



**Universidad
Zaragoza**



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**Profilaxis con Ácido ascórbico y
Quercetina frente a
Bis(2-cloroetil)amina**

**Ascorbic Acid and Quercetin
prophylaxis against
bis(2-chloroethyl)amine**

Carlota Herrerías Velilla

Directora: Dra. Desirée Pereboom Maicas

Departamento de Farmacología y Fisiología

Facultad de Medicina

Zaragoza 2018

ABREVIATURAS

CAQ	Convención de Armas Químicas
CEES	Sulfuro de 2-cloroetilo (analog 2-chloroethyl ethyl sulfide)
COX2	Ciclooxigenasa-2
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco)
GSH	Glutación
IP	Ioduro de propidio
MAP	Magnesio ascorbil fosfato
MN	Mostaza nitrogenada
NF-KB	Factor nuclear kappa B
REDOX	Reducción-oxidación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Vit C	Vitamina C

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	0
ABSTRACT	0
INTRODUCCIÓN	1
GAS MOSTAZA	1
RECUERDO HISTÓRICO	1
MECANISMO DE ACCIÓN	2
ALQUILACIÓN DE ADN Y APOPTOSIS	2
INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO	3
LESIONES POR EXPOSICIÓN	5
LESIONES CUTÁNEAS	6
LESIONES RESPIRATORIAS	7
LESIONES OCULARES	10
EFECTOS SISTÉMICOS	11
TRATAMIENTO Y ANTÍDOTOS	11
APLICACIONES TERAPÉUTICAS	12
VITAMINA C	13
FUNCIONES	14
ANTIOXIDANTE	14
FUNCIÓN ENDOTELIAL	14
HORMONAL	15
INMUNIDAD	16
SÍNTESIS DE COLÁGENO	16
AGENTE DESPIGMENTANTE	16
FARMACOCINÉTICA	16
CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS	17
DISTRIBUCIÓN Y TRANSPORTE	17
EXCRECIÓN	19
TOXICIDAD	19
TRATAMIENTO TÓPICO CON VITAMINA C	20
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	23
MATERIAL	23
REACTIVOS	23
TRATAMIENTOS	24
EQUIPOS Y MATERIAL FUNGIBLE	24
MÉTODOS	26
MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR	26
TRATAMIENTO CON VIT C, QUERCETINA Y MN	26
ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT TRAS EXPOSICIÓN A MN	27
ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR CON CITOMETRÍA DE IMAGEN	27
ESTADÍSTICA	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
ESTUDIO VIABILIDAD CELULAR CON MTT	30
ESTUDIO DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE IMAGEN	32
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	37
RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMEN

El gas mostaza pertenece al grupo de agentes vesicantes, usados como armas químicas en múltiples conflictos bélicos. Su mecanismo de acción es la lesión tisular mediante la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno generando estrés oxidativo.

Nuestra hipótesis de trabajo es usar sustancias antioxidantes como vitamina C y quercetina, antes de la exposición a este tóxico, para mitigar el estrés oxidativo y la inflamación derivados del mismo. Para ello hemos estudiado *in vitro* los efectos de bis(2-cloroetil)amina (mostaza nitrogenada) y de las sustancias antioxidantes utilizando fibroblastos humanos en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), ácido ascórbico, quercetina y la combinación de ambas, para analizar su posible efecto protector ante la exposición a mostaza nitrogenada. Tras 30 minutos de tratamiento con las sustancias antioxidantes, hemos expuesto estas células a bis(2-cloroetil)amina durante una hora. Para determinar el grado de protección que ofrecen estos compuestos se ha estudiado la viabilidad celular tras 24 horas con bromuro de tetrazolio (MTT).

Se han determinado los diferentes tipos de muerte celular (necrosis, necroptosis, apoptosis temprana, apoptosis tardía) provocados por bis(2-cloroetil)amina a través de citometría de imagen-AMNIS con una dosis de 2 mM durante una hora de exposición.

Se han examinado los efectos protectores de vitamina C y quercetina demostrando una mejora de la supervivencia celular y viéndose este efecto potenciado cuando combinamos ambas sustancias.

PALABRAS CLAVE

Gas mostaza, ácido ascórbico, citometría de imagen, MTT, quercetina, vitamina C.

ABSTRACT

Mustard gas is a vesicating agent used in chemical warfare. This toxic tissue injury is mediated by the overproduction of reactive oxygen species resulting in oxidative stress.

Our hypothesis consists in using, antioxidant agents like vitamin C and quercetin, to alleviate oxidative stress and secondary inflammation following exposure to bis(2-chloroethyl)amine. We have studied the effects of bis(2-chloroethyl)amine and antioxidant agents *in vitro* using human fibroblasts cultivated in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), ascorbic acid, quercetin and both combined to analyze their protective effect against nitrogen mustard. We have treated with antioxidant agents our fibroblasts and after 30 minutes we have exposed them to bis(2-chloroethyl)amine for one hour more.

To determinate the protection of these antioxidant agents, we have studied cellular viability after 24 hours by the technique MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium).

In order to determinate the different types of cellular death that bis(2-chloroethyl)amine 2 mM produces by an hour (necrosis, necroptosis, early apoptosis, late apoptosis) , we have used image cytometry AMNIS.

We have examined the protective effects of vitamin C and quercetin, both of them showing a significantly increase of cell survivor. We have observed too a better protective effect if we use both combined.

KEYWORDS

Mustard Gas, Ascorbic Acid, Image cytometry, MTT, Quercetin, Vitamin C.

1. INTRODUCCIÓN:

Gas mostaza

Recuerdo histórico:

El gas mostaza es el mayor representante dentro del grupo de agentes vesicantes. Ha sido utilizado como arma biológica en múltiples conflictos bélicos, como la Primera Guerra Mundial, donde se empleó por primera vez.

Así, durante este periodo nació el grupo denominado como Agentes Vesicantes, donde se incluyen; las mostazas de azufre, las mostazas nitrogenadas, las Lewisitas y la Oxima de fosgeno.

El gas mostaza se conoce coloquialmente como Iperita, puesto que fue utilizado por los alemanes por primera vez en Ypres en 1912, y los afectados describieron su olor como similar al ajo o la mostaza, de ahí su otro nombre.

Otros conflictos bélicos donde se utilizó el gas mostaza como agente de guerra fueron en España, en la guerra del Rif en 1920 e Italia en Etiopía en 1935. También se usó en la guerra de Japón contra China en 1938 y probablemente en Egipto en la Guerra Civil Yemení en 1960. (1)

El caso más reciente donde se utilizó fue en la guerra Irán-Iraq en 1983, donde se atacó tanto a militares como civiles por parte del ejército Iraquí. Según Seyed cerca de 100.000 iraníes han estado expuestos a este agente, de los cuales 34.000 sujetos han sido estudiados y continúan bajo seguimiento. (2)

Como resultado de los sucesos anteriores se creó en 1997 la CAQ (Convención de Armas Químicas), un tratado internacional de no proliferación, el cual, no solo prohíbe la síntesis, el almacenamiento y el uso de cualquier arma química, sino que también obliga a aquellos Estados que las posean a destruirlas. (1)

Sin embargo, a pesar de su prohibición, el gas mostaza está siendo utilizado actualmente por las fuerzas militares sirias como arma química, junto con gas sarín y gas cloro, contra grupos de rebeldes y civiles.

Mecanismo de acción

El gas mostaza es un potente agente vesicante que causa lesiones principalmente a nivel cutáneo, ocular y respiratorio. Se trata de una sustancia de características lipofílicas, por lo que penetra rápidamente en los tejidos y células, reaccionando con los grupos sulfidril, carboxi y amino, así como con formas nitrogenadas causando estrés oxidativo y nitrooxidativo. (3)

A pesar de ser conocido como “gas” mostaza, en realidad, los agentes vesicantes son líquidos a temperatura ambiente, presentan una volatilidad relativamente baja y esa cualidad les permite permanecer un mayor tiempo en la zona donde se emplean. (1)

No se conoce con exactitud el mecanismo de acción, aunque se sabe que reacciona con diferentes compuestos causando daño celular de dos formas diferentes:

Alquilación del ADN y apoptosis:

Se le conoce como un agente alquilante que reacciona con gran cantidad de macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, así como micromoléculas como el glutatión. (4, 5)

Tanto las mostazas de azufre como las nitrogenadas, tienen una reacción intramolecular que produce iones sulfonio o amonio, respectivamente. Esta reacción es favorecida por el agua y el aumento de temperatura, por ello son las zonas más húmedas del organismo las más afectadas.

Estos iones sulfonio y amonio son los que tienen el efecto alquilante sobre el DNA, sobre otras moléculas y son los que llevan a la muerte celular. Este mecanismo explica porque las células con mayor velocidad de división son las más afectadas.

Otras posibles dianas de este agente alquilante, son las enzimas que contienen grupos sulfidril, que son las encargadas de regular la homeostasis del calcio. Su lesión causa un aumento del calcio intracelular y provoca la apoptosis de la célula. (1)

Inflamación y estrés oxidativo:

El gas mostaza también produce un aumento de la liberación de citoquinas y células inflamatorias provocando daño celular y lesiones tisulares. Esto se produce como consecuencia de la activación de diferentes proteínas y vías de señalización, como el factor nuclear kappa B (NF-KB) que estimula a la ciclooxigenasa-2 (COX2), lo que produce un aumento de los mediadores de la inflamación y de las citoquinas, provocando la migración de células inflamatorias en los tejidos del organismo. (6)

Es importante conocer cómo funciona el proceso de oxidación-reducción: (7)

- La oxidación implica la pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno.
- La reducción consiste en la ganancia de electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno.

Un estado “redox” sería el equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe, se genera estrés oxidativo.

Los radicales libres son aquellas especies químicas que presentan uno o más electrones desapareados, tienen una vida media muy corta y causan daño en la célula cuando están en altas concentraciones.

El metabolismo humano libera radicales libres (en la cadena respiratoria o los leucocitos activados), pero también se producen por factores ambientales como el tabaco, la contaminación, el alcohol, algunas enfermedades e infecciones, siendo la radiación ultravioleta el mayor generador de radicales libres exógenos. (7-9)

El principal mecanismo de acción del gas mostaza es generar estrés oxidativo, actuando en dos dianas muy importantes:

- **Glutación**

El gas mostaza interacciona con el glutatión (GSH) provocando su disminución. El GSH es un péptido que contiene un grupo sulfidrilo que le permite la reducción de ROS, previniendo así la pérdida de integridad de la membrana celular, por lo que su disminución contribuye al aumento de radicales libres provocando la pérdida de la homeostasis oxidación-reducción y generando estrés oxidativo. (5, 6, 10)

- **ROS**

Durante el metabolismo normal, el oxígeno se utiliza en las mitocondrias para producir energía. Un pequeño porcentaje de oxígeno no se reduce por completo, lo que lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno conocidas como ROS. (9)

Las ROS principales son:

ROS	FORMULA
Anión superóxido	O ₂ ⁻
Radical hidróxilo	OH [·]
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Oxígeno singlete	1O ₂
Radicales alcoxí	RO
Radicales peróxido	ROO

Tabla I. Radicales libres. Tabla realizada por la autora usando la bibliografía citada. (7-9)

Se ha visto que tras la exposición a gas mostaza se produce un aumento de ROS. Laskin, recogió en una tabla diferentes artículos que miden, mediante distintos biomarcadores, el estrés oxidativo inducido por el gas mostaza.

Vesicant-induced oxidative stress in dermal and ocular tissues

Vesicant	System	Effects
<i>In vitro</i> studies		
CEES	PAM212 mouse keratinocytes	↑ H ₂ O ₂ production, ↑ protein oxidation, ↑ CuZn-SOD, catalase, GST, thioredoxin reductase
SM	Human HaCaT keratinocytes	↑ nitric oxide, nitrotyrosine protein, 8-isoprostane formation, iNOS and eNOS activity
<i>In vivo</i> studies		
CEES	Mice (IP)	↓ GST, ↓ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
CEES	SKH-1 mice (topical)	↑ 4-hydroxynonenal and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) formation, protein oxidation, protein adduct formation
CEES	SKH-1 mice (topical)	↑ myeloperoxidase activity
SM	Guinea pigs (topical-shaved)	↑ inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein
Antioxidant treatments		
SM	Guinea pigs (topical-shaved and depilated)	↓ skin lesions with CuZn-SOD, Mn-SOD No effect if given post-SM exposure
SM	Normal human keratinocytes	↑ cell survival with sulforaphane pretreatment
SM	SVK-14 human keratinocytes	↑ cell survival with GSH and methenamine pretreatment
SM	Isolated perfused pig skin	↓ number of dark basal keratinocytes, no change in vesication with thiosulfate, cysteine, niacinamide, or indomethacin pretreatment
NM	Guinea pigs (topical-shaved and depilated)	↓ erythema, necrosis, ulceration, edema, inflammation, and dermo-epidermal separation with antioxidants zinc oxide + zinc chloride + dimethylpolysiloxane pretreatment
NM	A431 human epidermoid cells	↓ lipid peroxidation with butylated hydroxyanisole (BHA), ↓ cytotoxicity with BHA and ebselen
NM	Guinea pigs (topical-shaved and depilated)	↓ reduced ulceration, fibrosis, nuclear pyknosis, hyperkeratosis with zinc chloride and desferrioxamine post-treatment
SM	Normal human keratinocytes and hairless guinea pig keratinocytes Hairless guinea pigs (vapor cup)	↓ cytotoxicity with pretreatment of cells with L-thiocitrulline (L-TC) or L-nitroarginine methyl ester decreased cytotoxicity, no effect post-treatment No effects with pre or post treatment observed <i>in vivo</i>
NM	Rabbit cornea (eye drops)	↓ corneal damage and ↑ corneal re-epithelialization with dexamethasone + zinc desferrioxamine post-treatment

SM, sulfur mustard; NM, nitrogen mustard.

Tabla II. (4)

Se observa que los iones sulfonio, derivados del gas mostaza, producen radicales libres derivados del carbono y provocan la reducción del oxígeno molecular para formar el anión superóxido y radicales peróxido e hidróxido. También se produce una disminución de antioxidantes intracelulares, que provoca el aumento de los agentes oxidativos, de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, causando estrés oxidativo. (5, 11)

Las principales dianas de los ROS son proteínas, lípidos y ADN. Oxidan las bases de ADN, afectando la transcripción de genes. También oxidan los ácidos grasos libres y las lipoproteínas, alterando la permeabilidad de la membrana celular. Oxidan proteínas modificando la función de las enzimas y la estructura de las mismas.

Como consecuencia, se ha comenzado a investigar sobre el uso de agentes antioxidantes como terapia tras la exposición al gas mostaza, pero también como profilaxis ante una posible exposición. Así, se ha utilizado agentes antioxidantes como el glutatión (GSH), vitamina E, flavonoides y diversos preparados de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o la catalasa. (4, 9)

Tewari estudió el estrés oxidativo producido por el gas mostaza en células de la epidermis humana y en ratones. Expuso las células a CEES después de haberles administrado AEOL 10150 y comprobó que atenuaba la toxicidad inducida por el CEES, disminuyendo el daño en el ADN celular y los niveles de ROS. (12)

Lesiones por exposición

El gas mostaza se absorbe principalmente a través de la piel, ojos y por inhalación, debido a su elevada lipofilia, lo que hace que sean sus principales puertas de entrada. Los daños que produce en estas dianas son muy diversos y de variable gravedad dependiendo de las vías de exposición, la dosis y las condiciones medioambientales, como temperatura y humedad, en las que tiene lugar el contacto. También presenta afectación sistémica, sobre todo a nivel de médula ósea, sistema digestivo y sistema nervioso central. Además no actúa de manera inmediata sobre el organismo sino que presenta un periodo de latencia de unas 2-48 horas tras la exposición, lo que dificulta el diagnóstico por parte del personal médico. La dosis letal en humanos es de 200 mg ingerido, o de 3 g cuando se aplica sobre la piel. (1, 5, 10, 13)

Lesiones cutáneas:

Aproximadamente un 10-20% del gas mostaza penetra en epidermis y dermis, e incluso llega a la circulación sistémica. (6)

Los niveles tóxicos a nivel dérmico son de 100-300 mg min/m³ en forma de vapor y de 10-20 µg/cm² en estado líquido. A pesar de que se absorbe de manera muy rápida, los síntomas empiezan a aparecer a las 2 horas agudizándose a las 48 horas. (5)

En piel el primer signo que aparece es el eritema, que posteriormente, se acompaña de ampollas pequeñas, que al agruparse, forman otras de mayor tamaño. Las lesiones más graves presentan necrosis e infecciones secundarias.

La reepitelización es lenta, suele dejar cicatrices y una hiperpigmentación residual intensa, más evidente en zonas de pliegues. (1)

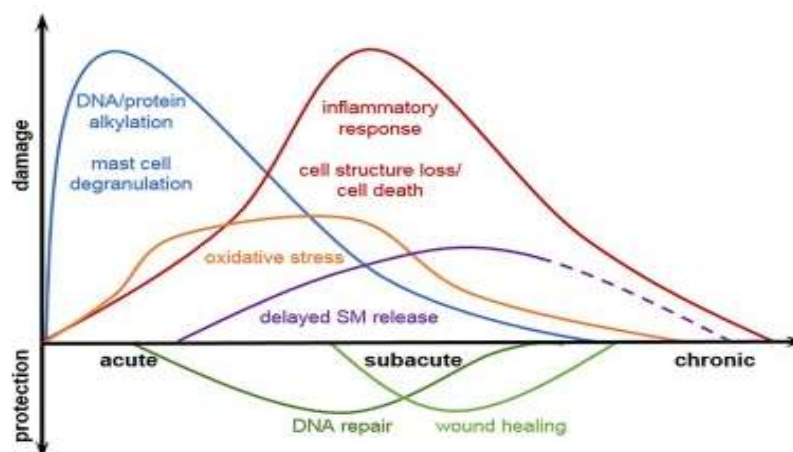


Tabla III. (14)

En la publicación de Rose en 2017, se presenta la evolución temporal del mecanismo de lesión cutáneo y su reparación. Primero se daña el ADN y se produce la degradación de mastocitos, seguidamente tiene lugar el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria. Las células pierden su integridad y aparecen ampollas y úlceras en la piel. Posteriormente se empieza a reparar el daño inducido por el gas mostaza. Se cree que existen depósitos de este agente que producirían una liberación retardada, pero no hay datos suficientes. (14)

La mayoría de las lesiones se presentan en axilas, cuello y área genital, puesto que son las zonas más húmedas. Los niños presentan una mayor susceptibilidad y su evolución es más rápida. (1, 6)

Schmidt en 2017 presenta un caso de exposición accidental a gas mostaza, en región abdominal y antebrazo. En las siguientes fotografías podemos observar la evolución de las lesiones tras la exposición:



Figura 1: Lesiones por exposición a gas mostaza. (15)

Lesiones respiratorias:

La exposición a los agentes vesicantes causa daños respiratorios tanto a corto como a largo plazo. La citotoxicidad aguda, el estrés oxidativo y la rotura de la estructura tisular, entre otros, son los que alteran la función pulmonar e inducen la activación de fibras musculares lisas y fibroblastos que generan depósitos de colágeno, provocando fibrosis que da lugar a enfermedades crónicas. (3)

A nivel respiratorio, la exposición a agentes vesicantes causa daño en tejido bronquial, inflamación y obstrucción de las vías aéreas.

TFG- Introducción

- Síntomas agudos:

Han sido muchos autores los que describen los síntomas que producen estos agentes tóxicos, Khazdair M. y cols., 2015, Panahi Y. y cols., 2017, Pita R. y cols., 2010. Revisando todos estos artículos, he podido observar que los síntomas que refieren son: tos, rinorrea, opresión torácica, faringitis aguda, laringitis, edema e hiperemia de mucosa bronquial, disnea, formación de pseudomembranas, broncoespasmo, neumonía, hemorragia pulmonar y fallo respiratorio final. En los casos más graves puede producirse un edema pulmonar no cardiogénico y causar la muerte del paciente. Mediante la espirometría se han encontrado patrones obstructivos y/o restrictivos. (1, 6, 16)

La publicación de Razavi en 2013 describe la patología en cuatro fases respiratorias:

- 1) Fase catarral
- 2) Estado de laringotraqueítis pseudomembranosa
- 3) Bronquitis pseudomembranosa y bronconeumonía
- 4) Formación de gangrena y abscesos pulmonares

- Síntomas crónicos:

La exposición al gas mostaza también presenta consecuencias a largo plazo, incluso después de veinte años tras la exposición, con síntomas como: aumento de la hipersensibilidad del tracto respiratorio, bronquitis crónica, fibrosis pulmonar, neumonía, bronquiolitis, estenosis del árbol traqueobronquial, asma, bronquiectasias, tos crónica y enfisema. (6, 16)

Algunos autores como Doi han publicado estudios de malignización de lesiones con diagnóstico de cáncer de pulmón en soldados iraníes expuestos a este gas. Realizó un estudio de cohortes en Japón y observó una mayor incidencia de cáncer de pulmón en pacientes expuestos a este gas cuatro años antes que el resto de la población. Taghaddosinejad estudia en su publicación autopsias de pacientes expuestos hace veinte años aproximadamente y encontró, además de fibrosis e infección, células malignas infiltrando tejido pulmonar. (17, 18)

En la figura 2 podemos observar que en la base de la lengua y la faringe aparece inflamación y rojez. Se encuentran también escaras necróticas amarillas en laringe y en carina. Aparecer líneas punteadas formadas grupos de vesículas en el muro posterior que pueden sangrar. Tanto la tráquea como los bronquios contienen abundante pus amarillo.

En la figura 3 vemos que el bronquio está lleno de fibrina y pus, y el epitelio de revestimiento está completamente destruido. Aparece alrededor del bronquio un aro de hemorragia causado por la propia inflamación. Además comienza a aparecer infección en los alveolos cercanos al tejido inflamatorio. De momento no se aprecia ni edema ni enfisema alveolar. (11)

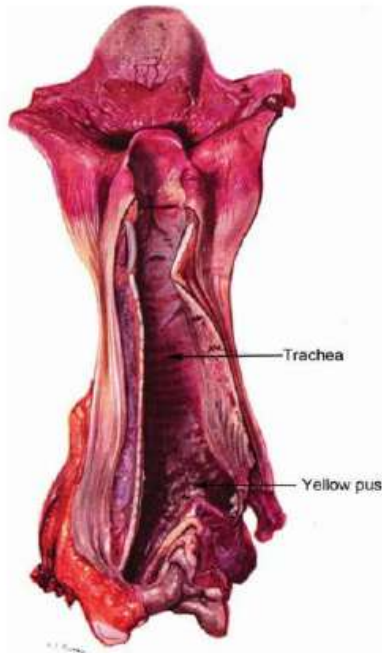


Figura 2. Lesiones macroscópicas en vías respiratorias altas al 12º día post-exposición.

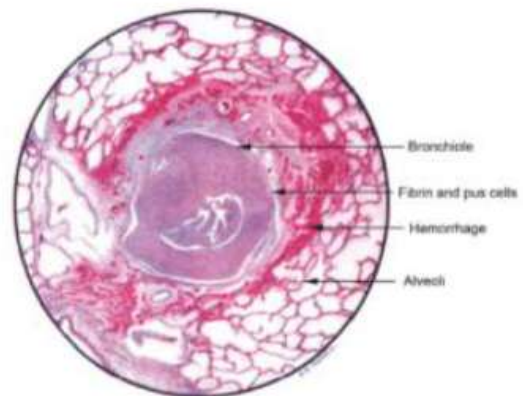


Figura 3. Sección de un pulmón humano a las 40 horas post-exposición a gas mostaza

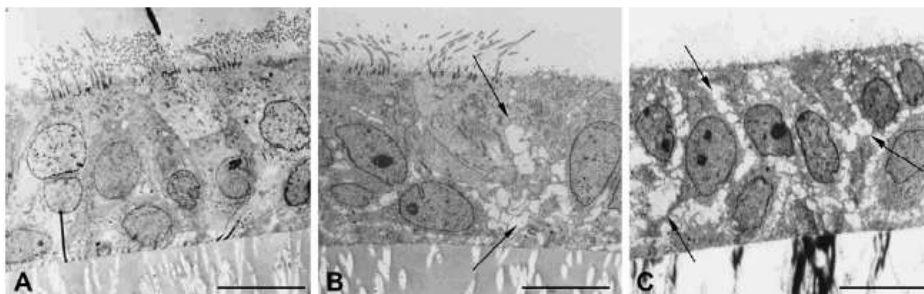


Figura 4. Imágenes a microscopio óptico

En la figura 4 se muestran los cambios agudos producidos en células del epitelio bronquial y fibroblastos derivados de tejido pulmonar tras la exposición a gas mostaza.

TFG- Introducción

- a) Cultivo en condiciones de control
- b) Cultivo expuesto a concentraciones de 300 μM de gas mostaza.
- c) Cultivo expuesto a concentraciones de 500 μM de gas mostaza.

Como se observa en B y C el gas mostaza indujo una dilatación del espacio intercelular, señalado por las flechas. Además en concentraciones altas, C, casi han desaparecido los cilios. (19)

Lesiones oculares:

Los ojos son el órgano más susceptible a la acción del gas mostaza debido a la humedad de la superficie ocular y al alto grado de renovación y metabolismo de las células del epitelio corneal.

El gas mostaza reacciona rápidamente con la solución acuosa ocular, alquila el colágeno corneal, aumenta los niveles de colagenasa y provoca una respuesta inflamatoria aguda con fotofobia y conjuntivitis. (6, 10)

Revisando las dosis tóxicas que manejan los autores Panahi y Solberg he realizado una tabla correlacionando dichas dosis con los primeros síntomas que aparecen. (10, 13)

Niveles	Dosis	Síntomas
Leve	<80 mg/min/m ³	Inflamación palpebral, conjuntivitis
Moderado	100-200 mg/min/m ³	Dolor ocular, ojo seco, fotofobia, blefaroespasmos, lesiones corneales: queratitis, abrasión corneal, úlceras y perforación
Grave	>200 mg/min/m ³	Miosis, quemosis, necrosis conjuntival y palpebral, daño en la vascularización del limbo, uveítis anterior, vasodilatación del iris, edema del estroma corneal, neovascularización corneal, cataratas, adhesión entre párpado y globo ocular. Puede aparecer una infección bacteriana 2 ^a (P. aeruginosa)

Tabla IV. Relación dosis de exposición y síntomas.

- Síntomas crónicos:

Estos síntomas se producen porque persiste la inflamación, tienen lugar reacciones autoinmunes y se liberan productos tóxicos en el metabolismo del gas mostaza. Podemos observar: inflamación crónica de la vascularización de la cornea y

de la conjuntiva que deriva en hemorragias, isquemia, depósitos lipídicos, cicatrices, opacificación corneal, ulceración y perforación, adelgazamiento corneal y erosiones. También aparecen depósitos de cristales de colesterol, déficit de células del limbo, neovascularización y lagrimeo. Además se han visto casos de visión borrosa, prurito, dificultades para la lectura, ojo rojo, dolor de ojo y sensación de cuero extraño, que también aparecían en daños agudos. (6, 10)



Figura 5: Se aprecia una úlcera corneal debida a la exposición a gas mostaza. (1)

Efectos sistémicos:

- **Gastrointestinales:** el gas mostaza daña el sistema digestivo mediante la ingestión de alimentos o agua contaminada y también por inhalación o contacto con la piel. Provoca náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, gastroenteritis aguda, pérdida de electrolitos, destrucción de la mucosa intestinal y colitis.
- **Sistema inmunitario y hematopoyético:** produce la supresión de la médula ósea. En los primeros días se aprecia leucocitosis, seguida de leucopenia tras una semana de exposición. También se produce un aumento de las inmunoglobulinas en exposiciones agudas y una disfunción de la inmunidad humoral y celular. (1, 6)
- **Sistema nervioso central y periférico:** se han descrito síntomas neuropáticos, cefaleas, agitación y letargia. En estos pacientes se han observado un aumento de trastornos obsesivos compulsivos, hostilidad, enfermedades psicosomáticas, depresión, insomnio, problemas emocionales, psicosis y estrés postraumático, causando todo ello una disminución de su calidad de vida y problemas en el ámbito social.
- **Sistema urogenital:** aparecen síntomas agudos de daño renal, disminución de la secreción androgénica y de la espermatogénesis. A largo plazo puede aparecer la infertilidad y la disminución de libido. (6)

Tratamiento y antídotos

No existe tratamiento curativo frente a la intoxicación por gas mostaza, por lo que todas las medidas terapéuticas van dirigidas a mitigar el daño provocado.

Debemos pautar un tratamiento paliativo y medicina para mitigar el dolor, como morfina, antihistamínicos o sedantes. Hasta ahora ningún autor ha publicado trabajos con métodos preventivos para paliar el posible daño por exposición a estos agentes tan nocivos.

Como medidas terapéuticas después de la exposición, debemos retirar lo antes posible la ropa contaminada, lavar piel y ojos trasladando al herido lo antes posible al hospital. Posteriormente será examinado y se le administrará 500 mg de tiosulfato de sodio, como posible antídoto, también son útiles la cisteína y los corticoides.

En lesiones cutáneas, el primer paso es desinfectar. Posteriormente se desbridan las ampollas más grandes y se aplica pomada de sulfadiazina argéntica para prevenir infecciones secundarias. Para controlar el dolor se puede administrar antihistamínicos y corticoides tópicos. (1, 6)

El primer paso en lesiones oculares, consiste igualmente, en lavado con suero salino. Tras el lavado, es recomendable realizar una tinción con colirio de fluoresceína para evaluar si existe daño corneal. Además, hay que añadir lágrimas artificiales y lubricantes, antibióticos tópicos, corticoides, midriáticos (para prevenir adherencias entre iris y córnea) y la utilización de gafas oscuras. (1, 6, 10)

El tratamiento del daño respiratorio, es mediante oxigenoterapia con aire húmedo, terapia física respiratoria, antibióticos, agentes mucolíticos, broncodilatadores y traqueostomía si aparece laringoespasma. (1, 6, 11)

Aplicaciones terapéuticas

Actualmente se estudia la utilidad del gas mostaza como antineoplásico. El investigador Hu Xu sintetiza, en su estudio, híbridos de mostaza nitrogenada y observa que presentan actividad antiproliferativa frente a diferentes estirpes celulares cancerosas. (20)

Gilad y Acharya muestran en sus estudios la utilidad de estos agentes alquilantes como antineoplásicos combinándolos con diferentes moléculas, como la amonafida (AM) inhibidora de la topoisomerasa II o con oximas de esteroides, respectivamente. Estos estudios orientan su utilidad hacia posibles tratamientos de melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o leucemias, pero todavía está en proceso de investigación. (21, 22)

Vitamina C

La vitamina C es un potente antioxidante esencial para el ser humano. Es una molécula hidrofílica que además presenta propiedades antiinflamatorias e inmunitarias. Posee un amplio espectro de acción, puesto que es efectiva contra radicales de peróxido, hidroxilo, superóxido y peroxinitrilo. Sin embargo, los seres humanos no pueden sintetizarla y como cualquier vitamina, tienen que obtenerla a través de la dieta. Las principales fuentes de vitamina C son las acelgas, tomates, limón, naranja, mandarina, kiwi, fresa y guayaba. (7, 23-27)

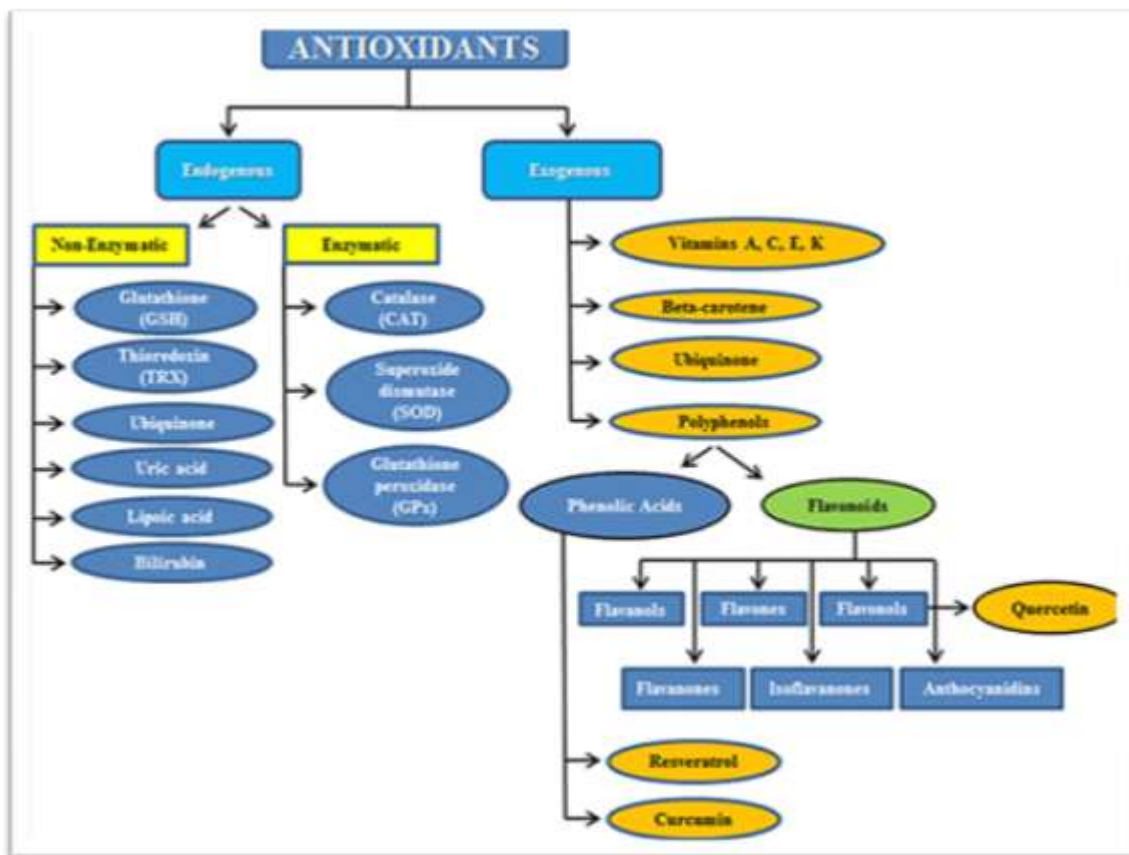


Figura 6. Grupos de antioxidantes en el ser humano. (9)

Existen dos formas biológicas de Vit. C en nuestro organismo, el ácido ascórbico, que es la forma reducida, y el ácido dehidroascórbico, que es la forma oxidada. La Vit. C está presente en el plasma principalmente en su forma reducida, en unas concentraciones de 30-60 μM . Por otra parte, hay células y tejidos (glándulas suprarrenales, hipófisis, cerebro, bazo e hígado) que tienen un contenido de ácido ascórbico de hasta 100 veces más que el presente en el plasma. (26)

Saitoh ha realizado en este año un estudio sobre el transporte y la acumulación de la Vit. C en células senescentes, utilizando fibroblastos. Observó que, al introducir 100 μM de ácido ascórbico en su cultivo, la Vit. C se acumulaba 1.6 veces más en las células “viejas”, que en las “jóvenes”, demostrando que la captación de Vit. C es potenciada por las células senescentes, ya que tienen mayores niveles de ROS. Este autor también descubrió que la captación y acumulación intracelular de la Vit. C era de hasta 5 veces mayor si se administraba ácido ascórbico respecto al ácido dehidroascórbico, por lo que los niveles intracelulares de Vit. C dependen del transporte del ácido ascórbico y no tanto del dehidroascórbico en las células de su estudio. (28)

Funciones

Antioxidante

El ácido L-ascórbico es un ácido débil, formado por un esqueleto de 6 carbonos y 2 grupos ionizables que son los que facilitan la oxidación-reducción, donando o aceptando electrones y así frenando a los radicales libres. Una propiedad química muy importante del ácido ascórbico es que su oxidación es reversible y todo ello convierte a la Vit. C en uno de los antioxidantes más potentes. (26)

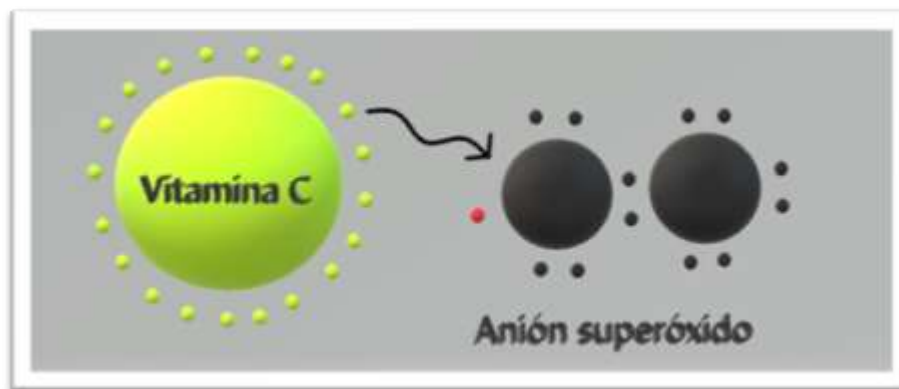


Figura 7. Interacción entre radical libre y Vitamina C. Figura realizada por la autora con la información de la bibliografía citada.

Función endotelial

Por otra parte, la Vit. C participa en funciones endoteliales, como el aumento de la síntesis y depósitos de colágeno tipo IV de la membrana basal, estimula la proliferación endotelial, inhibe la apoptosis y aumenta la biodisponibilidad de óxido nítrico para modular el flujo sanguíneo. (23, 29)

Barabutis, utilizó estas propiedades de la Vit. C en su estudio y descubrió que combinándola simultáneamente con hidrocortisona, se mantenía estable la función endotelial. Observó que la hidrocortisona y la Vit. C inhiben la activación del factor nuclear κ B, regulan la producción de mediadores proinflamatorios, aumentan las uniones estrechas entre células endoteliales y epiteliales preservando la función endotelial y el flujo microcirculatorio. (23)

Yin en su estudio reciente del 2018, somete células miocárdicas de cultivo a un estrés térmico, con y sin la administración de Vit. C, observando que efectivamente, las células que previamente habían recibido Vit. C estaban menos dañadas.

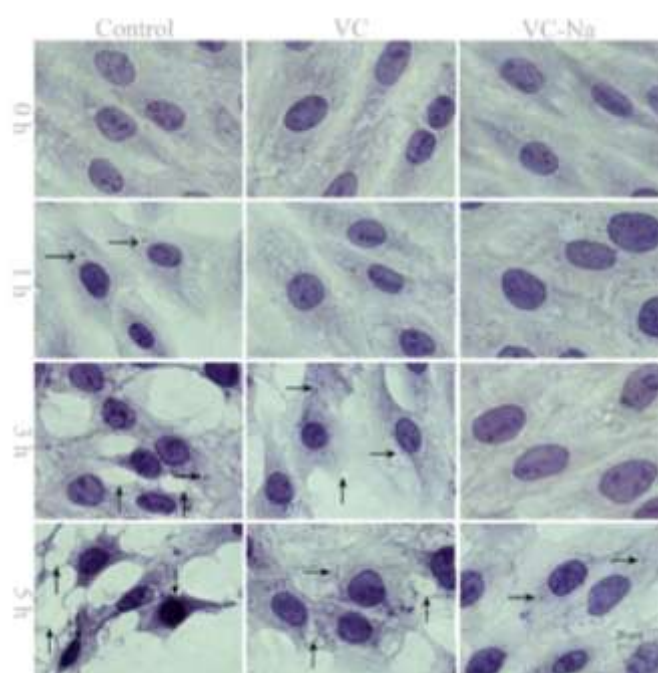


Figura 8. Daños en cultivo tras estrés térmico con tinción hematoxilina-eosina (30)

En la figura 8 observamos que el grupo control muestra una degeneración granular después de 1 hora, deterioro vacuolar a las 3 horas y picnosis tras 5 horas. El grupo con suplementación de Vit. C y de Vitamina C más bicarbonato (20 μ g/ml) presenta menos degeneración granular y vacuolar pasadas 3 horas y no presenta picnosis a las 5 horas. (30)

Hormonal

La Vit. C es un cofactor en la biosíntesis de catecolaminas, vasopresina y otras hormonas. Es esencial en la respuesta frente al estrés promoviendo la síntesis de cortisol y norepinefrina. (23, 24, 29)

Inmunidad

La Vit. C disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL1, IL6 e IL8) al inhibir la acción del factor nuclear κ B. Influye en la actividad de los macrófagos y crecimiento bacteriano. Los macrófagos durante la infección producen citoquinas y liberan ROS, que son necesarios para superar la infección, siempre que esta producción esté controlada. El ácido ascórbico ayuda a regular el proceso fagocítico del macrófago, reduciendo la adherencia, quimiotaxis y la producción de anión O_2^- . A nivel bacteriano también presenta una profunda actividad bacteriostática, impidiendo su crecimiento. En el estudio de Oudemans, se observó que con unas concentraciones de 100 a 1000 μ M se inhibía significativamente la replicación bacteriana en muestras de células fecales diluidas in vitro. (25, 29)

Síntesis de colágeno

La Vit. C también activa directamente la transcripción de síntesis de colágeno y estabiliza el ARNm de procolágeno, regulando así su síntesis. En la enfermedad del escorbuto muchos de sus síntomas y signos se deben a la alteración de la síntesis de colágeno. Estudios clínicos han demostrado que el uso tópico de la Vit. C aumenta la producción de colágeno en la piel. (27)

Agente despigmentante

Vit. C interactúa con los iones de cobre en el sitio activo de tirosinasa e inhibe la acción de la enzima tirosinasa, disminuyendo así la formación de melanina. Sin embargo, Vit. C es un compuesto inestable que a menudo se combina con otros agentes despigmentantes como la soja y regaliz para potenciar su efecto (27)

Farmacocinética

Dosis

Con una ingesta de Vit. C de entre 100 a 300 mg/día (5 raciones de frutas y verduras), alcanzamos en plasma una concentración de unos 70 a 85 μ M/L y se forma una meseta, por lo que si aumentamos considerablemente la ingesta de vitamina C (hasta 3 g al día), los incrementos en plasma son mínimos.

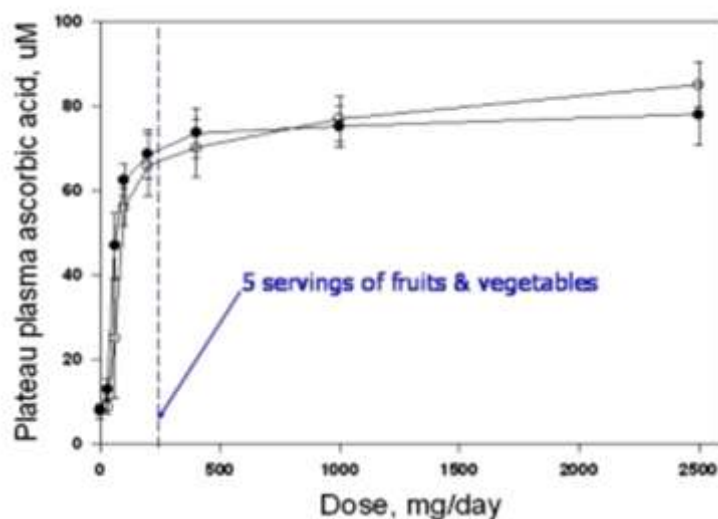


Figura 9. Concentraciones de vitamina C en plasma en función de la dosis. (31)

Se considera déficit de Vit. C las concentraciones plasmáticas por debajo de 20 μM / L. El escorbuto se desarrolla con niveles inferiores a 11 $\mu\text{mol/L}$. La dosis oral está limitada por la absorción intestinal por un mecanismo de transporte activo saturable, dependiente de energía, de sodio y de la dosis. (26, 27, 29, 32)

Concentraciones plasmáticas

Las concentraciones plasmáticas de Vit. C dependen de la absorción, el volumen de distribución, la captación celular, el consumo, reabsorción y excreción renal. En pacientes graves (sepsis, hemorragia, fallo multiorgánico...) aparecen concentraciones de Vit. C bajas debido a que se consumen durante el estrés oxidativo. Se encontraron concentraciones de 80 y 25 veces más de ascorbato intracelular en leucocitos y granulocitos respectivamente. Por eso la producción y renovación alta de estas células también contribuye a su agotamiento.

Las concentraciones plasmáticas más altas de Vit. C se consiguen con la administración intravenosa. Son necesarios de 3 a 6 g diarios para restablecer las concentraciones plasmáticas normales en pacientes muy graves. Estas dosis altas parecen ser bien toleradas y producir una mejoría en la microcirculación, macrocirculación y en la lesión celular. (29)

Distribución y transporte

La Vit. C ejerce la mayoría de su función antioxidante a nivel intracelular y necesita transportadores específicos de membrana, ya que al ser una molécula hidrofílica no puede pasar la membrana lipofílica por sí misma. Las células expresan

TFG- Introducción

dos sistemas de transportadores diferentes, uno es el de la familia SVCT, de transportadores acoplados al sodio, con especificidad absoluta para el ácido ascórbico y un segundo sistema de transportadores facilitadores de glucosa o GLUT que muestra la especificidad para el ácido dehidroascórbico. (26)

El transportador de ácido ascórbico SVCT1 se expresa predominantemente en intestino y riñón, manteniendo así las concentraciones de Vit. C en el organismo. El transportador SVCT2 se encarga de administrar ácido ascórbico al resto de los tejidos. Respecto a los transportadores del ácido dehidroascórbico, GLUT, existen 14 isoformas de las cuales sólo GLUT 1, GLUT3 Y GLUT 4 son capaces de transportarlo.

Las neuronas tienen concentraciones muy altas de Vit. C (10 mmol / L), lo que les permite eliminar el suficiente O_2^- .

El ácido ascórbico no pasa la barrera hematoencefálica. Es el ácido dehidroascórbico el que llega a cerebro, mediante el transportador de glucosa GLUT1 y posteriormente se reduce a ácido ascórbico una vez absorbido dentro de las neuronas. (26, 29)

Transportadores	K_M (μM)	Gen	Localización
Transportadores de Ácido Ascórbico			
SVCT1	100	SLC23A1 locus 5q31.2-31.3	Tejidos epiteliales: riñón, hígado, ovario, próstata, intestino delgado, colon, timo, pulmón y páncreas
SVCT2	20	SLC23A1 locus 20p12.2-12.3	Localización generalizada: cerebro, retina, placenta, bazo, próstata, testículos, ovario. Pulmón, músculo esquelético, intestino, riñón, glándula adrenal, hueso
Transportadores de Ácido Dehidroascórbico			
GLUT1	1500	SLC2A1	Cerebro, riñón, placenta, barrera hematoencefálica, músculo, testículos, tejido adiposo
GLUT3	2000	SLC2A3	Cerebro, corazón, testículos, músculo esquelético, placenta
GLUT4	1000	SLC2A4	Músculo, corazón, tejido adiposo

Tabla V. Transportadores de vitamina C. Tabla realizada por la autora con la información de la bibliografía citada.

Excreción

Existe un potente mecanismo de reciclaje de la Vit. C. La forma reducida, ácido ascórbico, se detecta en plasma y dentro de las células, lo que indica que la forma oxidada, ácido dehidroascórbico, es rápidamente excretada e hidrolizada (presenta una vida media de 15 segundos). Lo que ocurre es que es reciclada rápidamente, gracias a la participación directa de la ácido dehidroascórbico reductasa intracelular, que en presencia de glutatión, lo transforma de nuevo en ácido ascórbico. (26, 27)

El ácido ascórbico se metaboliza a ácido dehidroascórbico, glucuronatos, sulfatos y oxalatos. La principal ruta de eliminación es la excreción urinaria mediante los productos metabólicos del ácido ascórbico y como tal, cuanto mayor sea la dosis, mayor será la fracción excretada. (29, 32)

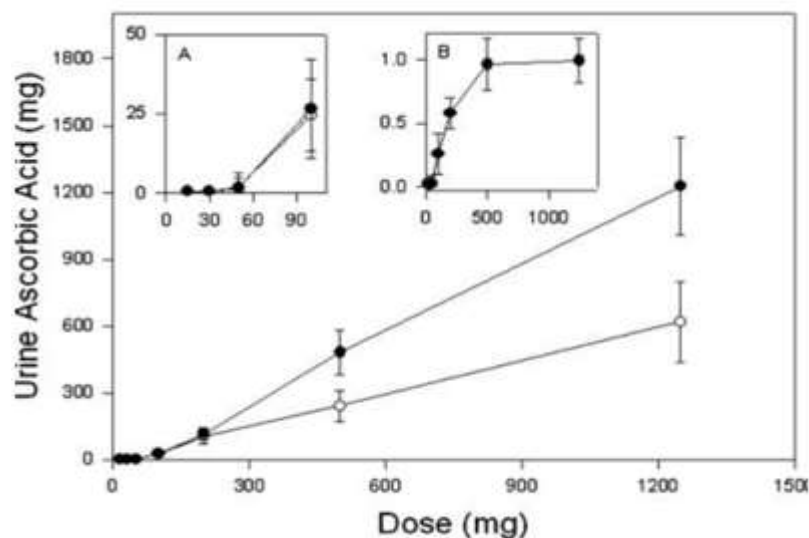


Figura 10. Excreción urinaria de vitamina C en función de dosis. (31)

Toxicidad

La ingesta oral prolongada de altas dosis de Vit. C acidifica la orina, aumentando el riesgo de cálculos renales de oxalato y también puede irritar el tubo digestivo. (29, 32)

Tratamiento tópico con Vit. C

Podemos usar el poder antioxidante de la Vit. C por vía tópica en dermatología para prevenir y tratar el fotoenvejecimiento, también como tratamiento de la hiperpigmentación. Como el estrato córneo de la piel es hidrofóbico y la Vit. C es hidrofílica, es muy difícil que se absorba a nivel de la piel.

La estabilidad de la Vit. C se controla disminuyendo el pH <3.5, de esta manera eliminamos la carga iónica y facilitamos su transporte a través del estrato córneo. El magnesio ascorbil fosfato (MAP) es más estable puesto que es una molécula lipofílica, se absorbe fácilmente por la piel y tiene un efecto hidratante. La vida media en la piel después de alcanzar la concentración máxima es de cuatro días. Un depósito de Vit. C en la piel es importante para una buena protección y se puede conseguir aplicándola regularmente cada ocho horas. (27, 33)

Según la publicación de Telang en el 2013 la combinación del aminoácido tirosina, zinc y Vit. C, aumenta 20 veces la biodisponibilidad de Vit. C.

Los efectos tóxicos de la Vit. C a nivel tópico, a unas dosis de 100-200 veces la dosis diaria, son: tinte amarillento de la piel, cabello hipopigmentado, urticaria y eritema. A nivel intracelular se ha observado apoptosis celular cuando las dosis tóxicas son muy altas, como 3 g diarios. (27)

2. Planteamiento y objetivos

Planteamiento

El estrés oxidativo, con la liberación de radicales libres, está involucrado en múltiples patologías como infecciones, enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas, neoplasias, proceso de envejecimiento... Hay gran cantidad de sustancias antioxidantes que pueden prevenir la aparición de estas circunstancias.

Los agentes vesicantes producen un aumento de los radicales libres generando estrés oxidativo, lo que nos lleva a plantearnos si sustancias con potente actividad antirradical libre pueden protegernos frente a la exposición de estos agentes.

En este trabajo se pretende analizar la toxicidad de bis(2-cloroetil)amina a nivel celular utilizando un modelo de fibroblastos humanos e investigar posibles sustancias protectoras como la vitamina C y quercetina, para evitar los daños derivados de la exposición a gas mostaza y a otros tóxicos que presenten el mismo mecanismo de acción.

Objetivos

Evaluar y medir la toxicidad de la mostaza nitrogenada sobre los fibroblastos humanos en cultivo.

Estudiar el mecanismo de acción del tóxico analizando el tipo de muerte celular inducida.

Determinar los efectos protectores de la vitamina C con varios periodos de incubación.

Cuantificar el posible efecto protector de la quercetina en fibroblastos expuestos a esta mostaza nitrogenada.

Estudiar el efecto simultáneo de ambas sustancias, vitamina C y quercetina, para ver si se potencian entre sí y dan mayor protección frente al tóxico.

3. Material y métodos

Material:

Material biológico:

Se han utilizado fibroblastos dérmicos procedentes de cultivos primarios de piel humana. Estas células se han mantenido en medio de cultivo DMEN (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza, BioWhittaker™, Belgium) con glucosa al 1%, suplementado con 10% de suero de ternera fetal (STF), antibióticos (1% penicilina) y antifúngicos (1% anfotericina).

Este medio de cultivo contiene proteínas (para facilitar la adhesión celular a la superficie del frasco), lípidos, minerales, entre otros. Además gracias a la suplementación con antibióticos y antifúngicos se evita la posible contaminación del cultivo.

Reactivos:

- Solución PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza, BioWhittaker®, Belgium): es una solución tampón que contiene cloruro sódico, cloruro potásico, fosfato sódico y fosfato potásico, presentando una osmolaridad similar al medio extracelular humano. Lo hemos utilizado para el lavado de nuestras células de cultivo.
- Tripsina (Cultek, 91L0930-100): es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas. La usamos en nuestro cultivo para romper las uniones intercelulares y despegar del frasco las células que están adheridas a él.
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma, USA): sal de tetrazolio, soluble en agua y de color amarillento. Mide la actividad metabólica de las células, puesto que al ser reducido por enzimas mitocondiales, se convierte en un compuesto de la familia de los formazanos. Este compuesto tiene un color violáceo y es insoluble.
- Isopropanol: es un alcohol, usado en nuestros experimentos para disolver los cristales de formazan MTT y poder medir la solución espectrofotométricamente.
- Ioduro de propidio (IP) (Alexa® Fluor 488 Annexin V and IP, ThermoFisher): es un fluorocromo intercalante utilizado en citometría de imagen que se une al ADN del núcleo celular, emitiendo una fluorescencia de color rojo. No puede atravesar

la membrana plasmática, por lo que nos permite diferenciar entre células sanas (con membrana intacta y que no se teñirán), apoptóticas o necróticas.

- Anexina V (Alexa® Fluor 488 Annexin V and IP, ThermoFisher): es una proteína que se une a la fosfatidilserina. La fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra en el lado citosólico de la monocapa lipídica y cuando la célula entra en apoptosis se expone en la superficie de la membrana celular. Por lo tanto la unión de la anexina V es indicador de apoptosis.

Tratamientos:

- Mostaza nitrogenada (bis(2-chloroethyl) amine hydrochloride 98%, Aldrich, USA)
PM: 178,49
- Ácido ascórbico
- Tris (Trizma BASE + Trizma HCl, SIGMA®, No. T-1503, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{HCl}$): nombre abreviado de tris(hidroximetil)aminometano, es un compuesto orgánico usado para preparar soluciones tampón. Hemos utilizado su forma básica (trizma BASE) para ajustar el ácido ascórbico a un pH de 7.
- Quercetina (Quercetin dihydrate, SIGMA®, Q-0125, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): flavonoide natural más abundante y habitual en nuestra dieta, encontrándose en nueces, uvas, cebollas, brócoli, manzanas y té negro. Representa un potente antioxidante natural debido a que en su estructura química presenta grupos hidroxilo (-OH). Otros estudios indican que presenta además propiedades antiinflamatorias, anticancerosas, antivirales, psicoestimulantes, cardio y neuroprotectoras e inmunitarias. (9, 34)

Equipos y material fungible:

- Estufa de cultivo (BINDER): 37°C y 5% de CO_2
- Microscopio Invertido de Fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000 S
- Cabina de seguridad biológica clase II (Telstar Bio-II-A)
- Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5810 R)
- Baño termostático (Nahita)
- Agitador de placas (Lab-Line instruments, INC)
- pHmetro (Hanna 211)

- Balanza de precisión (AND HR-120)
- Frascos Flask tipo Falcon de 75 y 25 cm², placas de cultivo de 6 y 12 pocillos, placas de 96 pocillos para determinación en lector de placas, tubos Eppendorf, gradillas, micropipetas, pipetas electrónicas multicanal, etc...
- Espectrofotómetro de microplacas termostaticado (EON Biotek): permite lectura de absorbancia en selección continua de longitudes onda desde 200 hasta 999 nm en incrementos de 1 nm. Lectura de microplacas desde 6 hasta 384 pocillos.

Figura 11. Lector Eon (SAI Citómica, Universidad de Zaragoza)



- Citómetro de imagen ImageStream[®] X AMNIS: permite la combinación de captura microscópica de imágenes (microscopio confocal con objetivos de 20, 40 y 60 aumentos) a alta velocidad con la citometría de flujo convencional, para un mejor análisis celular.



Figura 12. AMNIS ISX (SAI Citómica, Universidad de Zaragoza)

Métodos:

Mantenimiento del cultivo celular

El cultivo celular, para el estudio, se obtiene de un cultivo de fibroblastos primario y se redistribuye en frascos de 75 cm² de superficie en condiciones de mantenimiento de 37 °C, 95% de O₂ y 5% de CO₂. Cuando los cultivos se encuentran entre el 90-95% de confluencia celular, se tripsinizan y se subcultivan en otros frascos de cultivo de 75 ó 25 cm², en placas de 6 y 12 pocillos (1 mL / pocillo) y de 96 pocillos (100 µL / pocillo).

Técnica de tripsinización: Tras haber atemperado a 37°C el DMEM, PBS y la Tripsina, comenzamos retirando el medio de cultivo y lavando con PBS. Posteriormente cargamos la tripsina y la dejamos actuar de 3 a 4 minutos en la estufa. Comprobamos al microscopio si se ha producido la ruptura de las uniones intercelulares de nuestro cultivo y se han despegado las células. Añadimos STF e intentamos bajar la temperatura a unos 4 °C, colocando el frasco sobre hielo, para detener la reacción enzimática. Recogemos el contenido en un tubo Falcon de 50 mL y centrifugamos durante 6 minutos a 1200 rpm. Para eliminar la tripsina, lavamos las células con PBS y centrifugamos. Retiramos el sobrenadante, resuspendemos el pellet en DMEM y sembramos en placas de 6, 12 ó 96 pocillos, según requiera el experimento.

Tras 48 horas de crecimiento celular en la estufa a 37°C y 5% de CO₂, ya tenemos las células suficientes para comenzar el tratamiento con Vit C, quercetina y el tóxico, mostaza nitrogenada (MN).

Tratamientos con vitamina C y quercetina y dosis tóxicas de MN

En cada experimento retiramos el DMEM viejo. Se añaden 100 µL de cultivo a cada uno de los 96 pocillos con la siguiente distribución:

- Controles con 5 µL de vitamina C a concentración de 10 mM y pH ajustado a 7,38 (de un stock de 200 mM, añadiendo medio alcalino TRIS para conseguir pH fisiológico)
- Pocillos con 10 µL de quercetina a 1 µM (de un stock de 100 µM)
- Pocillos con ambos reactivos, quercetina y vitamina C.

- Pocillos con Mostaza nitrogenada. Después de que actúen durante 30 minutos la vitamina C y la quercetina, administramos 4 μL de MN 2 mM (de un stock de 50 mM) en todos los pocillos menos en los controles. La mostaza se deja actuar durante 1 hora y después retiramos el medio. A continuación, añadimos DMEM + STF y dejamos las células en la estufa a 37°C con 5% de CO_2 para ver el efecto de este tóxico al día siguiente.

Tras 24 horas de incubación, realizamos los estudios de viabilidad celular, mortalidad y apoptosis, así como el efecto protector de nuestras sustancias.

Estudios de viabilidad celular con MTT tras exposición a MN

Dilución de MTT en PBS a razón de 5 mg/ml. Cargamos 20 μL de MTT en cada pocillo incubando las células en estufa durante 3 horas y media a 37°C. Posteriormente, retiramos con cuidado el medio y añadimos 150 μL de isopropanol en cada pocillo para disolver los cristales de formazan. Agitamos las células durante 15 minutos en un agitador de placas. Posteriormente se procede a lectura en lector de placas Eon con recogida de datos y elaboración de gráficos y estadística en Excel. Realizamos el experimento por duplicado.

Estudios de viabilidad celular con citometría de imagen

El citómetro de imagen AMNIS permite establecer el porcentaje de fibroblastos vivos o muertos tras la exposición de nuestras células a reactivos y tóxicos. La técnica de fluorescencia es con el kit de apoptosis/necrosis (Anexina V+FITC/IP) para obtener los cinco tipos de poblaciones celulares (células vivas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías, necroptóticas y necróticas) en función de la morfología celular de fotografías recibidas en los objetivos de microscopía.

Tratamientos en placa control sin tóxico:

- 3 controles sin ningún tratamiento
- 1 pocillo con quercetina 1 μM
- 1 pocillo con vitamina C 10 mM
- 1 pocillo con vitamina C 10 mM y quercetina 1 μM

TFG- Material y métodos

Posteriormente realizamos otro experimento con el tóxico, para evitar que contamine los controles ponemos 1 placa únicamente con controles y otra placa con:

- 2 pocillos con MN
- 1 pocillo con vitamina C 10 mM + MN 2 mM
- 1 pocillo con quercetina 1 μ M + MN 2 mM
- 2 pocillos con vitamina C 10 mM + quercetina 1 μ M + MN 2 mM

Primero cargamos la vitamina C y la quercetina y tras 30 minutos administramos la mostaza nitrogenada. Tras 1 hora retiramos el sobrenadante y añadimos 1 mL de DMEM + STF. A las 24 horas de incubación, tripsinizamos los fibroblastos tratados y los controles con la técnica anteriormente descrita.

Para analizar las células en el AMNIS se utilizan tubos Eppendorf de 1,5 mL. Tinción: en 100 μ L de células, añadir 5 μ L Anexina V + 10 μ L IP. Incubar en oscuridad durante 15 minutos y se procede al análisis de muestras por citometría de imagen.

Con los dos fluorocromos podemos obtener los diferentes tipos de poblaciones:

- Doble negativo: son células vivas con la membrana celular intacta, por lo que no habrá IP y solo se verá la Anexina V en las células apoptóticas.
- IP positivo: son células necróticas con la membrana dañada y se tiñen con IP pero no con Anexina V, ya que no son células apoptóticas.
- Anexina V positivo: se trata de células apoptóticas tempranas, por lo que la fosfatidilserina se encontrará en la parte externa de la membrana celular y se teñirán con Anexina V. Sin embargo, la membrana no está dañada por lo que no se tiñen con IP.
- Doble positivo: apoptóticas tardías o necroptóticas. En este caso ambas se teñirán con ambos fluorocromos. Con el analizador AMNIS se pueden diferenciar por su morfología, las apoptóticas tardías presentan fragmentación del núcleo y del citoplasma y las necroapoptóticas no.

Estadística

Las valoraciones estadísticas y sus gráficas han sido realizadas con el programa Excel.

Todos los experimentos se realizaron al menos 2 veces como repeticiones biológicas independientes. Con la recogida de datos obtenida del lector de placas Eon se realizó un análisis descriptivo con la media y la desviación estándar.

Se estudió si las variables seguían una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se asumió un nivel de significación estadística de $p < 0.05$.

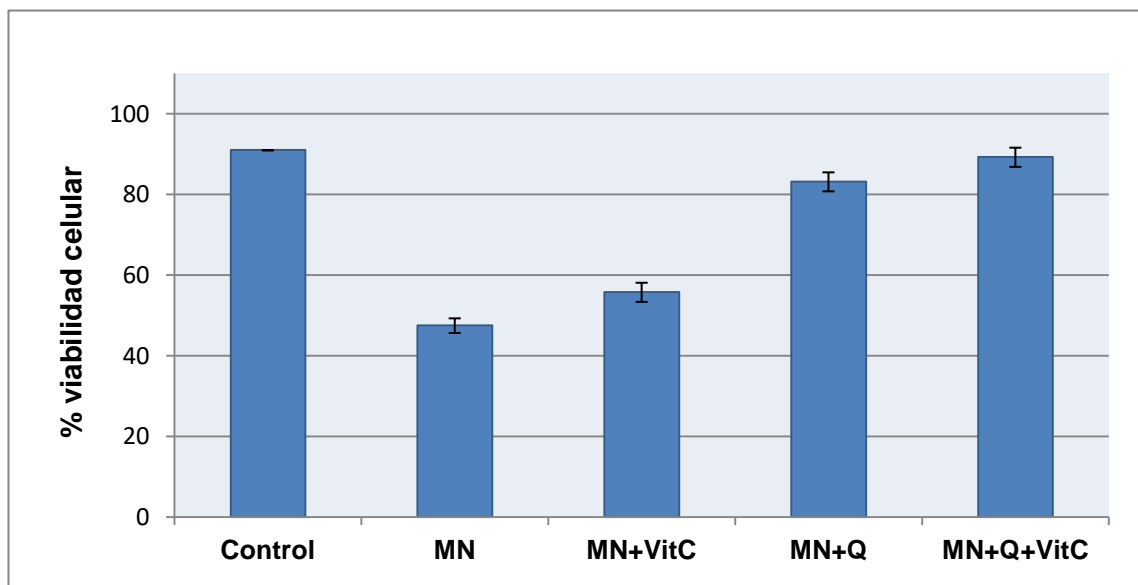
Se compararon múltiples variables mediante el test de ANOVA y fueron corregidas usando la prueba t-Test. Cuando las muestras fueron no paramétricas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación U de Mann-Whitney.

4. Resultados y discusión

En este estudio se han realizado diferentes experimentos con la finalidad de analizar el efecto sobre la viabilidad celular tras el contacto con MN utilizando la técnica de MTT y el efecto protector que aportan la vitamina C, la quercetina y la combinación de ambas frente a la exposición de MN. También se han determinado las 5 poblaciones celulares y los 4 tipos de muerte celular producidos tras el tratamiento con: vitamina C, quercetina, vitamina C más quercetina y su exposición posterior a MN con citometría de imagen-AMNIS.

Estudio de viabilidad celular con MTT

En la siguiente gráfica se presentan los efectos de someter las células a una concentración de 2 mM de MN durante una hora. Comparamos los resultados frente a los controles y frente a las muestras tratadas, 30 minutos antes de la exposición a MN, con vitamina C 10 mM, quercetina 1 μ M o con ambas juntas. En la gráfica 1 valoramos su efecto sobre la viabilidad celular con la técnica de MTT.



Gráfica 1. Estudio de la viabilidad celular de fibroblastos por MTT tras el tratamiento con quercetina, vitamina C, quercetina + vitamina C y su posterior exposición a MN.

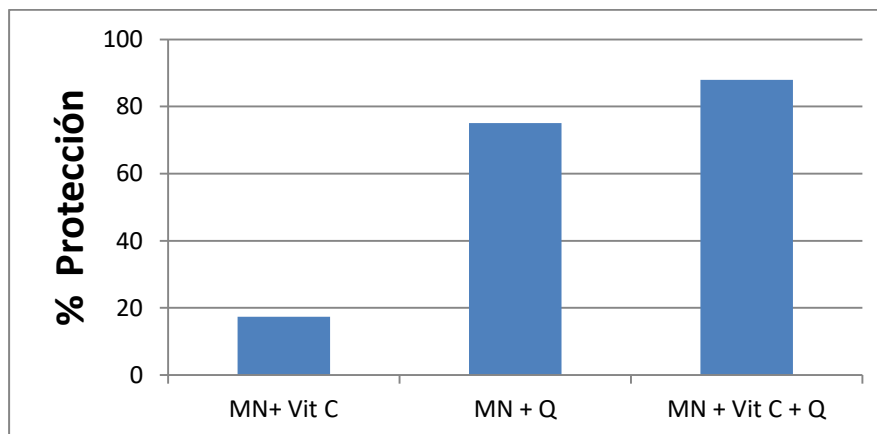
En la gráfica 1 observamos que cuando se aplica a fibroblastos MN 2 mM mueren el 50% aproximadamente (IC 50), con una viabilidad exacta calculada de 47,5% \pm 1,82.

Nosotros elegimos la concentración de MN 2 mM basándonos en las publicaciones realizadas por otros investigadores que han trabajado con este mismo tóxico, siendo la que más se aproximaba al IC 50. Autores como Pohl y colaboradores en 2009 y Khazdair y su equipo en 2015 utilizaban concentraciones de 30, 100, 300 y 500 μM de mostaza de azufre, de efectos parecidos a la nitrogenada. Son dosis más bajas que las usadas por nosotros, puesto que los tiempos de exposición celular eran mayores (24 y 72 horas) para estudiar la alteración de la membrana celular midiendo la resistencia eléctrica transepitelial y el efecto proinflamatorio (principalmente aumento de las IL-6 y 8) de este tóxico. (16, 19)

Como observamos en la gráfica 1, la vitamina C aumenta ligeramente la viabilidad celular en aproximadamente un 8% presentando una viabilidad calculada de $55,76\% \pm 2,37$. Si solamente tratamos con quercetina + MN observamos que la vitalidad aumenta hasta aproximadamente un 35% siendo la vitalidad calculada en este grupo de $83,16\% \pm 2,36$. Sin embargo, cuando realizamos el tratamiento con MN + vitamina C + quercetina observamos que sobreviven hasta el 40% de células en comparación con los expuestos a MN exclusivamente, con una vitalidad calculada de $89,26\% \pm 2,37$.

Jost y colaboradores en 2017 realizan un estudio parecido al nuestro, utilizando como sustancias antioxidantes 2-mercaptoetanol sulfonato de sodio (MESNA) y tiosulfato de sodio. Tratan un cultivo de células de pulmón humano durante 30 minutos con estas sustancias, tiempo de referencia que utilizamos también en nuestro trabajo incubando los fibroblastos con vitamina C y quercetina durante 30 minutos. Posteriormente expone a su cultivo a una concentración de gas mostaza de 50 μM , una dosis inferior a la nuestra, puesto que estudia la evolución del cultivo durante más de 72 horas. (35)

Volvemos a repetir nuestro experimento con la finalidad de demostrar la protección frente a daño celular de estas sustancias antioxidantes. Calculamos su efecto protector obteniendo para la vitamina C un 17,40% y para la quercetina un 75,09%. Cuando combinamos ambas, vitamina C + quercetina, aumentamos la protección en un 87,92%, como podemos observar en el gráfico 2.



Grafica 2. Efecto protector de la vitamina C, la quercetina y su combinación

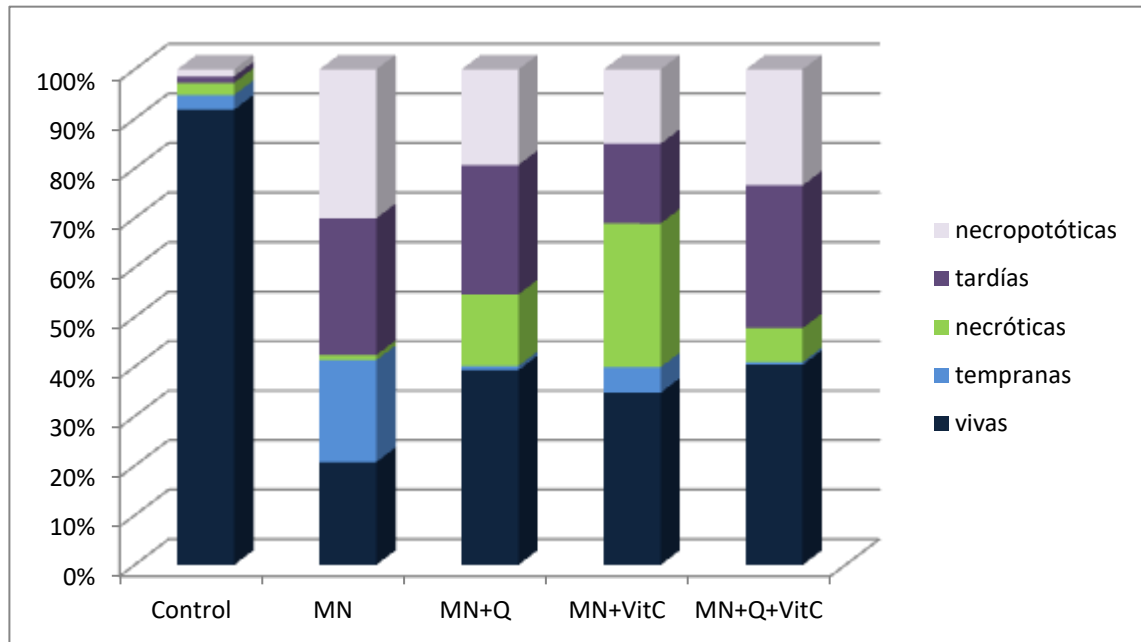
Fukui y colaboradores en 2010 estudiaron el efecto protector de la vitamina C. Para ello administraron 1 mM y 5 mM de ácido ascórbico a un cultivo de células pulmonares y tras 6 horas de incubación administraron nanopartículas de óxido de cinc (ZnO NP) provocando daño pulmonar agudo por aumento del estrés oxidativo. Observaron que disminuía la inflamación y la producción de ROS en aquellas células previamente expuestas a ácido ascórbico. En nuestro estudio utilizamos una dosis de ácido ascórbico de 10 mM, que es mucho más alta que en este estudio, pero solamente la dejamos actuar durante treinta minutos, por lo que conseguimos efectos parecidos. (25)

Estudio de las poblaciones celulares por citometría de imagen

Las células se incubaron en la estufa de cultivo con sustancias protectoras como la quercetina y la vitamina C durante 30 minutos para posteriormente añadir el tóxico, bis(2-cloroetil)amina. Se repartieron en pocillos con un tratamiento conjunto de quercetina 1 μ M + MN 2 mM, vitamina C 10 mM + MN 2 mM y quercetina 1 μ M + vitamina C 10 mM + MN 2 mM para evaluar si existe protección por alguna de las sustancias antioxidantes o por ambas.

Según Shakarjian en su revisión bibliográfica del 2010, los principales efectos de mostaza nitrogenada y sulfurada son debidos a la producción de radicales libre, peroxidación lipídica, que provocan apoptosis en sus células de cultivo que eran queratinocitos. (36) Nosotros hemos testado sustancias antirradicales libres, como la quercetina en nuestros fibroblastos. Cuando las células eran incubadas con quercetina y vitamina C 30 minutos antes de la

exposición al tóxico, éstas daban mejores resultados de viabilidad que aquellas que estaban directamente incubadas con el tóxico y sin protección.



Gráfica 3. Estudio de 5 poblaciones de fibroblastos control y expuestas a mostaza nitrogenada 2 mM y tratados con quercetina 1 µM, vitamina C 10 mM y ambas.

En la gráfica 3 podemos observar que tras la exposición a MN los fibroblastos mueren por apoptosis tardía y por necroptosis principalmente. Mientras que en la población control prácticamente no hay apoptosis tardía ($1,28 \pm 0,79$) ni necroptosis ($1,43 \pm 0,89$), en los expuestos a MN aumentan hasta un $27,4 \pm 1,48$ y $29,8 \pm 1,06$ respectivamente. Estos resultados son los que cabría esperar con lo estudiado, puesto que la MN produce daño celular por aumento de ROS lo que causaría la apoptosis celular.

Al igual que en el estudio de la viabilidad con MTT, podemos observar que el número de células vivas es mayor en fibroblastos tratados con las sustancias antioxidantes que en los que no recibieron tratamiento.

Autores como Barabutis en 2017 y Yin en 2018, refuerzan la premisa de que la MN aumenta los ROS causando necroptosis y además han realizado estudios que apoyan la eficacia de la vitamina C como antioxidante. Yin y colaboradores aplicaron durante 16 horas 20 µg/ml de vitamina C y 20 µg/ml de vitamina C con bicarbonato a cultivo de células miocárdicas. Posteriormente se sometieron a un estrés térmico durante 1, 3 y 5 horas, observando que existía menos daño celular y

un aumento de la actividad de la superoxido dismutasa en las células que habían recibido el antioxidante solo o con el bicarbonato. (30, 23)

Barabutis y colaboradores en 2017 observaron que existía una disminución de la mortalidad en pacientes sépticos combinando la hidrocortisona con la vitamina C. Para ello expusieron células del endotelio pulmonar a lipopolisacáridos (LPS), que aumentan la permeabilidad endotelial. Previamente administraron 4 μM de hidrocortisona más 1000 μM de vitamina C durante 16 horas. El resultado demostró que ambas sustancias en combinación disminuyen la resistencia transendotelial y restauran la barrera endotelial. (23)

Como apreciamos en nuestras gráficas, el gas mostaza es un potente tóxico, que provoca la muerte celular por apoptosis tardía y necroptosis principalmente. Además la vitamina C y la quercetina han mostrado ser factores protectores frente a la exposición a mostaza nitrogenada y su efecto antioxidante es mayor cuando se asocian ambas sustancias.

5. Conclusiones

Los resultados de viabilidad y mortalidad frente a la exposición a bis(2-cloroetil)amina han sido similares en los estudios con MTT y con citometría de imagen AMNIS.

En nuestro estudio con bis(2-cloroetil)amina en cultivo de fibroblastos humanos, se ha producido una mortalidad de aproximadamente el 50% con una dosis de 2 mM durante 1 hora de exposición (IC 50).

El tipo de muerte celular que ha predominado en las células expuestas a este tóxico, ha sido la apoptosis tardía y la necroptosis mayoritariamente.

La vitamina C ha demostrado proteger frente a bis(2-cloroetil)amina notablemente. Para exposiciones de mostaza nitrogenada 2 mM, la vitamina C a 10 mM ha protegido en un 17,40%.

Estudiando la quercetina 1 μ M, hemos observado que frente a la misma exposición tóxica que las células con vitamina C, alcanza un mayor porcentaje de protección, llegando hasta un 75,09%.

La protección proporcionada por la quercetina y la vitamina C, es aditiva ya que se incrementa significativamente, obteniendo una protección del 87,92% para las dosis de mostaza nitrogenada utilizadas.

6. Bibliografía

Recursos bibliográficos

Para la realización del trabajo ha sido indispensable hacer una revisión bibliográfica.

La mayoría de referencias corresponden a publicaciones buscadas en la base de datos PubMed, también cabe destacar la base de datos Google académico. Se han revisado especialmente las publicaciones más recientes, de los últimos 10 años, para conocer el estado actual del tema de investigación.

Para citar en el texto las referencias se ha utilizado el gestor bibliográfico EndNote.

Referencias bibliográficas:

1. Pita R, Vidal-Asensi S. [Cutaneous and systemic toxicology of vesicants used in warfare]. *Actas dermo-sifilograficas*. 2010;101(1):7-18.
2. Razavi SM, Salamati P, Harandi AA, Ghanei M. Prevention and treatment of respiratory consequences induced by sulfur mustard in Iranian casualties. *International journal of preventive medicine*. 2013;4(4):383-9.
3. Malaviya R, Sunil VR, Venosa A, Vayas KN, Heck DE, Laskin JD, et al. Inflammatory mechanisms of pulmonary injury induced by mustards. *Toxicology letters*. 2016;244:2-7.
4. Laskin JD, Black AT, Jan YH, Sinko PJ, Heindel ND, Sunil V, et al. Oxidants and antioxidants in sulfur mustard-induced injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1203:92-100.
5. McElroy CS, Min E, Huang J, Loader JE, Hendry-Hofer TB, Garlick RB, et al. From the Cover: Catalytic Antioxidant Rescue of Inhaled Sulfur Mustard Toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2016;154(2):341-53.
6. Panahi Y, Abdolghaffari AH, Sahebkar A. A review on symptoms, treatments protocols, and proteomic profile in sulfur mustard-exposed victims. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(1):197-206.
7. Coronado H M, Vega y León S, Gutiérrez T R, Vázquez F M, Radilla V C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*. 2015;42:206-12.
8. Jabeen H, Saleemi S, Razzaq H, Yaqub A, Shakoor S, Qureshi R. Investigating the scavenging of reactive oxygen species by antioxidants via theoretical and experimental methods. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2018;180:268-75.
9. Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, et al. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*. 2018;9(24):17181-98.
10. Panahi Y, Rajaei SM, Sahebkar A. Ocular Effects of Sulfur Mustard and Therapeutic Approaches. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;118(11):3549-60.
11. Weinberger B, Malaviya R, Sunil VR, Venosa A, Heck DE, Laskin JD, et al. Mustard vesicant-induced lung injury: Advances in therapy. *Toxicology and applied pharmacology*. 2016;305:1-11.

12. Tewari-Singh N, Inturi S, Jain AK, Agarwal C, Orlicky DJ, White CW, et al. Catalytic antioxidant AEOL 10150 treatment ameliorates sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-associated cutaneous toxic effects. *Free radical biology & medicine*. 2014;72:285-95.
13. Solberg Y, Alcalay M, Belkin M. Ocular injury by mustard gas. *Survey of ophthalmology*. 1997;41(6):461-6.
14. Rose D, Schmidt A, Brandenburger M, Sturmheit T, Zille M, Boltze J. Sulfur mustard skin lesions: A systematic review on pathomechanisms, treatment options and future research directions. *Toxicology letters*. 2017.
15. Schmidt A, Steinritz D, Rudolf KD, Thiermann H, Striepling E. Accidental sulfur mustard exposure: A case report. *Toxicology letters*. 2017.
16. Khazdair MR, Boskabady MH, Ghorani V. Respiratory effects of sulfur mustard exposure, similarities and differences with asthma and COPD. *Inhalation toxicology*. 2015;27(14):731-44.
17. Doi M, Hattori N, Yokoyama A, Onari Y, Kanehara M, Masuda K, et al. Effect of mustard gas exposure on incidence of lung cancer: a longitudinal study. *American journal of epidemiology*. 2011;173(6):659-66.
18. Taghaddosinejad F, Fayyaz AF, Behnoush B. Pulmonary complications of mustard gas exposure: a study on cadavers. *Acta medica Iranica*. 2011;49(4):233-6.
19. Pohl C, Papritz M, Moisch M, Wubbeke C, Hermanns MI, Uboldi C, et al. Acute morphological and toxicological effects in a human bronchial coculture model after sulfur mustard exposure. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009;112(2):482-9.
20. Hu X, Wang Y, Xue J, Han T, Jiao R, Li Z, et al. Design and synthesis of novel nitrogen mustard-evodiamine hybrids with selective antiproliferative activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2017;27(22):4989-93.
21. Acharya PC, Bansal R. Synthesis of androstene oxime-nitrogen mustard bioconjugates as potent antineoplastic agents. *Steroids*. 2017;123:73-83.
22. Gilad Y, Tuchinsky H, Ben-David G, Minnes R, Gancz A, Senderowitz H, et al. Discovery of potent molecular chimera (CM358) to treat human metastatic melanoma. *European journal of medicinal chemistry*. 2017;138:602-15.
23. Barabutis N, Khangoora V, Marik PE, Catravas JD. Hydrocortisone and Ascorbic Acid Synergistically Prevent and Repair Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Endothelial Barrier Dysfunction. *CHEST*. 2017;152(5):954-62.
24. de Grooth HJ, Manubulu-Choo WP, Zandvliet AS, Spoelstra-de Man AME, Girbes AR, Swart EL, et al. Vitamin C Pharmacokinetics in Critically Ill Patients: A Randomized Trial of Four IV Regimens. *Chest*. 2018.
25. Fukui H, Iwahashi H, Nishio K, Hagihara Y, Yoshida Y, Horie M. Ascorbic acid prevents zinc oxide nanoparticle-induced intracellular oxidative stress and inflammatory responses. *Toxicology and Industrial Health*. 2017;33(9):687-95.
26. Rivas CI, Zuniga FA, Salas-Burgos A, Mardones L, Ormazabal V, Vera JC. Vitamin C transporters. *Journal of physiology and biochemistry*. 2008;64(4):357-75.
27. Telang PS. Vitamin C in dermatology. *Indian dermatology online journal*. 2013;4(2):143-6.
28. Saitoh Y, Nakawa A, Tanabe T, Akiyama T. The influence of cellular senescence on intracellular vitamin C transport, accumulation, and function. *Molecular and cellular biochemistry*. 2018.
29. Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AM, de Waard MC. Vitamin C revisited. *Critical care*. 2014;18(4):460.
30. Yin B, Tang S, Sun J, Zhang X, Xu J, Di L, et al. Vitamin C and sodium bicarbonate enhance the antioxidant ability of H9C2 cells and induce HSPs to relieve heat stress. *Cell stress & chaperones*. 2018.

31. Levine M, Padayatty SJ, Espey MG. Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *Advances in nutrition*. 2011;2(2):78-88.
32. Torres M, Márquez M, Sutil de Naranjo R, de Yépez C, Leal de García M, Muñoz M, et al. Aspectos Farmacológicos relevantes de las Vitaminas Antioxidantes (E, A y C). *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2002;21:22-7.
33. Al-Niaimi F, Chiang NYZ. Topical Vitamin C and the Skin: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2017;10(7):14-7.
34. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*. 2016;8(3):167.

35. Jost P, Fikrova P, Svobodova H, Pejchal J, Stetina R. Protective potential of different compounds and their combinations with MESNA against sulfur mustard-induced cytotoxicity and genotoxicity. *Toxicology letters*. 2017;275:92-100.

36. 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.

