



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Protección celular frente a compuestos de gas mostaza por antiradicales libres en fibroblastos

Ignacio Pardo Zubieta

Director: Dr. José Octavio Alda Torrubia

Director: Dr. Álvaro Casanova Flor de Lis

Zaragoza 2017

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Recuerdo histórico del gas mostaza.....	1
1.2 Mecanismo de acción de SM y NM: toxicológico, apoptosis, necrosis, necroptosis, toxicidad en el DNA.	1
I. Toxicológico.....	1
II. Apoptosis.....	3
III. Necrosis.	5
IV. Necroptosis.	6
V. Daño a nivel de DNA.	7
1.3 Lesiones por exposición a agentes mostaza: oculares, cutáneas, aparato respiratorio, daño a nivel sistémico.	8
1.4 Tratamiento de las lesiones y antídotos de agentes de mostaza.	9
1.5 Aplicaciones terapéuticas de los compuestos de mostaza.	9
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	11
2.1 Planteamiento:.....	11
2.2 Objetivos:	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Reactivos	12
Medio de cultivo.....	12
Solución PBS (Phosphate Buffered Saline):.....	12
Tripsina EDTA:	12
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT):	12
Isopropanol:	13
Anexina V:	13
Ioduro de propidio:	13
3.2 Materiales fungibles y equipos	13
Espectrofotómetro de microplacas termostatzado “Eon”	14
Sistema morfocitométrico ImageStream X AMNIS	14
3.3 Métodos	14
Tripsinización.....	14
Tinción con fluorocromos.	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1 Determinación del IC50.....	16

Mostaza nitrogenada.....	16
Mostaza sulfurada.....	17
4.2 Estudio del tipo de muerte celular mediante citometría de imagen.....	18
Fibroblastos control	18
Fibroblastos tratados con mostaza nitrogenada.....	19
Fibroblastos tratados con mostaza sulfurada.....	20
Incremento del tipo de muerte celular	21
5. CONCLUSIONES	22
5. CONCLUSIONS	23
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESUMEN

Los compuestos de mostaza son agentes químicos que han sido utilizados en la historia reciente con fines bélicos y quimioterápicos. Son sustancias vesicantes cuyos órganos de acción principales son las mucosas respiratorias y la piel. Al contacto con esta, las mostazas son capaces de producir ampollas, edema, irritación y quemaduras, entre otros. Sus daños a nivel celular se basan en la alquilación del DNA y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo inflamación y muerte celular.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de los compuestos de mostaza, nitrogenada (NM) y sulfurada (SM), sobre fibroblastos humanos cultivados. El objetivo es determinar la dosis letal 50 (LD50) tras la exposición al gas mostaza durante 3 horas, mediante la técnica de MTT. También, mediante la citometría de imagen, se pretende estudiar los tipos de muerte celular que desencadena la exposición a estos compuestos durante 3 horas a distintas concentraciones.

En el caso de la mostaza sulfurada (SM), la dosis letal se encuentra a 3010 μM y las células estudiadas mueren principalmente por apoptosis. Por su parte, para la mostaza nitrogenada (NM) se ha determinado una LD50 de 3637 μM y los fibroblastos tratados mueren por necroptosis, fundamentalmente.

Palabras clave: Mostaza sulfurada, mostaza nitrogenada, citometría de imagen, MTT, apoptosis, necroptosis.

ABSTRACT

Mustard compounds are chemical agents which have been used in recent history for war and chemotherapeutic purposes. They are vesicant substances whose principal organs of action are respiratory mucous and the skin. Mustard compounds are able to produce blisters, edema, irritation and burns. At cellular level, their damages are based on the DNA alkylation and ROS release, producing inflammation and cell death.

In this work, mustard compounds (NM and SM) effect has been studied on human fibroblasts which have been cultivated. We want to determine the lethal dose 50 (LD50) after the exposition to mustard gas during 3 hours, by MTT technique. Also, by image cytometry, we intend to study cell death types which are triggered after 3 hours exposure to different concentrations.

Sulfur mustard LD50 is over 3010 μM , and cells die mainly by apoptosis. For its part, LD50 of nitrogen mustard is 3637 μM , and fibroblast that were treated die by necroptosis.

Keywords: Sulfur mustard, nitrogen mustard, image cytometry, MTT, apoptosis, necroptosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Recuerdo histórico del gas mostaza.

Los agentes químicos de guerra se definen como sustancias químicas cuyas propiedades tóxicas son utilizadas para matar, lesionar o incapacitar al enemigo, en guerras y operaciones militares (1).

En este trabajo, abarcaremos el estudio de los efectos y posibles aplicaciones de algunos de ellos, como son el gas mostaza sulfurado y el nitrogenado.

El sulfuro de mostaza (bis-(2-cloroetilo)), comúnmente conocido como gas mostaza (SM), fue descubierto de forma accidental en 1822 por Guthrie y Niemann. En cuanto a sus propiedades, sorprende que no se trata de un gas, sino de un líquido de color amarillo pálido y textura oleosa que se evapora a 25°C. Su densidad es unas 5.6 veces la del aire. El nombre de gas mostaza es debido a su fuerte olor, que recuerda a la mostaza. El olor se acentúa cuando hablamos de una muestra impura. (1)

La mostaza nitrogenada (NM) es un agente alquilante, análogo a la mostaza sulfurada. Existen 3 formas de mostaza nitrogenada, cada una con un olor característico, aunque todas comparten las propiedades alquilantes. (1)

Ambos tipos de mostazas son agentes vesicantes, puesto que se absorben por la piel produciendo irritación, ampollas, edema y quemaduras. Así mismo, producen llagas en mucosas externas y afectación en vías respiratorias al entrar en contacto con éstas.(2)

Las primeras referencias en cuanto al uso de estos compuestos con fines bélicos se remontan a los tiempos de los griegos y los romanos. Durante el S.XIX, los rápidos avances en la química y el desarrollo de la industria química fueron acompañados de graves accidentes con peligrosos componentes químicos. La “gran puesta en escena” de estos componentes como armas químicas tiene lugar en la I Guerra Mundial. Tras ella, los esfuerzos por desarrollar más y mejores armas químicas son patentes en la sociedad; incluyendo el desarrollo de peligrosas toxinas e incluso microorganismos para poder ser usados en guerra.

Durante la II Guerra Mundial, análogos de la mostaza sulfurada fueron diseñados y bautizados con el nombre de mostazas nitrogenadas. Tenían propiedades químicas similares a las anteriores, pero con mayor potencia bélica. Como hemos dicho antes, existen 3 tipos: HN1, HN2 y HN3. (3)

1.2 Mecanismo de acción de SM y NM: toxicológico, apoptosis, necrosis, necroptosis, toxicidad en el DNA.

I. Toxicológico.

Los compuestos de mostaza, bien sea sulfurados o nitrogenados, atacan primero a los ojos, la piel y los pulmones. Son compuestos vesicantes, que causan graves insuficiencias respiratorias, abrasiones a nivel de piel y ojos (aparición de ampollas, sarpullidos, etc.)

Si hablamos a nivel celular, distinguimos 2 mecanismos de acción por los cuales las mostazas producen daño: la alquilación del DNA y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).(4)

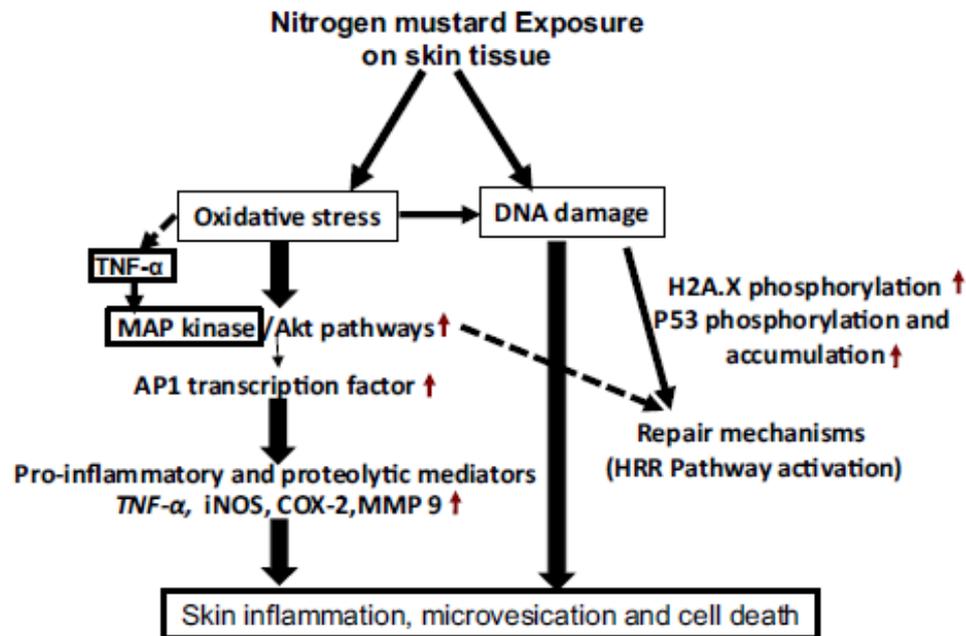


Figura 1: Mecanismo de acción de NM. Kumar, 2015.(5)

Mientras que las propiedades vesicantes han sido totalmente comprobadas en piel humana, los mecanismos por los cuales este agente induce la formación de ampollas no están todavía claros. Los estudios realizados por el grupo de Smith en 1999 mostraron que los eventos tempranos que ocurren en las lesiones de piel inducidas por SM incluyen una alteración de las células basales epidérmicas e inflamación progresiva en la membrana basal. (6)

Para determinar la dosis de SM a la cual puede ocurrir el daño epitelial, se llevaron a cabo experimentos preliminares para establecer el tiempo de exposición necesario para que ocurra el daño celular. Greenberg y colaboradores expusieron injertos durante distintos tiempos (2, 5, 8 y 10 minutos). Tanto 6 como 24 horas después de la exposición, analizaron la disposición del tejido mediante una tinción en hematoxilina-eosina.

Los resultados demostraban que a las 6 horas, existían alteraciones confinadas a un pequeño número de células en la capa basal, mientras que las capas suprabasales mostraban una disposición normal. Además, no se apreciaban alteraciones morfológicas o vesicantes. Llegaron a la conclusión de que la SM producía un daño al subconjunto de células de la capa basal.

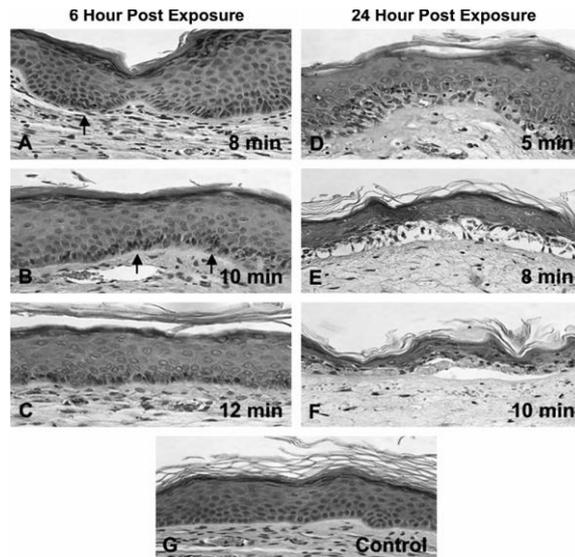


Figura 2: Aspecto del injerto tras la exposición a SM durante distintos tiempos. Greenberg, 2005.

Las células examinadas a las 24 horas mostraban mucho más daño que las anteriores. Estos cambios fueron vistos tras tiempos de exposición que eran incluso menores (5 minutos). Además, algunas células basales mostraban degeneración y comenzaban a separarse de la membrana basal. Para tiempos mayores de exposición (8, 10 minutos), las áreas de daño fueron caracterizadas por la presencia de células acantolíticas y la completa separación a lo largo de la membrana basal, para formar definidas microvesículas. En definitiva, se podía apreciar que la cantidad de daño incrementaba dependiendo de la dosis, sobre todo en las células suprabasales, y producía un adelgazamiento del epitelio. (6)

Si nos centramos en la NM, este compuesto desencadena la respuesta inflamatoria, microvesicante y muerte celular por apoptosis. Según Kumar y colaboradores (2015), la exposición de células de piel de ratón causaba la fosforilación de las proteínas p53 y H2A.X, así como la acumulación de p53, lo cual indica daño a nivel de DNA. También induce la activación de la proteína MAPkinasa, ERK1/2, JNK1/2 y p38, y activa la transcripción del factor AP1. Se induce también la expresión de factores proinflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX2), la óxido nítrico sintasa y el factor α de necrosis tumoral. (5)

II. Apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada (PCD) es el proceso por el cual una célula desencadena una cadena de transducción de señales que acaba desembocando en la muerte. En el proceso de apoptosis, las células comienzan a contraerse, conservando la integridad total de la membrana plasmática: condensan el núcleo, que puede acabar fragmentándose siguiendo un patrón característico, exponen al exterior residuos de fosfatidilserina, y acaban siendo fagocitadas por los

macrófagos antes de estallar y verter su contenido al exterior celular. Con ello evitamos que se produzcan reacciones de inflamación y similares.

Existen dos vías apoptóticas: intrínseca y extrínseca. En la primera de ellas, también conocida como vía mitocondrial, la célula decide iniciar el proceso de muerte celular debido a una falta de estímulos internos que la hacen incompatible con la vida: falta de nutrientes, de factores de crecimiento, etc. Comienzan a salir de la mitocondria moléculas de citocromo C, que interaccionan en el citosol con la proteína Apaf-1 en proporción 7:7, dando lugar al complejo conocido como apoptosoma. Este apoptosoma se encarga de activar la ruta de las caspasas: caspasas 9 y 3 son las que intervienen en esta ruta.

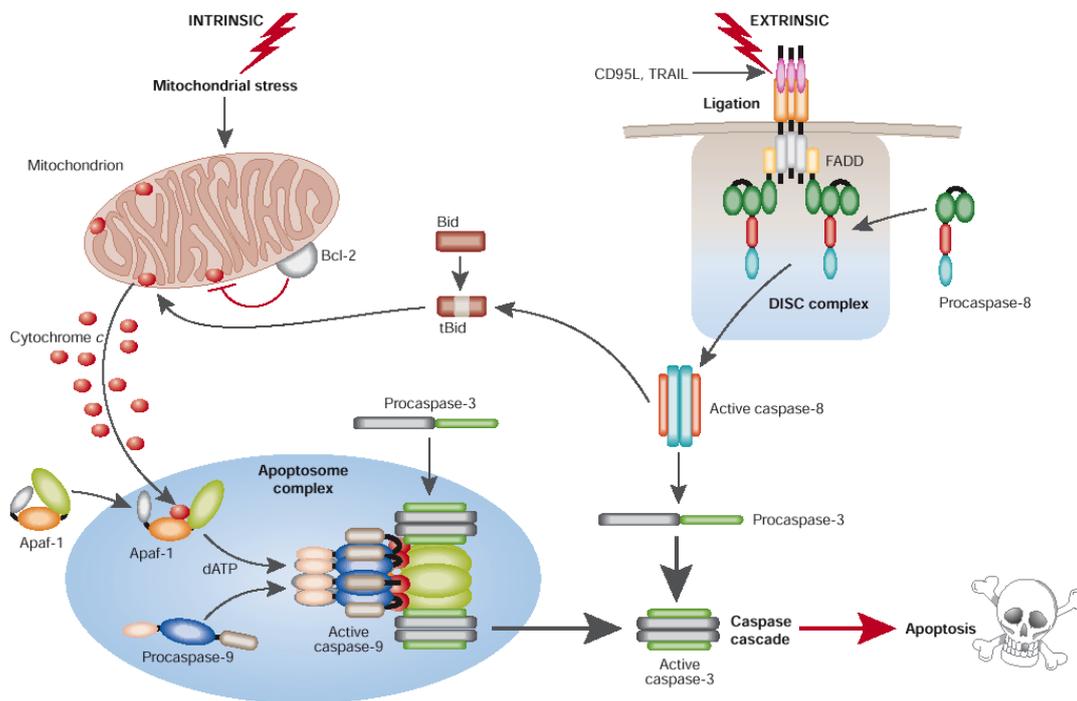


Figura 3. Esquema que representa las rutas apoptóticas intrínseca y extrínseca, y la relación existente entre ellas. (Poon IK, 2010).

En el segundo caso, el desencadenante son factores externos que provocan una serie de daños irreparables por la célula: excesiva cantidad de ROS en el medio, radiaciones ionizantes, etc. La célula apoptótica interacciona con un ligando extracelular, como Fas-L o Apo-1, que son los que inducen la ruta extrínseca. Ambas vías están conectadas mediante la proteína t-Bid.

Existen proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. En una situación basal, se encuentran en equilibrio o predominan las anti-apoptóticas. Cuando se rompe ese equilibrio y predominan las pro-apoptóticas, es cuando se desencadena el proceso apoptótico.

Así mismo, también podemos dividir la apoptosis en temprana y tardía. En la apoptosis temprana ocurren una serie de eventos que ponen en marcha el programa de muerte celular: exposición a la parte exterior de la membrana

plasmática de la fosfatidilserina (PS) o la glicoproteína CD14. Suele afirmarse sobre la apoptosis temprana que es un proceso tolerógeno (sustancia que induce la tolerancia inmunogénica y que no desencadena inflamación), mientras que en la apoptosis tardía y en la necrosis sí se observan procesos de inflamación.

Por su parte, las células apoptóticas tardías se diferencian de las tempranas en que su membrana plasmática se vuelve permeable. Además, la exposición directa de las células viables a daños externos, como las temperaturas extremas, o daños mecánicos/químicos, puede producir el paso de una apoptosis temprana a una tardía.(7)

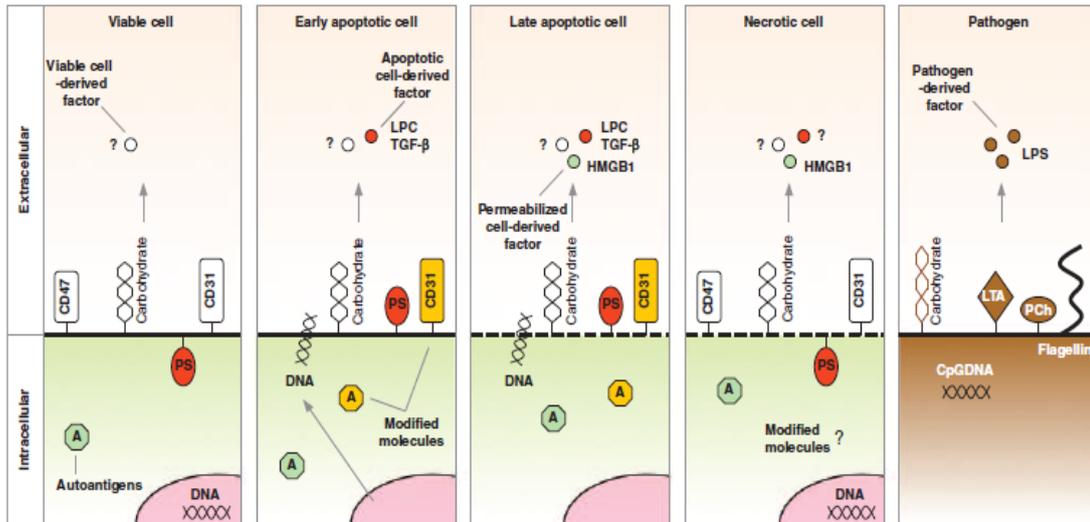


Figura 4. Distintos tipos de muerte celular.

III. Necrosis.

El proceso de necrosis ocurre generalmente en respuesta a estreses físico-dérmicos, incluyendo hipoxia, isquemia, hipoglucemia o cambios extremos de temperatura. También se ha visto que es un proceso imprescindible para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis; por ejemplo, durante la homeostasis, la necrosis de los condrocitos facilita el crecimiento longitudinal de los huesos. Por su parte, la necrosis de las células epiteliales del colon favorece el desarrollo del intestino grueso. Si bien es cierto que, de normal, la necrosis está relacionada con patologías como la neurodegeneración o infecciones producidas por patógenos.

Entre los cambios metabólicos que ocurren durante la necrosis, tenemos el descenso en el aporte de oxígeno a la célula. Ello conlleva una inhibición de la fosforilación oxidativa, y en consecuencia, una inhibición de la producción de ATP en la mitocondria. Por tanto, se produce un descenso en los niveles de ATP intracelulares, y un aumento en los niveles de fosfato libre. Para poder mantener los niveles normales de ATP, la célula introduce la glucosa (procedente de los restos de glucosa y del glucógeno almacenado) en la glucólisis anaeróbica. Se produce ácido láctico como producto, lo cual conlleva un descenso en el pH intracelular. Para contrarrestar este descenso del pH, la célula activa el sistema cotransporte Na^+/H^+ : saca protones de la célula y entran iones sodio. El Na^+ se acumula en el interior. Este acumulo de sodio en el interior no se puede subsanar: la vía normal de salida de sodio de la célula es la bomba Na^+/K^+ dependiente de

ATP; como no tenemos ATP suficiente en el interior, esta bomba no es activa y el sodio se acumula. Otro de los mecanismos que posee la célula para equilibrar la concentración de sodio en el interior es el cotransporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, por el cual el sodio sale al exterior y el calcio entra. Los niveles de calcio en el citosol aumentan, debido tanto a la entrada del calcio extracelular como a la salida de calcio del retículo endoplásmico, lo cual acaba alterando el funcionamiento normal de la mitocondria.

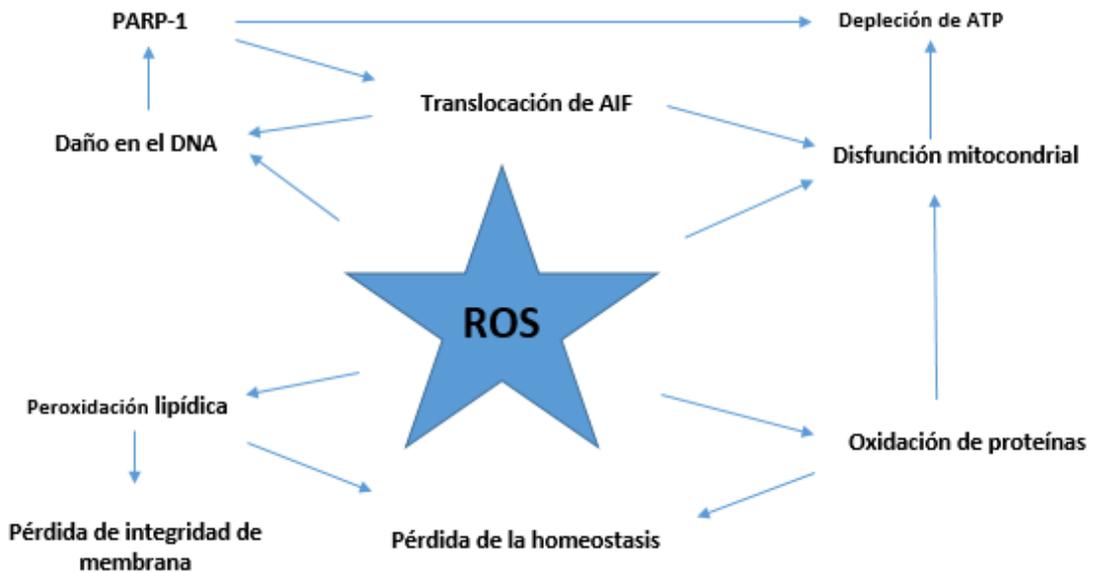


Figura 5: Cascada de reacciones que tienen lugar en la necrosis.

A su vez, otra de las vías que tiene la célula para poder restaurar niveles normales del pH es reintroducir el oxígeno en sus rutas metabólicas. Ello acaba produciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En resumen, se altera la concentración de metabolitos intracelulares muy importantes para la fisionomía de la célula. (8)

IV. Necroptosis.

La necroptosis es el punto intermedio entre la apoptosis y la necrosis. Podríamos definirla como el punto de partida que acaba desembocando en la necrosis. Para iniciarse la necrosis, es necesario que se activen una serie de quinasas, como RIPK1 o RIPK3, que acaban produciendo la desintegración de la membrana mitocondrial, la lisosomal y la plasmática.

La necroptosis participa en la patogénesis de las enfermedades, incluyendo las lesiones isquémicas, neurodegenerativas y las infecciones virales.

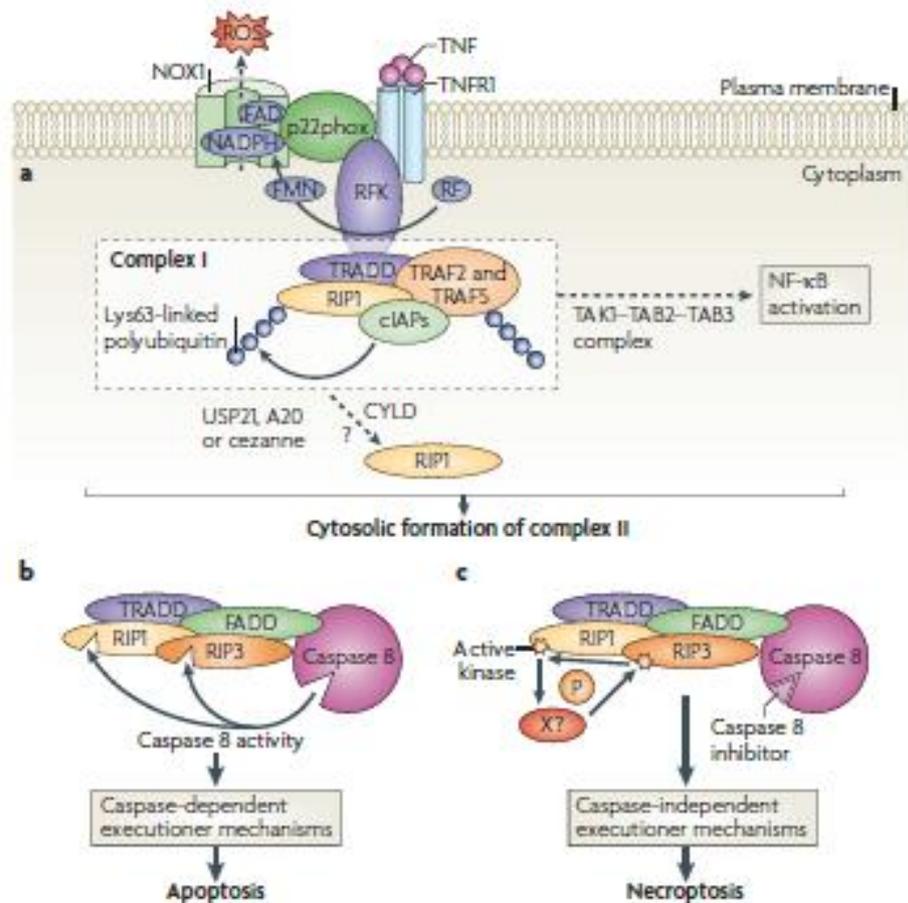


Figura 6: Proceso de activación de la necroptosis.

Como se puede apreciar en la imagen, la caspasa 8 juega un papel fundamental en el hecho de que la célula tome un camino u otro. En el caso de la apoptosis, las kinasas RIP1 y RIP3 se encuentran inactivas, de tal manera que la caspasa 8 es activa y la célula muere por la vía apoptótica. Por su parte, en la necroptosis, las kinasas RIP1 y RIP3 se activan, lo que conlleva la inactivación de la caspasa 8. Al estar inhibida la caspasa 8, se bloquea la ruta apoptótica y la célula toma el camino de la necroptosis. (9).

V. Daño a nivel de DNA.

Estos compuestos tienen capacidad alquilante, es decir, transferir grupos alquilo al DNA, alterando su estructura y provocando mutaciones. Estos dos compuestos alquilantes inducen la apoptosis. Esta apoptosis depende del tiempo y de la dosis. Además, dosis bajas inducen la apoptosis, mientras que dosis altas inducen la necrosis.(10)

Por parte de las mostazas sulfuradas, su capacidad alquilante reside en la formación de intermedios "ion sulfonio", mientras que si hablamos de la mostaza nitrogenada, esto se debe a la formación de iones amonio.

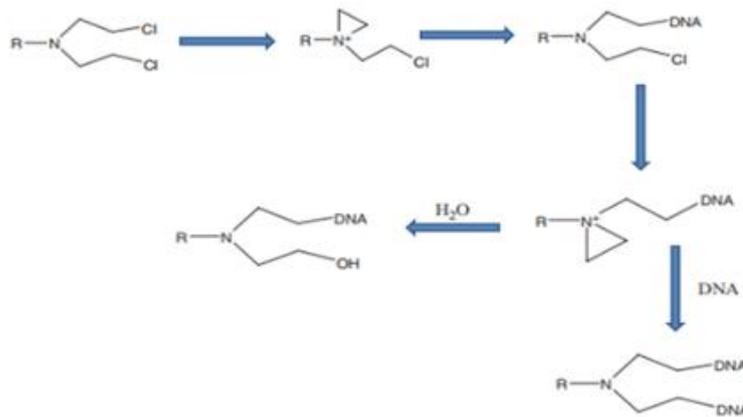


Figura 7: Proceso de alquilación del DNA por acción del gas mostaza nitrogenado.

También son capaces de generar especies reactivas de oxígeno y radicales libres, como el peróxido de hidrógeno o el anión superóxido. Todos ellos acaban produciendo alteraciones celulares que dan lugar a la muerte celular.

Como consecuencia de la interacción de los compuestos de mostaza con los elementos celulares (DNA, proteínas), se producen daños que acabarán produciendo la muerte de la célula. La maquinaria de reparación celular no es capaz de reparar esos daños, y aparecen una serie de señales que dan lugar a la apoptosis. Destacar que, a bajas concentraciones de agente alquilante se desencadena la apoptosis, mientras que a altas concentraciones es frecuente la muerte por necrosis.

1.3 Lesiones por exposición a agentes mostaza: oculares, cutáneas, aparato respiratorio, daño a nivel sistémico.

Las lesiones dependen de varios parámetros: el tipo de mostaza empleado, la dosis, el tiempo de exposición, etc. En este trabajo, además, combinaremos la acción de los gases mostaza junto con la quercetina, molécula de origen vegetal, para comprobar el efecto protector y/o curativo de esta molécula.

El daño es general en todos los tejidos, pero nosotros nos centraremos en las lesiones cutáneas, pues el trabajo está realizado con fibroblastos, que son células cutáneas.

Según especifica Kehe, en su publicación del año 2005, las lesiones orgánicas producidas por los gases mostaza son (11):

- A nivel ocular: los ojos son el órgano más sensible a la exposición por gas mostaza. En comparación con la piel, el periodo de latencia es menor. La dosis límite (LD50) de SM es de 100 mg·min/m³. A esa dosis, los síntomas oculares como la conjuntivitis, la arenilla debajo del párpado y el lagrimeo ocurren entre 4 y 12 horas después de la exposición. A dosis mayores, aparece edema corneal con discapacidad visual, fotofobia o el edema de los párpados aparecen entre 3 y 12 horas después de la exposición. Cualquier dosis por encima de los 400 mg·min/m³

resulta en daño severo corneal con ulceraciones y oclusión de los vasos sanguíneos conjuntivales, debido al daño endotelial.

- A nivel cutáneo: Tres factores determinan la susceptibilidad de la piel a la mostaza: la temperatura y humedad de la piel son los factores más importantes que incrementan el daño a nivel de este órgano. El comienzo de los síntomas depende del tiempo de exposición a la mostaza y de la concentración de la misma. Los queratinocitos de rápida proliferación, situados en la lámina basal, son la diana principal de la mostaza sulfurada. Por tanto, esta lámina basal muestra mayores daños que cualquier otro tejido: la formación de ampollas ocurre entre la epidermis y la dermis. Otras ampollas, denominadas tardías, pueden aparecer algunas semanas más tarde sin ningún contacto adicional con la mostaza. Otro efecto importante es el bronceado que sufre la piel tras la exposición, que puede persistir en el área afectada durante décadas.

- A nivel respiratorio: La inhalación de mostaza sulfurada afecta fundamentalmente a las vías respiratorias superiores. Causa rinorrea, pérdida de gusto y olfato y secreciones lacrimales. También puede causar, a niveles más inferiores, traqueobronquitis y tos dolorosa.

- A nivel sistémico: Los síntomas son similares a los observados en pacientes de radio- y quimio-terapia. La exposición a bajas dosis de mostaza puede provocar dolor de cabeza, náuseas, vómitos y pérdida de apetito. Dosis más altas pueden causar daño a nivel gastrointestinal y de médula ósea. Ello puede desembocar en inmunosupresión, leucopenia, diarrea, etc.

1.4 Tratamiento de las lesiones y antídotos de agentes de mostaza.

Actualmente no existen antídotos frente a estas intoxicaciones. Lo que se busca es aliviar los síntomas y estimular la reepitelización y la cicatrización. Se recomienda reventar las ampollas formadas en la piel, y después colocar un vendaje con antisépticos locales.

A nivel celular, el tratamiento se basa en agentes antioxidantes y antiinflamatorios, inhibidores de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y de la metaloproteínasa, y reguladores de la reparación del daño en el DNA. (12)

En el caso de que la mostaza afecte a los ojos, se recomienda lavar con abundante agua y no aplicar antisépticos locales, sino sistémicos, para evitar las lesiones a nivel corneal. Si existen lesiones en la córnea, deben administrarse midriáticos para prevenir las posibles adherencias entre el iris y la córnea.(2)

1.5 Aplicaciones terapéuticas de los compuestos de mostaza.

Se está estudiando la posibilidad de utilizar mostaza nitrogenada como agente antitumoral. En estas terapias, se emplea la mostaza nitrogenada junto con la molécula de azobenceno, en forma de N,N-bis(2-cloroetil)-1,4-bencenodiamina. Ello nos permite utilizar la mostaza nitrogenada como un agente alquilante del DNA de forma más o menos dirigida, ampliando la ventana terapéutica.

El mecanismo se basa en dirigir la acción del fármaco contra la mitocondria. Los tumores, en condiciones de hipoxia, desencadenan los procesos de

angiogénesis y/o vasculogénesis (no son incompatibles). En dichas condiciones, el enlace azo presente en el compuesto se reduce, produciendo un acoplamiento cruzado en el DNA mitocondrial y un daño alquilante. Finalmente, la célula muere.(13)

Así mismo, se ha estudiado el efecto de la mostaza nitrogenada en células T malignas, tanto en enfermedades inmunológicas como en linfomas cutáneos. Tiene efectos tanto en linfomas de Hodgkin como en los non-Hodgkin. (14)

En 2015, Zhao y colaboradores estudian la mostaza nitrogenada como agente antitumoral. Son conscientes de que la elevada toxicidad causada en el huésped, así como la resistencia al medicamento que se desarrolla, son puntos negativos muy importantes a tener en cuenta. Intentan desarrollar un fármaco complejo, que esté formado por la mostaza nitrogenada asociada a una molécula que se una covalentemente al DNA, para aumentar la selectividad y reducir la toxicidad. La molécula escogida es la hidroxiantraquinona, sustituida en posición 1 por una molécula de mostaza nitrogenada. Estudiaron su citotoxicidad en 4 líneas celulares: MDA-MB-231, HeLa, MCF-7 y A549, y mostraba una excelente especificidad frente al cáncer de mama.(15)

En otro estudio, realizado por Cheloufi y colaboradores (2016), testaban la potencia de la mostaza nitrogenada como agente antitumoral en linfoma, mieloma, leucemia y carcinoma de células epidérmicas, todos ellos por MTT. Lo comparan con el clorambucil, medicamento antitumoral utilizado típicamente frente a los distintos tipos de cáncer y actualmente, de forma específica frente a la leucemia linfática crónica; y demuestran que la potencia de la mostaza nitrogenada es mayor que la de dicho fármaco. (16)

Mangerich y su grupo (2016) estudian la formación de polímeros de ADP-ribosa (poli-ADP-ribosilación, PARP) en queratinocitos, y el uso de inhibidores de dicho proceso como tratamiento frente a las mostazas. Pretenden diseñar un protocolo en el que se consiga actuar específicamente frente a las células tumorales regulando el proceso de poli-ADP-ribosilación mediante el uso de inhibidores. (17)

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2.1 Planteamiento:

- Existen una gran variedad de compuestos tóxicos cuyos efectos adversos se basan en la producción de radicales libres, de la misma manera que lo hacen los agentes de mostaza. Así mismo, tanto la mostaza nitrogenada como la sulfurada son capaces de inducir daño y muerte celular alterando la fluidez de la membrana.
- En este trabajo se pretende estudiar el efecto tóxico de la mostaza nitrogenada y sulfurada sobre fibroblastos humanos, para comprender el tipo de muerte que desencadena cada una de ellas mediante citometría de imagen.
- Para calcular las concentraciones tóxicas del 50% (IC50), se ha utilizado la técnica de MTT.

2.2 Objetivos:

- Evaluar y cuantificar la dosis letal 50 de la mostaza sulfurada y la nitrogenada en fibroblastos humanos.
- Tratamiento con dosis cercanas a la LD50 para cuantificar el tipo de muerte inducido por la exposición a cada mostaza.
- Determinación del mecanismo de acción de cada compuesto según el tipo de muerte celular que desencadena su administración.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha trabajado con cultivo primario de fibroblastos humanos. Las células se siembran en frascos "Flask" de 75 cm², y se mantienen hasta confluencia. Cuando el número de células en el frasco es muy elevado, son tripsinizadas y sembradas en placas de 96 y de 6 pocillos, donde se han realizado los experimentos.

3.1 Reactivos

Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento de la línea celular es DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), el cual contiene glucosa al 1% y rojo fenol, que nos permite comprobar si el medio está agotado o no en función del color que adopte. El medio debemos suplementarlo, además, con los siguientes componentes:

- i. Suero fetal bovino (SFB): aporta factores de crecimiento esenciales para el desarrollo del cultivo (no los aporta el DMEM), además de proteínas para facilitar la adhesión de las células a la superficie del frasco. También aporta lípidos, vitaminas o minerales.
- ii. Antibióticos: penicilina y estreptomina al 1% en volumen. Con ello buscamos evitar posibles contaminaciones bacterianas que pudiesen surgir a lo largo del cultivo.

Solución PBS (Phosphate Buffered Saline):

Solución salina amortiguada por fosfatos; permite regular el pH en procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentraciones de iones son muy semejantes a la del líquido extracelular de los mamíferos. Es isotónica e inocua para las células. Tiene diferentes usos en nuestro cultivo: lavado de células tanto en frascos como en pasos previos a la centrifugación; así como medio disolvente para preparar las disoluciones de mostaza.

Tripsina EDTA:

La tripsina es una enzima de origen porcino que se emplea para despegar las células adheridas, mientras que el EDTA es una sal sódica del ácido etilendiaminotetracético que sirve para quelar los iones calcio y magnesio. Al estar suplementado el DMEM con SFB, las proteínas del suero fetal actúan como bloqueantes de la tripsina. Por ello, es fundamental lavar con PBS una vez retirado el medio del frasco antes de añadir la tripsina. Con ello, conseguimos que la actividad de la tripsina sea máxima y reduciremos el tiempo necesario para despegar las células del frasco.

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT):

Comercializado como un reactivo en polvo, en este estudio trabajamos con disoluciones en agua destilada a una concentración de 5 mg/mL. Permite determinar la toxicidad de cualquier compuesto, en nuestro caso las mostazas. En estado líquido adquiere un color amarillento: es internalizado por las células vivas,

llevado hasta la mitocondria y reducido a cristales de color azul. La cantidad de cristales será proporcional a la cantidad de células vivas del pocillo (18)

Isopropanol:

Permite solubilizar los cristales de MTT formados, para después poder leer las absorbancias de los pocillos de la placa de 96 con el lector "Eon".

Anexina V:

Es una proteína incapaz de atravesar la membrana plasmática, y que tiene la capacidad de interactuar con la fosfatidilserina, que es un tipo de fosfolípido que se encuentra siempre en la parte interna de la membrana plasmática y que se expone excepcionalmente al exterior cuando la célula entra en apoptosis. Al fusionar la anexina con un fluorocromo (isotianato de fluoresceína FITC), podremos detectar en que momento la fosfatidilserina se expone en el exterior de la membrana. El FITC se excita con 488 nm y se recoge a 525 nm.

Ioduro de propidio:

Es una molécula impermeable, incapaz de penetrar en las células cuando estas mantienen la membrana plasmática íntegra. Se une estequiométricamente al DNA y para ello, deberá atravesar la membrana plasmática y entrar en el núcleo. Sólo serán capaces de interactuar con el DNA aquellas células que tengan perforada o alterada la membrana celular, como ocurre en las células necróticas o apoptóticas tardías, por eso se utiliza para analizar la mortalidad celular. Este fluorocromo se excita a 488 nm y la fluorescencia se recoge a 575 nm.

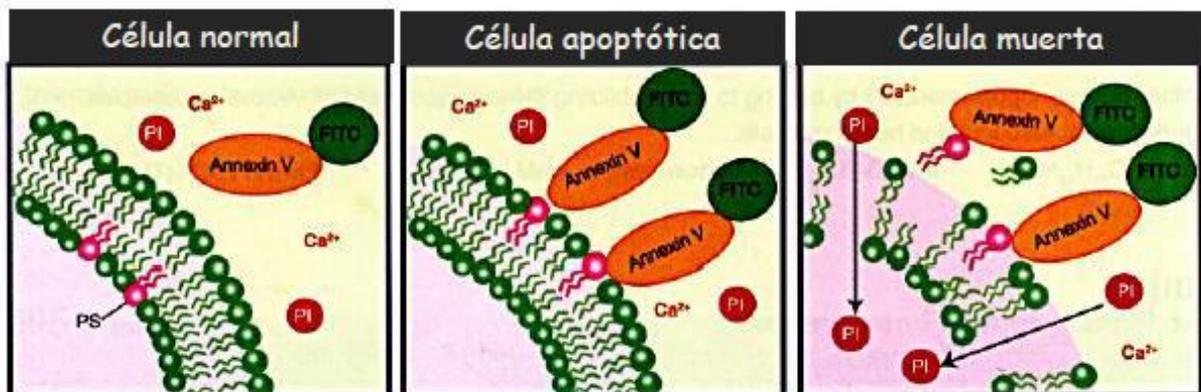


Figura 8: Interacción de anexina V+FITC con fosfatidilserina (PS). También aparece reflejado el mecanismo de acción del ioduro de propidio (IP).

3.2 Materiales fungibles y equipos

- Frascos "Flask" de 75 cm² tipo Falcon.
- Tubos cónicos de 50 mL.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Gradillas.
- Micropipetas de 20, 100, 200 y 1000 μ L.
- Puntas de plástico.
- Pipetas de vidrio.
- Estufa a 37°C con CO₂ al 5%.
- Nevera y congelador.
- Cabina de flujo laminar estéril.
- Placas de 6 y 96 pocillos.
- Centrífuga.
- Agitador de placas.

Espectrofotómetro de microplacas termostatzado “Eon”

Utilizado como lector de las microplacas de 96 pocillos. Permite medir las absorbancias de los pocillos en un rango desde los 200 a los 999 nm, en incrementos de 1 nm. En este estudio, el lector se requiere para determinar el IC50 de los compuestos de mostaza en conjunto con el MTT. En ese caso, las longitudes de onda empleadas son 550 y 690 nm.

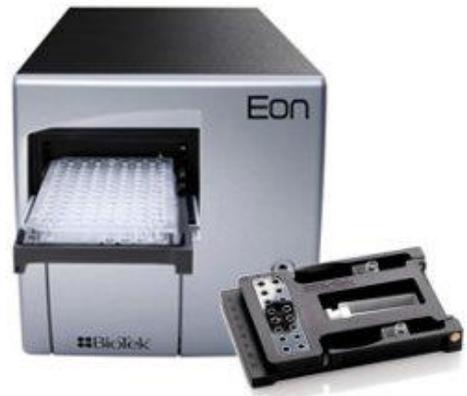


Figura 9: Lector “Eon” (SAI Citómica, Universidad de Zaragoza).

Sistema morfocitométrico ImageStream X AMNIS

Combina la captura microscópica de imágenes a alta velocidad con la citometría de flujo, para crear una plataforma estadísticamente sólida, ofreciendo una amplia gama de nuevas aplicaciones de análisis celular.



Figura 10: AMNIS ISX (SAI Citómica, Universidad de Zaragoza).

Dispone de:

- 5 láseres
- 12 canales de imagen
- 3 objetivos de microscopía de 20, 40 y 60 aumentos
- Campo claro que permite utilizar el espectro lumínico completo para conseguir la imagen deseada
- Sistema de termostatzación para mantener las células a una temperatura adecuada mientras se realiza el análisis.

Algunas de las determinaciones realizadas son:

- Estudios de apoptosis: ciclo celular, morfología celular/nuclear, compactación y fragmentación celular.
- Estudios de viabilidad/mortalidad celular.
- Estudios de estrés oxidativo
- Potencial de membrana mitocondrial.

Para las determinaciones de citometría de imagen, debemos seleccionar y calibrar los láseres previamente, establecer los canales de fluorescencia y ajustar la intensidad de luz para no saturar la fluorescencia celular. Los datos del citómetro deben ser tratados después para poder obtener la información.

3.3 Métodos

Trypsinización

Una vez las células se encuentran confluyentes, tendremos que separarlas del frasco y podremos hacer varias cosas con ellas:

- Subcultivar en nuevos frascos, para ir manteniendo el cultivo.
- Congelar las células en nitrógeno líquido, a -196°C .
- Sembrar placas de 6 y 96 pocillos para experimentos posteriores.

Para una correcta tripsinización de las células, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Retirar el medio de cultivo del frasco. Lavar con 7-8 mL de PBS estéril para asegurarnos que hemos retirado completamente el medio de cultivo.
2. Una vez retirado el PBS, añadir 5 mL de tripsina atemperada (37°C).
3. Incubar el frasco durante 4 minutos en estufa a 37°C , las condiciones idóneas para que actúe la tripsina.
4. Pasados los 4 minutos, observar al microscopio que las células se encuentran despegadas (su morfología varía de estar adheridas a la placa a estar sueltas). Si todavía no estuviesen sueltas, se pueden dar ligeros golpes en la placa para favorecer el despegue total.
5. Bloquear la reacción de la tripsina. Añadir tanta cantidad de DMEM suplementado con SFB como tripsina hayamos añadido (proporción 1:1). También se puede añadir únicamente SFB en las mismas proporciones, pues realmente son las proteínas presentes en el SFB las que se encargan de parar la reacción.
6. Traspasar todo el contenido líquido a un tubo Falcón de 50 mL.
7. Centrifugar, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en PBS, para darle un lavado.
8. Repetir la operación de centrifugado, pero esta vez resuspender el pellet en DMEM suplementado con SFB y antibiótico. Resuspender en tantos mL de DMEM suplementado como mL necesitemos para sembrar posteriormente las placas.
9. Sembrar las placas:
 - a. Para placas de 6 pocillos: 2 mL por pocillo.
 - b. Para placas de 96 pocillos: 100 μL por pocillo.

Tinción con fluorocromos.

Una vez que tenemos nuestra muestra preparada para pasarla por el citómetro, tenemos que añadir los fluorocromos y dejar incubando en oscuridad durante 15 minutos. El protocolo a seguir es el siguiente:

1. Preparar el tampón de unión de Anexina V: 10 mM HEPES/NaOH ($\text{pH} = 7.4$) 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 .
2. Inducir la apoptosis de las células. Se debe preparar un control negativo que contenga células no tratadas, que sirva para definir el nivel basal de células en apoptosis, necrosis o células muertas.
3. Tripsinizar las células de los pocillos tras el tratamiento y lavado con PBS.
4. Resuspender en un tampón de unión de Anexina V 1X a una concentración de 106 células/mL.
5. Añadir 5 μL de Anexina V-FITC y 10 μL de yoduro de propidio (IP).
6. Incubar las células a temperatura ambiente durante 15 minutos (25°C) en la oscuridad.
7. Después del periodo de incubación, añadir 400 μL de tampón de unión a Anexina V. analizarlo por citometría de flujo antes de 1 hora.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

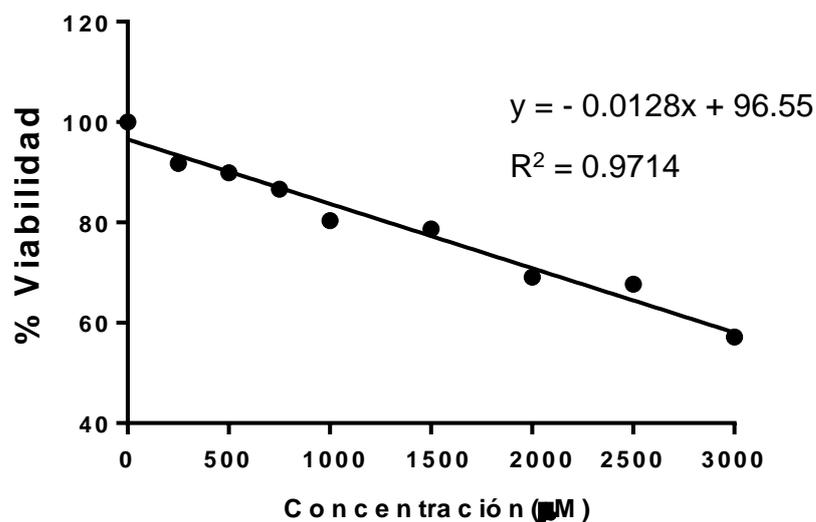
En primer lugar, se determinó la dosis letal 50 (IC50) tanto de la mostaza sulfurada como de la nitrogenada. Para ello, se empleó el método de MTT en placas de 96 pocillos: los fibroblastos son expuestos durante 30 minutos a distintas concentraciones de mostaza.

Es importante destacar que los pocillos control (sin tratamiento) son protegidos durante el tiempo que dura la exposición al compuesto. Se comprobó que la mostaza es capaz de evaporarse e inducir muerte en los pocillos control, de ahí la necesidad de protegerlos.

4.1 Determinación del IC50.

Mostaza nitrogenada.

Tras exponer los fibroblastos a concentraciones de mostaza nitrogenada durante 3 horas, en un rango de 250-3000 μM , los resultados de viabilidad celular se recogen en la siguiente gráfica:



Gráfica 1: Cálculo de la dosis letal 50 para la mostaza nitrogenada.

A partir de los datos obtenidos en esta primera gráfica, se extrapola, una vez calculada la recta de regresión $y = -0.0128x + 96.55$; el valor del IC50 de 3637 μM . Este valor calculado se encuentra por encima de las concentraciones estudiadas, pero muy próximo y con una recta con $R=0,9714$. Con este resultado, se diseñaran proximos experimento donde se evaluará su efecto por citometría de imagen dándonos idea además del tipo de muerte celular por el que se produce.

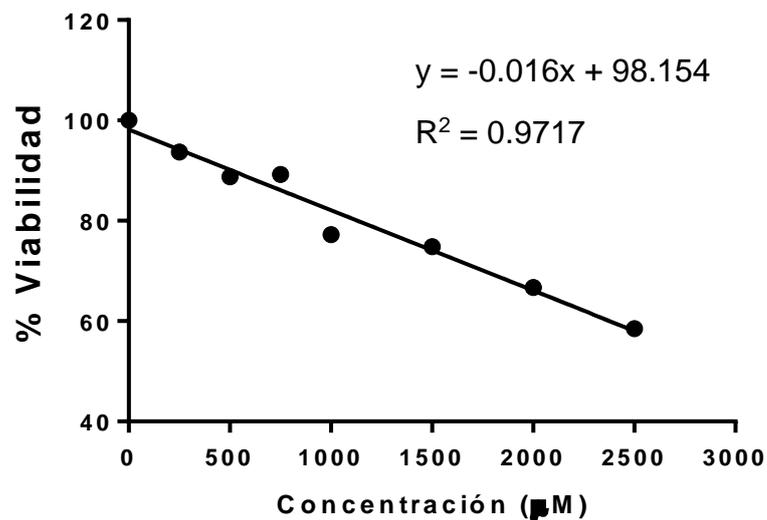
Partiendo de placa de 6 pocillos, 3 de ellos son utilizados como control, y otros 3 son tratados con mostaza nitrogenada a 2000 μM . Se pretende observar el tipo de muerte celular mediante la citometría de imagen.

Según Kumar y colaboradores (2015), los cuales estudian diferentes mecanismos de inflamación y fosforilación de proteínas proapoptóticas, para una concentración de 3.2 mg. de NM en 200 μ L de acetona los efectos comienzan a hacerse notables a las 24 horas de exposición. A las 72 y a las 120 horas, los efectos proinflamatorios y vesicantes se ven acentuados. (5)

Por su parte, Inturi y su grupo (2014) observan que, exponiendo un cultivo de 10^4 células a una concentración de 0.75 μ M, los efectos tóxicos son máximos a las 16 horas. Por tanto, podemos deducir de todos ellos, así como de nuestro experimento, que debemos exponer las células a una determinada concentración y medir los resultados dejando pasar al menos 12-16 horas, ya que sus efectos no son inmediatos.(19)

Mostaza sulfurada

El procedimiento es exactamente idéntico que para el caso de la mostaza nitrogenada. El rango de concentraciones en este caso es 250-2500 μ M, y los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 2.



Gráfica 2: Cálculo de la dosis letal 50 para la mostaza sulfurada.

A partir de la recta de regresión (gráfica 2): $y = -0.016x + 98.154$; el valor del IC50 calculado para la mostaza sulfurada es de 3010 μ M. Al igual que con la nitrogenada, conociendo dicho dato se diseña el siguiente experimento para observar el tipo de muerte celular. En este caso, también se trabaja con placas de 6 pocillos: 3 pocillos son tomados como control, mientras que los otros 3 son tratados con mostaza sulfurada 4000 μ M durante 30 minutos.

Kehe y colaboradores (2005) comprueban que la mostaza sulfurada produce efectos tóxicos a concentraciones mucho menores (2.3 μ M) pero utiliza para sus medidas tiempos de exposición mayores (12-24 horas). (11)

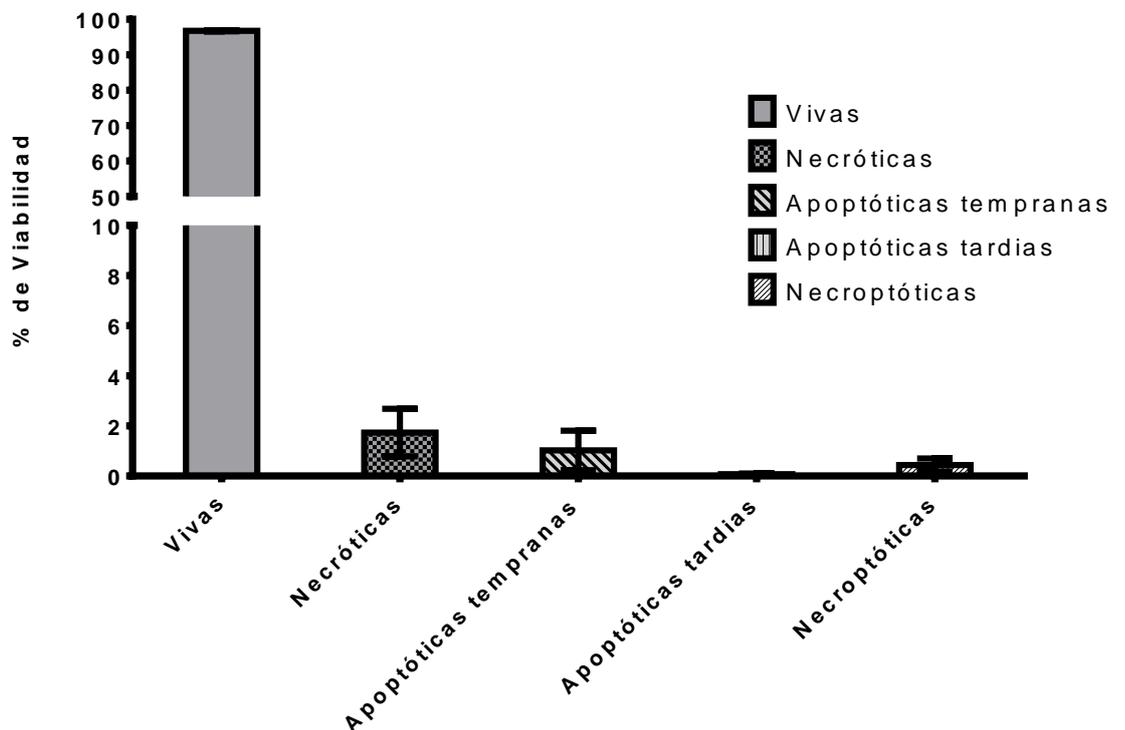
4.2 Estudio del tipo de muerte celular mediante citometría de imagen.

Para determinar el tipo de muerte celular, se trabaja con 3 grupos de fibroblastos: control, tratados con NM y tratados con SM.

Fibroblastos control

En primer lugar, se estudia el tipo de muerte en la población control, para poder determinar cómo mueren las células tratadas. Los fibroblastos control han sido sembrados en las mismas condiciones que los tratados, y todos proceden del mismo cultivo primario.

Los resultados obtenidos se recogen en la gráfica 3.

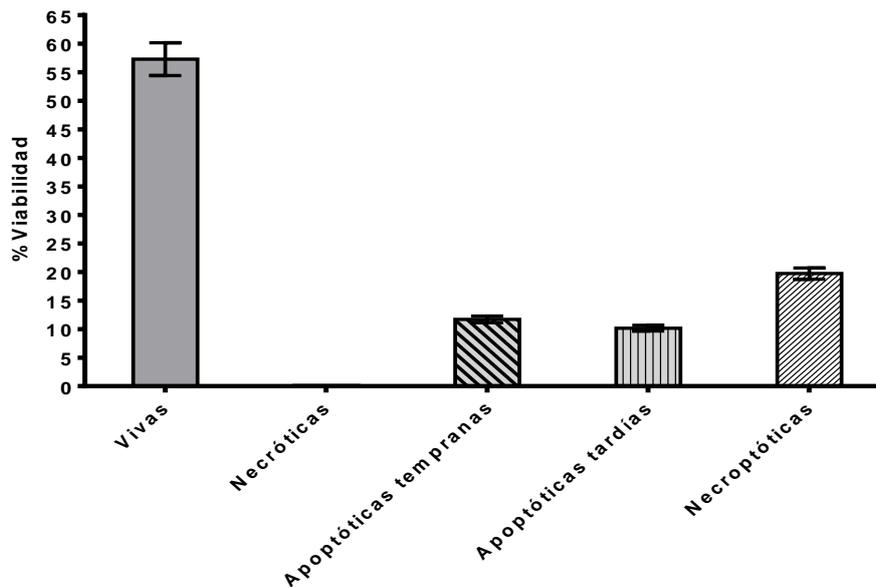


Gráfica 3: Estudio de las 5 poblaciones de fibroblastos control.

En este experimento, los resultados afirman que en ausencia de tratamiento, el 96% de las células viven. Del 4% de células muertas, únicamente las necróticas y las apoptóticas tempranas suponen un número representativo (1.73% y 1.02% respectivamente).

En base a estos resultados, se pretende conocer el mecanismo por el cual ambos tipos de compuestos de mostaza son capaces de desencadenar daño a nivel celular y muerte.

Fibroblastos tratados con mostaza nitrogenada



Gráfica 4: Estudio de las 5 poblaciones en fibroblastos tratados con 2000 μM de mostaza nitrogenada durante 30 minutos.

Observando la gráfica 4, se llega a la conclusión de que a una concentración de 2000 μM de mostaza nitrogenada, viven un 57% de células (valor esperado, pues la concentración a la que aplicamos el tratamiento es menor del IC50). Aproximadamente, el 20% de las células mueren por necroptosis. Ello tomando como población el conjunto total de células (vivas y muertas). Si únicamente atendemos a la población de células muertas, las necroptóticas Las apoptóticas tempranas suponen el 11.7% de la población total.

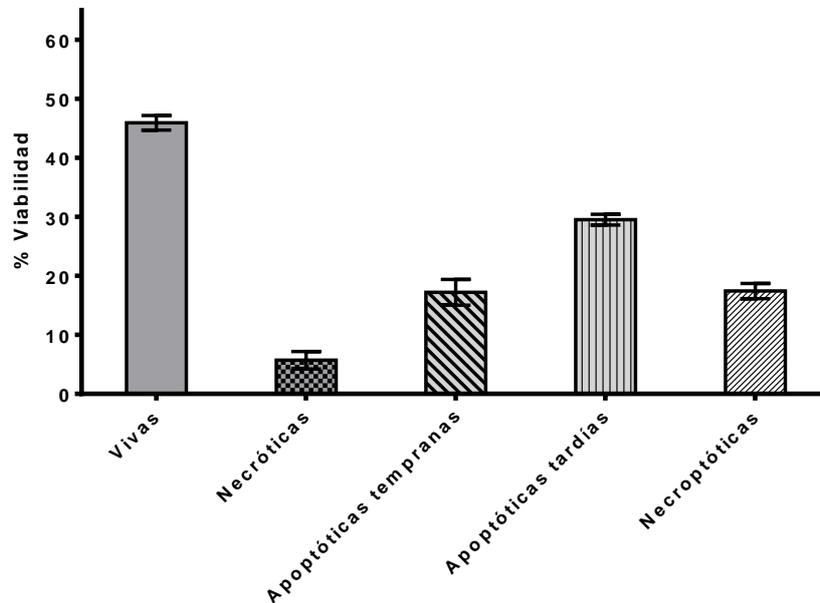
El grupo de Au y Meisch (2015) expone a ratones a una concentración de 26.6 mg NM/kg, y estudian el efecto protector de la vitamina D3 frente a la liberación de especies reactivas de oxígeno. Se observa que, comparando los controles sin vitamina D3 frente a los tratados, la viabilidad es mayor en estos últimos. Ello confirma que uno de los mecanismos de acción de la NM es la producción de ROS, lo cual también contrasta con lo observado en nuestro experimento, en el que los fibroblastos mueren por necroptosis (proceso también mediado por la producción de ROS).(20)

Además, Malaviya y colaboradores (2015) estudian cómo se desencadena la respuesta inflamatoria tras la exposición a la mostaza nitrogenada, la acumulación de macrófagos, etc. En este trabajo, administran la NM por vía intratraqueal (0.125 mg/kg de ratón), combinándolo en algunos casos con la administración intravenosa de anticuerpo anti-TNF α (15 mg/kg ratón). El anticuerpo anti-TNF α reduce el reclutamiento de macrófagos proinflamatorios y citotóxicos. (21)

Los resultados obtenidos por citometría de imagen concuerdan con desarrollado por Malaviya: la muerte celular es debida a mecanismos necroptóticos acompañados de inflamación y liberación de ROS.

Por último, destacar que los resultados obtenidos por citometría de imagen refrendan los obtenidos por la técnica de MTT: al tratar con una concentración de 2000 μM durante 3 horas, las células vivas corresponden a un 57%. Es lógico a concentraciones por debajo de la LD50, la viabilidad sea mayor del 50%.

Fibroblastos tratados con mostaza sulfurada.



Gráfica 5: Tipo de muerte en población tratada con 4000 μM mostaza sulfurada.

En este experimento, los fibroblastos son tratados durante 3 horas con 4000 μM de mostaza sulfurada. Los resultados concuerdan con lo esperado: al aplicar un tratamiento mayor al IC50, el % de células vivas es menor del 50%, concretamente un 46%. A diferencia de la mostaza nitrogenada, con este compuesto vemos que el principal tipo de muerte se debe a apoptosis tardía, llegando a suponer un 30% del total. Si comparamos las apoptóticas tardías únicamente entre la población de células muertas, vemos que este tipo de muerte llega a representar al 55% de esa población.

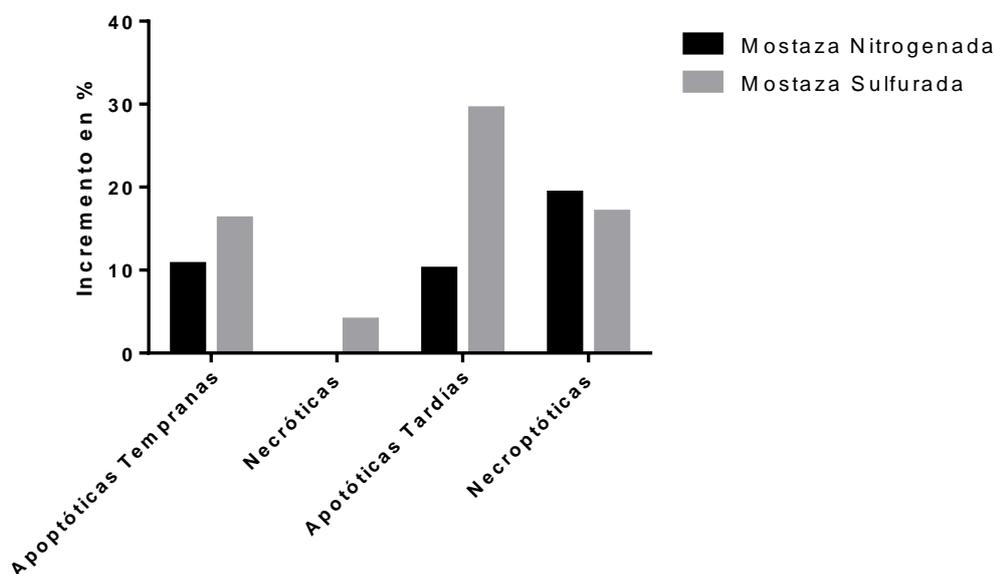
Simbulan-Rosenthal (2006) estudiaron el efecto de la mostaza sulfurada a concentraciones vesicantes, entre 100 y 300 μM , con células que no expresaban la calmodulina. El tiempo de exposición al tratamiento son 24 horas, en la población control se produce muerte por apoptosis, mientras que las deficientes en calmodulina no pueden activar la ruta de las caspasas, y en ellas no se desencadena la apoptosis. Esto apoyaría nuestra teoría de que la mostaza sulfurada causa muerte por apoptosis, como hemos comprobado mediante citometría de imagen. (22)

También, Kehe y colaboradores (2013) estudian los efectos vesicantes en un rango similar: 0.3-300 μM . Llegan a la conclusión de que la mostaza interacciona con el DNA, produciendo alquilación y finalmente muerte por apoptosis. (23)

Previamente, el propio grupo de Kehe (2005) determinó que la mostaza sulfurada induce la alquilación de la hexokinasa, reacciona con el glutatión (aumenta el número de especies reactivas de oxígeno) y produce la alquilación de la guanina, con lo que el ciclo celular se detiene, se altera tanto el DNA como la síntesis de proteínas y la célula acaba muriendo por apoptosis.(11)

Al igual que en el caso de la mostaza nitrogenada, los resultados obtenidos por citometría de imagen concuerdan y apoyan la hipótesis de que la LD50 de la mostaza sulfurada se encuentra en torno a 3000 μM . Tras haber tratado durante 3 horas con 4000 μM (concentración mayor que la LD50 obtenida por MTT), la viabilidad de los fibroblastos se reduce hasta un 46%.

Incremento del tipo de muerte celular



Gráfica 6: comparación del incremento de cada tipo de muerte celular en relación a la muerte en la población control.

A la vista de los resultados obtenidos en la Gráfica 6, podemos concluir que el mecanismo de acción por el cual la mostaza nitrogenada induce la muerte celular es la necroptosis, mientras que la mostaza sulfurada actúa promoviendo los procesos de apoptosis temprana y tardía.

La mostaza nitrogenada incrementa la muerte por necroptosis con respecto al control en un 19.3%. Por su parte, la mostaza sulfurada es capaz de aumentar la muerte por apoptosis temprana en un 16.19%, y por apoptosis tardía en un 29.45%.

Destacar de la gráfica que, en el caso de la mostaza nitrogenada, la muerte por necrosis resulta insignificante. Ello puede deberse a que realmente la NM no produzca muerte por necrosis convencional, sino una necrosis regulada o necroptosis.

5. CONCLUSIONES

1. El gas mostaza nitrogenado (NM) induce toxicidad en los cultivos de células de fibroblastos humanos y tiene una dosis letal 50 calculada de unos 3637 μM cuando los fibroblastos son expuestos a 3 horas de tratamiento.
2. El gas mostaza sulfurado (SM) induce toxicidad en los cultivos de células de fibroblastos humanos y tiene una dosis letal 50 calculada de unos 3010 μM en fibroblastos, tras la exposición de los mismos al compuesto durante 3 horas.
3. Por tanto, en vista a los resultados obtenidos por la técnica de MTT, podemos afirmar que la mostaza sulfurada es más nociva que la nitrogenada.
4. El estudio mediante citometría de imagen de los fibroblastos tratados con mostaza nitrogenada revela que la exposición a una concentración de 2000 μM induce la muerte celular. Produce un 42.7% de muerte, fundamentalmente por vía necroptótica, con un incremento del 19.29%. La muerte inducida por mecanismos de necrosis es muy inferior, apenas de un 0.11%.
5. El estudio mediante citometría de imagen de los fibroblastos tratados con mostaza sulfurada muestra que su exposición induce la muerte celular a dosis de 4000 μM . Produce un 54.07% de muerte, en este caso mayoritariamente por la vía apoptótica, con un incremento de 16.19% (apoptosis temprana) y de un 29.45% (apoptosis tardía) con respecto al control. Podemos determinar que la muerte por apoptosis, tanto temprana como tardía, predomina sobre los mecanismos necróticos y necroptóticos.

5. CONCLUSIONS

1. Nitrogen mustard gas (NM) has a LD50 of 3637 μM when fibroblasts are exposed during 3 hours of treatment.
2. Sulfur mustard gas (SM) has a LD50 of 3010 μM in fibroblasts, after their exposition to the compound for 3 hours.
3. According to the results obtained by MTT technique, sulfur mustard is more toxic than nitrogen mustard can be affirmed.
4. Image cytometry study of nitrogen mustard treated fibroblasts shows that the exposition to 2000 μM induces cell death. It produces 42.7% of death, fundamentally by necroptotic route, with an increment of 19.29% with respect to control. Cell death induced by necrotic mechanisms is much lower, barely 0.11%.
5. Image cytometry study of sulfur mustard treated fibroblasts shows that the exposition to 4000 μM induces cell death. It produces 54.07% of death cell, in this case mainly by the apoptotic route, with an increment of 16.19% (early apoptosis) and 29.45% (late apoptosis) in comparison with control. We can determinate that death by apoptosis, both early and late, predominates over necrosis and necroptosis mechanisms.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Chauhan S, Chauhan S, D'Cruz R, Faruqi S, Singh KK, Varma S, et al. Chemical warfare agents. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2008;26(2):113-22.
2. Pita R, Vidal-Asensi S. [Cutaneous and systemic toxicology of vesicants used in warfare]. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2010;101(1):7-18.
3. Zuo GM, Cheng ZX, Li GW, Wang LY, Miao T. Photoassisted reaction of sulfur mustard under UV light irradiation. *Environmental science & technology*. 2005;39(22):8742-6.
4. Shakarjian MP, Heck DE, Gray JP, Sinko PJ, Gordon MK, Casillas RP, et al. Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2010;114(1):5-19.
5. Kumar D, Tewari-Singh N, Agarwal C, Jain AK, Inturi S, Kant R, et al. Nitrogen mustard exposure of murine skin induces DNA damage, oxidative stress and activation of MAPK/Akt-AP1 pathway leading to induction of inflammatory and proteolytic mediators. *Toxicology letters*. 2015;235(3):161-71.
6. Greenberg S, Kamath P, Petrali J, Hamilton T, Garfield J, Garlick JA. Characterization of the initial response of engineered human skin to sulfur mustard. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2006;90(2):549-57.
7. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell death and differentiation*. 2010;17(3):381-97.
8. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current molecular medicine*. 2008;8(3):207-20.
9. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(10):700-14.
10. Calvet JH, Feuermann M, Llorente B, Loison F, Harf A, Marano F. Comparative toxicity of sulfur mustard and nitrogen mustard on tracheal epithelial cells in primary culture. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 1999;13(6):859-66.
11. Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*. 2005;214(3):198-209.
12. Tewari-Singh N, Agarwal R. Mustard vesicating agent-induced toxicity in the skin tissue and silibinin as a potential countermeasure. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016.
13. Verwilt P, Han J, Lee J, Mun S, Kang HG, Kim JS. Reconsidering azobenzene as a component of small-molecule hypoxia-mediated cancer drugs: A theranostic case study. *Biomaterials*. 2017;115:104-14.
14. Sharma M, Vijayaraghavan R, Agrawal OP. Comparative toxic effect of nitrogen mustards (HN-1, HN-2, and HN-3) and sulfur mustard on hematological and biochemical variables and their protection by DRDE-07 and its analogues. *International journal of toxicology*. 2010;29(4):391-401.
15. Zhao LM, Ma FY, Jin HS, Zheng S, Zhong Q, Wang G. Design and synthesis of novel hydroxyanthraquinone nitrogen mustard derivatives as potential anticancer agents via a bioisostere approach. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;102:303-9.
16. Cheloufi H, Belhani B, Ouk TS, Zerrouki R, Aouf NE, Berredjem M. Synthesis and antitumor evaluation of novel sulfonylcycloureas derived from nitrogen mustard. *Molecular diversity*. 2016;20(2):399-405.
17. Mangerich A, Debiak M, Birtel M, Ponath V, Balszuweit F, Lex K, et al. Sulfur and nitrogen mustards induce characteristic poly(ADP-ribosyl)ation responses in HaCaT keratinocytes with distinctive cellular consequences. *Toxicology letters*. 2016;244:56-71.
18. 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.

19. Inturi S, Tewari-Singh N, Agarwal C, White CW, Agarwal R. Activation of DNA damage repair pathways in response to nitrogen mustard-induced DNA damage and toxicity in skin keratinocytes. *Mutation research*. 2014;763-764:53-63.
20. Au L, Meisch JP, Das LM, Binko AM, Boxer RS, Wen AM, et al. Suppression of Hyperactive Immune Responses Protects against Nitrogen Mustard Injury. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(12):2971-81.
21. Malaviya R, Sunil VR, Venosa A, Verissimo VL, Cervelli JA, Vayas KN, et al. Attenuation of Nitrogen Mustard-Induced Pulmonary Injury and Fibrosis by Anti-Tumor Necrosis Factor-alpha Antibody. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2015;148(1):71-88.
22. Simbulan-Rosenthal CM, Ray R, Benton B, Soeda E, Daher A, Anderson D, et al. Calmodulin mediates sulfur mustard toxicity in human keratinocytes. *Toxicology*. 2006;227(1-2):21-35.
23. Kehe K, Schrettl V, Thiermann H, Steinritz D. Modified immunoslotblot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts. *Chemico-biological interactions*. 2013;206(3):523-8.

