



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Efecto del estrés oxidativo sobre la proliferación
celular.

Oxidative stress effect in cells proliferation.

Autora

Nuria Pilar Antón Baltanás

Directores

José Octavio Alda Torrubia

Matilde Desirée Pereboom Maicas

Facultad de Ciencias

Curso 2018-2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1.INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 RADICALES LIBRES.....	2
I. Concepto.....	2
II. Clasificación de los radicales libres.....	2
III. Generación de radicales libres.....	3
1.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES.....	4
I. Enzimas antioxidantes con estructura compleja y peso molecular elevado.....	4
II. Antioxidantes de menor tamaño y menor peso molecular.....	5
1.3. ESTRÉS OXIDATIVO.....	5
I. Estrés oxidativo y cultivo celular.....	7
1.4. INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO. MOSTAZA NITROGENADA (MN).....	7
1.5. QUERCETINA.....	8
1.6. PROLIFERACIÓN CELULAR. MUERTE CCELULAR.....	8
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	9
2.1. PLANTEAMIENTO.....	9
2.2 OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. MATERIALES.....	10
I. Material biológico.....	10
II. Reactivos.....	10
III. Equipos.....	11
3.2. MÉTODOS.....	12
I. Cultivo celular.....	12
II. Determinación de la proliferación celular mediante el colorante CFSE.....	13
III. Experimento proliferación CFSE.....	13
IV. Determinación de la proliferación celular mediante el ensayo WST-1.....	13

3.3 ESTADÍSTICA.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1. PROLIFERACIÓN FIBROBLASTOS DETEMINADA CON CFSE.....	15
4.2. EFECTO DE MOSTAZA NITROGENADA SOBRE LA PROLIFERACIÓN.....	16
4.3. EFECTO PROTECTOR DE QUERCETINA FRENTE A MOSTAZA NITROGENADA.....	18
4.4 EFECTO DE QUERCETINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN.....	19
5. CONCLUSIONES.....	21
5.1. CONCLUSIONS.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22
6.1. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS.....	22
6.2. REFERENCIAS.....	22

RESUMEN

Tanto en el organismo como a nivel celular se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) de forma endógena o como producto de agentes exógenos. Debe haber un balance entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes celulares para la correcta regulación metabólica, ya que si se produce un desequilibrio a favor de los sistemas oxidantes, se induce estrés oxidativo, una situación que causa efectos tóxicos sobre todos los componentes de la célula.

En este trabajo se ha estudiado el efecto tóxico de la mostaza nitrogenada (MN), un potente agente oxidante, sobre la proliferación de un cultivo de fibroblastos humanos. También se ha querido determinar el posible efecto protector de quercetina ante la oxidación producida por MN, viendo cómo la aplicación combinada de estos agentes afecta a la proliferación del cultivo. Para llevar a cabo estas determinaciones se ha requerido la puesta en marcha del ensayo con el colorante WST-1.

También, mediante la puesta en marcha de la técnica del fluorocromo CFSE se ha podido determinar la proliferación de un cultivo empleando citometría de imagen.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are generated both at an organism and a cellular level either endogenously or as a product of exogenous agents. There must be a balance between the oxidant and antioxidant cellular systems in order to have a correct metabolic regulation, since if there is an imbalance in favor of the oxidant systems, oxidative stress occurs and this situation causes toxic effects on all the components of the cell

In this project, the toxic effect of nitrogen mustard (NM), a powerful oxidizing agent, has been studied by measuring its effects in the proliferation of a human fibroblasts culture. We also wanted to determine if quercetin had a protection effect against the oxidation produced by MN, seeing how the combined application of these agents affects cell proliferation. In order to carry out these determinations, we had to adjust the technique with the WST-1 dye.

Also, optimizing the protocol for the CFSE technique allowed us to determine the level of cell proliferation in a culture using image cytometry.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Radicales libres.

I. Concepto

Se define como radical libre a las moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en su última órbita. Un radical libre se origina cuando se añade un electrón extra a la capa de valencia de un átomo, quedando este radical desapareado. El electrón extra confiere un grado de reactividad elevado, aportándole alto poder oxidante o reductor, lo que hace que reaccione de inmediato para lograr mayor estabilidad química. Esta estabilidad se logra robando un átomo de hidrógeno de otra molécula, ligándose químicamente a otra molécula o combinándose con otro radical libre de tal forma que ambos se estabilicen.

Desde el punto de vista molecular, son moléculas de pequeño tamaño producidas por diversos mecanismos que generan daño celular al interactuar con otras moléculas biológicas del organismo. Se ha demostrado que los seres vivos no sólo se han adaptado a la presencia de los radicales libres en su organismo, si no que han desarrollado mecanismos para un uso ventajoso en diversas funciones fisiológicas cuando las concentraciones son bajas, como la inducción de respuesta mitogénica, la participación en la fagocitosis para la defensa ante agentes infecciosos o la activación de enzimas de la membrana celular.(1)(2)

II. Clasificación de los radicales libres

Los radicales libres se clasifican de acuerdo con el tipo de átomo del cuál provienen, de esta forma, existen radicales libres derivados del oxígeno (ROS) y radicales del nitrógeno (RNS), ambos productos del metabolismo celular normal. En la Figura 1 se detalla su clasificación.

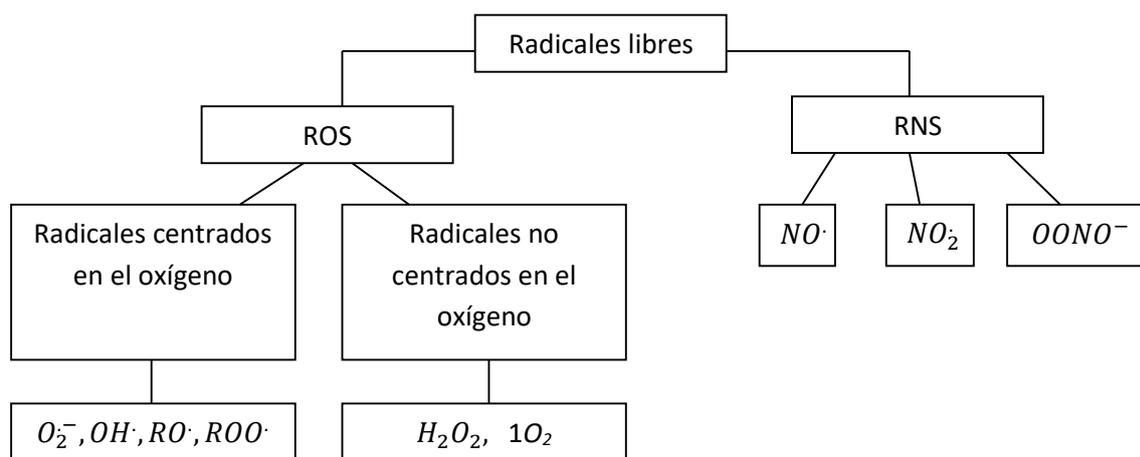


Fig.1. Clasificación de radicales libres (2) (3). Esquema realizado por la autora.

Los radicales libres más importantes en los organismos vivos se detallan en la tabla I:

ROS	Fórmula
Radical Superóxido	O_2^-
Radical Hidroxilo	$OH\cdot$
Radical Peroxilo	$ROO\cdot$
Radical Alcoxilo o fenoxilo	$RO\cdot$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Oxígeno singlete	$1O_2$

Tabla I: Radicales libres. Tabla realizada por la autora empleando la bibliografía citada.

III. Generación de radicales libres.

Los ROS presentes en el organismo se pueden originar de manera endógena o exógena como respuesta a estímulos externos: luz ultravioleta, radiación ionizante, fármacos o agentes tóxicos (Figuras 4 y 6). (4)

Los mecanismos endógenos de generación de radicales libres son:

Mitocondrias:

Generan un 90% de los radicales en células eucariotas (5). Los electrones se escapan de la cadena de transporte electrónico mitocondrial antes de que los electrones alcancen el complejo IV e interaccionan con el oxígeno molecular para dar el radical superóxido (O_2^-), que de forma espontánea o por medio de enzimas se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$). (6)(7)

Peroxisomas:

Contienen enzimas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos y en el metabolismo de los aminoácidos; producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y también tienen capacidad de formar anión superóxido (O_2^-) principalmente a partir de la enzima xantina oxidasa (XO). (8)

Retículo endoplasmático:

En él se localiza el citocromo P450, responsable de la desintoxicación de xenobióticos (Figura 4). Para ello se produce el paso de electrones desde el NADPH hasta el citocromo P450, proceso que puede sufrir fugas dando lugar a radicales oxígeno, sobretodo radical superóxido (O_2^-). (9)

Membranas plasmática y nuclear:

En la Figura 4 se observa la producción de ROS por acción de las NADPH oxidasas con tránsito de electrones desde las NADPH hasta el O_2 , formándose el radical superóxido (Figura 2), que actúa como defensa ante microorganismos invasores.(10).



Fig.2.Reacción de producción de ROS por la enzima NADPH oxidasa.

Citosol:

Se producen ROS como subproductos metabólicos del ácido araquidónico y también por reacción del oxígeno con iones hierro, ya que reacciona el ión superóxido con Fe^{+++} dando Fe^{++} , el cual mediante la reacción de Fenton (Figura 3) reacciona con el peróxido de hidrógeno dando como productos: hierro férrico, radical hidroxilo y radical hidróxido.(10)



Fig.3.Reacción de Fenton.

1.2. Sistemas antioxidantes.

Las células han desarrollado diferentes métodos para prevenir la formación de radicales libres o llevar a cabo su detoxificación. Un antioxidante es aquella molécula que evita los procesos de oxidación porque estabiliza especies reactivas o porque transforma sus configuraciones en otras de reactividad reducida (11)(12).

Se pueden clasificar en:

I. Enzimas antioxidantes con estructura compleja y peso molecular elevado:

Destacan la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y glutatión peroxidasa (GPX). Estas tres enzimas actúan sincrónicamente para reducir y eliminar de forma efectiva especies reactivas de O_2^- , transformándolas en agua y oxígeno. La SOD dismuta el radical O_2^- produciendo H_2O_2 , entonces, la catalasa dismuta y peroxida dos moléculas de H_2O_2 produciendo O_2 y H_2O . Es en ese momento, cuando la GPX oxida su sustrato, el glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) a la vez que elimina hidroperóxidos y peróxidos orgánicos (Figuras 4 y 6).

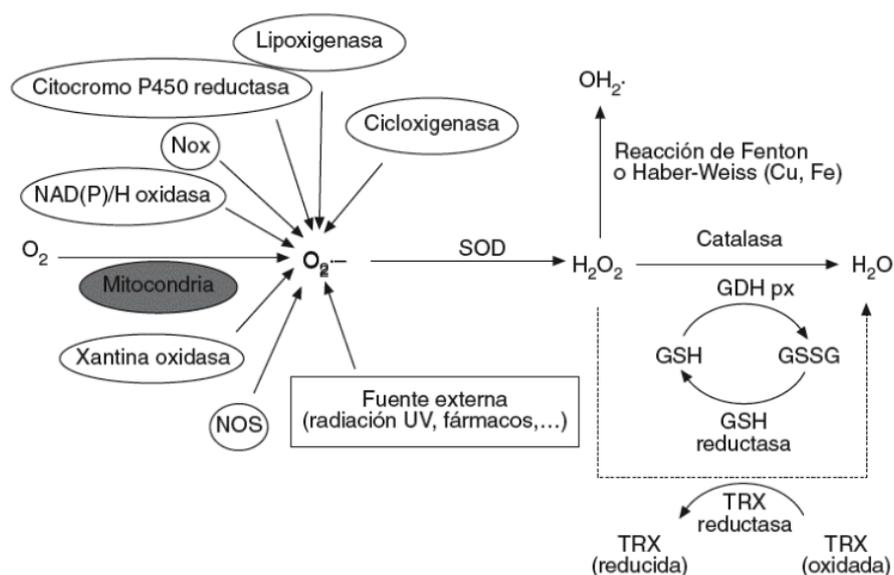


Fig.4. Formación y metabolización celular de las especies reactivas de oxígeno (ROS). (5)

II. Antioxidantes de menor tamaño y menor peso molecular:

Actúan como barredores o atrapadores de radicales libres, interactuando directamente con ellos para neutralizarlos o disminuir su reactividad. Todas estas acciones están referenciadas en la Figura 5.

Vitamina E: la vitamina E o α -tocoferol tiene actividad antioxidante basada en el sistema redox tocoferol-tocoferilquinona. Son secuestradores de radicales libres y de radicales peróxidos que detienen la peroxidación lipídica. (13)

Vitamina C: es un potente antioxidante soluble en agua y como cualquier vitamina no se encuentra en el organismo y se debe ingerir con la dieta. El organismo necesita vitamina C para producir colágeno y además es un donante de electrones que actúa en reacciones enzimáticas como cofactor. La unión de las vitaminas E y C es responsable de la mayoría de los efectos antioxidantes del organismo. {Formatting Citation}

Ácido úrico: es el mayor antioxidante del plasma humano capaz de eliminar radicales absorbiendo un electrón y convirtiéndose en un radical poco reactivo. Una de sus funciones es proteger la membrana eritrocítica de la oxidación de lípidos. (16)

β -caroteno: previene la peroxidación lipídica al atrapar el radical peróxido y formar un epóxido (17)

Coenzima Q10: en su forma reducida (ubiquinona) inhibe la oxidación del DNA, proteínas, peroxidación lipídica de los lípidos de membrana y lipoproteínas presentes en la circulación. Destaca su papel en la cadena de transporte electrónico mitocondrial al reducirse a ubisemiquinona/ubiquinol y volver a oxidarse a ubiquinona. (18)

1.3. Estrés oxidativo.

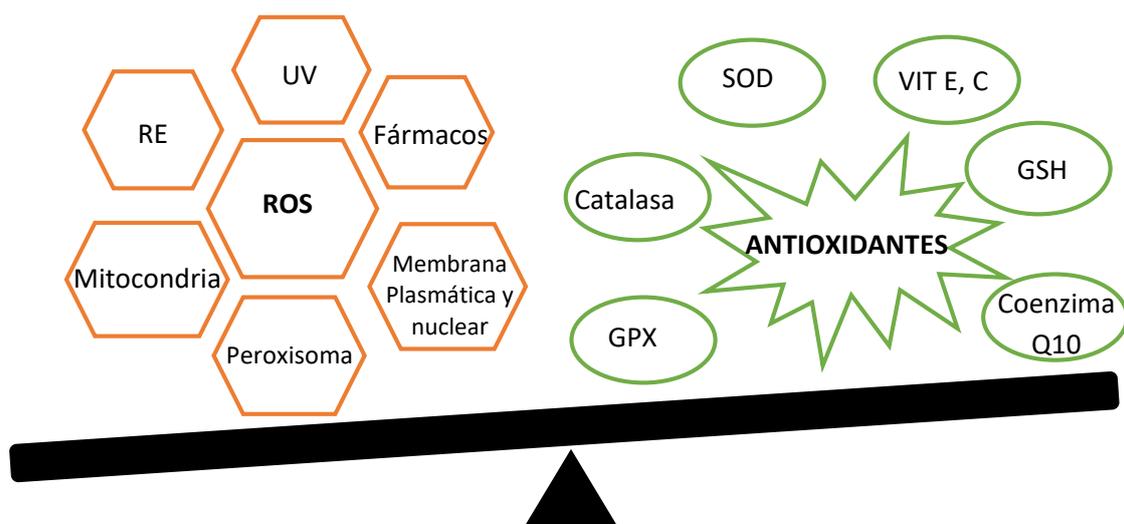


Fig.5. Representación del balance existente entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes. Si este balance se pierde se genera estrés oxidativo. Esquema realizado por la autora empleando la bibliografía citada.

Para la correcta regulación metabólica celular debe haber un balance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes. Si este balance se desequilibra a favor de los sistemas oxidantes por la producción desmesurada de radicales o por la ineficiente acción de los sistemas antioxidantes, se induce una situación conocida como estrés oxidativo.

Estos radicales libres primarios de células y tejidos generan una cascada de radicales libres secundarios. Esta alteración del equilibrio causa efectos tóxicos que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo la oxidación de DNA y proteínas y la peroxidación lipídica, detallados en la Figura 6.

Con la peroxidación de lípidos de las membranas biológicas, se oxidan los ácidos grasos poliinsaturados dando malondialdehído (MDA) con alta reactividad a proteínas y DNA. Las modificaciones del material genético producidas por este daño oxidativo son el paso precedente a los fenómenos de mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento. (1)(2)

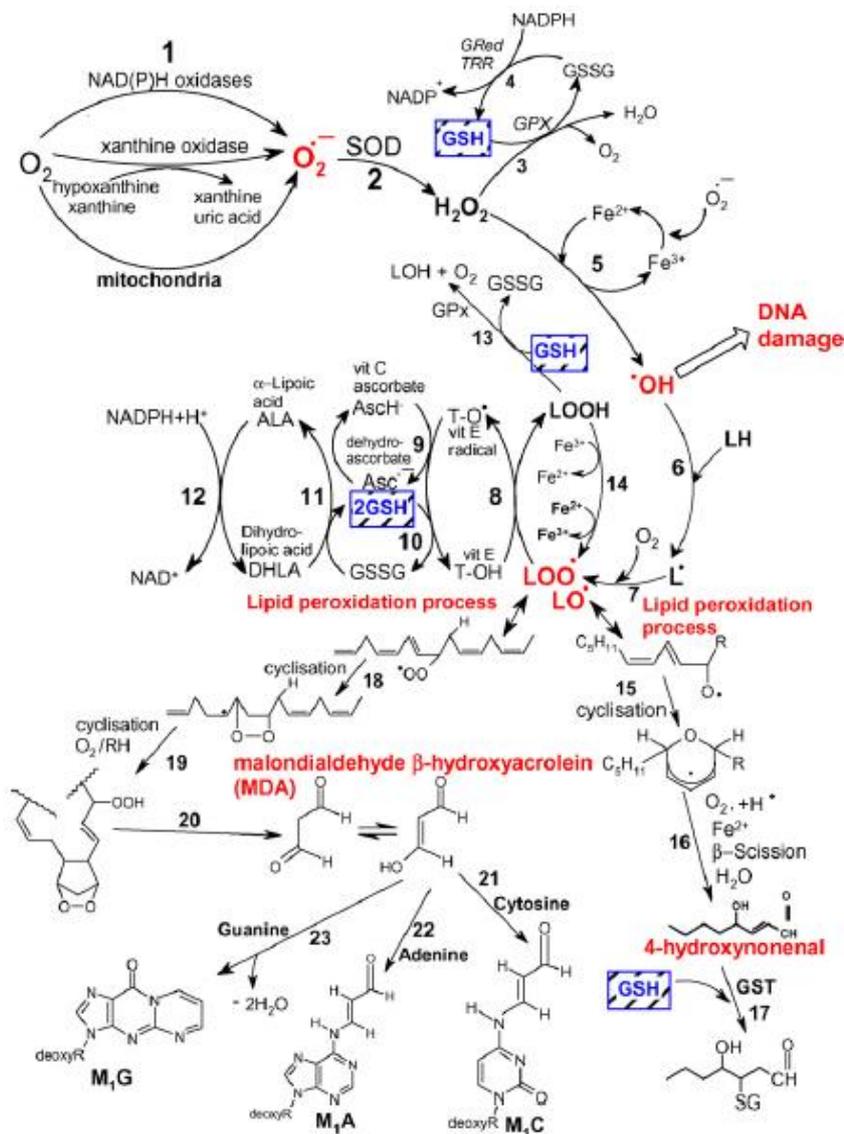


Fig.6. Vías de formación de ROS, proceso de peroxidación lipídica y el papel de distintos antioxidantes en el control y dirección del fenómeno de estrés oxidativo. (1)

I. Estrés oxidativo y cultivo celular

Cuando se llevan a cabo estudios sobre el estrés oxidativo en cultivos celulares, hay que tener en cuenta que se dan eventos que no ocurren en las células in vivo. Por un lado, los medios de cultivo son deficientes en antioxidantes como las vitaminas E y C y pueden contener iones metálicos presentes como contaminantes o añadidos deliberadamente, como es el caso de sales de Fe^{3+} en el medio de cultivo DMEM.

Puesto que las condiciones de cultivo en la estufa son de un 95% de aire/ 5% CO_2 , están en un medio con concentraciones de O_2 muy elevadas, lo que es probable que aumente la tasa de formación de ROS. (11)

1.4. Inducción de estrés oxidativo. Mostaza nitrogenada.

Uno de los objetivos de este trabajo de investigación era la generación de radicales libres en células de cultivos. Dado que en el Departamento de Fisiología se están estudiando agentes tóxicos como la mostaza nitrogenada, hemos testado este agente por su gran efecto oxidante y productor de radicales libres intracelulares.

Los dos mecanismos de acción de la mostaza nitrogenada (MN) son: agente productor de estrés oxidativo y efecto alquilante del DNA (Figura 7).

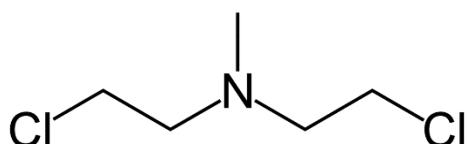


Fig.7. Estructura química mostaza nitrogenada.

A nivel sistémico en el ser humano, las mostazas nitrogenadas son agentes muy tóxicos que afectan a la piel, ojos, pulmones y los sistemas endocrino, inmune, neuromuscular y hematológico. Debido a su carácter lipofílico es capaz de atravesar la membrana celular y reacciona en el citoplasma con grupos sulfidriilo, carboxi y amino causando estrés oxidativo y nitrosativo; también atraviesa la membrana nuclear alquilando el DNA, es decir, contribuye al DNA con un grupo alquilo. Por eso se define a la mostaza nitrogenada como un agente mutagénico y citotóxico.(19)

La interacción entre la MN y las estructuras celulares se da a través de la molécula aziridinio (Figura 8), compuesto orgánico con grupo funcional azirina, un heterociclo de tres miembros con fórmula molecular $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$. Es este anillo con el que se une a las macromoléculas alquilándolas, conduciendo a la formación de enlaces cruzados entre o dentro de las hélices del DNA. Estos enlaces cruzados son los responsables de la citotoxicidad ya que bloquean procesos esenciales en la célula como la replicación y transcripción del DNA. Por tanto, induce apoptosis afectando sobre todo a las células con mayor velocidad de división. (20)

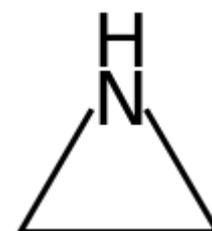


Fig.8. Estructura química aziridina.

Además, puede reaccionar con el RNA y las proteínas. Esto induce el agotamiento del glutatión reducido (GSH) y de las enzimas antioxidantes, lo que va a resultar en la acumulación de ROS con la consecuente peroxidación lipídica y oxidación de DNA y proteínas.(21)

1.5. Quercetina.

Es el flavonoide más natural más habitual de nuestra dieta, se puede encontrar en alimentos como: nueces, cebollas, manzanas, tomates, vino tino y té negro. Es un antioxidante muy potente gracias a los grupos hidroxilo ($OH\cdot$) presentes en su estructura (Figura 9). La quercetina es un antioxidante más potente que las vitaminas C y E y que el β -caroteno, además, puede quelar iones de metales de transición, incluido el hierro, evitando así, la reacción de Fenton. (22)

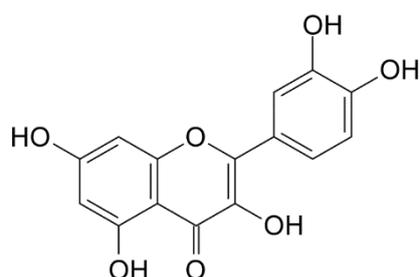


Fig.9. Estructura química quercetina.

La quercetina es capaz de inhibir enzimas capaces de generar ROS como la xantina oxidasa (XO), ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX), NADPH oxidasa y de estimular enzimas con capacidad antioxidante como la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y la superóxido dismutasa (SOD).(23)

1.6. Proliferación celular. Muerte celular.

La proliferación celular es un término referido a la velocidad en la que una célula copia su DNA y se divide en dos células hijas.

En este trabajo vamos a medir el efecto del estrés oxidativo sobre la proliferación celular. Es un indicador vital para comprender el mecanismo de acción de genes, proteínas y de todas aquellas rutas involucradas en la supervivencia o muerte celular tras la exposición de las células a agentes tóxicos. Por tanto, cuando se establece un claro desequilibrio hacia el estrés oxidativo, se produce daño inicial a las macromoléculas la alteración de las funciones de los distintos compartimentos intracelulares lo que desemboca en el proceso de apoptosis.

Sin embargo, se conocen según bibliografía actual 14 tipos de muerte celular, las que nos interesas, y es capaz de distinguir el citómetro de imagen mediante una tinción IP/ anexina V son: apoptosis, necrosis y necroptosis.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2.1. Planteamiento.

El estrés oxidativo se da ante una situación de desequilibrio en la que predominan los agentes productores de ROS frente a los mecanismos y agentes antioxidantes de las células. El estrés oxidativo va a producir daño celular y la alteración de funciones que resulta en la variación de la velocidad de división de las células hijas o proliferación celular.

Se induce estrés oxidativo sobre diversos cultivos celulares con la finalidad de poder observar cómo esos estreses han afectado al cultivo de células al determinar su proliferación en un tiempo establecido.

El estrés oxidativo se va a inducir aplicando mostaza nitrogenada. Por otro lado, se va a determinar el efecto que producen concentraciones bajas de quercetina en un cultivo y la proliferación celular obtenida en un cultivo tratado simultáneamente con quercetina y mostaza nitrogenada.

2.2. Objetivos.

- I. Poner en marcha técnicas de evaluación de la proliferación celular una de fotometría (WST-1) y otras de fluorescencia mediante el fluorocromo CFSE.
- II. Evaluar el efecto de la mostaza nitrogenada (como inductor de estrés oxidativo) sobre la proliferación celular en cultivo de fibroblastos.
- III. Estudiar el posible efecto protector de la Quercetina sobre fibroblastos tratados con mostaza nitrogenada

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

I. Material biológico.

Se ha empleado un tipo celular, fibroblastos de una línea humana. Han sido cultivados en la estufa a una temperatura de 37°C y un 5% de CO₂. Se han mantenido en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF), 1% de antibióticos y 1% de antifúngicos, lo que impide posibles contaminaciones del medio.

II. Reactivos.

- PBS (tampón fosfato salino): es una solución salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmolaridad y concentración de iones es muy semejante a la del cuerpo humano. Se ha empleado para el lavado del cultivo celular previo a los tratamientos.
- Tripsina: enzima que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis. La empleamos para despegar las células adheridas al fondo de los frascos de cultivo.
- CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Figura 10):
El CFSE es muy eficaz para la medida de la proliferación celular. Es una molécula que atraviesa con facilidad las membranas celulares (Figura 11), formando en el interior celular complejos covalentes intracelulares entre el colorante fluorescente (carboxifluoresceína) y las moléculas celulares de larga duración. Por ello, la fluorescencia en la célula se mantiene por largos periodos de tiempo y permite determinar de forma cuantitativa la proliferación celular mediante citometría con λ excitación de 492nm y λ emisión de 517nm, por lo que emite fluorescencia verde.
Tras cada división celular, la fluorescencia de las células hijas es aproximadamente la mitad de la que poseía la célula parental. (24)(25)



Fig. 10. Kit CFSE de la casa ThermoFisher para medir la proliferación celular. (25)

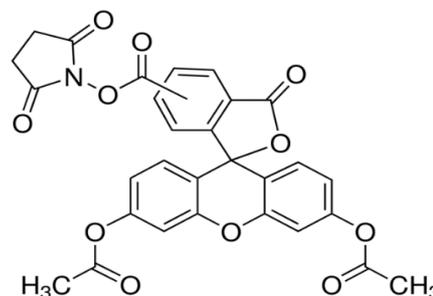


Fig. 11. Estructura química molécula CFSE. (25)

- WST-1: Permite llevar a cabo un ensayo colorimétrico basado en el monitoreo de la síntesis del DNA, que indirectamente permite medir la proliferación celular por cuantificación no radioactiva.

WST-1 es una sal de tetrazoilo que se escinde en formazán soluble por un mecanismo dado en la superficie celular (Figura 12). Esta biorreducción depende de la producción glicolítica de NAD(P)H en células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán formado está directamente relacionado con el número de células metabólicamente activas en cultivo. La forma de cuantificar este colorante (amarillo) es midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas con una longitud de onda de referencia de 630 nm. La resta de la medida de referencia de la absorbancia a 450 nm nos indica el valor real que depende del número de células vivas que han absorbido el colorante.

La absorbancia medida se correlaciona directamente con el número de células viables. (26)

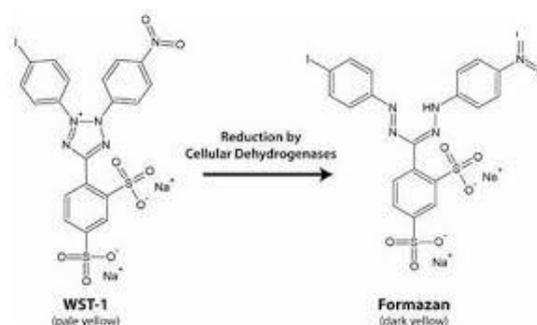


Fig.12. Reducción del reactivo WST-1 al colorante formazán en la superficie celular, por la acción de deshidrogenasas

III. Equipos.

- Estufa de cultivo marca BINDER: 37°C y 5% CO₂
- Microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000S
- Campana de seguridad biológica tipo II (Telstar Bio-II-A)
- Citómetro de imagen ImageStreamX AMNIS (Figura 13): permite adquirir hasta 12 imágenes simultáneamente de cada célula, a velocidades de hasta 5,000 objetos por segundo con alta sensibilidad fotónica (microscopía confocal de 20, 40 y 60 aumentos). Combinando esto con la citometría de flujo convencional para análisis más exhaustivos.



Fig.13. Citómetro AMNIS ISX. SAI Citómica Universidad de Zaragoza (Facultad de Medicina)

- Baño termostatzado (Nahita)
- Centrífuga Eppendorf 5810 R
- Agitador de placas (Lab-Line instruments, INC)
- Espectrofotómetro microplacas termostatzado Eon (EON biotek): Lector de placas tanto determinaciones a punto final, como cinéticas enzimáticas (Figura 14).



Fig. 14. Lector de placas EON. SAI Citómica Universidad de Zaragoza (Facultad de Medicina)

3.2. Métodos.

I. Cultivo celular.

El cultivo celular empleado en el proyecto se ha adquirido de una línea de fibroblastos primarios. Han sido cultivados en frascos de 75 cm² con medio DMEM suplementado al 10% con STF en las condiciones de la estufa de cultivo (37°C, y una atmósfera con un 5%CO₂). Cuando las células se han dividido hasta casi cubrir el fondo del frasco hay que hacer un subcultivo puesto que en condiciones en que la confluencia entre las células es muy elevada, se agotan los nutrientes del medio y por falta de espacio no pueden continuar dividiéndose. Tanto para llevar a cabo el subcultivo en otro frasco, como para pasar las células a placas de 6 pocillos o placas de 96 pocillos, donde se llevan a cabo los experimentos, se ha de realizar una tripsinización.

La tripsinización es necesaria para despegar las células que crecen adheridas a la pared del frasco. En primer lugar, se retira el medio de cultivo del frasco y se lava con PBS, la finalidad del lavado es la de retirar todas aquellas proteínas que, si estuvieran al añadir la tripsina, impedirían que esta realizara su acción sobre las células. Tras el lavado se añade la tripsina (atemperada a 37°C) y se deja actuar unos 5 minutos en la estufa. Tras comprobar al microscopio que las células se han despegado, se para la tripsinización aplicando frío (con una base de hielo) e incorporando medio DMEM (10%STF) al frasco. Luego, se centrifuga a 850rpm durante 4 minutos para obtener el pellet de las células deseado. Se retira el sobrenadante y se resuspende dicho pellet en el medio de cultivo a la cantidad requerida para el ensayo.

II. Determinación de la proliferación celular mediante el colorante CFSE(27) (28)

Mediante el fluorocromo CFSE se va a determinar la proliferación celular en un cultivo de fibroblastos. El protocolo a seguir para poder teñir de forma adecuada es el siguiente:(29)

Previamente, el CFSE conservado en el congelador en alícuotas de 5mM, se atempera y se diluye en PBS con 1% de STF hasta una concentración final de 20µM.

Gracias a esta dilución previa conseguimos que desaparezca el efecto tóxico que podría tener sobre las células el DMSO en el que estaba diluido el CFSE durante la congelación. Una vez las células están tripsinizadas y resuspendidas en el medio, se incorpora el fluorocromo a las células en igual volumen que el medio en el que se encuentran. La mezcla se somete a agitación para que el fluorocromo se distribuya bien accediendo a todas las células. Se distribuye en placas de 6 pocillos a 1 mL por pocillo. Posteriormente, el CFSE nos permitirá determinar la proliferación mediante citometría de imagen.

III. Experimento proliferación CFSE:

Se cultivan placas 6 pocillos con células teñidas como indica el protocolo, según el apartado anterior. Los fibroblastos estarán cultivados a 2'5, 20% de STF, el cual aporta factores de crecimiento que promueven la proliferación del cultivo. A mayor concentración de STF, se espera mayor proliferación.

Tras cultivar las placas durante 72 horas en estufa (37°C y 5% CO₂), se tripsinizan las células y se procede a realizar la medida de la proliferación mediante citometría.

Las imágenes realizadas por el citómetro AMNIS nos permitirán observar la fluorescencia y morfología de las células de forma individual y precisa.

IV. Determinación de la proliferación celular mediante el ensayo WST-1(26)

Se emplea el colorante WST-1 en determinaciones de proliferación de fibroblastos. Todos valores obtenidos corresponden a la media de 3 experimentos, con 8 puntos para cada uno de ellos. Para ello:

A las células adheridas a los pocillos se les añade WST-1 a una dilución 1:10, 10µL de WST-1 diluido por cada 100µL de medio del pocillo. La determinación mediante espectofotometría se lleva a cabo a las 3 horas de la incorporación del colorante.

En este ensayo se cultivan 100µL de células en placas de 96 pocillos. Se incorpora WST-1 y a las 3 horas se mide la absorbancia en el lector de placas, así tendremos las absorbancias iniciales. Cada columna será sometida a un agente, dejando una columna como control. Por tanto, se aplicará quercetina 1, 2 y 4µM, MN 50, 100 y 150µM y Q1, 2 y 4 µM combinado con MN100µM.

Las lecturas en el espectrofotómetro se realizan a las 72 horas.

3.3. Estadística.

El análisis estadístico de los datos y las gráficas fueron realizados utilizando Excel.

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Proliferación fibroblastos determinada con CFSE.

Se quiso determinar la proliferación celular en distintos cultivos de fibroblastos sometidos a 2'5, 20% de STF. El STF aporta factores de crecimiento que van a estimular la proliferación celular. Puesto que uno de los objetivos del trabajo es poner en marcha la técnica para medir proliferación celular con el fluorocromo CFSE, se realizó este experimento para determinar la proliferación en fibroblastos.

Se cultivaron fibroblastos con los porcentajes indicados de STF en placas de 6 pocillos. Las células antes de sembrarse se tiñeron previamente siguiendo el protocolo de tinción con CFSE indicado en el apartado de materiales y métodos. A las 72 horas de cultivo se preparan para introducir las al citómetro, los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 15 y 16.

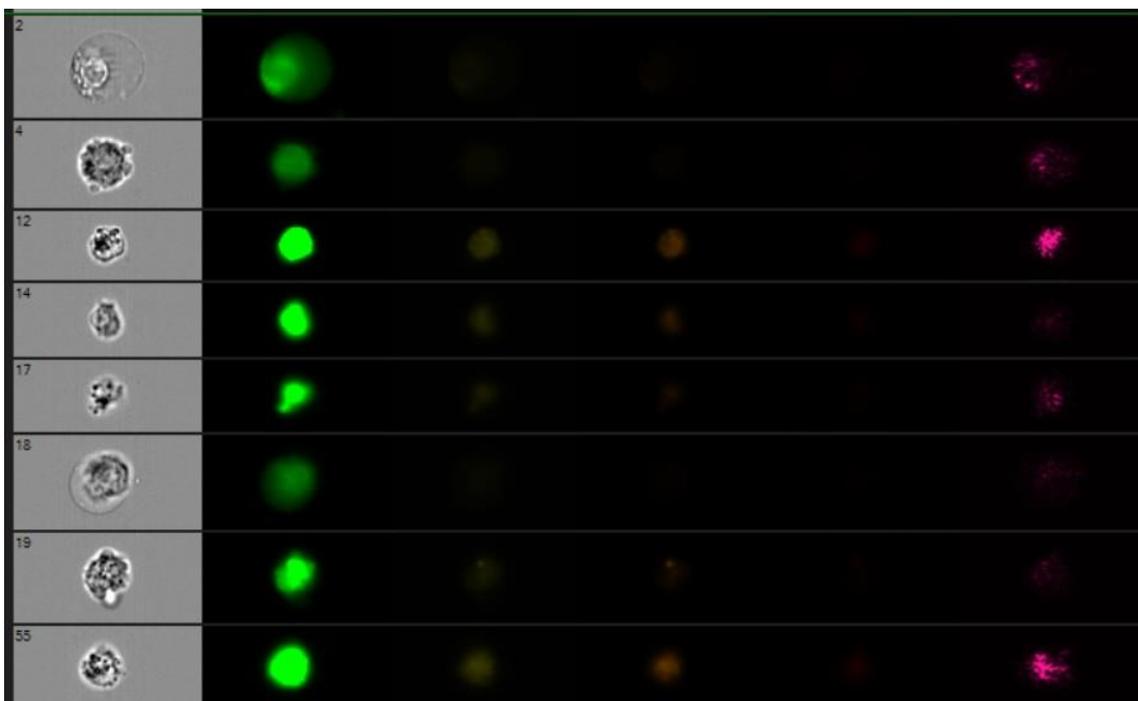
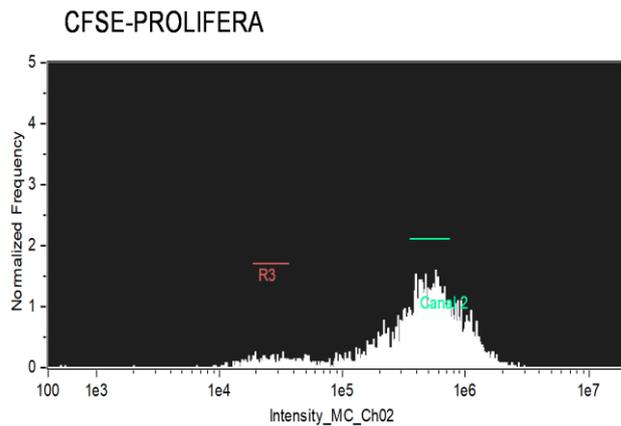


Fig. 15. Imagen de células teñidas con CFSE obtenida mediante citometría de imagen (AMNIS). La columna de la izquierda representa la imagen en campo claro. La segunda columna (canal 2) representa la imagen de la fluorescencia emitida entre 488-560nm. En el canal 6, se aprecia la granulosidad.

En la Figura 15, se pueden observar las imágenes obtenidas por el citómetro AMNIS de las células teñidas con el fluorocromo CFSE. En la primera columna se presentan las imágenes obtenidas mediante campo claro. La segunda columna corresponde al canal 2 de fluorescencia, que es en el que obtenemos determinación ya que el CFSE emite en color verde.



Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated	Mean	Std. Dev.	CV
redondas & Redondas & Cells & Single & Focus	3467	100	540071,78	387994,56	71,84
Canal 2 & redondas & Redondas & Cells & Single & Focus	1407	40,6	521038,8	104120,27	19,98
R3 & redondas & Redondas & Cells & Single & Focus	145	4,18	26629,04	5313,04	19,95

Fig.16. Valores de intensidad de fluorescencia de células teñidas con CFSE obtenidas en el canal 2 (488-560nm) del citómetro AMNIS.

Se presenta en la Figura 16 los valores de fluorescencia obtenidos para el experimento. Se aprecian dos poblaciones celulares según los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos, una de las poblaciones emite el doble de fluorescencia que la otra. Aquella población cuya fluorescencia es la mitad, corresponde a las células hijas, es decir, a las células que se han dividido repartíendose el fluorocromo a partes iguales entre las dos células resultantes, por lo que emiten la mitad de fluorescencia que la célula madre.

El 40% de las células se encuentran en la población con mayor fluorescencia, y solamente el 4% de células se han dividido. El haber obtenido simplemente dos poblaciones, nos puede indicar que las solo algunas de las células tratadas a la concentración superior de STF (20%) son las que se han dividido, mientras que el resto no ha tenido el estímulo suficiente como para multiplicarse.

4.2. Efecto de mostaza nitrogenada sobre la proliferación.

Uno de los objetivos del trabajo era evaluar el efecto de la mostaza nitrogenada como inductor de estrés oxidativo sobre la proliferación en cultivo de fibroblastos. Se decidió exponer de forma crónica durante un periodo de tiempo de 72 horas a las células a unas concentraciones de MN de 50, 100 y 150 μ M. Además, se mantuvieron unos pocillos como control, sometidos a las mismas condiciones, pero sin incorporarles MN.

Los resultados se obtuvieron gracias al colorante WST-1, que permitió obtener unos valores de absorbancia que se correlacionan con la cantidad de célula presentes por pocillo y, por tanto, con la proliferación del cultivo. Los resultados se recogen en la Figura 17.

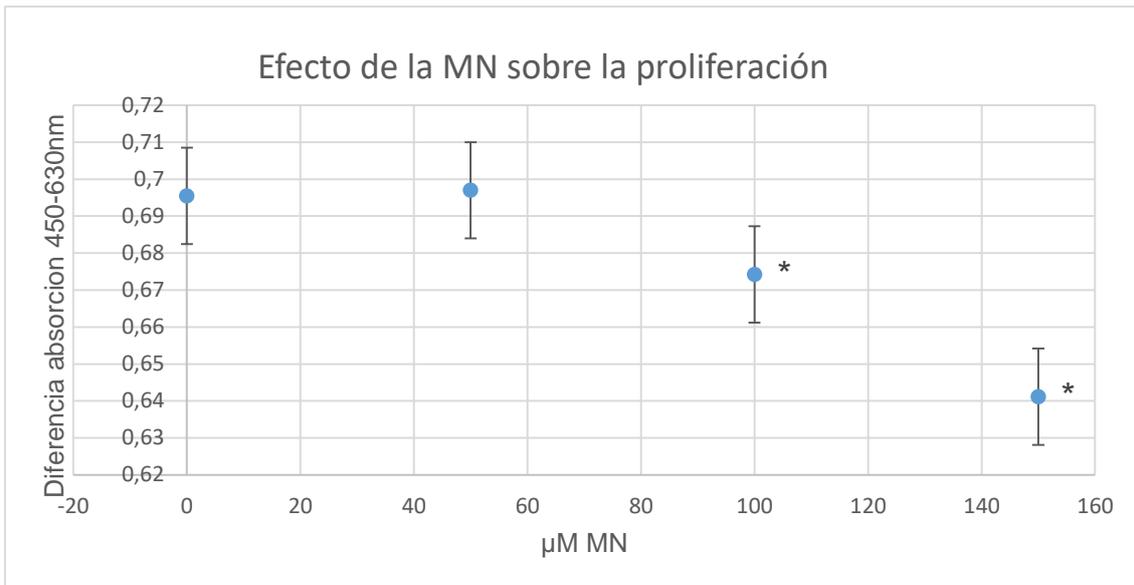


Figura.17. Efecto de la mostaza nitrogenada sobre la proliferación celular de un cultivo de fibroblastos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3 por experimento). Un asterisco (*) indica la existencia de diferencias significativas respecto al control ([mostaza nitrogenada]=0) con un nivel de significación de 0,05.

Revisando la bibliografía, numerosos autores han publicado en sus trabajos la capacidad de la MN de inducir estrés del tipo oxidante sobre las células. Nuestros experimentos indican que a concentración de 50 μM con respecto al control no hay diferencia significativa; en cambio, a una exposición de 100 y 150 μM se encuentran resultados significativos, por lo que se puede confirmar el efecto de la MN como agente oxidante en las células que conlleva a la muerte celular y a una reducción de la proliferación del cultivo.

Para nuestro experimento interesa conocer el interés que presenta el uso de concentraciones bajas crónicas de mostaza nitrogenada. Se han realizado diversos trabajos mostrando el potencial antitumoral de la exposición prolongada a bajas dosis, incluso en la publicación de Chen y su equipo en 2018 se estudió el efecto como quimioterapéutico de mostazas nitrogenadas en valores menores a 100 μM ligadas a otros fármacos, obteniendo un mejorado efecto antitumoral, alta selectividad y toxicidad reducida. (30)

En 2016 Roth y colaboradores trabajaron exponiendo eritrocitos a concentraciones muy elevadas de MN, hasta 56mM. Midieron los niveles presentes de la enzima GPX, que oxida su sustrato, el glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) a la vez que elimina hidroperóxidos y peróxidos orgánicos. Se observó la notable reducción de cantidad de GPX y GSH, mostrando que la MN afecta sobre este mecanismo antioxidante generando estrés oxidativo celular.(31)

El efecto de las MN lleva años estudiándose, ya en 1992 Khan y su grupo estudiaron el efecto sobre hepatocitos de 400, 700, 1000 y 1500 μM . Son concentraciones elevadas que a las 3 horas de exposición con 1500 y 1000 μM había causado el 100% de muerte celular. La acción de 400 μM en ese periodo de tiempo causaba un 20% de muerte celular, que son unos valores más adecuados para nuestro

experimento donde queríamos medir una exposición crónica a MN. También se observó la caída rápida de los niveles de GSH tras la adición de MN incrementando la peroxidación lipídica. (32)

4.3. Efecto protector de quercetina frente a mostaza nitrogenada.

Ante los resultados obtenidos de la exposición de cultivos celulares a MN, se quiso testar si un agente anti radical libre como es la quercetina, tenía efecto protector frente a tóxicos tan oxidantes como son las mostazas nitrogenadas.

El experimento consistió en incubar las células durante 24 horas con 1, 2 y 4 μM de quercetina, para posteriormente en esos mismos pocillos añadir 100 μM de mostaza nitrogenada y mantenerlos durante 72 horas en estufa a 37°C y 5% CO_2 . Pasadas las 72 horas, a las placas se les añadía el colorante WST-1 que permite medir la proliferación celular. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 18.

Todos pocillos, incluido el control, están sometidos a 100 μM de MN. También se incluye, en rojo, el control en el que no hay ni quercetina ni MN. Los resultados observables a las distintas concentraciones de quercetina no se pueden considerar significativos. Sin embargo, sí que se aprecia un aumento de la proliferación del cultivo a concentraciones crecientes de este agente antioxidante.

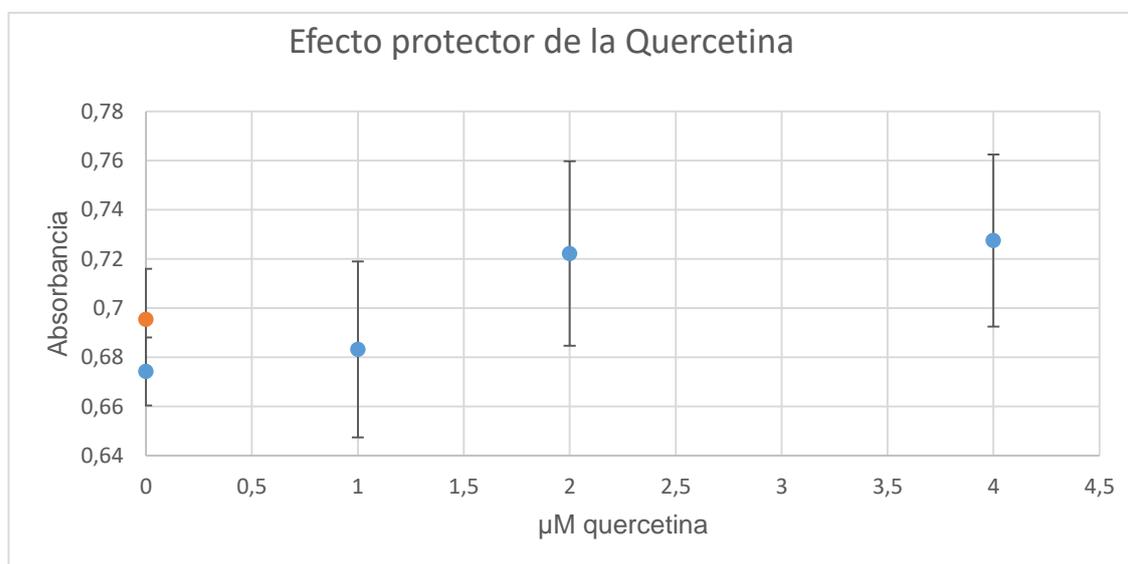


Figura.18. Efecto protector de distintas concentraciones del antioxidante quercetina sobre la proliferación celular de un cultivo de fibroblastos humano sometido a 100 μM de mostaza nitrogenada. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n=3$ por experimento). Se muestra un control azul ([mostaza nitrogenada]= 100 μM , [quercetina]=0) y un control rojo ([mostaza nitrogenada]= 100 μM , [quercetina]=0).

No se encuentran muchos artículos donde se haya medido la protección de la quercetina ante MN, sin embargo, consta el trabajo de Hoffmann y su equipo (1988) con células

Walker de carcinoma de rata en las que se midió la inhibición de la proliferación a concentraciones de MN y de quercetina de hasta 1000 μM , así como el efecto combinado de ambos agentes. Se determinó que la quercetina protege de la oxidación de la MN al hacer que la inhibición de la proliferación del cultivo por parte de este agente sea notablemente menos pronunciada, aunque a concentraciones suficientemente elevadas de MN se llegue a los mismos valores de inhibición de la proliferación.(33) Basándonos en esta referencia, nosotros evaluamos el efecto sinérgico de los agentes a unas dosis de quercetina bajas que según otros trabajos, indicaban el efecto protector (34).

Puesto que se ha visto un incremento de la proliferación del cultivo conforme aumentaba la concentración de quercetina, se llevó a cabo un experimento para ver qué efecto tendría la aplicación de quercetina sobre los fibroblastos y, si de alguna forma, no solo protege de antioxidantes, si no que sobreprotege influyendo sobre la proliferación de un cultivo.

4.4. Efecto de quercetina sobre la proliferación.

Este experimento se realizó incorporando unas concentraciones de quercetina 1, 2 y 4 μM sobre un cultivo de fibroblastos. Las placas se mantuvieron en cultivo en estufa durante un periodo de 72 horas. En la Figura 19 están recogidos los datos obtenidos de la lectura de la placa en el espectrofotómetro con el colorante WST-1.

Se puede apreciar un aumento de la proliferación celular a dosis más elevadas de quercetina, aunque los resultados son sólo significativos para la concentración 4 μM . El gráfico nos permite interpretar que la quercetina de alguna forma incrementa la proliferación celular del cultivo, por lo que se podrían realizar otros experimentos aumentando la dosis de quercetina para poder interpretar de forma significativa las concentraciones que inducen la proliferación y a partir de que dosis puede resultar tóxica para los fibroblastos.

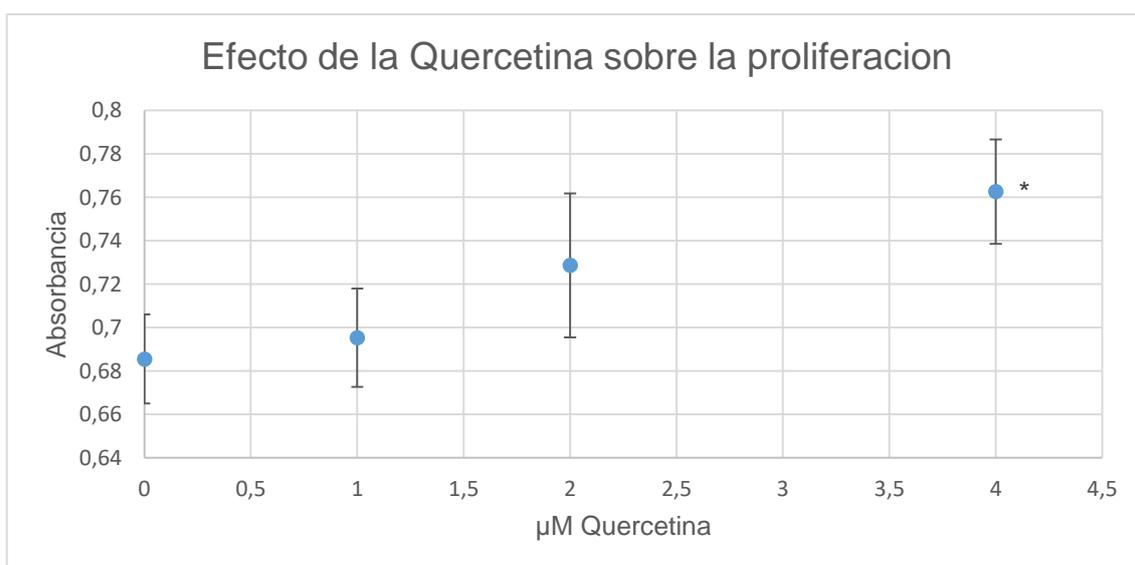


Figura. 19. Efecto de distintas concentraciones de quercetina sobre la proliferación celular de un cultivo de fibroblastos humano. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n=3$ por experimento). Un asterisco (*) indica la existencia de diferencias significativas respecto al control ($[\text{quercetina}]=0$) con un nivel de significación de 0,05

La mayoría de artículos sobre la quercetina hablan de su efecto tóxico a concentraciones elevadas, superiores a 20 μM , produciendo aumentos de la mortalidad, probablemente como consecuencia de su efecto inhibidor sobre genes anti-apoptóticos específicos, como PI3K y otras quinasas(35). Sin embargo, para nuestro experimento nos interesa su efecto promotor de la proliferación celular a bajas concentraciones (menores de 10 μM) sobre fibroblastos, como se muestra en la Tesis Doctoral de Casanova Flor de Lis (2015) (36).

5. CONCLUSIONES

- I. Se ha puesto en marcha la técnica basada en el colorante WST-1 adaptada a nuestro laboratorio y a nuestro modelo celular de fibroblastos humanos en cultivo primario con buenos resultados obteniendo pequeños errores típicos y una buena relación con el número de células vivas.
- II. La exposición crónica de los fibroblastos cultivados con mostazas nitrogenadas disminuyó su proliferación celular de forma dosis dependiente y de manera significativa a partir de 100 μM de MN.
- III. El efecto antiproliferativo de la mostaza nitrogenada fue compensado por la adición de quercetina, aunque los datos obtenidos no son significativos.
- IV. La adición de concentraciones de 1 a 4 μM de quercetina incrementó la proliferación celular de los fibroblastos siendo significativo para la dosis de 4 μM .

5.1. Conclusions.

- I. The technique based on the WST-1 dye has been adapted to our laboratory and to our cell model of human fibroblasts in primary culture. We obtained good results, obtaining small typical errors and a correct relationship with the number of living cells.
- II. Chronic exposure of fibroblasts cultured with nitrogen mustards decreased their cell proliferation in a dose-dependent manner with significant values from 100 μM MN.
- III. The antiproliferative effect of nitrogen mustard was compensated by the addition of quercetin, although the data obtained are not significant.
- IV. The addition of concentrations from 1 to 4 μM of quercetin increased cell proliferation of the fibroblasts being significant for the dose of 4 μM .

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1. Recursos bibliográficos.

Para llevar a cabo la memoria del trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos y reviews mayormente pertenecientes las bases de datos: PubMed, PubChem, Medline, Embase y SciELO. Aquellos artículos seleccionados se han elegido por pertenecer a una fuente de información fiable y por aportar relevancia al tema desarrollado en el trabajo.

La bibliografía ha sido gestionada y citada en el texto mediante el gestor bibliográfico Mendeley, siguiendo las normas de Vancouver.

6.2. Referencias.

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007.
2. Gutiérrez-Salinas J, Mondragón-Terán P, García-Ortiz L, Hernández-Rodríguez S, Ramírez-García S, Núñez-Ramos NR. Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno [Internet]. Vol. 19, *Rev Esp Med Quir*. 2014 [cited 2019 May 20]. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2014/rmq144h.pdf>
3. Justo C, Venereo Gutiérrez R. DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES [Internet]. Vol. 31, *Rev Cubana Med Milit*. 2002 [cited 2019 May 10]. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v31n2/mil09202.pdf>
4. Vaquero-Raya EC, Molero-Richard X. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2019 May 20];28(8):473–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570505715089>
5. Skulachev VP. Mitochondria-Targeted Antioxidants as Promising Drugs for Treatment of Age-Related Brain Diseases. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2012 Jan 25 [cited 2019 May 20];28(2):283–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21987592>
6. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2014 Dec 5 [cited 2019 May 20];224:164–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452175>
7. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* [Internet]. 2003 Oct 15 [cited 2019 May 20];552(2):335–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561818>
8. Kuppusamy P, Zweiers JL. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Characterization of Free Radical Generation by Xanthine Oxidase EVIDENCE FOR HYDROXYL RADICAL GENERATION* [Internet]. Vol. 264. 1989 [cited 2019 May 20]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/bee2/d800294d1b5809be96ad0318beaed5705a2a.pdf>

9. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo Y Do. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* [Internet]. 2011 Dec 22 [cited 2019 May 20];32(6):491–509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22207195>
10. Nauseef WM. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Jun 20 [cited 2019 May 20];283(25):16961–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420576>
11. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress: Figure 1. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2019 May 22];35(5):1147–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956298>
12. Valencia E, Marín A. Balance Redox (oxidantes/antioxidantes) en pacientes críticamente enfermos. *Red Rev Científicas América Lat el Caribe, España y Port* [Internet]. 2003 [cited 2019 May 25];31, núm. 4. Available from: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=195118159006>
13. Maestro-Durán R, Borja Padilla R, Padilla RB. Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y Aceites* [Internet]. 1993 Apr 30 [cited 2019 May 25];44(2):107–11. Available from: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1106/1113>
14. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* [Internet]. 2003 Feb [cited 2019 May 25];22(1):18–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569111>
15. ¿Qué es la vitamina C? ¿Para qué sirve? [Internet]. [cited 2019 May 25]. Available from: <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminC-DatosEnEspanol.pdf>
16. Sautin YY, Johnson RJ. URIC ACID: THE OXIDANT-ANTIOXIDANT PARADOX. [cited 2019 May 25]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895915/pdf/nihms212414.pdf>
17. Mueller L, Boehm V. molecules Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different in Vitro Assays. *Molecules* [Internet]. 2011 [cited 2019 May 25];16:16. Available from: www.mdpi.com/journal/moleculesArticle
18. Littarru GP, Tiano L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Mol Biotechnol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2019 May 25];37(1):31–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914161>
19. Tekiner A, Yucel D, Bayar MA, Yucel O, Erdem Y, Karakaya J. The effect of nitrogen mustard on the enzymatic antioxidant defense of rat brain tissue and the therapeutic value of proanthocyanidin. *Turk Neurosurg* [Internet]. 2011 [cited 2019 May 25]; Available from: http://www.turkishneurosurgery.org.tr/summary_en_doi.php?doi=10.5137/1019-5149.JTN.4028-10.3
20. Castaño A, Roy U, Schärer OD. Preparation of Stable Nitrogen Mustard DNA Interstrand Cross-Link Analogs for Biochemical and Cell Biological Studies. *Methods Enzymol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2019 May 25];591:415–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687917300885>

21. 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. *Toxicol Lett* [Internet]. 2015 Jun 15 [cited 2019 May 25];235(3):161–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891025>
22. Dong Y, Wang J, Feng D, Qin H, Wen H, Yin Z, et al. Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. *Int J Med Sci* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 25];11(3):282–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516353>
23. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* [Internet]. 2001 Oct [cited 2019 Jun 21];47(5):357–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11814152>
24. Parish BJ. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *J Vis Exp* [Internet]. 2010 [cited 2019 May 24];(44):2259. Available from: www.jove.comurl:<https://www.jove.com/video/2259>
25. CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2019 May 24]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C34554>
26. WST-1 Cell Viability & Proliferation Assay [Internet]. [cited 2019 May 24]. Available from: <https://www.sciencellonline.com/PS/8038.pdf>
27. Wallace PK, Tario JD, Fisher JL, Wallace SS, Ernstoff MS, Muirhead KA. Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: Monitoring proliferation by dye dilution. *Cytom Part A* [Internet]. 2008 Nov [cited 2019 May 27];73A(11):1019–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18785636>
28. Tario JD, Humphrey K, Bantly AD, Muirhead KA, Moore JS, Wallace PK. Optimized Staining and Proliferation Modeling Methods for Cell Division Monitoring using Cell Tracking Dyes. *J Vis Exp* [Internet]. 2012 Dec 13 [cited 2019 May 27];(70):e4287. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271219>
29. Lyons AB, Doherty K V. Flow Cytometric Analysis of Cell Division by Dye Dilution. In: *Current Protocols in Cytometry* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2004 [cited 2019 Jun 23]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142956.cy0911s27>
30. Chen Y, Jia Y, Song W, Zhang L. Therapeutic Potential of Nitrogen Mustard Based Hybrid Molecules. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Dec 17 [cited 2019 Jun 27];9:1453. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01453/full>
31. Roth EJ, Nagel R, Neuman G, Vanderhoff G, Kaplan B, Jaffe E. Metabolic effects of antisickling amounts of nitrogen and nor-nitrogen mustard on rabbit and human erythrocytes. *Blood*. 1975;45(6).
32. Khan S, Ramwani JJ, O'Brien PJ. Hepatocyte toxicity of mechlorethamine and other alkylating anticancer drugs. Role of lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1992 May 8 [cited 2019 Jun 26];43(9):1963–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1596284>

33. Hofmann J, Doppler W, Jakob A, Maly K, Posch L, Uberall F, et al. Enhancement of the antiproliferative effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) and nitrogen mustard by inhibitors of protein kinase C. *Int J cancer* [Internet]. 1988 Sep 15 [cited 2019 Jun 26];42(3):382–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3417367>
34. Maramaldi G, Togni S, Pagin I, Giacomelli L, Cattaneo R, Eggenhöfner R, et al. Soothing and anti-itch effect of quercetin phytosome in human subjects: a single-blind study. *Clin Cosmet Investig Dermatol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 Jun 26];9:55–62. Available from: <https://www.dovepress.com/soothing-and-anti-itch-effect-of-quercetin-phytosome-in-human-subjects-peer-reviewed-article-CCID>
35. Malavolta M, Pierpaoli E, Giacconi R, Costarelli L, Piacenza F, Basso A, et al. Pleiotropic Effects of Tocotrienols and Quercetin on Cellular Senescence: Introducing the Perspective of Senolytic Effects of Phytochemicals. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 26];17(4):447–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343116>
36. Casanova Flor de Lis A. Estudio del efecto de la radiación ultravioleta sobre fibroblastos y su protección por Quercetina.[Tesis doctoral] Zaragoza. Facultad de Medicina; 2015