expresión de ICAM-1:

Este experimento se llevó a cabo en líneas celulares de queratinocitos HEK y células transformadas HaCat, también en su origen queratinocitos. Con la presencia de quercetina los niveles de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, principal mediador de la inflamación cutánea) disminuyen gracias a la inhibición de la ruta de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) [13].

1.5.3 Inducción de metaloproteinasa -1 *in vitro* e *in vivo*:

La formación de una cicatriz normalmente se debe a un desequilibrio entre la producción y degradación de colágeno. Se ha demostrado que la quercetina aumenta significativamente los niveles de MMP-1 (metaloproteinasa-1). Este aumento se debe a una señal aumentada de ERK. En el año 2009 Jae-We Cho utilizó ratones alimentados con quercetina y tras una exposición a rayos ultravioleta observó que la piel de estos ratones presentaba un aumento del crecimiento de fibroblastos y un envejecimiento dérmico (photoaging) mucho menor [14].

1.5.4 Inhibición de la expresión de moléculas de adhesión inducidas por LPS:

En artículos recientes, los autores Chuan Li y colaboradores han trabajado en cultivos celulares primarios de células endoteliales aórticas humanas a las que se les añadió quercetina de manera progresiva, dilucidando algunos mecanismos de acción de la misma. La expresión endotelial de moléculas de adhesión juega un papel crítico en la iniciación y la progresión de la aterosclerosis, en la que los factores E-selectina (molécula de adhesión endotelial de leucocitos) y la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) juegan un papel importante. En este artículo se demuestra que la adición de quercetina disminuye la expresión de estos factores derivada de la presencia de LPS (lipopolisacárido de las bacterias gram negativas); además promueve la Inducción del factor eritroide relacionado-2 (Nrf-2) y la consiguiente expresión de enzimas antiinflamatorias y antioxidativas como la hemoxigenasa-1 (HO-1), NADPH deshidrogenasa, quinona-1 y la glutamato cisteína quinasa [15].

1.5.5 Efectos del pre y post tratamiento con quercetina:

Korkina et.al testaron los efectos de la aplicación de quercetina en queratinocitos (además de otros dos flavonoides, resveratrol y verbascósido) anteriores y posteriores a la irradiación por rayos ultravioleta A y B. Observaron que tratando las células antes de la irradiación, la quercetina era el único flavonoide que tenía actividad anti óxido nitroso (NO) y que el nivel de peróxidos disminuía significativamente comparados estos resultados con las células control. Sin embargo, el tratamiento previo a la exposición no reveló diferencias tan notorias en cuanto a estos niveles de producción de ROS. Esto se debe a que la quercetina estimula principalmente la fase II de la respuesta celular, llevando a una disminución de la expresión de Cyp1a1, Cyp1b1 (estas dos son predominantes de fase I) y de la ciclo-oxigenasa II (de fase II). [16]

1.5.6 Efectos de la quercetina en la expresión enzimática de fase II:

Las enzimas expresadas en la fase II de la repuesta celular llevan a cabo reacciones de conjugación necesarias para el metabolismo de algunas drogas o el metabolismo de los productos obtenidos en la fase I (estas reacciones son llevadas a cabo normalmente por citocromo oxidadasas de función mixta). En este estudio se

demuestra que tanto la expresión de glutatión-S-transferasa como de NADPH-quinona oxido-reductasa (NQO1) se ve aumentada; estas enzimas pueden incrementar el ratio de excreción de xenobióticos en células adultas [17].

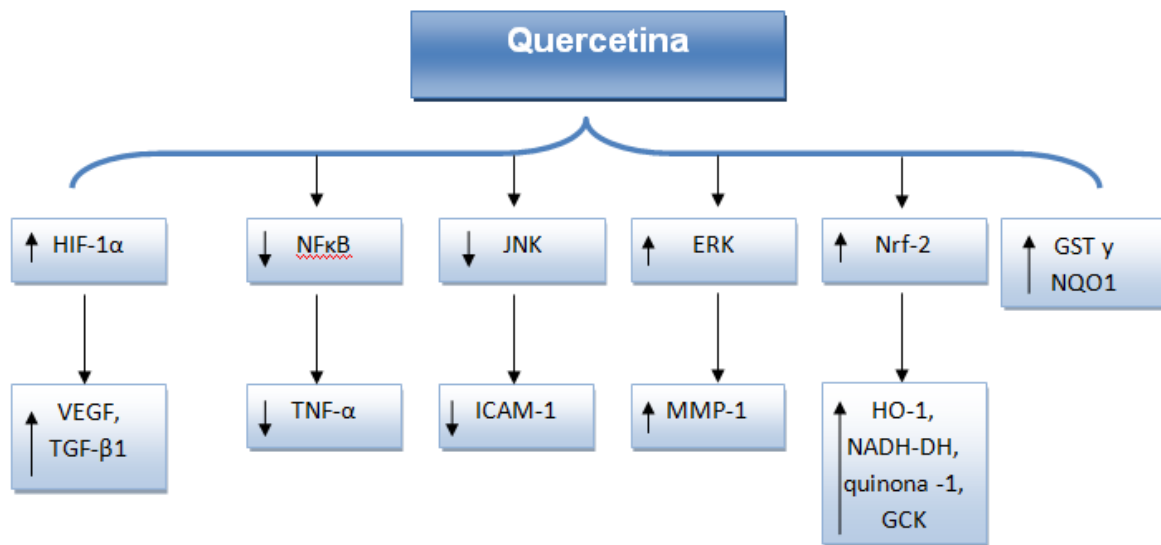


Figura 2: resumen de las rutas reguladas por la quercetina, efectos antiinflamatorios y antioxidativos.

1.6 Efecto prooxidativo y proapoptótico, papel de la quercetina como anticancerígeno:

La quercetina tiene un papel importante como anticancerígeno por su actividad pro-oxidante de las células tumorales. Esta actividad se contrapone a las explicadas anteriormente, sin embargo se tiene conocimiento de algunos de los mecanismos pro-oxidativos per se de la molécula como de la regulación transcripcional que es capaz de llevar a cabo en células cancerosas, siendo esta última regulación mucho más importante y en la que nos centraremos.

Tal y como exponen Foti y colaboradores, la actividad pro-oxidativa de la quercetina depende de la concentración a la que es aplicada a las células cancerosas; las concentraciones necesarias para llevar a la apoptosis a estas células son mucho mayores, aunque se ha conseguido minimizar con el uso de derivados de quercetina, que tienen actividad apoptótica de células cancerosas a las mismas concentraciones en las que disminuyen la cantidad de agentes ROS en células normales [18].

Sin embargo, aunque se conozca que la quercetina por sí misma tiene actividad anticarcinogénica por la generación de ROS (generados en la reacción de Fenton mayoritariamente) [11], no se conocen todavía con detalle las vías transcripcionales que activa la quercetina, aunque algunas se están empezando a dilucidar. Liu y colaboradores investigaron la potencial importancia de la inducción por quercetina del gen p53-inducible (PIG-3), una NADPH-quinona oxidoreductasa, en células HepG2 de hepatoma. Los resultados muestran que la quercetina inhibe el crecimiento de estas células de manera dependiente de la dosis y el tiempo, e

induce cambios característicos de la apoptosis. Estos mismos autores encontraron niveles de ROS muy altos (debido a la expresión de la enzima anteriormente mencionada, entre otras) y de potencial de membrana mitocondrial bajos; por otra parte se regula positivamente el ratio Bax/Bcl-2, lo que activa las caspasas-9 y 3, llevando a la apoptosis celular intrínseca [19]. Por el contrario Chen y colaboradores dos años antes de la publicación del artículo anterior, no relacionan la activación de las caspasas-9 y 3 con el ratio Bax/Bcl-2 en las células epidérmicas de carcinoma KB [20].

1.6.1 Regulación transcripcional en el cáncer:

La quercetina se ha propuesto como un tratamiento adicional y complementario a los actuales tratamientos quimioterápicos. Diversos artículos ponen de manifiesto sus actividades antineoplásicas, centrándose en el cáncer de piel. Zigang y colaboradores demostraron que la quercetina inhibe la transformación neoplásica casi por completo a concentraciones mayores de 20 µg/mL, de las células JB6. La transformación neoplásica de estas células viene dada por la expresión de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), siendo la expresión de AP-1 y NF-κB inducida por la presencia de TPA (activándolas por fosforilación). La quercetina inhibe la transactivación mediada por TPA de AP-1 y NF-κB, dando como resultado la inhibición de la transformación cancerosa de estas células.

Estos mismos autores han demostrado que la quercetina es capaz de inhibir la transactivación, también mediada por TPA, de la ruta de las MAP quinasas (MAPK), disminuyendo la expresión de las rutas ERK y JNK. También inhibe la expresión de la ruta MEK/ERK, impidiendo la activación de AP-1 y NF-κB [21].

Por otra parte, Agarwal et.al definen la quercetina como un agente preventivo del cáncer de piel y ponen de manifiesto su actividad contra señales mitogénicas y reguladoras del ciclo celular. En este artículo se analiza el efecto de la quercetina sobre la ruta erbB1-Shc-ERK1/2, conocida por ser una ruta mitogénica en las células de carcinoma epidérmico A431. Una de las causas por las que esta ruta se ve promovida es por la secreción del ligando del factor EGF (factor de crecimiento epitelial). Al adicionar la quercetina la señalización de esta ruta se ve disminuida, no así la presencia de erbB1, dando a entender que esta disminución se da por la incapacidad de estas dos moléculas de acoplarse y transactivarse [22].

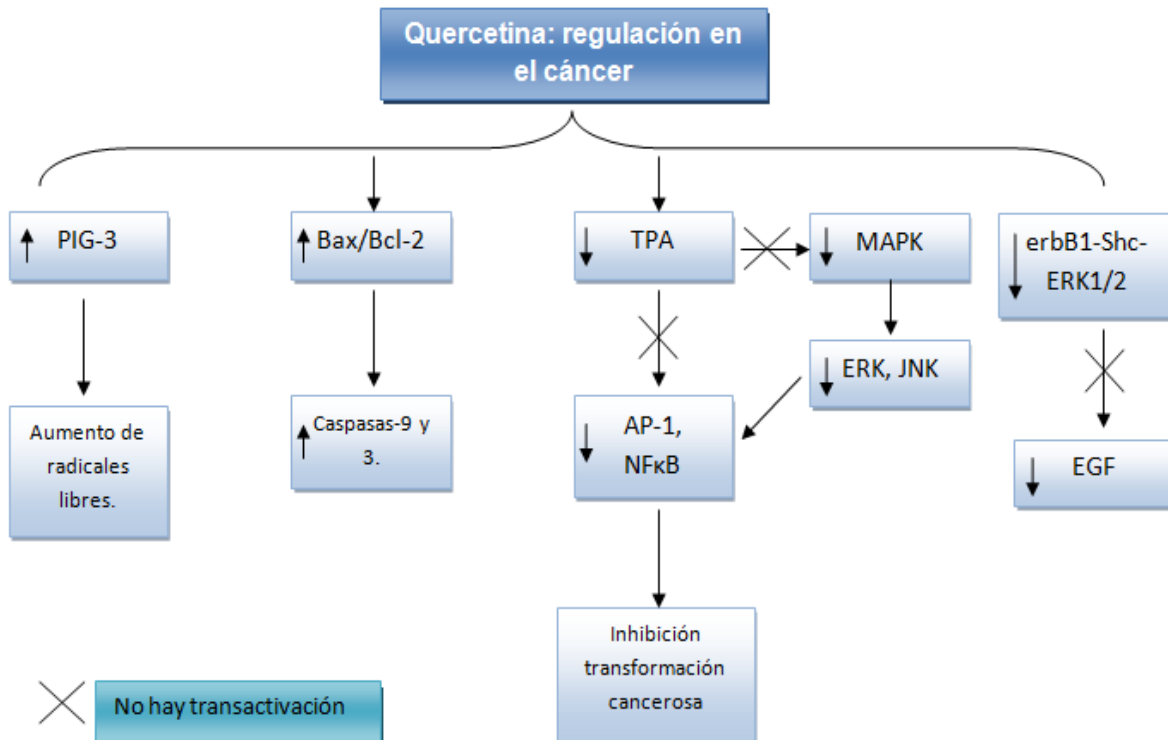


Figura 3: resumen de las rutas reguladas por la queretina en el cáncer.

1.7 Tipos de muerte celular:

Los tipos de muerte celular han sido definidos por el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) e incluyen 12 tipos distintos de muerte celular. La importancia de definir el tipo de muerte que provoca un compuesto está en saber si esa vía es reversible o no y sobre todo para llegar a un consenso de toda la comunidad científica en la manera de denominar estos fenómenos. Cabe destacar que todos estos procesos pueden agruparse en dos grandes grupos: muerte dependiente de caspasas y muerte independiente de caspasas. Aunque haya definidos 12 tipos en el presente trabajo describiremos 4 de ellos: apoptosis (intrínseca y extrínseca), necrosis y necroptosis [23].

1.7.1 Apoptosis:

La apoptosis es un proceso activo en el cual se produce la proteólisis de gran cantidad de proteínas y la escisión del DNA cromosómico. El núcleo se disgrega en pequeños fragmentos, la célula se encoge y se generan unos fragmentos envueltos de membrana denominados cuerpos apoptóticos. Varios genes reguladores de la apoptosis han sido encontrados: ced-3 y ced-4 son genes proapoptóticos, mientras que ced-9 es un gen inhibidor de la apoptosis. Ced-3 codifica para la única caspasa de *C.elegans*, la proteasa encargada de llevar a cabo la disgregación de más de 100 proteínas; en mamíferos se han descrito por lo menos 7. De igual manera, la traslocación de la fosfatidilserina (señal característica de la apoptosis) es

dependiente de caspasas, aunque no se han identificado todavía las dianas de las caspasas que provocan esta traslocación [24].

Apoptosis extrínseca: este término se emplea para aquella muerte mediada por apoptosis en la que las señales son de origen extracelular. Estas señales son detectadas por la célula como señales de estrés y se propagan por la célula vía receptores específicos de membrana. Esta vía puede comenzar por la unión de varios ligandos como FAS/CD95L, factor de necrosis tumoral (TNF α) y la superfamilia TNF ligando. Esta vía es dependiente de caspasas y por ello podría ser suprimida (teóricamente) por inhibidores de la apoptosis como N-bencilloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-fmk) o por la sobreexpresión de inhibidores virales de las caspasas como el modificador de la respuesta a citoquinas A (CrmA).

Apoptosis intrínseca: esta vía de apoptosis puede ser desencadenada por multitud de estreses intracelulares (daño en el DNA, estrés oxidativo, exceso de calcio intracelular...). Sin embargo aunque estas señales sean variadas, todas parecen estar dirigidas hacia un mecanismo de control mitocondrial. La permeabilización mitocondrial (MOMP) puede comenzar en la membrana externa de la mitocondria gracias a la actividad de las proteínas tipo BCL-2, proapoptóticas, o bien con la formación del complejo permeable de transición (PTPC). Independientemente de qué vía se active, MOMP va seguido de las siguientes consecuencias irreversibles: disipación del potencial de membrana mitocondrial (con la consecuente interrupción de la producción de ATP y transporte mediado por diferencia de potencial), liberación de proteínas tóxicas de la membrana interna mitocondrial al citosol; como el factor inductor de la apoptosis (AIF) entre otros, y la inhibición de la cadena transportadora de electrones.

Cabe destacar que la apoptosis intrínseca puede estar mediada o no por caspasas. Esta clasificación se basa en la capacidad o no de citoprotección que confieren algunos agentes antiapoptóticos cuya actividad es la inhibición de caspasas. Se ha demostrado que la vía dependiente de caspasas es más importante in vivo y que in vitro estos compuestos apenas hacen efecto porque la ruta mayoritaria es la independiente de caspasas [23].

1.7.2 Necrosis:

Este tipo de muerte se caracteriza morfológicamente por una ganancia de volumen celular, orgánulos hinchados, ruptura de la membrana celular y la consiguiente pérdida de componentes intracelulares. Durante mucho tiempo la necrosis se consideró una forma incontrolada de muerte celular, originada normalmente por una lesión aguda [24]. Sin embargo hay evidencias de que la ejecución de este tipo de muerte celular puede llevar en realidad una regulación mediada por señales de transducción [25]. Cuando las caspasas son inhibidas por manipulación genética o bien bloqueadas por agentes químicos, no se degradan los factores de la familia RIP y llevan a la muerte por necrosis de las células.

1.7.3 Necroptosis:

Este término ha sido utilizado recientemente como sinónimo de necrosis regulada, pero se introdujo inicialmente para indicar un tipo de necrosis regulada específica, iniciada por la ligación de TNFR1 y que puede ser inhibida mediante el uso de un fármaco que tiene como diana la proteína RIP-1. El NCCD anima a los científicos a no utilizar este término, a no ser que se especifique que se refiere a la ruta regulada por RIP-1 [23].

Estos tipos de muerte celular pueden ser medidos en el citómetro mediante el uso de colorantes específicos. En nuestro caso haremos uso de la anexina V y el yoduro de propidio. La anexina V es capaz de unirse a la fosfatidilserina (presente en las membranas de las células apoptóticas o accesible en caso de ruptura de la membrana) mientras que el yoduro de propidio se une al DNA de las células cuya membrana está rota [26].

1. 8 Utilización actual y forma de administración:

Aunque los polifenoles son constituyentes importantes en la dieta humana, muestran poca solubilidad en agua, resultando en una pobre viabilidad, permeabilidad y sobretodo un primer metabolismo de la molécula muy acusado antes de llegar a su diana [31] (aunque otros autores defienden que un primer metabolismo de la rutina, quercetina glicosilada, aumenta su solubilidad y es por tanto un paso necesario en la farmacocinética y farmacodinámica de la molécula) [2].

Experimentos con humanos han revelado que la quercetina se encuentra glucuronada o sulfatada principalmente tras este primer metabolismo (estos resultados se vieron tras someter a 16 pacientes a una ingesta del 0,45% en quercetina durante 6 semanas). Estudios farmacocinéticos en estos mismos pacientes demuestran que la pobre biodisponibilidad de esta molécula se debe principalmente a su pobre absorción y rápido metabolismo. Para solucionar este problema se han desarrollado sistemas de liberación lenta como emulsiones, liposomas, formulaciones de fosfolípidos, nanocristales...[31].

La administración de quercetina en nanovesículas es capaz de disminuir la permeabilidad vascular local, la pérdida epidérmica y la infiltración leucocitaria, además de incrementar la biodisponibilidad y estabilidad in vivo [27]. Un estudio similar demuestra que la aplicación de quercetina en nanovesículas lipídicas mejora la solubilidad y fluidez de la bicapa vesicular [28].

Actualmente la quercetina se aplica únicamente en ensayos clínicos como geles acuosos (también se vende en forma de pastillas) o como cremas oleosas, se suele preferir una mezcla de ambas: en el caso de las primeras la liberación de la quercetina es rápida mientras que en las segundas se crea un reservorio que se va liberando lentamente. La ventaja de realizar una mezcla de ambas formulaciones es

maximizar la liberación y captación de la molécula. Ésta necesita la presencia de una fase lipídica para maximizar la solubilidad; por otra parte la quercetina tiene cabezas polares que favorecen la presencia de agua y por tanto pueden situar a la quercetina en la interfase y maximizar su biodisponibilidad [29]. Además por razones de comodidad los pacientes prefieren emulsiones más acuosas por su fácil aplicación.

Otra posible aplicación de la quercetina es mediante smartCrystals®. El objetivo de estas nanopartículas es aumentar la solubilidad, estabilidad y velocidad de disolución de esta sustancia en un gel no-iónico de fácil aplicación. Bègu et.al comprobaron que no solo esta emulsión era estable durante semanas sino que conservaba su actividad antioxidante (se comprobó en células Vero a las cuales se les había inducido toxicidad por peróxido de hidrógeno) [30].

Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos contra la dermatitis atópica, con resultados muy prometedores. Durante quince días los pacientes recibieron 2g de quercetina al día (emulsionado con suero de leche), dando como resultado una atenuación de la severidad de la dolencia y un descenso de la inflamación característica de esta enfermedad. Además en pacientes con sarcoidosis reduce la cantidad de TNF α e IL-8, citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio. Por otra parte no se ha visto toxicidad relacionada con la quercetina en ninguno de estos ensayos, con lo que la hacen candidata a ser utilizada en múltiples dolencias relacionadas con trastornos inflamatorios [31].

2. PLANTEAMIENTO:

La piel es el órgano más expuesto a agentes oxidantes y radicales libres, además de a las radiaciones solares y productos químicos. Es por ello que la búsqueda de nuevas moléculas es crucial para la generación de nuevos productos que protejan a este órgano. Por otra parte, el uso terapéutico de cualquier molécula requiere una serie de ensayos de toxicidad y de eficacia in vitro previos a cualquier ensayo clínico.

Esta descrito que la quercetina tiene un efecto bivalente dado que a bajas concentraciones es un gran protector celular, seguramente por su actividad anti radical; además de que está descrito un aumento de la proliferación celular activando varias rutas proliferativas, mientras que a grandes concentraciones activa rutas apoptóticas sobre todo en células senescentes y cancerosas.

En este trabajo se intenta hacer un estudio celular de los efectos protectores y tóxicos de la quercetina, separando claramente la dosis farmacológica y la dosis toxica.

3. OBJETIVOS:

- Recopilar información sobre los diferentes mecanismos celulares que es capaz de desencadenar la quercetina además de definir sus propiedades antioxidantes.
- Estudiar el efecto de la quercetina sobre la proliferación de los fibroblastos.
- Cuantificar y si es posible discriminar las concentraciones a las cuales la quercetina no tiene un efecto nocivo, es decir no disminuye la viabilidad, en el cultivo celular mediante la técnica Alamar Blue®.
- Cuantificar las concentraciones a las cuales la quercetina es capaz de presentar un efecto tóxico sobre las células calculando su IC50.
- Determinar el tipo de muerte celular originado por dosis tóxicas de quercetina por citometría de imagen.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1 Materiales:

4.1.1 Material biológico:

Para este estudio utilizamos fibroblastos dérmicos procedentes de cultivo primario de piel humana, cultivados en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO) con un 10% de suero de ternera fetal (FBS) y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma, P-3539). El medio DMEM tiene la siguiente composición:

- Metabolitos y nutrientes.
- Minerales.
- Buffer (sustancia con capacidad tampón).
- Inhibidores de proteasas.
- Inactivantes de materiales tóxicos.
- Enzimas y proteínas necesarias para la adherencia de las células al soporte donde se cultivan.

Por otra parte, el suero de ternera fetal es imprescindible para los cultivos de células animales, porque contiene factores de crecimiento esenciales que permiten la proliferación de las células. Sin estas señales las células no se dividen y los cultivos no avanzan.

4.1.2 Reactivos:

- Quercetina: 95% (Quercetin HPLC solid, Sigma-Aldrich, Q4951-10G, $C_{15}H_{10}O_7$).
- Fluorocromos: Kit AnexinaV-IP (BioLegend).
- Medio de cultivo a base de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium+10% FBS+1% penicilina-estreptomicina Sigma, P-3539).
- Tripsina 1x (Cultek, 91L0930-100).
- Tampón fosfato salino (PBS), (Lonza).
- Alamar Blue® (azul de resazurina), (Sigma Aldrich).

4.1.3 Equipos:

- Estufa de cultivo a 37°C, 5% CO₂.
- Cabina de seguridad biológica clase II Telstar Bioll A.
- Espectrofotómetro de microplacas termostaticado Eon (Biotek, Vermont USA).
- Citómetro de flujo AMNIS ImageStream X (Seattle, WA, USA).
- Cámara Neubauer.

4.1.4 Material fungible:

- Frascos plásticos de cultivo de 75 cm².
- Placas de cultivo de 96 pocillos.
- Placas de cultivo de 6 pocillos.
- Tubos Eppendorf, tubos de ensayo y tubos Falcon.
- Micropipetas de 2, 20, 200 y 1000 µL.
- Pipetas de 1 y 10 mL desechables.

4.2 Métodos:

4.2.1 Mantenimiento de los cultivos:

Los fibroblastos se cultivaron en frascos de plástico de 75 cm² a un volumen de 8mL por frasco; éstos son células adherentes por lo que se quedan pegados al plástico. Una vez que los fibroblastos llegan a la confluencia máxima (90-95%) se procede a hacer un pase de estas células. Para ello se extrae el medio de las placas, se lavan con tampón fosfato salino (PBS) y se añade tripsina 1x, manteniendo las células en la estufa de cultivo a 37°C durante el tiempo requerido (2-5 minutos). A continuación se añadiría medio DMEM con suero fetal para parar la reacción, se vuelven a lavar con PBS y se centrifugan en tubos de centrifuga durante 5 minutos a 800 rpm (un total de tres veces). Las células se resuspenden en medio DMEM completo a una concentración final aproximada de 3x10⁶ células/mL y se siembran a un volumen de 8mL.

Todas las manipulaciones se llevan a cabo en condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica clase II (Teslar).

4.2.2 Medida de la viabilidad:

La medida de la viabilidad de una muestra tras un tratamiento consiste en calcular el porcentaje de células vivas y muertas que hay tras la aplicación de éste. Para la medida de viabilidad utilizamos dos métodos: Alamar Blue® y medida con citómetro de Imagen tratados con el software específico IDEAS de AMNIS.

4.2.2.1 Tratamiento con Alamar Blue®:

Partimos de fibroblastos humanos sembrados en placas de 96 pocillos con medio DMEM completo.

Todas estas medidas se realizan tras 24 horas de duración del tratamiento, tras las cuales se evalúa la viabilidad con Alamar Blue®. Este contiene azul de resazurina, un compuesto que tras ser captado por la célula es reducido de muchas maneras: por el FMNH₂, FADH_s, NADH, NADPH y por las enzimas de la familia de los citocromos. Además este compuesto no es tóxico para las células y podrían reutilizarse para experimentos posteriores [32].

Se preparó una disolución de 0,15mg/mL de azul de resazurina a partir de una suspensión en polvo de Alamar Blue® resuspendida en PBS. Se toma un mililitro de esta disolución y se resuspende en 9 de medio DMEM. Una vez preparada la disolución se continúa con los siguientes pasos:

1. Retirar el sobrenadante de los pocillos.
2. Añadir 100 μ L de la disolución de azul de resazurina preparada, a una concentración final de 0,015 mg/mL.
3. Incubar en la estufa durante 2 horas.
4. Realizar la medida a 570nm y 600nm.

4.2.2.2 Medida con citometría de flujo:

La valoración de las distintas poblaciones de muerte celular con citometría de flujo se realizó sobre el IC50. En placas de 6 pocillos se realizó un tratamiento de 24 horas; se destinaron dos pocillos a controles, dos se trataron con concentraciones de 800 μ M y 1000 μ M tras lo cual se tripsinizaron las muestras y se trataron con yoduro de propidio y anexina V.

El yoduro de propidio es un fluorocromo que se une al DNA de las células que hayan perdido la integridad de su membrana y por tanto se hayan generado poros en ella. La anexina V es capaz de unirse a la fosfatidil-serina, un fosfolípido presente mayoritariamente en la cara interna de la membrana plasmática, pudiendo unirse estas dos moléculas cuando se da una traslocación de la fosfatidil-serina en fenómenos como la apoptosis.

Con este citómetro podemos diferenciar 4 poblaciones celulares:

1. Células vivas: conservan su integridad de membrana por lo que el yoduro de propidio no penetra en ellas y la anexina V no puede unirse a la membrana por la ausencia de fosfatidil-serina.
2. Células necróticas: la membrana está rota y el yoduro de propidio es capaz de teñir el DNA, pero no se ve unión de Anexina V.
3. Células apoptóticas tempranas: la fosfatidil serina se trasloca y por tanto puede unirse a la Anexina V, la membrana está intacta de manera que no hay tinción por yoduro de propidio.
4. Células apoptóticas tardías y necroptóticas: se marcan con ambos fluorocromos. Ambas poblaciones pueden diferenciarse por morfología: las apoptóticas presentar fragmentación nuclear y citoplasmática mientras que las necroptóticas mantienen su morfología.

4.2.3 Contaje de células:

El contaje de células se realiza mediante una cámara de Neubauer. Para el contaje se prepara una placa de 6 pocillos sembrada con fibroblastos (a una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^4$ cel/mL) y se tratan dos pocillos con concentraciones $1 \mu\text{M}$, otros dos con $5 \mu\text{M}$ y dos controles sin tratamiento. Tras 24 horas de incubación se tripsinizan las células y se diluyen la disoluciones obtenidas 10 veces. A continuación se lleva a cabo el contaje en la cámara, que vista al microscopio tiene el siguiente aspecto (*ilustración 2*):

El contaje de las células se realiza en los 4 cuadrantes de los extremos, conteniendo cada uno 16 cuadrados en su interior llevándose a cabo un contaje total en 256 cuadrados. Una vez obtenido el número de células se aplica la siguiente fórmula (figura 5):

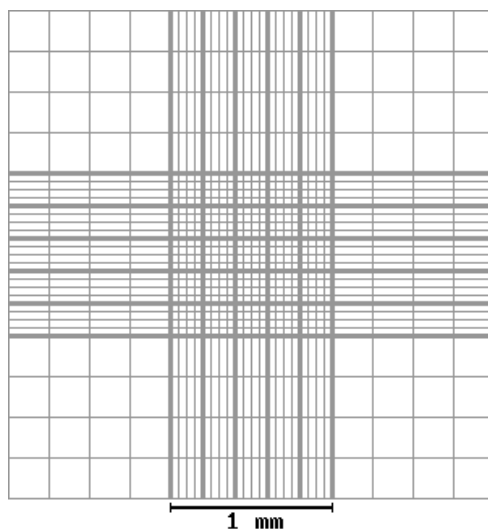


Figura 5: cámara de Neubauer, aspecto al microscopio.

$$\frac{\text{Cél}}{\text{mL}} = \frac{\text{células contadas} \times \text{dilución} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes contados}}$$

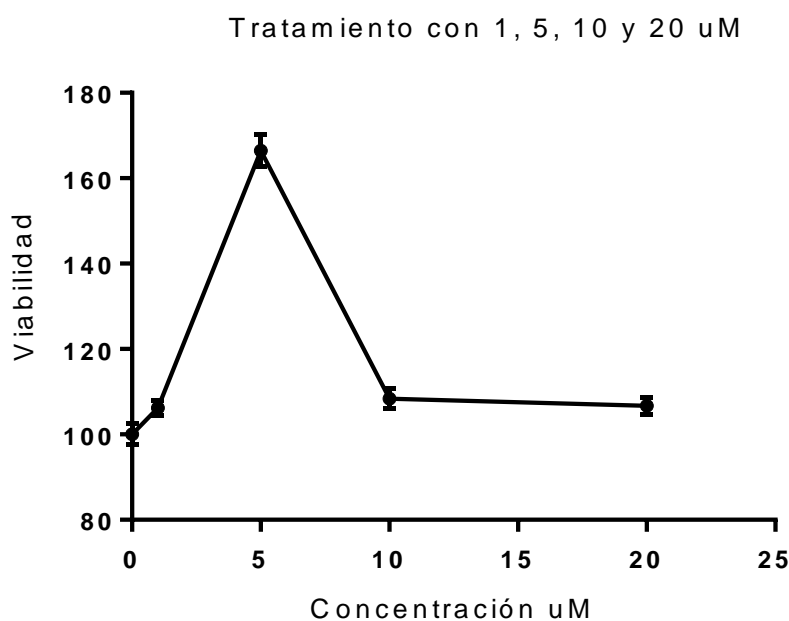
Figura 6: fórmula a aplicar para calcular la concentración de células en un cultivo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1 Medidas de viabilidad Alamar Blue:

5.1.1 Tratamiento con 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M:

La aplicación de quercetina sobre células sin tratamiento previo no debería aumentar ni disminuir la viabilidad de las mismas (en un porcentaje significativo). Sin embargo tal y como se muestra en la *gráfica 1* hay un aumento muy notable de la viabilidad a una concentración de quercetina de 5 μ M. Este experimento se repitió dos veces más, obteniéndose resultados muy similares.



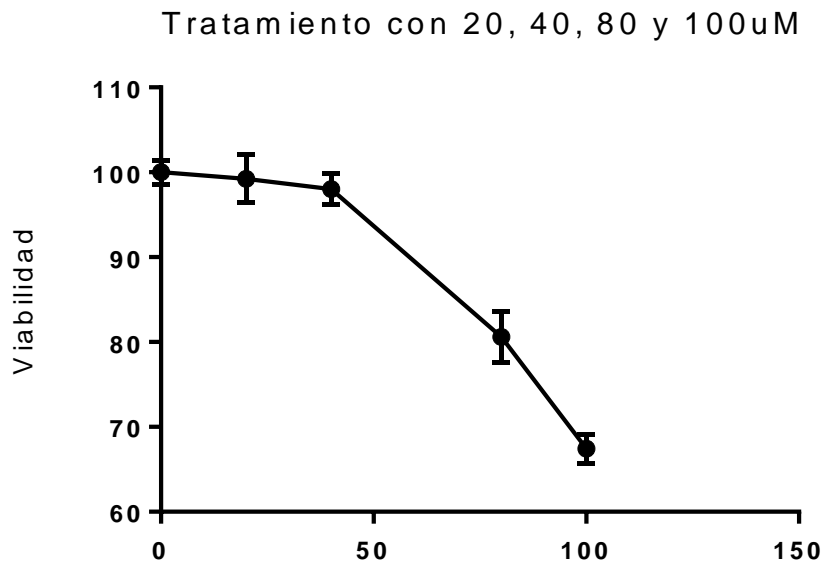
Gráfica 1: Medida de absorbancia tras el tratamiento con quercetina a 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M.

A una concentración de 5 μ M las células presentan una viabilidad del 160%, un 60% más que con respecto al control. Una vez realizado el experimento por duplicado (ver Anexo B1), desarrollamos la hipótesis de que este aumento de la viabilidad se debía a un aumento en la proliferación de las células tratadas a esta concentración. La confirmación de esta hipótesis se muestra en el apartado 5.2.

Como se ha expuesto en el apartado Introducción, la quercetina estimula gran cantidad de rutas antioxidantes pero también algunas que incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (señalizador de proliferación en células del endotelio) y otras rutas implicadas en la proliferación de células de la piel. Es por ello que ésta podría ser la concentración óptima a la cual hay una proliferación máxima de este tipo de células aunque sería necesaria la realización de otras pruebas confirmatorias de esta hipótesis.

5.1.2 Tratamiento con 20 μM , 40 μM , 80 μM y 100 μM :

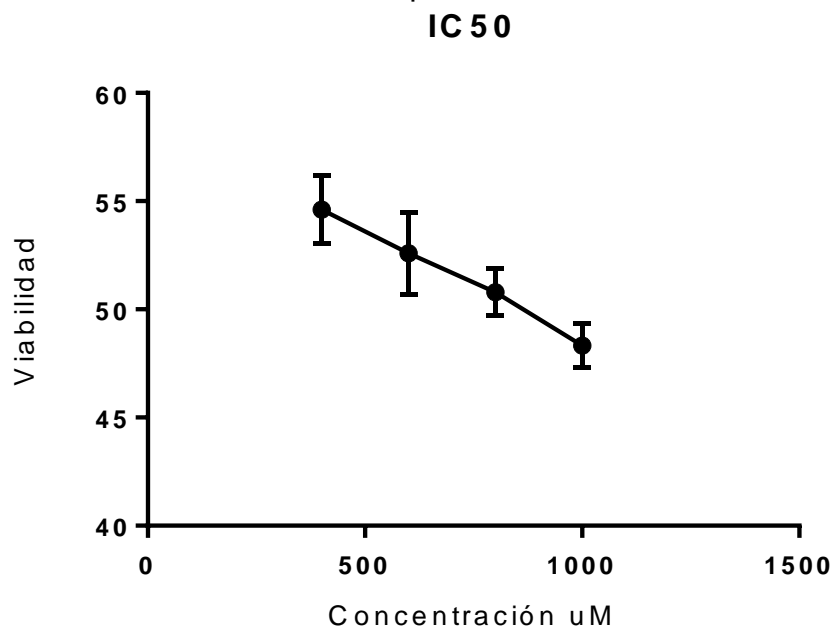
Las concentraciones intermedias de quercetina muestran una viabilidad similar al control en las concentraciones de 20 μM y 40 μM y un descenso notable a partir de esta última. De esta manera podemos delimitar la "zona terapéutica" hasta esta última concentración, tomando como modelo los fibroblastos humanos.



Gráfica 2: Medida de absorbancia tras el tratamiento con quercetina a 20 μM , 40 μM , 80 μM y 100 μM .

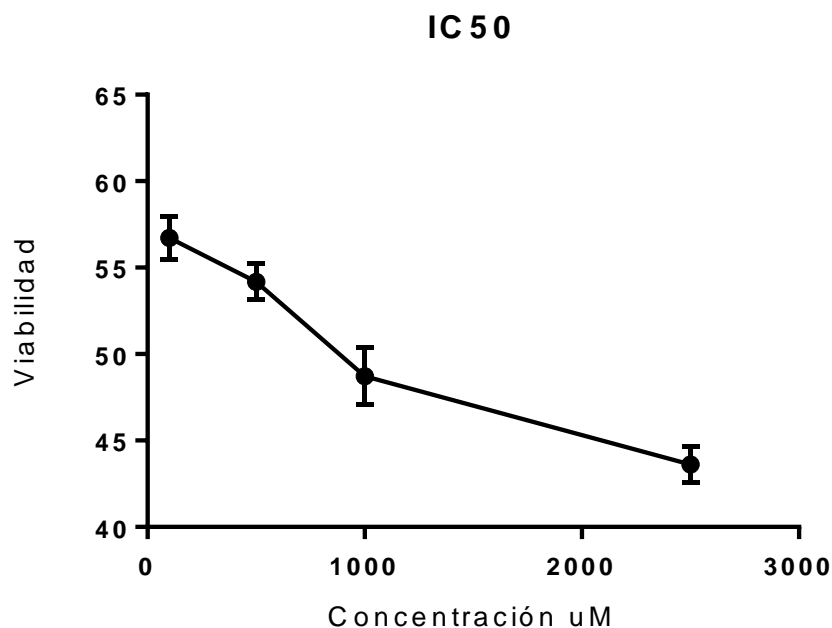
5.1.3 IC₅₀, tratamiento con 400 μM , 600 μM , 800 μM y 1000 μM :

La medida del IC₅₀ da una aproximación de la dosis a la cual mueren la mitad de las células tras ser sometidas a un tratamiento farmacológico. En el caso de la quercetina se encuentra en torno a 800 μM .



Gráfica 3: Medida de absorbancia tras el tratamiento con quercetina a 400 μM , 600 μM , 800 μM y 1000 μM . En esta gráfica no se muestra el control por una cuestión de formato de la misma.

Sin embargo no hay mucha diferencia entre estas 4 concentraciones por lo que es necesaria una repetición con concentraciones diferentes para confirmar el resultado anterior.



Gráfica 4: Medida de absorbancia tras el tratamiento con quercetina a 100µM, 500µM, 1000 µM y 2500 uM. En esta gráfica no se muestra el control por una cuestión de formato de la misma.

En el siguiente caso la medida del IC50 se encuentra en torno a 870 µM, similar al resultado obtenido en el experimento anterior. Para poder dar un valor más exacto realizamos la medida del IC50 en el citómetro de imagen (ver apartado 5.3).

Podemos observar que pasada la concentración de 100 µM la viabilidad desciende poco a poco, es por ello que la medida del IC50 no es tan significativa en este compuesto (que sí necesaria) ya que la muerte celular presenta un aumento muy poco significativo con el aumento de la concentración.

5.2 Medida de la proliferación:

Las medidas de proliferación se muestran en la tabla 1. Se puede observar que tras 24 horas y habiéndose sembrado la misma concentración de células inicial (ver Materiales y Métodos 4.2.3), las células tratadas con las dos concentraciones de quercetina están en mayor concentración, siendo mayor la de las tratadas con una concentración de 5µM.

Muestra	Células contadas	Concentración (cel/mL)
Control 1	11	$2,75 \times 10^5$
Control 2	12	$3,0 \times 10^5$
Tratadas 1µM	21	$5,25 \times 10^5$
Tratadas 1µM	25	$6,25 \times 10^5$
Tratadas 5µM	41	$10,25 \times 10^5$
Tratadas 5µM	38	$9,5 \times 10^5$

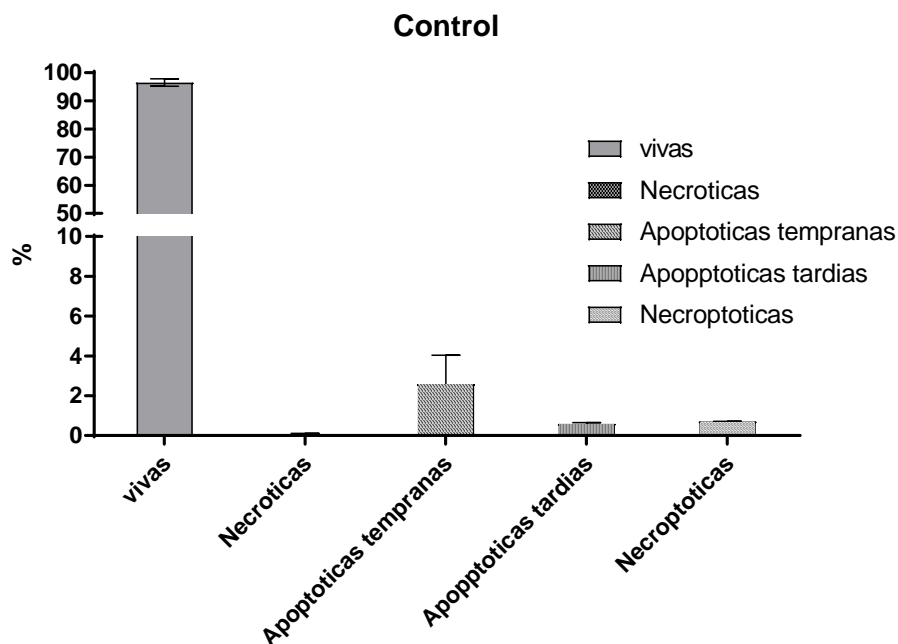
Tabla 1: medidas de proliferación tras el tratamiento de quercetina a 1 y 5 µM tras 24 horas de tratamiento.

Podemos afirmar entonces la hipótesis presentada en el apartado 5.1.1 en la cual la concentración de quercetina que estimula más óptimamente el crecimiento de las células es $5\mu\text{M}$ (dadas las concentraciones testadas ya que el rango entre 6 y $10\mu\text{M}$ queda sin testar). No obstante serán necesarias otro tipo de comprobaciones, como la medida del ciclo celular en un citómetro de flujo o de imagen.

5.3 Medida de la viabilidad con citómetro de imagen:

5.3.1 Control:

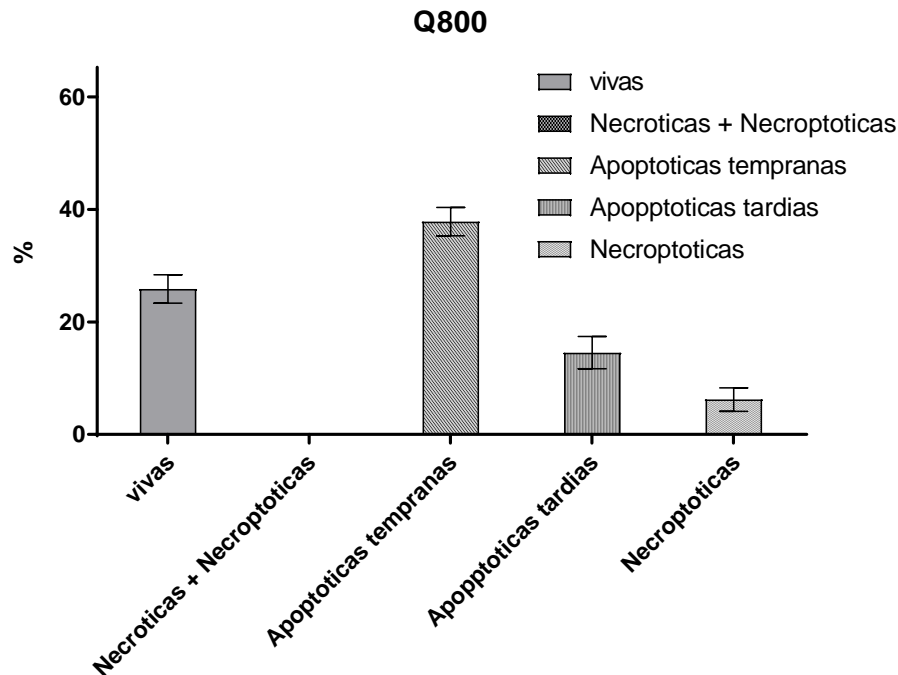
La población de células presentes en los controles son mayoritariamente vivas, con una ligera presencia de células apoptóticas tempranas y aun menor de necróticas, necroptóticas y apoptóticas tardías.



Gráfica 5: Estudio de las poblaciones celulares en el citómetro de imagen de las células control (sin tratamiento de quercetina).

5.3.2 Tratamiento con $800\mu\text{M}$ de quercetina:

El tratamiento con $800\mu\text{M}$ debería dar unos resultados similares a los obtenidos mediante la técnica de Alamar Blue®, sin embargo, la población de células vivas disminuye considerablemente (aproximadamente un 25% de disminución frente a los resultados con la técnica anterior). Este descenso puede deberse a la variación entre ambas técnicas: la técnica de Alamar Blue® toma el control como el 100% de células vivas, sin embargo este porcentaje no es real sino una aproximación para realizar los cálculos posteriores. Por otra parte, la técnica de citometría demora la medida de las muestras varias horas, por lo que los resultados pueden estar alterados y las células haber perdido viabilidad.

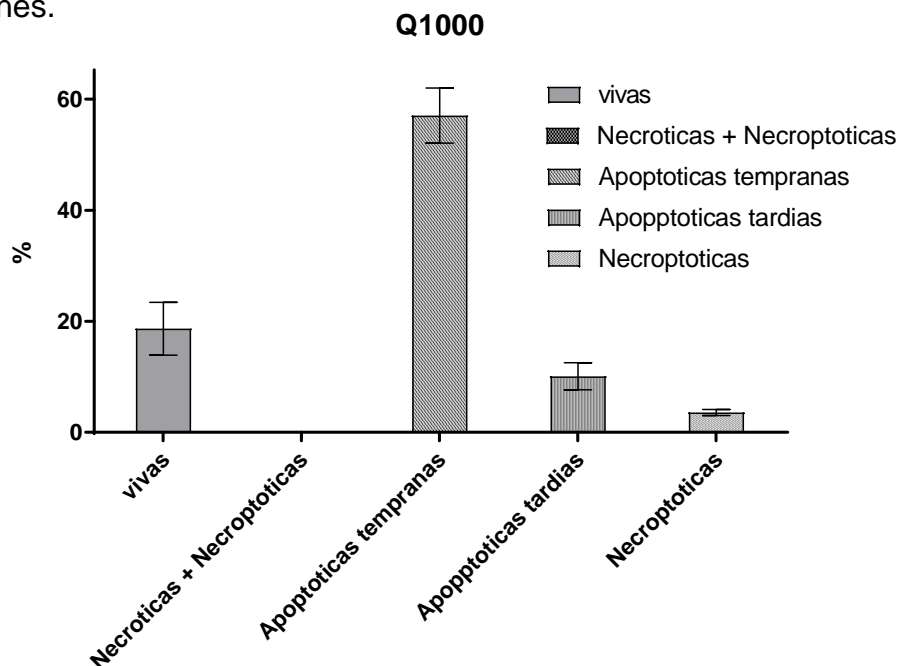


Gráfica 6: Estudio de las poblaciones celulares en el citómetro de imagen de las células con un tratamiento con 800 μ M de quercetina.

En cuanto al estudio de poblaciones, hay un gran aumento de células apoptóticas tempranas (37,83%), un ligero aumento de las apoptóticas tardías (14,54%) y de necroptóticas (3,56%). En las células necróticas no se aprecia ningún cambio significativo.

5.3.3 Tratamiento con 1000 μ M de quercetina:

Este tratamiento muestra, al igual que el anterior, una disminución del número de células vivas mucho más acusado del esperado. En este caso también hay un aumento muy notorio de la población de células apoptóticas tempranas (57,7%), pero no un aumento significativo frente a la concentración anterior en cuanto al resto de poblaciones.



Gráfica 7: Estudio de las poblaciones celulares en el citómetro de imagen de las células con un tratamiento de 1000 μ M de quercetina.

Los resultados anteriores están referidos a las medias realizadas a los resultados obtenidos a 3 réplicas del mismo experimento: tres tubos para el control, tres para el tratamiento a 800 μ M y tres para 1000 μ M.

5.3.4 Comparativa del aumento de muerte celular:

En las siguientes tablas se muestran los incrementos de cada población celular en función de la dosis de quercetina aplicada. En la tabla 2 observamos los incrementos de las tres muestras tratadas con una concentración de 800 μ M de quercetina: en todos los casos hay disminución de las células vivas y un incremento similar de la población de apoptóticas tempranas. Cabe destacar que el caso del tubo 3 hay un gran incremento de apoptóticas tardías en comparación con las otras tres muestras, debido probablemente a la demora en el tiempo que requiere la técnica. Las necróticas apenas sufren cambios y hay un aumento notable de las apoptóticas tardías y necroptóticas, aunque no tan significativo como el de las apoptóticas tempranas.

	Q800-1	Q800-2	Q800-3
Vivas	-63,80	-69,40	-78,80
Necróticas	0,16	-0,10	-0,08
Apop tem	33,61	36,79	35,35
apop tardias	19,50	19,46	31,29
Necrop	6,70	9,80	12,49

Tabla 2: incrementos de las poblaciones celulares tratadas con concentraciones 800 μ M de quercetina.

En el caso del tratamiento a 1000 μ M la población de células apoptóticas aumenta considerablemente, al igual que en el caso anterior, pero aumenta su porcentaje de manera dependiente a la dosis. Esta última afirmación no ocurre con el resto de poblaciones, que disminuye con respecto al tratamiento con una concentración de 800 μ M.

	Q1000-1	Q1000-2	Q1000-3
Vivas	-72,80	-83,30	-77,50
Necróticas	0,00	-0,04	-0,08
Apop tem	63,21	49,69	50,55
apop tardias	6,40	9,84	12,19
Necrop	2,47	2,47	3,61

Tabla 3: incrementos de las poblaciones celulares tratadas con concentraciones 1000 μ M de quercetina.

En el Anexo B2 pueden verse todos los valores referidos al porcentaje de muerte celular de todas las muestras.

6. CONCLUSIONES

- El tratamiento con quercetina aumenta la proliferación de los fibroblastos humanos, presentando su máximo a una concentración de 5 μM de las concentraciones testadas.
- La quercetina no provoca la disminución de la viabilidad celular aplicada hasta concentraciones de 40 μM .
- El IC50 calculado mediante la técnica de Alamar Blue® está en torno a 800 μM , mientras que a esa misma concentración las medidas con el citómetro muestran una viabilidad de aproximadamente el 25%.
- El tipo de muerte celular por el cual la quercetina es capaz de provocar la muerte celular es mayoritariamente la apoptosis.

6. CONCLUSIONS

- Quercetin treatment encourages fibroblast growth at a 5 μM dose administration.
- Quercetin does not diminish cellular viability when applied at a maximum of 40 μM dose.
- Determined IC50 with Alamar Blue® is 800 μM , whereas citometer experimentation shows a 25% viability at this same concentration.
- Apoptosis is the main cell type provoked by quercetina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pallauf, K., Duckstein, N. and Rimbach, G. (2016). A literature review of flavonoids and lifespan in model organisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(02), pp.145-162.
2. Dong, C., Hu, H., Hu, Y. and Xie, J. (2016). Metabolism of Flavonoids in Novel Banana Germplasm during Fruit Development. *Frontiers in Plant Science*, 7
3. Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras* y M.^a J. Tuñón *Nutr. Hosp.* (2002) XVII (6) 271-278
4. Forkmann, G. and Martens, S. (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), pp.155-160.
5. Li, J. (1993). Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *THE PLANT CELL ONLINE*, 5(2), pp.171-179.
6. Graf, B., Milbury, P. and Blumberg, J. (2005). Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), pp.281-290.
7. Saric, S. and Sivamani, R. (2016). Polyphenols and Sunburn. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), p.1521.
8. Warnakulasuriya, S., Ziaullah and Rupasinghe, H. (2016). Novel long chain fatty acid derivatives of quercetin-3-O-glucoside reduce cytotoxicity induced by cigarette smoke toxicants in human fetal lung fibroblasts. *European Journal of Pharmacology*, 781, pp.128-138.
9. Lic. Gilberto Pérez Trueba (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev.Cubana Investigación Biomédica* 2003:22(1): 48-57.
10. Heim, K., Tagliaferro, A. and Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), pp.572-584.
11. Casagrande, R., Georgetti, S., Verri, W., Borin, M., Lopez, R. and Fonseca, M. (2007). In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 328(2), pp.183-190.
 - A. Gopalakrishnan, M.Ram, S. Kumawat, SK Tandan & D. Kumar (2014). Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF- β 1. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol 54, pp 187-195.
12. Bito, T., Roy, S., Sen, C., Shirakawa, T., Gotoh, A., Ueda, M., Ichihashi, M. and Packer, L. (2002). Flavonoids differentially regulate IFN γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. *FEBS Letters*, 520(1-3), pp.145-152.
13. Lee (2010). Onion extract and quercetin induce matrix metalloproteinase-1 in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, 25(3).
14. Li, C., Zhang, W. and Frei, B. (2016). Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction. *Redox Biology*, 9, pp.104-113.
15. Potapovich, A., Kostyuk, V., Kostyuk, T., de Luca, C. and Korkina, L. (2013). Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research*, 62(8), pp.773-780.
16. Warwick, E., Cassidy, A., Hanley, B., Jouni, Z. and Bao, Y. (2012). Effect of phytochemicals on phase II enzyme expression in infant human primary skin fibroblast cells. *British Journal of Nutrition*, 108(12), pp.2158-2165.
17. Dell'Albani, P., Di Marco, B., Grasso, S., Rocco, C. and Foti, M. (2017). Quercetin derivatives as potent inducers of selective cytotoxicity in glioma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, pp.56-65.
18. Zhang, Q., Cheng, G., Qiu, H., Zhu, L., Ren, Z., Zhao, W., Zhang, T. and Liu, L. (2015). The p53-inducible gene 3 involved in flavonoid-induced cytotoxicity through the reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptotic pathway in human hepatoma cells. *Food Funct.*, 6(5), pp.1518-1525.

19. Zhang, J., Yi, T., Liu, J., Zhao, Z. and Chen, H. (2013). Quercetin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway in KB and KBv200 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(9), pp.2188-2195.
20. Lee, K., Kang, N., Heo, Y., Rogozin, E., Pugliese, A., Hwang, M., Bowden, G., Bode, A., Lee, H. and Dong, Z. (2008). Raf and MEK Protein Kinases Are Direct Molecular Targets for the Chemopreventive Effect of Quercetin, a Major Flavonol in Red Wine. *Cancer Research*, 68(3), pp.946-955.
21. Bhatia, N., Agarwal, C. and Agarwal, R. (2001). Differential Responses of Skin Cancer-Chemopreventive Agents Silibinin, Quercetin, and Epigallocatechin 3-Gallate on Mitogenic Signaling and Cell Cycle Regulators in Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells. *Nutrition and Cancer*, 39(2), pp.292-299.
22. L Galluzzi, I Vitale, JM Abrams, ES Alnemri, EH Baehrecke, MV Blagosklonny, TM Dawson, VL Dawson, WS El-Deiry, S Fulda, E Gottlieb, DR Green, MO Hengartner, O Kepp, RA Knight, S Kumar, SA Lipton, X Lu, F Madeo, W Malorni, P Mehlen, G Núñez, ME Peter, M Piacentini, DC Rubinsztein, Y Shi, H-U Simon, P Vandenabeele, E White, J Yuan, B Zhivotovsky, G Melino and G Kroemer (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 19, 107–120
23. *The Cell: A Molecular Approach*. (n.d.). 6th ed. p.682.
24. G Kroemer*, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, ES Alnemri, EH Baehrecke, MV Blagosklonny, WS El-Deiry, P Golstein, DR Green, M Hengartner, RA Knight, S Kumar, SA Lipton, W Malorni, G Nuñez, ME Peter, J Tschopp, J Yuan, M Piacentini, B Zhivotovsky, and G Melino (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16(1): 3–11.
25. Donald Wlodkowic, PhD, Joanna Skommer, PhD, and Zbigniew Darzynkiewicz, MD, PhD (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol.*; 559: 19-32
26. Castangia, I. et al. (2014) Fabrication of quercetin and curcumin bionanovesicles for the prevention and rapid regeneration of full-thickness skin defects on mice. *Acta Biomater.* 10, 1292–1300
27. Caddeo, C. et al. (2014) Topical anti-inflammatory potential of quercetin in lipid-based nanosystems: in vivo and in vitro evaluation. *Pharm. Res.* 31, 959– 968
28. T. Hatahet, M. Morille a, A. Hommoss, J.M. Devoisselle, R.H. Müller, S. Bégu (2016). Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 108 41–53.
29. T. Hatahet, M. Morille a, A. Hommoss, C. Dorandeu, R.H. Müller, S. Bégu (2016) Dermal quercetin smartCrystals: Formulation development, antioxidant activity and cellular safety. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 102 51–63.
30. Karuppagounder, V., Arumugam, S., Thandavarayan, R., Sreedhar, R., Giridharan, V. and Watanabe, K. (2016). Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis. *Drug Discovery Today*, 21(4), pp.632-639..
31. alamarBlue® Assay. U.S. Patent No. 5,501,959
32. Manual de uso: AMNIS ImageStream X citometer

ANEXOS

A. Abreviaturas:

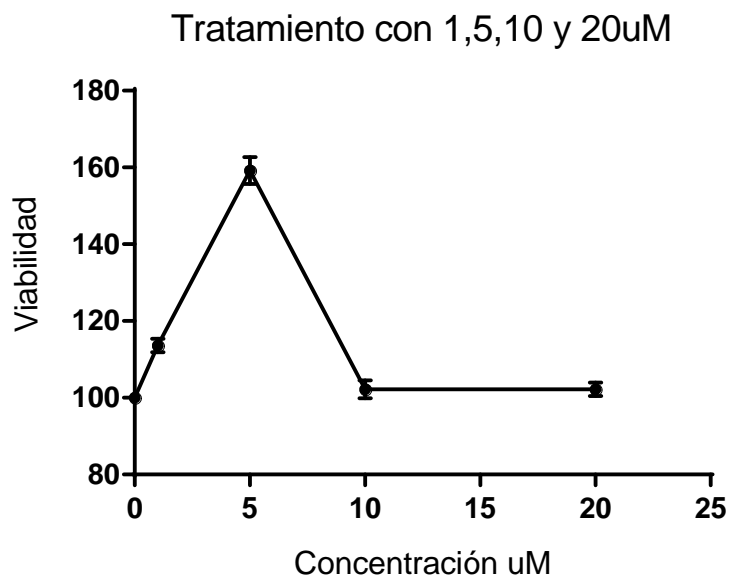
- Mev-1: gen de la succinato deshidrogenasa (citocromo).
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
- TGF- β 1: factor de crecimiento transformante Beta.
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
- HIF-1 α : subunidad alfa del factor inducible por hipoxia.
- NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa.
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.
- HEK: células embrionarias de riñón humano.
- HaCat: línea inmortal aneuploide proveniente de queratinocitos humanos
- JNK: quinasas c-Jun N-terminal
- MMP-1: metaloproteinasa-1.
- ERK: señal de las quinasas reguladas por señal extracelular
- MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos
- LPS: lipopolisacárido de las bacterias gram negativas.
- Nrf-2: factor eritroide relacionado.
- HO-1: hemo-oxigenasa
- NO: óxido nitroso
- Cyp1a1: citocromo P450 subfamilia A polipeptido 1
- Cyp1b1: citocromo P450 subfamilia B polipeptido 1
- NQO1: NADPH-quinona óxido-reductasa
- GST: glutatión S-transferasa
- GCK: glutamato cisteína quinasa
- PIG-3: gen p53-inducible
- Bcl-2: protooncogén de linfoma de células B 2.
- Bax: bcl-2-like protein 4.
- TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
- AP-1: proteína activadora 1.
- MEK: quinasa de MAPK/ERK
- erbB1: receptor del factor de crecimiento epidérmico
- Shc: SH2-containing collagen-related proteins
- EGF: factor de crecimiento epithelial
- NCCD: Comité de Nomenclatura de Muerte Celular
- Ced3, Ced4 y Ced9: proteínas del núcleo ejecutoras de la apoptosis 3, 4 y 9.
- FAS: receptor 6 de la familia TNF.
- Z-VAD-fmk: N-bencilloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona
- CrmA: modificador de la respuesta a citoquinas A
- MOMP: permeabilización mitocondrial

- PTPC: complejo permeable de transición
- AIF: factor inductor de la apoptosis
- RIP: interacting protein receptor
- TNFR1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral
- DMEM: medio Eagle modificado
- PBS: tampón fosfato salino

B. Resultados:

B.1 Duplicado tratamiento con concentraciones 1, 5, 10 y 20 μM .

En este caso el incremento a 5 μM es casi idéntico y las condiciones experimentales fueron las mismas en ambos casos.



Gráfica 7: duplicado de la medida de la viabilidad de las células tras el tratamiento con concentraciones a 1, 5, 10 y 20 μM .

B.2 Porcentajes de poblaciones celulares por muestra tratada a 800 μM y 1000 μM .

		CONTROL		Q800		Q1000	
		Media	desv	Media	desv	Media	desv
Vivas		96,53	1,35	25,87	7,53	18,67	4,77
Necroticas		0,06	0,05	0,05	0,08	0,02	0,03
Apop tem		2,58	1,46	37,83	2,52	57,07	4,97
doble	apop tardias	0,58	0,07	14,54	9,87	10,10	2,45
	Necrop	0,70	0,02	6,20	4,08	3,56	0,55

Tabla 4: media de las poblaciones celulares obtenidas, control: tratamiento con 800 y 1000 μM .

		Control 1			Control 2			Control 2		
Vivas		97,90			97,00			94,70		
Necroticas		0,00			0,10			0,08		
Apop tem		0,89			3,81			3,05		
doble	apop tardias	1,17	44,40	0,52	1,28	43,10	0,55	1,45	46,40	0,67
	Necrop		57,80	0,68		54,90	0,70		50,00	0,73

Tabla 5: media de las poblaciones celulares obtenidas en los controles triplicados.

		Q800			Q800			Q800		
Vivas		34,10			27,60			15,90		
Necroticas		0,16			0,00			0,00		
Apop tem		34,50			40,60			38,40		
doble	apop tardias	30,60	74,90	22,92	30,70	65,20	20,02	45,40	70,40	31,96
	Necrop		24,10	7,37		34,20	10,50		29,10	13,21

Tabla 6: media de las poblaciones celulares obtenidas en los tratamientos con 800 μ M por triplicado.

		Q1000			Q1000			Q1000		
Vivas		25,10			13,70			17,20		
Necroticas		0,00			0,06			0,00		
Apop tem		64,10			53,50			53,60		
doble	apop tardias	10,20	67,80	6,92	13,70	76,70	10,51	17,20	74,80	12,87
	Necrop		30,80	3,14		23,30	3,19		25,20	4,33

Tabla 7: media de las poblaciones celulares obtenidas en los tratamientos con 1000 μ M por triplicado.

C. Materiales y Métodos:

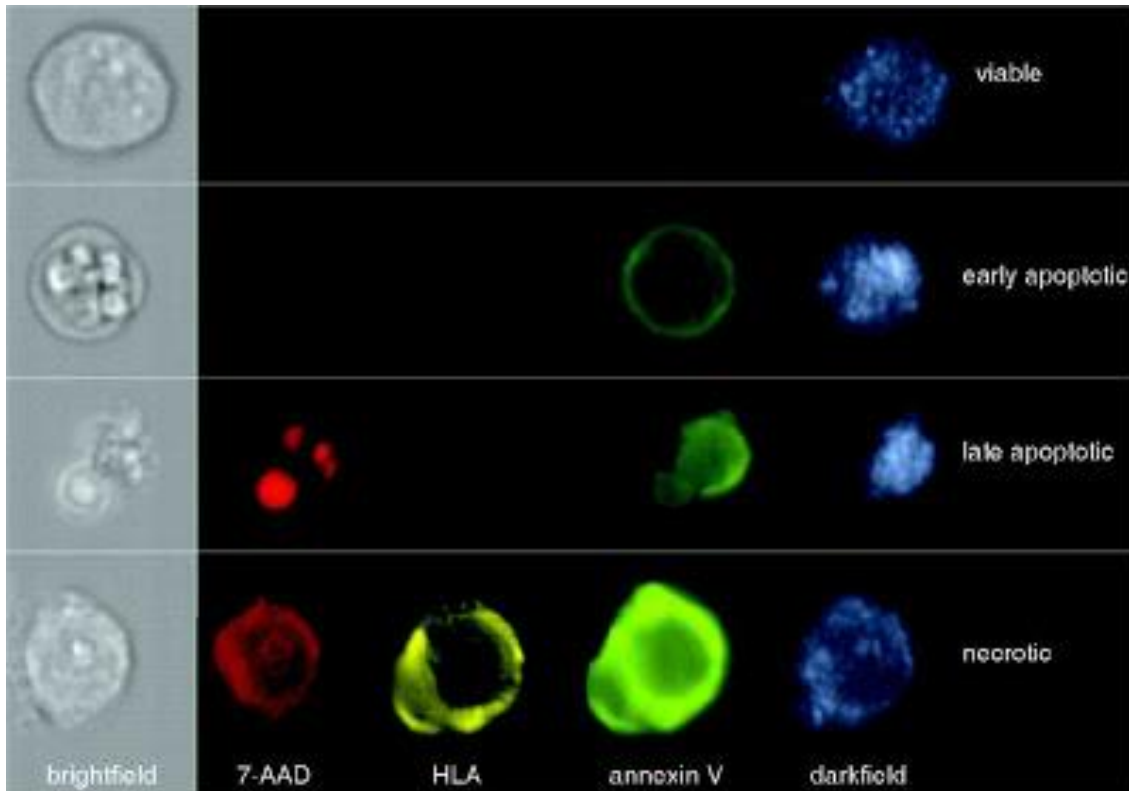


Figura 4: imágenes obtenidas en el citómetro de imagen AMNIS. En este caso se muestran 3 de las 4 poblaciones obtenidas, sin embargo, las necróticas tendrían la misma tinción que las apoptóticas tardías y serían distinguibles por su morfología, ya que no se observarían cuerpos apoptóticos.

Es equipo (AMNIS ImageStream X) combina imagen y citometría de flujo. Está equipado con una lámpara de campo brillante (100 W) con emisión entre 430 y 730 nm, un láser azul (488 nm) con una potencia entre 20 y 200 mW, con opciones de láser ultravioleta (375 nm; 10 mW), violeta (405 nm; 180 mW) y rojo (658 nm; 80 mW). El primer canal queda reservado para el campo oscuro, mientras que los restantes -hasta un total de seis- están reservados para el campo brillante y las fluorescencias, permitiendo el uso de fluorocromos como DAPI, Hoechst, AlexaFluor 488, PE, Cy-3, PE-TexasRed, ECD, PerCP, DRAQ5, entre muchos otros. El límite de detección es cercano a los 50 MESF, permitiendo analizar 10,000 células por minuto. Esto es posible gracias a una cámara CCD de gran sensibilidad y velocidad de captura de imágenes [33].