



Universidad
Zaragoza



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio del efecto de CES (2-cloroetil-sulfuro) y quercetina en fibroblastos humanos

Ana María Muñoz Lahuerta

Director: Dra. Desirée Pereboom Maicas

Codirector: Dr. Álvaro Casanova Flor de Lis

Departamento de Farmacología y Fisiología

Facultad de Medicina

Zaragoza 2016

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	pg 1
A. RECUERDO HISTÓRICO DE GAS MOSTAZA	pg 1
B. MECANISMO DE ACCIÓN DE SM	pg 2
I. Mecanismo de acción toxicológico	pg 2
II. Apoptosis	pg 8
III. Necrosis	pg 9
IV. Necroptosis	pg 10
V. Toxicidad en el ADN	pg 11
C. LESIONES POR EXPOSICIÓN A SULFURO DE MOSTAZA	pg 13
I. Lesiones oculares	pg 14
II. Lesiones esplénicas	pg 15
III. Lesiones cutáneas	pg 15
IV. Lesiones renales	pg 17
V. Lesiones del aparato digestivo y hepáticas	pg 17
VI. Lesiones del aparato respiratorio	pg 18
D. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES Y ANTÍDOTOS DE SM	pg 18
E. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE SM	pg 19
F. QUERCETINA	pg 20
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	pg 23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	pg 25
A. REACTIVOS	pg 25
I. Medio de cultivo	pg 25
Suero fetal bovino	pg 25
Antibióticos	pg 25
II. Solución PBS	pg 25
III. Tripsina EDTA	pg 26
IV. Bromuro de 3-(4, 5 dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol	pg 26
V. Isopropanol	pg 26
VI. Anexina 5%	pg 26
VII. Ioduro de propidio	pg 26
B. MATERIAL FUNGIBLE Y EQUIPACIÓN	pg 27
I. Espectrometrofotómetro de microplacas termostatizadas Eon	pg 27
II. Sistema morfocitométrico ImageStream x AMNIS	pg 28

C. TRATAMIENTOS	pg 29
I. Cloroetil sulfuro ó mostaza de sulfuro	pg 29
D. SUSTANCIAS “PROTECTORAS” DE SM	pg 30
I. Quercetina	pg 30
E. PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN	pg 30
I. Cultivo y mantenimiento de un cultivo celular	pg 30
II. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES	pg 31
III. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES y quercetina	pg 32
IV. Determinaciones de 5 poblaciones mediante citometría de imagen	pg 33
F. MÉTODO LD50	pg 36
G. ESTADÍSTICA	pg 36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	pg 37
A. RESULTADOS	pg 37
I. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES	pg 37
II. Determinación de 5 poblaciones celulares mediante citometría de imagen	pg 39
III. Determinación de muerte celular mediante citometría tras exposición a CES	pg 40
IV. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES y quercetina	pg 41
B. DISCUSIÓN	pg 42
5. CONCLUSIONES	pg 45
6. BIBLIOGRAFIA	pg 47

RESUMEN

El gas mostaza es un agente tóxico sintético que se utilizó el siglo pasado con fines bélicos. Se trata de una sustancia vesicante, ya que se absorbe principalmente por la piel produciendo ampollas, edema, irritación, ulceraciones y quemaduras. También puede absorberse por vía ocular (conjuntiva) y vía respiratoria. Su principal mecanismo de acción es la alquilación de diversos componentes celulares, incluido el ADN. Su intervención en mecanismos inflamatorios produce la liberación de especies reactivas de oxígeno que provocan mutaciones en el ADN, alterando la división celular y en última instancia causando la muerte celular.

En este estudio se ha trabajado con fibroblastos humanos cultivados en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y con uno de sus derivados, el sulfuro de mostaza con fórmula química 2-cloroetil- sulfuro (CES), para determinar la viabilidad celular tras una exposición de 30 minutos a diferentes concentraciones de CES (200, 500, 1000 y 2000 μM). Se ha calculado que la dosis letal al 50% (LD50) se encuentra cercana a 1000 μM mediante el uso de la técnica MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium).

A través de la citometría de imagen AMNIS hemos podido diferenciar los diferentes tipos de muerte celular (necrosis, necroptosis, apoptosis temprana, apoptosis tardía) que produce el sulfuro de mostaza a la concentración LD50 de 1000 μM .

Se ha comprobado por primera vez el efecto protector que ofrece el radical libre quercetina frente a la toxicidad celular que causa el sulfuro de mostaza. Este estudio ha utilizado concentraciones de quercetina de 0.5 y 2.5 μM en fibroblastos expuestos a sulfuro de mostaza a 1000 μM , habiéndose obtenido una protección celular del 66,22 y 88,96% respectivamente.

PALABRAS CLAVE

Gas sulfuro de mostaza, citometría de imagen, MTT, apoptosis, necrosis, necroptosis, alquilación, cloroetil sulfuro, fibroblasto, quercetina.

SUMMARY

Mustard gas is a synthetic toxic agent which was used over the last century with warfare means. It is a vesicant substance due to its skin absorption producing blisters, edema, irritation, ulceration and burns. It can also be absorbed through ocular (conjunctiva) and respiratory tract. The main mechanism of action is alkylation of several cellular components, including the DNA. Its intervention in inflammatory mechanisms produces the liberation of reactive oxygen species that cause DNA mutations, altering the cellular division and finally cellular death.

This study has worked with human fibroblasts cultivated in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) and one of its products, sulfur mustard with the chemical formula 2-Chloroethyl ethyl sulfide (CES), to determine cellular viability after a 30 minute exposition to different CES concentrations (200, 500, 1000 y 2000 μM). We have estimated a lethal dose of 50% (LD50) at nearly 1000 μM by the technique MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium).

We have differentiated the multiple types of cellular death by image cytometry AMNIS (necrosis, necroptosis, early apoptosis, late apoptosis) that sulfur mustard produces in a LD50 of 1000 μM .

For the first time it has been confirmed the protective effect of the quercetin free radical against cellular toxicity caused by sulfur mustard. This study has used quercetin concentrations of 0,5 and 2,5 μM in human fibroblasts exposed to sulfur mustard at 1000 μM , obtaining a cellular protection of 60 and 80% respectively.

KEYWORDS

Sulfur mustard gas, image cytometry, MTT, apoptosis, necrosis, necroptosis, alkylation, 2-Chloroethyl ethyl sulfide, fibroblast, quercetin.

INTRODUCCIÓN

A. Recuerdo histórico de gas mostaza

El sulfuro de bis (2-cloroetilo) (CES), utilizado para la realización de este trabajo, es un derivado de otro compuesto que reunió ciertas características para ser utilizado como agente de guerra química durante algunas de las operaciones militares del siglo pasado. Actualmente esta sustancia está dentro de un mismo grupo al que se le ha denominado coloquialmente como “gas mostaza” o “iperita”, aunque su formulación química sea ligeramente variable (Batal et al., 2014).

La mostaza de sulfuro (SM) o sulfuro de bis(2-cloroetilo), es un líquido aceitoso que varía entre la gama de color transparente a pardo e inodoro, excepto a concentraciones elevadas; los primeros afectados describían un olor picante que les recordaba al ajo, cebolla o a la mostaza (quizás debido a la mezcla con otras sustancias químicas), de ahí que sea el origen del denominado gas mostaza. Es un agente tóxico de tipo vesicante ya que se absorbe por la piel produciendo irritación, edema, ampollas y quemaduras; llagas en mucosas externas y afectación en vías respiratorias al entrar en contacto (Pita R. and Vidal-Asensi S., 2010).

SM no se encuentra en el medio ambiente de forma natural, sino que se sintetizó por primera vez en 1860 gracias a Guthrie en Reino Unido y por Niemann en Alemania; la producción del compuesto purificado se informó por primera vez por Meyer en 1886. A partir de esa fecha se ha estado utilizando con fines bélicos y no industriales como sí lo han hecho otros compuestos químicos que se inventaron al mismo tiempo. Fue utilizada por primera vez, como agente químico de guerra, durante la Primera Guerra Mundial (1917) por parte de los alemanes que bombardearon la ciudad belga Yprés (de ahí el nombre de iperita) y se ha seguido utilizando con la misma finalidad hasta fechas más recientes, como es el caso del conflicto que tuvo lugar en los países Irán e Irak en 1988 (Batal et al., 2014).

TFG- Introducción

Este compuesto ha sido utilizado cuando los italianos invadieron Etiopía entre los años 1935 y 1936, en la invasión China por los japoneses entre 1937 y 1945 y en la intervención egipcia en el país oriental de Yemen en los años 1963 a 1967. Incluso se utilizó en España en la guerra del Rif en la década de 1920.

Tras la primera guerra mundial, se identificaron análogos nitrogenados, sustancias que ya eran conocidas, pero que fueron modificadas de forma que tuviesen mayor eficacia en cuanto a fines bélicos; algunos de estos nuevos compuestos nitrogenados son: tris-(2-cloroetil) amina, metil- y etil-bis-(2-cloroetil) amina cuyas abreviaturas son HN3, HN2 y HN1 respectivamente. Estos compuestos nitrogenados, junto con la SM fueron utilizados durante la segunda guerra mundial (Sznicz L., 2005).

B. Mecanismo de acción de SM

I. MECANISMO DE ACCIÓN TOXICOLÓGICO

Todavía no se conoce muy bien el mecanismo de acción de las mostazas de azufre y de nitrógeno; pero existen varias hipótesis como es la reacción de ciclación intramolecular que da lugar a reactivos intermedios; esos reactivos son iones sulfonio, por parte de la mostaza de azufre, o amonio, de la mostaza nitrogenada.

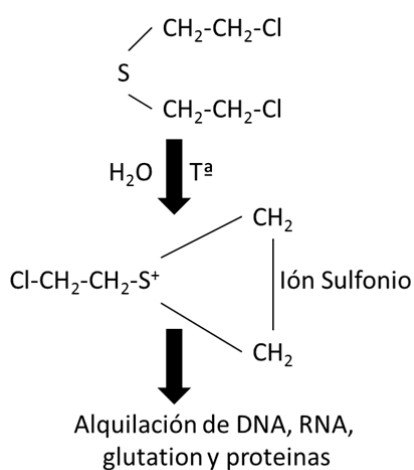


Figura 1.: Formación de iones sulfonio que causan alquilación (Pita R. and Vidal-Asensi S, 2010)

La generación en el organismo de estos intermediarios reactivos debido al contacto con estas sustancias conduce a una reacción con diferentes moléculas o estructuras celulares (Pita R. and Vidal-Asensi S., 2010).

Los iones sulfonio y amonio son potentes agentes alquilantes del ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), glutatión y proteínas, entre otros, tal y como se aprecia en el esquema anterior (Kehe Kai and Szinicz Ladislaus, 2005).

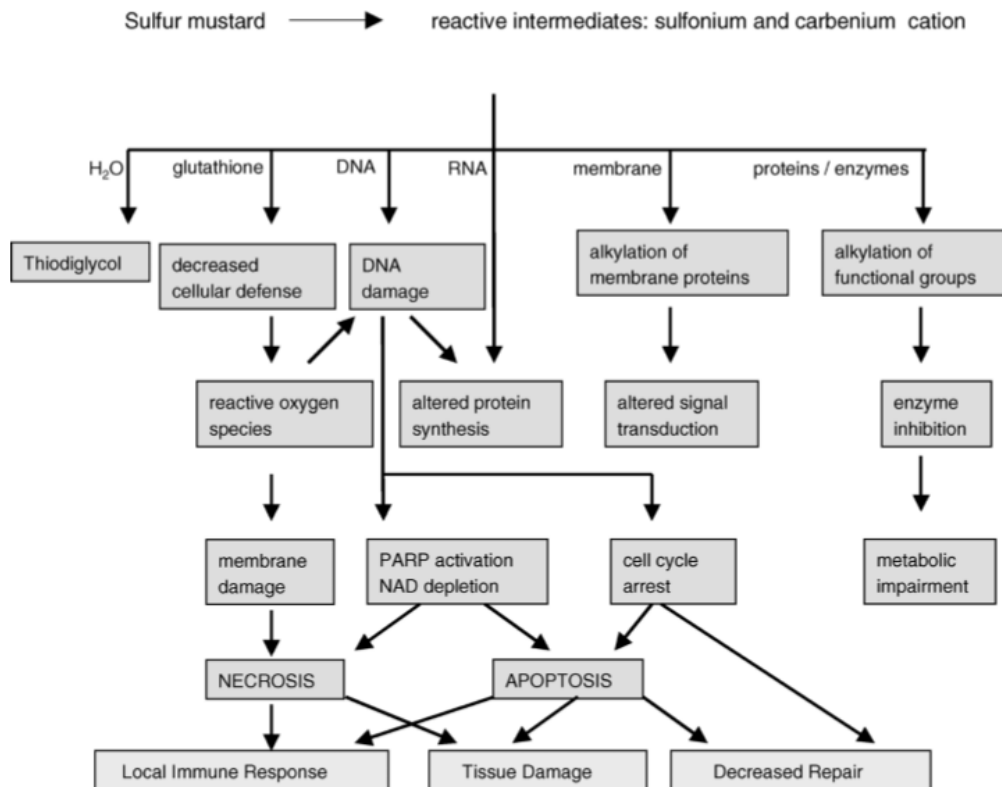


Figura 2.: Interacciones y efectos del gas mostaza sobre las células (Kehe Kai and Szinicz Ladislaus, 2005)

Las mostazas, ya sean nitrogenadas o de azufre (SM), en general se comportan de forma similar ya que poseen los mismos mecanismos de acción. Aunque que existen algunas diferencias en cuanto a toxicidad entre la mostaza de azufre y la de nitrógeno,

TFG- Introducción

resultando este último grupo menos tóxico según la LD50 (Dosis Letal al 50%). (Keke Kai et al., 2013). Dentro del grupo de las mostazas nitrogenadas también se han comparado tanto los mecanismos como los efectos entre:

- ✓ **Bis-(2-cloroetil) etilamina** denominada **HN-1**
- ✓ **Bis-(2-cloroetil) metilamina** denominada **HN-2**
- ✓ **Tris- (2-cloroetil) amina** denominada **HN-3**.

Observándose diferencias muy sutiles entre ellas, de tal forma que en 2008, Sharma Manoj y colaboradores, establecieron un orden de toxicidad de los compuestos en función de la LD50 en ratones:

HN-2 < HN-1 < HN-3 < SM cuya vía de administración es percutánea

SM < HN-3 < HN-1 < HN-2 cuya vía de administración es subcutánea

La conclusión a la que llegan estos autores es, que las células que han estado expuestas al gas mostaza, sufren **mutaciones** del **material genético** con alteraciones en la **división celular** (Sharma et al., 2008)

Posteriormente Inturi Swetha y colaboradores, en 2014 observaron que cuando las células eran expuestas a la mostaza de nitrógeno, se alteraba la estructura del material genético surgiendo uniones covalentes de los compuestos mostaza con el ADN celular, irrumpiendo en los mecanismos de transcripción, transducción, o incluso en la organización de cromatina. Esas uniones covalentes con el ADN limitaban la estabilidad electrolítica y podían persistir el tiempo suficiente como para interrumpir la fase S del ciclo celular (Inturi Swetha et al., 2014).

Groehler Arnold y colaboradores corroboran estos datos con la mostaza de nitrógeno en 2016, demostrando que puede afectar a la transcripción, y de esta forma se produce citotoxicidad y mutaciones celulares.

Tras la exposición a la mostaza de sulfuro, las uniones covalentes van desapareciendo conforme la concentración de los reactivos va disminuyendo, es decir siguiendo la cinética de primer orden, excepto en dosis elevadas (Batal Mohamed et al., 2013).

La síntesis proteica se ve alterada por dos vías. Una de ellas consiste en la alquilación directa del ADN y su afectación por las especies reactivas del oxígeno (ROS) que surgen de la interacción de la mostaza con el glutatión; como consecuencia se alteran la transcripción para la formación de ARN y la transducción que iniciaría la síntesis proteica. La otra vía se ve modificada debido a la alquilación directa de las proteínas de la membrana celular produciéndose inhibición enzimática y alterando la señal de transducción. Todo ello contribuye a la alteración del funcionamiento celular.

Se sabe que la interrupción de la polaridad celular junto con la pérdida de la señalización de la integrina beta 4 puede sensibilizar a las células epiteliales a la muerte celular apoptótica. Es posible que la pérdida de las uniones entre las células mediante hemidesmosomas durante la exposición de la mostaza de azufre puede actuar de una manera similar a hacer que las células sean más susceptibles a la apoptosis (Greenberg Shari et al., 2006).

Smith y colaboradores en 1995 observaron que las enzimas que contienen grupos sulfidrilo y que están encargadas de regular la homeostasis del calcio en la célula, producían una reacción de alquilación en la célula con los iones sulfonio y amonio.

Esto provoca un aumento de la concentración intracelular de calcio que altera los microfilamentos responsables de la integridad de la célula y activa endonucleasas, proteasas y fosfolipasas, que finalmente provocan muerte celular. Pita R. y Vidal-Asensi S. en 2010 corroboran esta información completándola, de forma que determinan que esa muerte celular se trata de apoptosis.

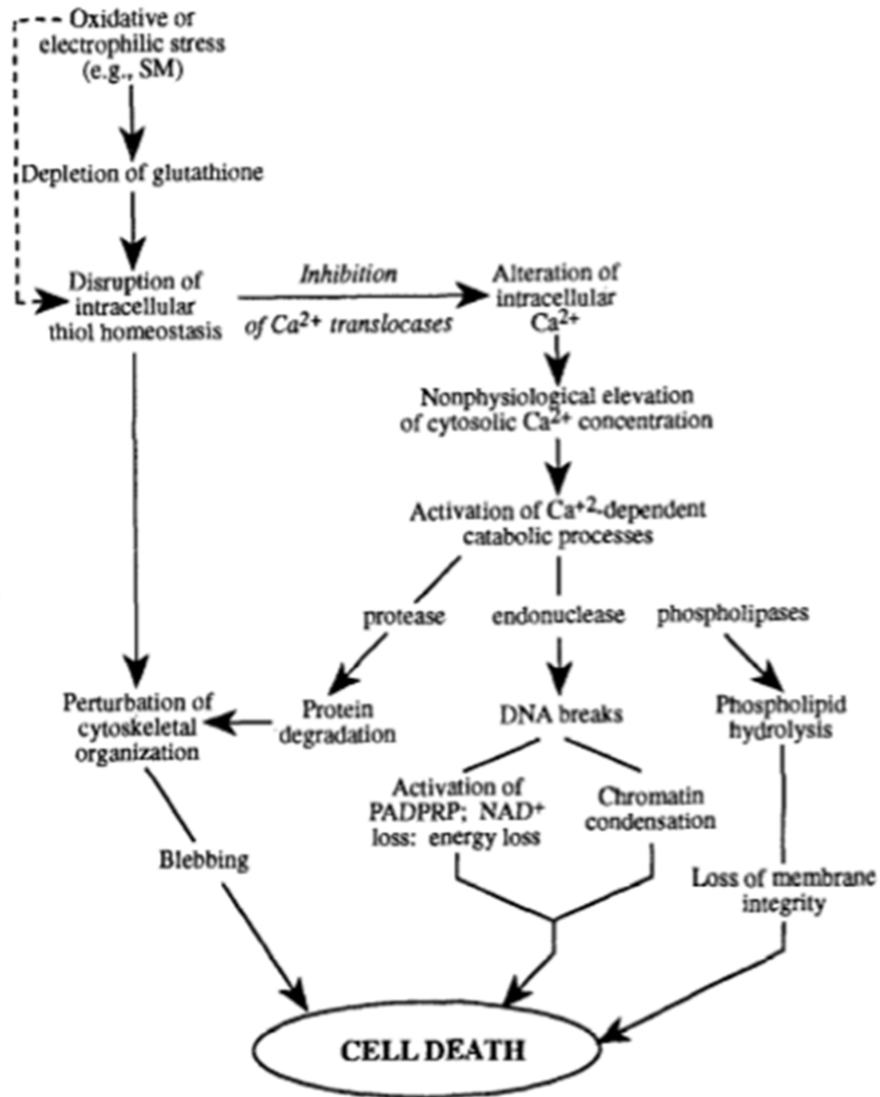


Figura 3. Muerte celular (Smith et al, 1995)

Desde 1975 hay conciencia, gracias a Roth Eugene F. y colaboradores, que tras la exposición a la mostaza nitrogenada surgen una serie de procesos, que ellos todavía no reconocían; observaron que había una detención del consumo de energía de la célula que desencadenaba su muerte. Años después se ha observado que en esos procesos están implicadas las caspasas y citoquinas proinflamatorias que finalmente producen **apoptosis** y **necrosis** celular (Kehe Kai and Sznicz Ladislaus., 2005).

Los iones reactivos de SM y ROS dañan el ADN y conducirían a la activación de polimerasas (PARP), disminución del ATP celular y **necrosis**. Otro tipo de muerte celular que se ha observado ha sido la **apoptosis** mediante la activación de la vía extrínseca e intrínseca de apoptosis. La liberación de prostaglandinas y de citocinas proinflamatorias, que se ha relacionado con la activación de NFkB, provocan **necrosis**. Kehe Kai y colaboradores demostraron que se producía activación de metaloproteinasas de matriz (MMP) que podrían estar relacionadas con la transducción de la señal, pero no lograron identificarla. Los inhibidores de las polimerasas, fármacos antiinflamatorios, antioxidantes, e inhibidores de MMP podrían ser medidas farmacológicas prometedoras para mejorar la clínica (Kehe Kai et al., 2008).

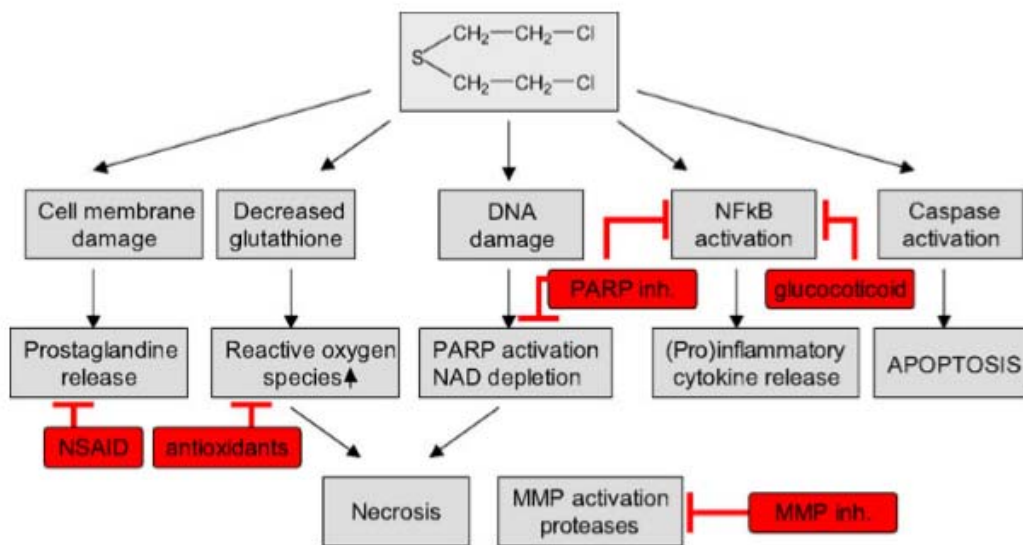


Figura 4. Vías implicadas en la fisiopatología de SM y posibles objetivos (rojo) para la intervención terapéutica. (Kehe Kai et al., 2008).

Todos estos procesos mencionados desencadenan muerte celular. Se sabe que existen diferentes tipos de muerte celular, como son la apoptosis, necroptosis, autofagia o necrosis. En este caso, se dan varios tipos de muerte celular, **apoptosis**, **necrosis** y **necroptosis celular**.

II. APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada es el proceso por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. En su proceso ocurre un desmantelamiento progresivo del contenido celular por absorción de los tejidos, disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y escisión del DNA cromosómico en fragmentos.

Al contrario de las células necróticas, la membrana plasmática, mantendrá integridad hasta su eliminación, sin producirse inflamación ni vaciamiento del contenido intracelular; su superficie va a emitir protrusiones y se desprenden trozos de citoplasma rodeados de membrana, denominados cuerpos apoptóticos, de modo que una célula adyacente o un macrófago los fagocita con rapidez, sin provocar respuesta inflamatoria.

Este tipo de muerte celular, es un proceso controlado y regulado por numerosas proteínas. Se distinguen dos grupos de proteínas: caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2 que se subdivide en: antiapoptóticas, proapoptóticas y sólo-BH3.

Existen dos mecanismos principales que inician la apoptosis, ambos a través de la activación de la ruta de las caspasas. Las caspasas son enzimas que están implicadas en la inflamación o bien en la apoptosis. Cada vía usa sus propias caspasas iniciadoras y complejo de activación (Alberts B. et al, 2002).

La vía de la apoptosis tipo I o extrínseca está relacionada por la unión de ligandos a miembros de la superfamilia de receptores de muerte de la membrana plasmática.

El antígeno de membrana capaz de inducir señales de apoptosis es el Fas o Apo-1, una proteína que pertenece a la superfamilia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF) (Clement M. V. et al, 1994) y que está presente en tejidos normales y líneas tumorales y expresado en linfocitos activados. (Suda T. et al, 1993). Otros miembros de esta familia son TNF tipo I y II, el receptor de crecimiento neuronal (NFG) (Schulze-Osthoff K. 1994).

Greenberg Shari y colaboradores en 2006 publican unos resultados obtenidos en cultivos de queratinocitos y en injertos de piel humana, los cuales habían sido expuestos a SM y observaron que en la mayoría de las células se producían fenómenos de apoptosis, debidos a un mecanismo mediado por caspasas a través de los receptores de Fas/TNF; también observaron en pequeñas poblaciones celulares fenómenos de necrosis celular.

La vía de apoptosis tipo II, intrínseca o mitocondrial es producida en respuesta a una lesión celular u otras formas de estrés como señales de muerte extracelular, daños intracelulares, daño al ADN, falta de oxígeno, de nutrientes o de señales que influyen directa o indirectamente en el potencial de membrana mitocondrial y en su capacidad oxidativa. Se produce la liberación irreversible en el citosol de proteínas de la matriz mitocondrial y de membrana: citocromo C (componente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial), factor inductor de la apoptosis (AIF), endonucleasa G y proteínas Smac/Diablo (Hengartner M.O., 2000). De este modo se inicia una cascada diferente de la extrínseca; el citocromo C liberado al citosol activa el factor activador de proteasas apoptóticas-1 (Apaf1) quien a su vez activará procaspasas implicadas en la apoptosis, por ejemplo caspasa-9, procaspasa-3, -6 y -7.

III. NECROSIS

Es otro tipo de muerte celular regulada dependiente de caspasas. Se inicia con una inhibición de la fosforilación oxidativa, que activa vías de transducción involucrando proteínas quinasas, p53, proteínas de familia Bcl-2, PARP, proteasas, ROS, mitocondrias (Mimeault M., 2002) dando lugar a una disminución de los segundos mensajeros Ca^{++} y ATP y finalmente muerte celular. Es la expresión de la muerte patológica de un conjunto de células o tejido, provocada por un agente o situación nociva, como estrés oxidativo, acción de sustancias químicas o toxinas, exposición a radiaciones ionizantes, que no se puede reparar o curar (Hetz C. A. et al, 2005).

Smith Kathleen y colaboradores observaron ya en 1995 fenómenos que conducían finalmente a la necrosis celular.

TFG- Introducción

Comienza con un desequilibrio en la homeostasis celular por disminución de ATP y pH intracelular (Lockshin R. A. et al, 2002) caracterizada por un influjo de agua y de iones extracelulares (aumento de Na⁺ y Ca⁺⁺ citosólico) con un aumento de volumen de la célula (Mimeault M., 2002), liberación de ROS y perturbación en la organización del citoesqueleto que conducen finalmente a la alteración de la integridad de la membrana plasmática y lisis (Leist. M et al, 1997), liberándose el contenido citoplasmático al medio extracelular y generando la respuesta inflamatoria mediante citoquinas.

Como resultado de todo lo anterior, debido a la exposición al gas mostaza surgen alteraciones en tejidos y órganos, así como en su reparación (Kehe Kai and Szinicz Ladislaus, 2005).

IV. NECROPTOSIS

Es un tipo de muerte celular programada que origina disfunción mitocondrial y permeabilización de la membrana plasmática con la consiguiente liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular dando lugar a reacciones inflamatorias. Está asociada a ROS pero sin fragmentación del ADN (Wu W et al., 2012). Se caracteriza por la activación del receptor de interacción de la proteína 1 (RIP1) que se activa en primer orden y del receptor de interacción de la proteína 3 (RIP3) (Cho Y. S. et al, 2009); ambas desencadenan la necroptosis e inhibición de la caspasa 8 y por tanto de la cascada de apoptosis; RIP1 determinará si las células mueren por apoptosis o necroptosis (Newton K. et al, 2014).

Algunos autores como Dunai en 2011 opinan que la necroptosis es un mecanismo de acción inmunitario contra elementos patógenos (Dunai Z. et al, 2011), otros como Welz que está relacionada con modelos de inflamación (Welz P. S. et al, 2011).

Según Mc Namara en 2013 sería un mecanismo para eliminar selectivamente células tumorales (Mc Namara C. R. et al, 2013).

V. TOXICIDAD EN EL ADN

La toxicidad intramolecular (figura 1) está favorecida por la presencia de agua y por un aumento de la temperatura, de ahí que las zonas más húmedas del cuerpo sean las más susceptibles. (Pita R. and Vidal-Asensi S., 2010)

La alquilación que se da en el ADN da lugar a entrecruzamientos y rotura de las cadenas del ADN, y se activan ciertas polimerasas. (Batal Mohamed et al, 2014).

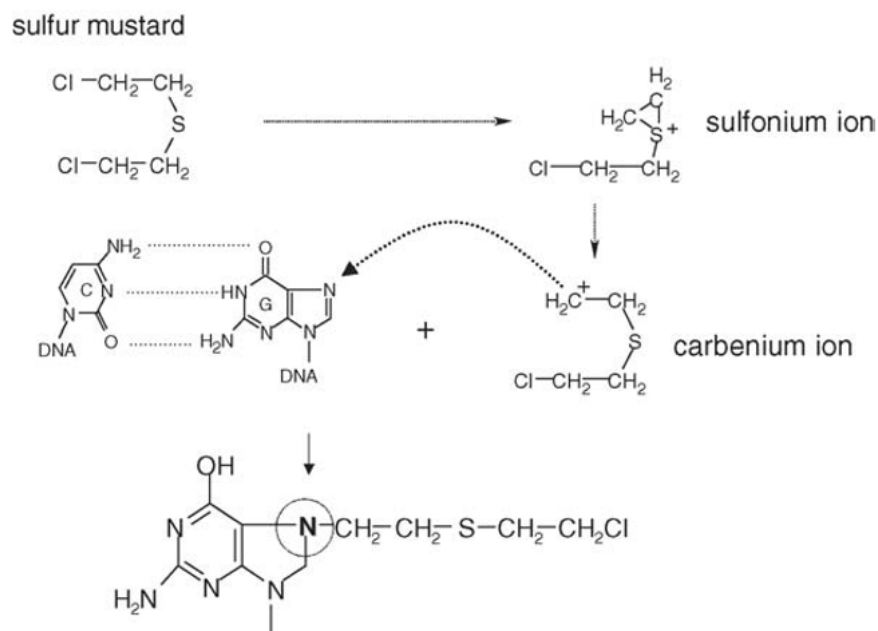


Figura 5. Formación del enlace covalente entre la guanina del ADN y el reactivo (Kehe Kai and Szinicz Ladislaus, 2005)

La activación de esas polimerasas hace que disminuya el ATP celular y provoca muerte celular. Éste es el motivo por el que las células con mayor velocidad de división son las más afectadas por las mostazas (Pita R. and Vidal-Asensi S., 2010).

Se ha observado que los enlaces que se forman con el ADN parecen tener una afinidad especial por el N-7 de la guanina (Figura 5). Como resultado de esa unión, tiene lugar la formación de N7-hidroxietiltioetil-guanina (HETE-N7Gua) y en menor medida en la posición N3 de la adenina que da lugar a N3-hidroxietiltioetil-adenina

TFG- Introducción

(HETE-N3Ade); incluso se puede formar un enlace entre dos guaninas de la posición N7 (Figura 6)(Batal Mohamed et al., 2013).

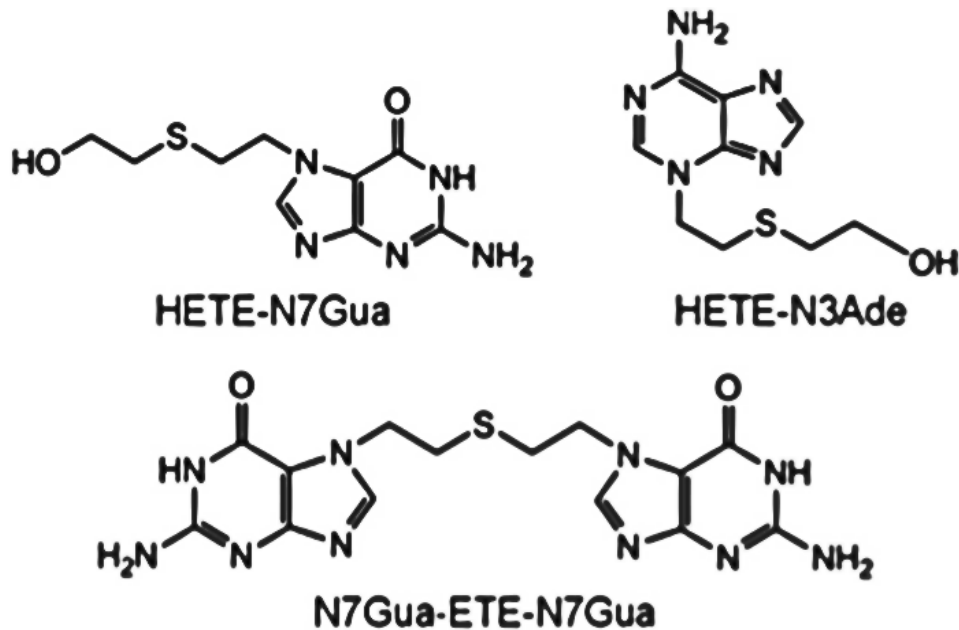


Figura 6. Enlace covalente entre mostaza de sulfuro y bases de DNA (guanina 7, adenina 3 y dos guaninas 7) (Batal Mohamed et al, 2013)

Ya desde 1995 Smith y colaboradores describen la ruta de la peroxidación lipídica mediante la enzima glutatión transferasa (Figura 6). Esta mostaza también interaccionan con el glutatión y aumentan los radicales libres originados por peroxidación de los lípidos de membrana, alterando su integridad (Shakarjian Michael P. et al., 2010).

Pita R. y Vidal-Asensi S en 2010 plantean que el estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS) tiene un papel relevante en el mecanismo de acción toxicológico de la mostaza de azufre.

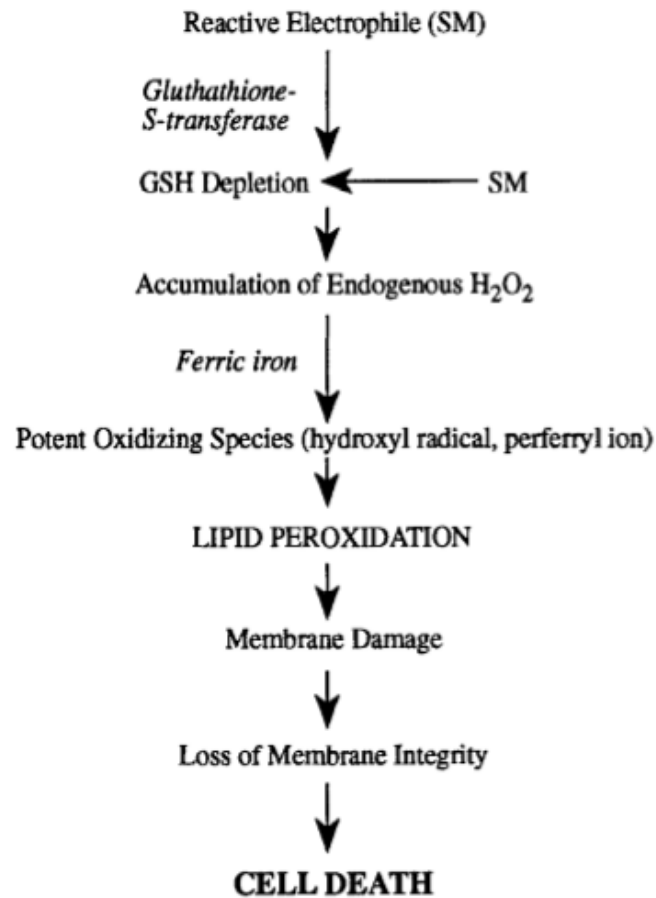


Figura 7. Ruta de la peroxidación lipídica (Smith et al, 1995).

C. Lesiones por exposición a sulfuro de mostaza

Normalmente, ante la exposición de SM se observa un intervalo de varias horas antes de la aparición de los síntomas. En las mostazas nitrogenadas aparecen inmediatamente a su exposición.

La duración del intervalo libre sin síntomas es inversamente proporcional a la dosis absorbida del agente. La intensidad máxima de los síntomas se puede alcanzar días después del contacto.

TFG- Introducción

A dosis tóxicas bajas los síntomas agudos que se producen son: náuseas, vómitos y anorexia. A medida que aumenta la dosis se provoca inmunosupresión, leucopenia, diarrea, anemia aplásica, fiebre y caquexia. En casos severos, excitación del sistema nervioso con convulsiones y muerte (Ching C. Lau and Arthur B. Pardee., 1982). Las enfermedades que surgen de forma más tardía, tras 10 ó 15 años tras la exposición es el cáncer pulmonar o la leucemia Chauchan S. et al, 2008).

La dosis letal de SM por ejemplo, en el 50% de las personas expuestas (LD50) está estimada en 100 mg/Kg. La concentración letal en forma gaseosa o aerosol causa muerte en el 50% de personas expuestas (LD50) con dosis de 15,0 mg min/mm³ de piel expuesta (Chauchan S. et al., 2008).

Un estudio comparó la toxicidad que producen las diferentes sustancias nitrogenadas y sulfuradas comentadas sobre algunos de los órganos del cuerpo, resultando: (Sharma et al., 2010)

ÓRGANO	3^{er} día tras exposición	7^o día tras exposición
Bazo	HN-2=SM<HN-1<HN-3	HN-2<HN-1<SM<HN-3
Hígado	HN-2<HN-1<HN-3<SM	HN-2<HN-1<HN-3<SM
Riñón	HN-1<HN-2<HN-3<SM	HN-1<HN-3<HN-2<SM
Piel	HN-2<HN-1<SM<HN-3	HN-2<HN-1<SM<HN-3

Figura 8. Comparación de toxicidad de los diferentes tipos de gas mostaza tras tres y siete días de exposición y en tejidos diferentes (Sharma et al., 2010)

Las sustancias de mostaza, tanto las nitrogenadas como las sulfuradas van a producir efectos tóxicos sobre las células de todos los tejidos, pero especialmente en los aquellos con mayor concentración de agua:

I. Lesiones oculares:

El gas mostaza penetra más rápidamente que en la piel y el período de latencia para la aparición de signos y síntomas oculares es más corta que para los síntomas de la piel (Pita R. and Vidal-Asensi S., 2010).

La irritación y escozor ocular leve se puede observar después de la exposición al vapor a dosis de 12 a 70 mg · min / m³. Las concentraciones de vapor de SM de 50 a 100 mg · min / m³ causan síntomas oculares como conjuntivitis, sensación de arenilla debajo del párpado y lagrimeo (Kehe Kai and Szinicz Ladislaus, 2005).

A medida que van aumentando las dosis de este vapor (más de 200 mg · min / m³), aparecen lesiones más severas edema palpebral, edema corneal con deterioro de la visión hasta la ulceración corneal, ceguera, fotofobia y blefaroespasma severo (Chauchan S. et al., 2008).

Aparecen también úlceras corneales al poco tiempo de la exposición a dosis todavía más elevadas (Kehe Kai et al, 2008).

II. Lesiones esplénicas:

Goswami y colaboradores en 2015, observaron en los análisis de sangre de ratones, una disminución del número de leucocitos circulantes (linfocitos y monocitos) tras la exposición a la mostaza nitrogenada (muy parecida a la mostaza sulfurada), por lo que analizaron la histología del bazo. En ella, se observó al microscopio que se producía una disminución progresiva de la pulpa blanca y roja a las 24 horas tras la exposición. Esta destrucción de tejido provoca una disminución en el tamaño y peso del órgano (Goswami et al., 2015).

III. Lesiones cutáneas:

La susceptibilidad de la piel a la exposición de las mostazas depende de la temperatura de la piel, la humedad y localización. Zonas húmedas con capa epidérmica delgada (escroto, región anal) son más sensibles.

El inicio de los síntomas depende de la dosis absorbida. Generalmente el eritema se observa entre las cuatro y ocho horas tras la exposición (con dosis en vapor de 100-300 mg por minuto/m³ y líquida: 10-20 g/cm²).

TFG- Introducción

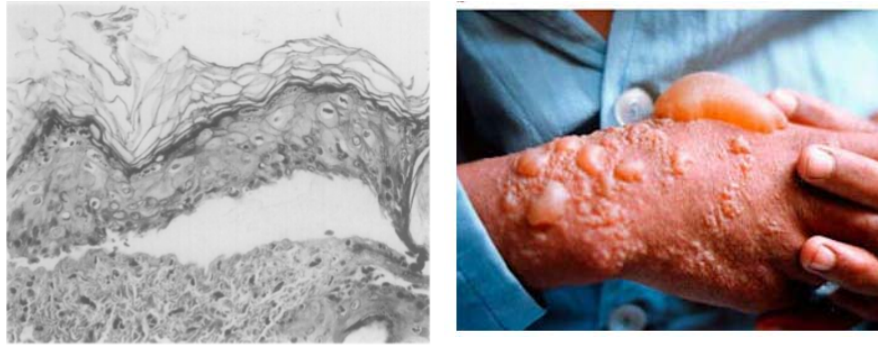
La formación de ampollas (histológicamente se muestra separación de la epidermis de la dermis) se producen con dosis más elevadas; aparecen como pequeñas vesículas en la zona eritematosa y se van uniendo hasta formar una gran ampolla de pared delgada y llena de líquido amarillo claro. Las áreas afectadas muestran signo de Nikolsky positivo por fricción de la piel; las ampollas pueden perdurar semanas después.

Las lesiones más graves consisten en ulceración de estructuras de la dermis y necrosis con susceptibilidad a la infección (Kehe Kai and Szinicz Ladislaus, 2005).

Clasificación de las lesiones cutáneas:

1. Forma eritematosa: comienza con una proliferación basal acelerada de queratinocitos y sus núcleos empiezan a degenerar volviéndose picnóticos. Aparece edema en dermis, dilatación de sus capilares, infiltrado intersticial y perivascular.
2. Exfoliación pigmentaria, con desorganización de la capa basal.
3. Vesicular superficial con forma ampollosa: pasadas nueve o doce horas de exposición, los queratinocitos migran a otras zonas por lo que se pierden las uniones entre los queratinocitos y ello permite la formación de pequeñas vesículas, que se van rellenando y uniendo entre ellas formando grandes ampollas (Smith Kathleen J. et al., 1995).
4. Necrotización bullosa: se mueren las células que forman las ampollas.
5. Necrotizante profunda
6. Reacciones alérgicas de contacto y tóxicos de la piel.

Con frecuencia se observan cicatrices hipertróficas tardías con alteraciones en la pigmentación. Esta hiperpigmentación puede persistir durante décadas. También se observan zonas de hipopigmentación junto a las áreas hiperpigmentadas dando una apariencia sería similar a la de la poiquilodermia (Kehe Kai et al, 2008)



Figuras 9 y 10: A la izquierda podemos ver un corte histológico de la piel con la formación de una vesícula (Smith Kathleen J. et al, 1995). A la derecha observamos ampollas (Pita R. and Vidal-Asensi S., 2010)

IV. Lesiones renales:

Se ha observado atrofia del tejido renal con claro descenso del peso de estos órganos tras la exposición. Microscópicamente se produce dilatación de los capilares de los glomérulos, alteración del filtrado glomerular puesto que las concentraciones séricas de BUN y creatinina son más elevadas y cambios sutiles en los túbulos contorneados proximales. También se ha visto que entre 72 y 120 horas tras la exposición se producía diferentes estadios de deshidratación, incluso el shock (Goswami et al., 2015).

V. Lesiones del aparato digestivo y hepáticas:

En este aparato se produce distrés epigástrico, anorexia, diarrea y caquexia.

Microscópicamente, inflamación y vacuolización, edema del tejido, núcleos celulares picnóticos, muerte celular en las células de las vellosidades intestinales, reducción del número de placas de Peyer, eosinofilia y un incremento

considerable de macrófagos entre las células de la mucosa de las vellosidades. También se vio dilatación de los vasos linfáticos y por supuesto, apoptosis celular.

En el hígado se produce una gran atrofia, con dilataciones de los sinusoides hepáticos. Sin embargo, no se observó esteatosis, ni focos inflamatorios o marcadores de daño celular o la muerte, pero los hepatocitos parecen tener menos citoplasma lo que indicaría la pérdida de líquidos (Goswami et al., 2015).

VI. Lesiones del aparato respiratorio:

Se producen lesiones más leves que van desde irritación de la mucosa nasal con rinorrea, hasta lesiones más graves que ocurren a lo largo de períodos de tiempo más largos, como es el cáncer de pulmón; las estirpes histológicas suelen ser carcinoma escamoso de pulmón y adenocarcinoma.

Otros síntomas que se incluyen son espasmos laríngeos, disminución de los sentidos del olfato y del gusto, traqueobronquitis, edema de las vías respiratorias que condicionan el paso del aire o ulceraciones de las vías respiratorias y edema del parénquima pulmonar que más tardíamente evoluciona en enfisema pulmonar.

Las complicaciones más frecuentes relacionadas con el daño epitelial de la mucosa de las vías respiratorias y la supresión de la inmunidad es la infección (Chauchan S. et al., 2008).

D. Tratamiento de las lesiones y antídotos de SM

Inicialmente, se lleva a cabo una descontaminación. La descontaminación se debe hacer en menos de 30 min por su rápida absorción. Lo mejor es utilizar previamente al lavado un material absorbente y a continuación lavar con agua o con una solución de hipoclorito sódico al 0,5%. Sobre los ojos está indicada la utilización inmediata de abundante agua o de suero fisiológico.

Actualmente no existen antídotos frente a estas intoxicaciones. Por ello el objetivo es aliviar los síntomas y evitar las infecciones, estimulando la reepitelización y la cicatrización. Mantener el estado metabólico adecuado y reemplazar la pérdida de fluidos y electrolitos.

No existe consenso en si se deben o no romper las ampollas y en la forma de tratamiento (vendajes o no; húmedos o secos). Sin embargo, la experiencia de los profesionales sanitarios en países afectados como es el caso de Irán, recomiendan romperlas (excepto en las de tamaño pequeño o menores de 2 cm) y posteriormente, colocar vendajes con antisépticos locales.

En las lesiones oculares, los analgésicos locales pueden aumentar el daño de la córnea por lo que se debe recurrir a analgésicos sistémicos. Si existen lesiones de la córnea se deben administrar midriáticos para prevenir adherencias entre el iris y la córnea (Pita R. and Vidal-Asensi S., 2010).

E. Aplicaciones terapéuticas de SM

Se han realizado diversos estudios en cuanto a las indicaciones que pueden tener estos compuestos en las áreas de dermatología y oncología (quimioterapia) y al tratamiento de ciertas patologías (Hansson Johan et al., 1987).

Se sabe que existen oncogenes, como el oncogén ras en las zonas del genoma con un alto contenido en guanina y que algunos virus como el virus de Epstein-Barr tienen un alto contenido de guanina. Esta información no sólo es útil para estudiar los efectos cancerígenos de estos agentes y la predicción de tumores malignos que pueden ser susceptibles a NH₂, sino que también sirve para la identificación de áreas específicas del material genético del virus que se incorpora en el genoma humano, poder destruirlo para evitar que puedan desempeñar su papel en el desarrollo de lesiones clínicas (Smith et al., 1995).

TFG- Introducción

Según el mecanismo de acción de las mostazas, no sólo provocan la muerte celular, sino que además impiden la división celular, contribuyendo a la destrucción y freno de la invasión y extensión de tumores. Se han realizado estudios sobre el tratamiento con estas mostazas en melanomas (Hansson Johan et al., 1987).

También han ensayado el tratamiento con mostaza de nitrógeno en células T malignas de linfomas cutáneos y en enfermedades inmunológicas y se ha visto que tienen efectos sobre la enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin y también en tumores cerebrales (Sharma Manoj et al., 2010).

F. Quercetina

La quercetina es otra sustancia que se ha utilizado para la realización de uno de los estudios que se incluyen en este trabajo. Es un flavonoide que se encuentra en vegetales y frutas (Sax NI, L. R., 1993). Es uno de los flavonoides más abundante y habitual en la mayoría de las dietas humanas encontrándose en mayor medida en las cebollas, manzanas, pimientos, ajos, té, cítricos, tomates, brócoli, moras, frutos secos... entre otros. También podemos encontrarla en productos manufacturados como en el vino tinto.

La quercetina de la dieta se metaboliza principalmente en hígado, aunque también lo realiza en las células del epitelio intestinal antes de entrar en la circulación, riñón y otros tejidos que contienen enzimas de conjugación (Murota K. M. Y. et al., 2004). En el estudio de Gee en 1998 llevado a cabo con voluntarios humanos, se observó que los glicósidos de quercetina pueden ser absorbidos en el intestino delgado en mayor porcentaje que la aglicona (quercetina sin el grupo azúcar) (Hollman P. C. de Vries et al, 1995). Una probable explicación de ello es porque se facilita la absorción a través de desglicosilación (Day. A. J., et al, 1998) o de un transporte mediado por transportadores. En el intestino humano, la molécula de quercetina se conjuga con los grupos metilo, sulfato y ácido glucurónico para generar ciertos conjugados, como el

quercetin-3-O-sulfate (Harwood M., et al, 2007). En humanos, la mitad de la quercetin-3-rutinosido se metaboliza a ácido phenyl-C2 por medio de la microflora del colon (Manach C. et al, 2005).

Posee propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales y antioxidantes. De esta última se ha observado que inhibe el estrés oxidativo, la generación y liberación de ROS como el anión superóxido (O_2^-) evitando el daño en el ADN (Bors W., Michel C., 2002).

Algunos estudios, como el de Panchal de 2012, demuestran que la quercetina podría atenuar factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. Otros estudios, como el de Olson y colaboradores en 2008 y 2010, comprueban que es una sustancia que protege tanto *in vivo* como *in vitro* de los rayos UV inhibiendo los procesos de inflamación.

Reduce la mortalidad de los fibroblastos irradiados con UVB y UVC, la producción de radicales libres inducidos y el potencial de membrana mitocondrial (Casanova A., 2015).

Planteamiento y Objetivos

A. Planteamiento

Muchos tóxicos, tanto naturales como los utilizados en la guerra química, actúan generando radicales libres de la misma manera que el sulfuro de mostaza. Así mismo, tenemos experiencia con el antirradical libre quercetina por su potente actividad barredora lo que nos ha inducido a valorar su posible actividad protectora.

Muchos trabajos sobre los tóxicos se realizan en animal completo, siendo pocos los realizados a nivel celular; en este estudio se pretende analizar la toxicidad de sulfuro de mostaza a nivel celular utilizando un modelo de fibroblastos humanos cultivados y buscar antídotos protectores que sirvan tanto para este tóxico como para otros que tengan el mismo mecanismo de acción.

B. Objetivos

Medida de la toxicidad del sulfuro de mostaza sobre los fibroblastos humanos en cultivo

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

Determinación de los efectos protectores de la quercetina.

Material y métodos

Para la realización de este estudio se han requerido la puesta en marcha de cultivo primario de fibroblastos humanos en frascos de Flask 75 cm² hasta que se encuentran confluyentes. En ese momento tripsinizaremos y cultivaremos en placas de cultivo de 96 pocillos. En este soporte realizaremos el tratamiento y posterior análisis.

A. REACTIVOS

I. Medio de cultivo

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con glucosa al 1% y fenolftaleína (un indicador del pH del medio que nos resulta indicativo para ver si el medio está agotado). El medio de cultivo hay que complementarlo con:

- a) Suero fetal bovino (SFB): es el suero universal utilizado para el cultivo y proliferación de células *in vitro* y producción biológica de células animales. Sus componentes principales son proteínas para facilitar la adhesión de las células a la superficie del frasco, factores de crecimiento, lípidos, vitaminas o minerales entre otros.
- b) Antibióticos: se han administrado al medio de cultivo penicilina y estreptomycinina al 1% para evitar el crecimiento de ciertas bacterias que hayan podido contaminar el cultivo de fibroblastos.

II. Solución PBS (Phosphate Buffered Saline):

Solución salina amortiguada por fosfatos constituye una solución amortiguadora de pH empleada en procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl⁻, Na⁺ y K⁺) es muy semejante a la

TFG- Material y métodos

del líquido extracelular de los mamíferos, es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. Se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal, también para lavar células que posteriormente se centrifugan, como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas, entre otros.

III. Tripsina EDTA:

Enzima de origen porcino que se utiliza para disociar las células adheridas, junto a la sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como agente quelante del calcio y el magnesio.

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

Es un líquido que permite determinar el efecto citotóxico de un agente, en este caso SM, sobre líneas celulares tumorales o en este caso cultivos primarios de células normales (de Castro de Pardo Clemencia., 2006).

V. Isopropanol:

Es un líquido que se utiliza para poder realizar la lectura de las microplacas en el lector de Eon.

VI. Anexina V:

Es una proteína celular, capaz de difundir a través de la membrana, que tiene como función modular la actividad de las fosfolipasas A_2 y es un inhibidor en la cascada de la coagulación ya que compete por sitios de unión de la fosfatidilserina. Las células viables tienen fosfatidilserina en el interior de la membrana citoplasmática pero al inicio de la apoptosis se transloca al exterior de ésta siendo detectada por el citómetro; por tanto es marcador de viabilidad celular.

VII. Ioduro de propidio:

Es una molécula fluorescente impermeable a la membrana celular y por tanto no puede introducirse en células vivas. Si una célula sufre una alteración en su membrana, esta molécula entra en la célula uniéndose al ADN y produce fluorescencia cuando es excitado por un láser. Por tanto esta molécula se utiliza en citometría junto con anexina V para determinar viabilidad celular, apoptosis, necrosis o necroptosis.

B. Material fungible y equipos

Como material fungible se han utilizado los siguientes elementos: Frascos Flask 75 y 25 cm² tipo Falcon, tubos 50 cm², tubos eppendorf, gradillas, micropipetas de capacidad de 1000, 200, 100 y 50 microlitros con sus respectivas puntas de plástico, pipetas de vidrio, baño de agua caliente, estufa a 37°C con CO₂ al 5%, nevera, congelador, cabina estéril de trabajo, placas de 96 pocillos, centrífuga, microscopio invertido y como equipación importante para la lectura y obtención de datos:

I. Espectrofotómetro de microplacas termostatzado Eon

Es una herramienta que nos sirve como lector de microplacas de 6 hasta 384 pocillos. Esa medida la realiza mediante la lectura de absorbancia en una selección continua de longitudes de onda desde 200 hasta 999 nm en incrementos de 1 nm (SAI Citómica. Universidad de Zaragoza).

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

II. Sistema morfocitométrico ImageStream X AMNIS

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

Este equipo está formado por cinco láseres, 12 canales de imagen, tres objetivos de microscopía de 20, 40 y 60 aumentos, campo claro que permite utilizar el espectro lumínico completo para conseguir la imagen deseada y un sistema de termostatación para mantener las células a una temperatura adecuada mientras se realiza el análisis (SAI Citómica. Universidad de Zaragoza).



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

C. Tratamientos

I. Cloroetil sulfuro (CES) o sulfuro de mostaza de (SM)

Nombre científico	2-cloroetil etil sulfato	<p>GHS05, GHS06, GHS08 GHS09</p>
Fórmula química	C ₄ H ₉ ClS	
Formula lineal	ClCH ₂ CH ₂ SC ₂ H ₅	
Peso molecular	124.63 g/mol	
Densidad a 25°C	1.07 g/ml	

Figura 13. Propiedades CES (www.sigmaaldrich.com)

CES es un derivado del conocido “gas mostaza” que se ha utilizado en este trabajo puesto que está prohibida la comercialización del original. Este tóxico se ha obtenido a través de su compra en la empresa Sigma Aldrich.

Este compuesto **carcinógeno** de categoría 1^a y **mutagénico** en células germinales, es un líquido amarillo pálido, casi incoloro, que tiene una pureza de un 97.5%.

La Comunidad Europea lo clasifica como un líquido **inflamable** de categoría 3 cuyo punto de inflamabilidad es 52°C, **corrosivo** en metales, piel (categoría 1B) y ojos.

La Unión Europea lo clasifica también como un **tóxico agudo** para la reproducción y en ciertos órganos. Por vía oral, cutánea e inhalatoria está clasificado como categoría 3.

D. Sustancias “protectoras” del sulfuro de mostaza

I. Quercetina

Este flavonoide se ha obtenido a través de su compra en la empresa Sigma Aldrich.

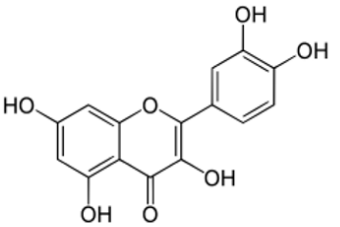
Nombre científico	Quercetina	
Fórmula química	3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone	
Fórmula lineal	C15H10O7	
Peso molecular	302.24 g/mol	
Densidad	1.8 g/cm ³	

Figura 14. Propiedades y fórmula de quercetina (www.sigmaaldrich.com)

Es una sustancia que en este trabajo se ha tomado como “protectora”, pero hay que tener en cuenta que también puede llegar a ser tóxica. En 1951 se investigó en ratones la dosis LD50 oral de quercetina y establecieron una dosis letal oral de 160 mg/kilo de peso y LD50 subcutánea de 100 mg/kg de peso; posteriormente esos valores se modificaron porque a dosis LD50 eran toleradas. Los síntomas de toxicidad si la administración es intravenosa son movimientos atípicos y respiración dificultosa (Harwood M., et al, 2007).

E. Protocolos de experimentación:

I. Cultivo y mantenimiento de un cultivo celular

El modelo de investigación de cultivo de fibroblastos humanos se obtiene de un cultivo primario de fibroblastos humanos. Este cultivo de fibroblastos se redistribuye en varios frascos de 75 cm² de forma que la población celular vaya creciendo. Las

condiciones de mantenimiento son en estufa a 37°C y con ambiente de oxígeno 95% y 5% de CO₂) hasta conseguir el 90-95% de confluencia.

Método de cultivo y siembra en placas:

1. Se extrae el medio de cultivo del frasco y las células que están adheridas en el fondo se lavarán tres veces con PBS.
2. Se añade tripsina en el frasco de cultivo dejándolos en la estufa unos minutos hasta que observemos mediante el microscopio que las células están despegadas de la base del frasco.
3. Tras la tripsinización es necesario frenar esta reacción enzimática añadiendo SFB a 4°C.
4. Inmediatamente se recoge el contenido de los frascos en un tubo Falcon de 50 mL, se lavan las células con PBS, se resuspenden y se centrifugan a 800 rpm durante 5 min. Este procedimiento se realiza tres veces para conseguir una concentración aproximada de 3×10^6 células/mL.
5. El pellet celular se resuspende en DMEM y se siembra en placas de 96 pocillos.
6. Tras unas 48 horas de incubación en estufa a 37°C y 5% CO₂ las células ya se han aclimatado y han crecido en cada uno de los pocillos.
7. A continuación, se procederá a realizar el tratamiento con gas mostaza para posteriormente medir el porcentaje de células muertas/vivas y calcular su toxicidad.

II. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES

Fase 1. Tras el cultivo de fibroblastos en placas de 96 pocillos, se realizan las mediciones de concentraciones de los tratamientos que se llevarán a cabo.

Para el tratamiento con cloroetil sulfuro (SM), se ha determinado la molaridad resultando un valor de 8.6 molar. Las diferentes concentraciones con las que se ha

TFG- Material y métodos

trabajado a partir de un stock de 10 mM realizado previamente han sido: 200 μM para 2 μl de SM, 500 μM para 5 μl de SM, 1000 μM para 10 μl de SM y de 2000 μM para 20 μl de SM.

Fase 2. Se vierte SM con las diferentes concentraciones sobre los pocillos que contienen los fibroblastos y se dejan expuestas las células 30 minutos.

Fase 3. A continuación se disuelve MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium) en agua destilada a 5mg/ml. Tras la espera de 30 minutos se cargan en cada pocillo 100 μl de cultivo con 10 μl de MTT.

Fase 4. Tras el tratamiento con MTT se introduce la placa en la estufa a 37°C y se esperan 4 horas.

Fase 5. Se disuelven 175 μl de isopropanol en cada pocillo y se agita para que se mezcle adecuadamente, esto es mediante la observación de cristales en el microscopio y el cambio de coloración del pocillo, que resulta un tono violáceo.

Fase 6. Se retira el sobrenadante intentando no retirar el MTT.

Fase 7. Tras todo lo anterior, se procede a la lectura. Se introduce la placa en el lector de microplacas de Eon.

Fase 8. Se procede a la recogida de datos y elaboración de gráficos.

III. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES y quercetina

Fase 1. En este estudio se han sembrado fibroblastos cultivados previamente en varias placas de 96 pocillos donde se les ha administrado gas mostaza de un stock de 1 mM en todos los pocillos excepto el grupo control; en otras columnas de pocillos quercetina 0.5%, en otras quercetina 2.5% y por último varias columnas con SM.

Fase 2. Se introducen en la estufa y se mantienen expuestas 30 minutos. Mientras tanto se disuelve MTT en agua destilada a razón de 5 mg/ml.

Fase 3. Se cargan en cada pocillo 100 µl de cultivo en la placa de 96 pocillos con los 10 µl de MTT y se introduce en la estufa para esperar 5 horas.

Fase 4. Se disuelven 175 µl de isopropanol en cada pocillo y se agita para que se mezcle correctamente observando cristales en el microscopio y cambio de coloración de pocillo los pocillos.

Fase 5. Se retira el sobrenadante intentando no retirar el MTT y se procede a la lectura con el lector de microplacas de Eon.

Fase 6. Se procede a la recogida de datos y elaboración de gráficos.

IV. Determinación de 5 poblaciones celulares con citometría de imagen

Fase 1. Sembrado de cultivo primario de fibroblastos en placa de 96 pocillos.

Fase 2. Administración de SM a 1mM en varias columnas de la placa excepto en aquellas que sean controles.

Fase 3. Tras 30 minutos de exposición se retira el tratamiento de SM y se cambia el medio (DMEM con antibiótico y SFB) de los fibroblatos.

Fase 4. Esta placa se introduce en la estufa a 37°C y 5% CO₂ y se mantiene durante 24 horas.

Fase 5. Se procede a la tripsinización de cada uno de los pocillos para repartirlos sobre tubos de ensayo.

TFG- Material y métodos

Fase 6. Los tubos de ensayo, unos son controles y los otros contienen fibroblastos que habían estado expuestos a SM. Para después centrifugar durante 5 minutos a 800 rpm.

Fase 7. Se retira el sobrenadante y se procede al lavado con 100 μ l de PBS en cada tubo de ensayo para introducir las células en los tubos eppendorf que requiere el citómetro.

Fase 8. De nuevo los fibroblastos, esta vez en tubos eppendorf, vuelven a ser centrifugados durante 5 minutos a 800 rpm.

Fase 9. Se retira el sobrenadante con cuidado de no retirar el pellet y se añade a las células los fluorocromos anexina V e ioduro de propidio.

Fase 10. Tras unos minutos de espera y estando tapados los tubos con papel de aluminio (evitando que la luz solar interfiera en los fluorocromos) se introducirán en el citómetro de imagen AMNIS para su lectura.

Fase 11. Por último, se determinan los distintos tipos de muerte celular que el citómetro ha registrado.

Con la tinción doble anexina V / ioduro de propidio se obtendrán las diferentes poblaciones:

- **Doble negativo:** el ioduro de propidio no se habrá introducido dentro de la célula puesto que la membrana está intacta en las **células vivas** y la anexina V solo se vería en células apoptóticas.
- **Ioduro de propidio positivo:** la membrana estará dañada con lo que se observará tinción con ioduro de propidio, pero no con anexina V al no ser apoptóticas. Esto es propio de **células necróticas**.

- **Anexina V positiva:** la fosfatidilserina se encontrará en la parte externa de la membrana citoplasmática pero la membrana permanecerá todavía intacta y no incorporará yoduro de propidio. Esto es propio de **células apoptóticas tempranas**.
- **Doble positivo:** las células incorporarán anexina V + yoduro de propidio ya que la membrana no estará dañada pero la fosfatidilserina se encontrará en el exterior de las células. El problema reside en que existen dos tipos de muertes celulares que cuadran en este marcaje, la **apoptosis tardía y necroptosis**.

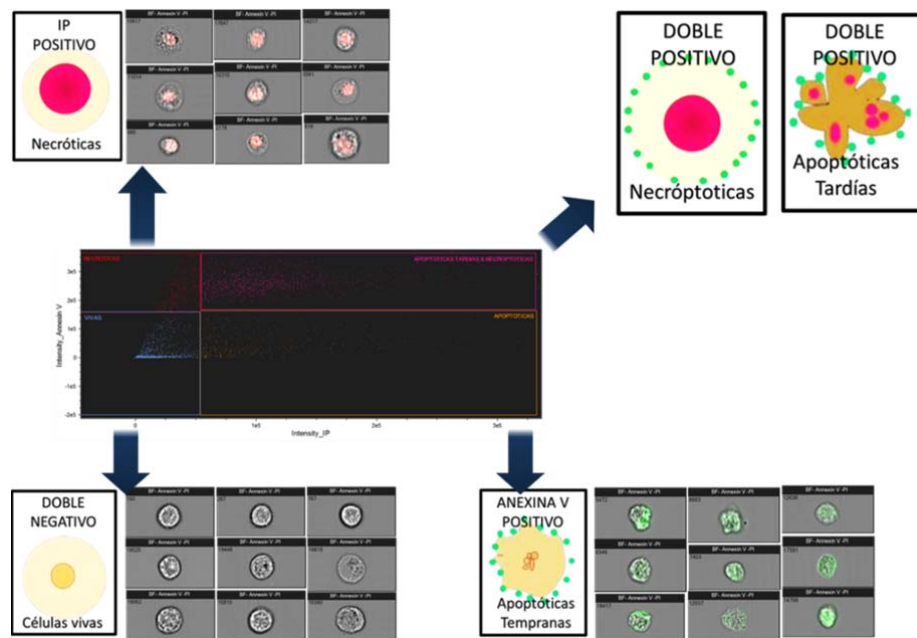


Figura 15. Representación en dibujo que permite diferenciar las 5 poblaciones que se pueden identificar con yoduro de propidio y anexina V (Casanova Flor de Lis Álvaro, 2015).

F. Método LD 50

Es la dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto o población de células o de animales.

Este valor se utiliza como indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia. Suele expresarse en miligramo de sustancia tóxica por kilogramo de peso del animal.

G. Estadística:

Para estudiar si los datos tienen una distribución paramétrica se aplicaron las medidas estadísticas de Skewness and Kurtosis a cada variable cuantitativa. Posteriormente se aplicaron los test de ANOVA y test de t-Student cuando los resultados eran “paramétricos” y la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon si las muestras eran “no paramétricas”.

El citómetro de imagen AMNIS aplica test estadísticos específicos para citometría de flujo en los que se valora la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Con la recogida de los datos obtenidos de la lectura de placas de Eon se ha procedido a la realización de los datos estadísticos para posteriormente crear los gráficos. Para ello se ha usado un test paramétrico de la t de Student para la distribución de probabilidad que surge del problema de estimar la media de una población normalmente distribuida cuando el tamaño de la muestra es pequeño.

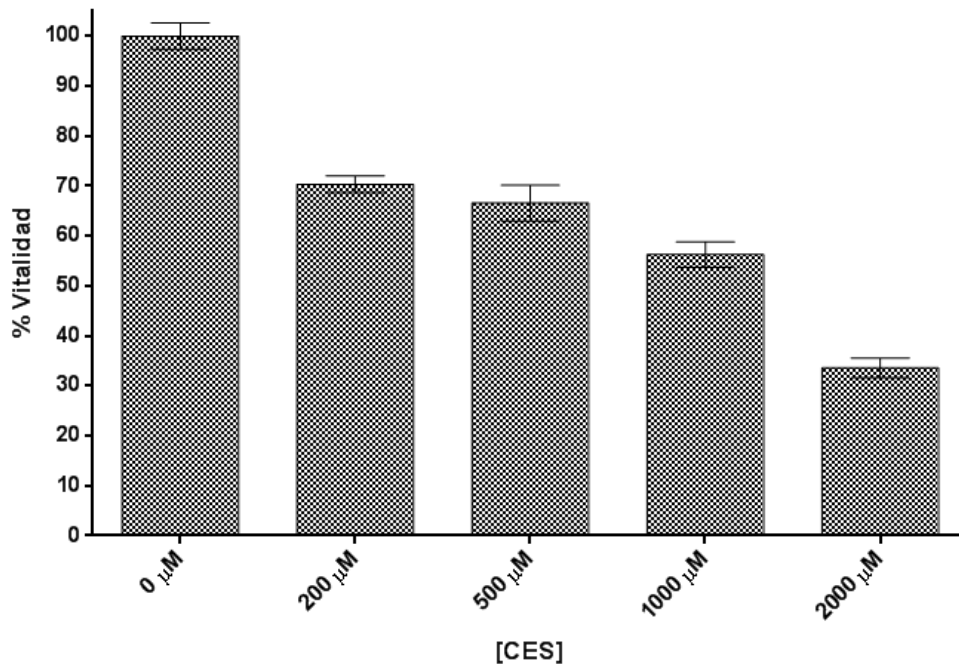
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Resultados

En este trabajo se han estudiado varios experimentos que consisten en el estudio del efecto sobre la viabilidad celular con MTT tras exposición a sulfuro de mostaza a diferentes concentraciones, la determinación de cinco poblaciones celulares tratadas con sulfuro de mostaza mediante citometría de imagen-AMNIS, determinación de cuatro poblaciones celulares muertas para estudiar los tipos de muerte celular que se producen tras exposición a SM con citometría y por último estudio de la viabilidad celular tras exposición a SM y quercetina así como valoración de la protección que ofrece quercetina a las células ante SM.

I. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES

En esta primera gráfica se estudian los efectos de someter las células a varias concentraciones de cloroetil sulfuro (200 μ M, 500 μ M, 1100 μ M y 2 mM) durante 30 minutos, comparando las muestras tratadas frente a los controles para valorar el efecto sobre mortalidad y viabilidad celular con la técnica MTT (gráfica 1). El compuesto demostró ser citotóxico de manera dosis dependiente.

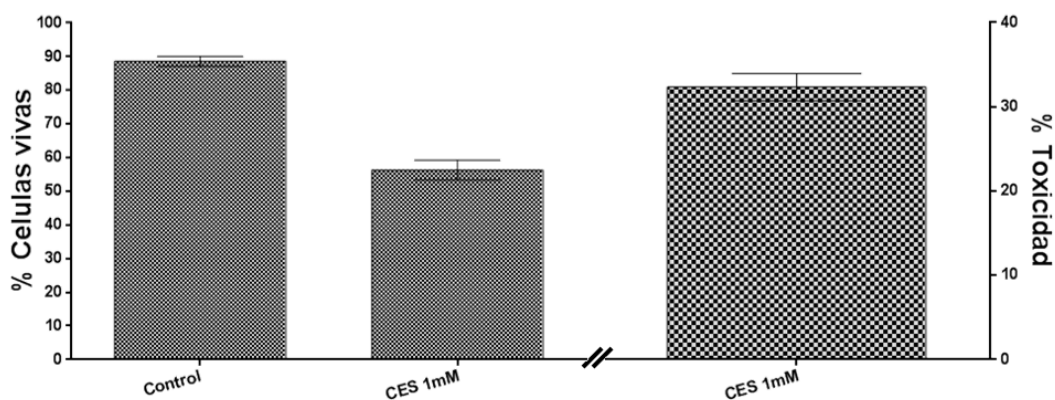


Grafica 1. Cálculo de dosis letal 50 para el sulfuro de mostaza (CES) mediante test MTT.

Según se observa en la gráfica 1, la viabilidad del grupo control de células es del 100% porque no llevan ningún tóxico. Cuando se aplica a los fibroblastos una concentración muy baja de 200 μM del tóxico las células mueren aproximadamente un 30% con un valor calculado de viabilidad del 70,33% con una desviación estándar de $\pm 1,68\%$. Con el tratamiento de 500 μM del sulfuro de mostaza, la mortalidad es aproximadamente del 35% y viabilidad del 66.56% con una desviación estándar de $\pm 3,58\%$. Con dosis de 1000 μM la mortalidad es aproximadamente de un 45% y la viabilidad del 56.27% $\pm 2.58\%$ deduciendo de esta cifra la dosis letal 50 en 1290 μM . A concentraciones muy altas de 2000 μM , la mortalidad celular calculada era de aproximadamente 70% (viabilidad 33.57 \pm 1.99). Nosotros utilizaremos una DL50 de 1000 μM para el resto de los experimentos, porque resulta próxima a 1290 μM .

II. Determinación de viabilidad celular mediante citometría de imagen

La determinación de 5 poblaciones celulares realizada con anexina V/IP mediante citometría de imagen AMNIS permite determinar la población de células vivas que se han tratado con 1 mM de CES y calcular el porcentaje de toxicidad producido por este tratamiento.



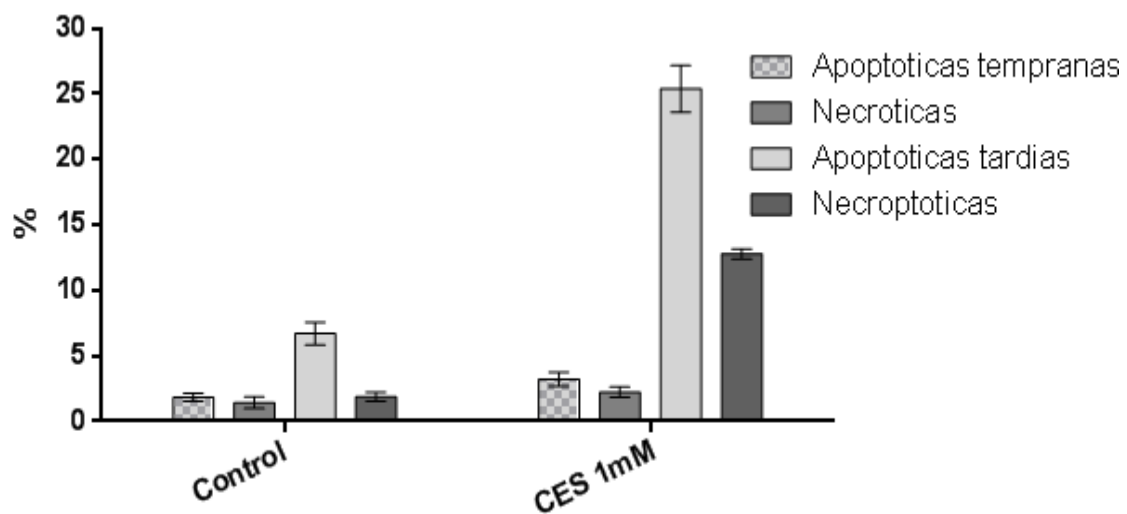
Gráfica 2. Determinación por citometría de imagen de los porcentajes de células vivas y de toxicidad en 5 poblaciones celulares tratadas con CES a 1mM.

La gráfica 2 muestra la disminución de la población de células vivas de las muestras tras realizar un tratamiento de 1 mM de CES (se utiliza este valor por ser el más cercano al LD50) obteniendo una viabilidad de $55.30 \pm 2.946\%$. Mediante estos valores se puede calcular la toxicidad de la dosis 1mM en $33.33 \pm 1.595\%$ como vemos en la gráfica.

Se puede observar como los valores obtenidos de viabilidad mediante citometría de imagen y mediante el test de MTT son bastante similares y congruentes entre sí.

III. Determinación de tipos de muerte celular mediante citometría de imagen tras exposición a CES

Tal como se ha descrito anteriormente existen diversos tipos de muerte celular, la citometría de imagen-AMNIS permite valorar características morfológicas unidas a la tinción de yoduro de propidio-anexina V. En el apartado anterior se mostraba la población de células vivas y en la gráfica 3 se muestran los cuatro tipos de muerte celular estudiados con un tratamiento de 30 minutos con CES tras 24 horas.



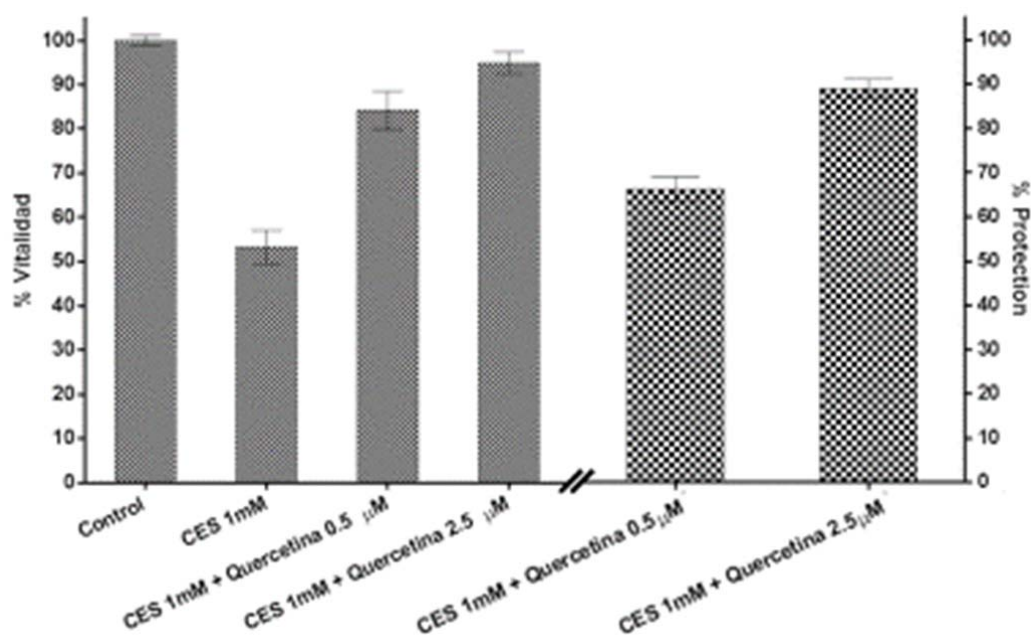
Gráfica 3. Valoración de los tipos de muerte celular producidos en fibroblastos tratados con CES por citometría de imagen.

La gráfica 3 muestra los cambios en la población debida al tratamiento con CES 1mM. Se pueden observar cambios en todas las poblaciones celulares siempre encontrando un aumento con el tratamiento. Sin embargo, las poblaciones de apoptóticas tempranas y necróticas que en el control son de $1.82 \pm 0.289\%$ y $1.42 \pm 0.445\%$ respectivamente, aplicando CES aumentan solamente hasta $3.217 \pm 0.532\%$ y $2.227 \pm 0.414\%$ lo que implica una subida muy leve de estas poblaciones debido al tóxico. Sin embargo, la población control de apoptóticas tardías ($6.697 \pm 0.860\%$) y de necroptóticas ($1.867 \pm 0.362\%$) aumentan por efecto del tratamiento CES hasta $25.383 \pm 1.787\%$ y $12.779 \pm 0.388\%$ respectivamente. Esto indica

un aumento de más de 4 veces en la población de apoptóticas tardías y casi 7 veces más para el caso de las necroptóticas.

Los valores obtenidos permiten concluir que el tratamiento con CES 1mM incrementa principalmente la muerte por apoptosis tardía y necroptosis.

IV. Estudio de viabilidad celular con MTT tras exposición a CES y quercetina



Grafica 4. Vitalidad de fibroblastos tras exposición a CES 1mM frente a protección que ofrece quercetina, a dosis de 0.5 µM y 2.5 µM mediante MTT.

Se realizó una segunda tanda de experimentos mediante test de MTT para evaluar el efecto protector de la quercetina frente a los daños producidos por CES. En este experimento se utilizó la dosis de 1mM de CES por ser la más cercana al LD50 y se han calculado valores de vitalidad de 53.27±3.80%

Se sometió a las células a un tratamiento conjunto de 1 mM CES y quercetina 0.5 y 2.5 μ M para evaluar si existía algún tipo de protección por este último. Como se aprecia en la gráfica 4 la quercetina aumentó la vitalidad de las células tratadas con 1mM de CES desde los $53.27\pm 3.80\%$ hasta $84.22\pm 4.30\%$ en dosis de 0.5 μ M y hasta $94.85\pm 2.51\%$ para 2.5 μ M de quercetina. De esta forma, la quercetina demostró proteger frente al daño celular producido por CES de manera dosis dependiente, calculando una protección de $66.22\pm 2.88\%$ y $88.96\pm 2.22\%$ para dosis de 0.5 y 2.5 μ M respectivamente.

B. Discusión

La mayoría de los autores, como Kai Kehe en 2013, Arroyo en 2000 y Shahin C. en 2001, han utilizado concentraciones de CES entre 100-300 μ M para intentar describir los mecanismos vesicantes que se producen tras la exposición a CES; es decir, la alquilación de estructuras celulares y moleculares y toda la cascada de acontecimientos que confluyen hasta la muerte celular. En 1992 Khan S. y colaboradores se atreven a utilizar concentraciones más elevadas de hasta 1.5 mM pero de mostaza nitrogenada en hepatocitos, muy parecida a la del azufre; con la referencia de estos autores se ha decidido realizar estos experimentos a concentraciones en torno a las descritas.

Kai Kehe y colaboradores en 2013 describen un modelo de queratinocitos en cultivo en que aplican sulfuro de mostaza a concentraciones entre 0.3 y 300 μ M, detectando enlaces entre CES y ADN. En este mismo artículo se señala que se producían efectos del tóxico en soldados iraníes intoxicados con unas concentraciones sistémicas de 0.9 μ M; es decir, que a esas concentraciones tan pequeñas de CES ya se alcanzan ciertas citotoxicidades, aunque las lesiones macroscópicas y sistémicas probablemente se produzcan a dosis mucho más elevadas.

En la **gráfica 1** se ha calculado la dosis letal del 50% (LD50) del tóxico CES en 1 mM, cuando se han expuesto los fibroblastos durante 30 minutos. La mayoría de los autores referenciados en la bibliografía, plantean los estudios en animales de experimentación y no calculan la LD50; por tanto, las dosis utilizadas no son comparables a las realizadas en nuestro trabajo, a excepción de Khan S en 1992, quienes utilizaron mostaza nitrogenada y un modelo celular de hepatocitos logrando determinar a concentración de 1.5 mM una mortalidad celular de casi un 50% (LD50) tras 120 minutos de exposición, mientras que a concentraciones de 1 mM de esta mostaza nitrogenada la mortalidad era de un 25%; es decir que prácticamente la letalidad celular *in vitro* con el mismo tiempo de exposición (30 minutos) y a la misma concentración (1 mM) la mostaza sulfurada de nuestro estudio es doblemente agresiva y letal que la nitrogenada en cuanto a tiempo de exposición/concentración.

Sharma Manoj en 2008 afirman que la toxicidad del sulfuro de mostaza es mayor que la nitrogenada cuando la vía de administración es subcutánea.

En la **gráfica 2** se aprecia un aumento de la mortalidad de los fibroblastos de un 33.33% con 1mM de CES, próxima a LD50.

Los autores Smith K. J. en 1997, Simbulam-Rosenthal en 2006 y Kehe K. en 2000, observaron mediante experimentos *in vitro* con queratinocitos un aumento en la población de células apoptóticas utilizando concentraciones de 100 μ M, sin especificar que esta dosis fuera LD50. Por tanto, para estos autores esta concentración es significativa en términos de citotoxicidad *in vitro* puesto que comienza a producirse la cascada de acontecimientos (modificaciones de la membrana celular y núcleo picnótico) que desencadena la apoptosis celular.

En cuanto a los tipos de muerte celular según se demuestran en los resultados obtenidos mediante citometría de imagen en la **gráfica 3**, se ha observado que se produce necrosis, necroptosis, apoptosis temprana y tardía, pero a concentraciones del tóxico más elevadas de las que utilizan los autores mencionados. En ninguno de los artículos se describe necroptosis celular ni distinguen entre apoptosis temprana y

tardía. En esta misma gráfica, se ha podido observar que los dos tipos de muerte celular predominantes tras la exposición a CES son la apoptosis tardía ($25.383\pm 1.787\%$) y la necroptosis ($12.779\pm 0.388\%$).

Smith J. en 1995 solamente describe la muerte por necrosis como único mecanismo de muerte celular en el que participa el CES. Tres años más tarde, en 1998 Rosenthal fue capaz de diferenciar una población apoptótica producida por efecto de CES, de forma que la muerte por necrosis no es la única vía de acción de la toxicidad del CES. Posteriormente autores como Sharma M. en 2010, Greenberg Shari en 2006 o Kehe Kai en 2008, corroboran que se dan dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis.

En la **gráfica 4** se ha podido comprobar mediante test de MTT el gran efecto protector que ofrece la quercetina ante la exposición a CES. Concentraciones de quercetina de $0.5 \mu\text{M}$ ofrecen una protección de 66.22% y a dosis $2.5 \mu\text{M}$ una protección todavía más significativa del 88.96% . El tóxico libera radicales libres, tal y como describen los autores Kehe Kai y Szinicz Ladislaus, en 2005. Basándonos en nuestros resultados podemos suponer que la reducción de la muerte celular con tratamientos de quercetina, conocido antioxidante (Bors W., Michel C., Casanova A., 2002, 2005 y 2015), podría ser debida al efecto antirradicales libres de esta sustancia.

Dado que en la revisión bibliográfica realizada, no existen estudios recientes sobre la aplicación preventiva y/o protectora de quercetina para la exposición a CES, no se ha podido comparar nuestros resultados con ningún autor.

CONCLUSIONES

En nuestro modelo los resultados de viabilidad y mortalidad celular para el tóxico CES obtenidos tanto con MTT, como por citometría de imagen AMNIS, son muy similares.

En el cultivo de fibroblastos humanos, el tóxico CES induce la muerte celular de manera dosis dependiente, con una dosis letal 50 de 1290 μM .

El tipo de muerte celular inducida por el tóxico CES, es mayoritariamente por apoptosis tardía y necroptosis, ambas poblaciones celulares han incrementado siete veces los valores control.

La quercetina ha mostrado proteger contra la exposición al tóxico con gran eficacia. Para exposiciones de CES 1 mM, la quercetina 0,5 y 2,5 μM disminuyó la mortalidad celular en un 66.22% y 88.96% respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B. & Peter Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Science, N.Y. G. Ed.), 1 “Chapter 18”, New York.
2. Arroyo C. M. & Carmichael A. J. (2000). Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard: Cytokine release. *J. Appl. Toxicol.* 20 (Suppl. 1), S63-S72.
3. Batal Mohamed & Douki Thierry. (2014). DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicology and Applied Pharmacology* 278, 39-44.
4. Batal Mohamed & Douki Thierry. (2013). Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulfur mustard-exposed skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 273, 644-650.
5. Bors W. and Michel C. (2002). Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 57-69.
6. Casanova A., (2015) Estudio del efecto de la radiación ultravioleta sobre fibroblastos y su protección por quercetina [Tesis doctoral]. Zaragoza: Departamento de Farmacología y Fisiología Humana, Universidad de Zaragoza.
7. Chauhan S. & Karthink V. (2008). Chemical warfare agents. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26, 133-122.
8. Ching C. Lau and Arthur B. Pardee. (1982). Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Cell Biology. Proc. Natl. Acad. Sci* 79, 2942-2946.
9. Cho Y. S. & Chan F. K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137, 1112-23.
10. Clement M. V. & Stamenkovic I. (1994). Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. *J Exp Med* 180, 557-67.

TFG- Bibliografía

11. Day A. J. & Williamson G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 436, 71-5.
12. De Castro de Pardo Clemencia. (2006). Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT test. Bogotá, Colombia. Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín.
13. Dunai Z. & Mihalik R. (2011). Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathol Oncol Res* 17, 791-800.
14. Goswami Dinesh G. & Agarwal Rajesh. (2015). Topical nitrogen mustard exposure causes systemic toxic effects in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 67, 161-170.
15. Greenberg Shari & Garlick Jonathan A. (2006). Characterization of the Initial Response of Engineered Human Skin to Sulfur Mustard. *Toxicological sciences* 90(2), 547-557.
16. Groehler Arnold & Tretyakova Natalia. (2016). Covalent DNA- Protein Cross-Linking by Phosphoramidate Mustard and Nornitrogen Mustard in Human Cells. *Chemical Research in Toxicology* 29, 190-202.
17. Hansson Johan & Nilsson Bo. (1987). Formation and Removal of DNA Cross-Links Induced by Melphalan and Nitrogen Mustard in Relation to Drug-induced Cytotoxicity in Human Melanoma Cells. *Cancer Research* 47, 2631- 2637.
18. Harwood M. & Lines T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol* 45, 2179-205.
19. Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.
20. Hetz C. A. & Quest A. F. (2005). Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochem Cell Biol* 83, 579-88.
21. Hollman P. C. de Vries & Katan M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J. Clin Nutr* 62, 1276-82.
22. Inturi Swetha & Argarwal Rajesh. (2014). Activation of DNA damage repair pathways in response to nitrogen mustard-induced DNA damage and toxicity in

- skin keratinocytes. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 763-764, 53-63.
23. Khan S. & O'Brien PJ. (1992). Hepatocyte toxicity of mechlorethamine and other alkylating anticancer drugs. Role of lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 43 (9), 1963-7.
 24. Kehe Kai & Steinritz Dirk. (2013). Modified immunoblot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts. *Chemico-Biological Interactions* 206, 523-528.
 25. Kehe Kai and Szinicz Ladislaus. (2005). Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* 214, 198-209.
 26. Kehe Kai & Szinicz Ladislaus. (2000). Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in SCLII cells in vitro. *J. Appl. Toxicol* 881-886.
 27. Kehe Kai & Thiermann Horst. (2008). Sulfur Mustard Research- Strategies for the Development of Improved Medical Therapy. *EPlasty* 8.
 28. Leist M. & Nicotera P. (1997). The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 1-9.
 29. Lockshin R. A. & Zakeri Z. (2002). Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 14, 727-33.
 30. Manach C. & Remesy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S-242S.
 31. Mc Namara C. R. & Degterev A. (2013). Akt Regulates TNF α synthesis downstream of RIP1 kinase activation during necroptosis. *PLoS One* 8, e56576.
 32. Mimeault M. (2002). New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS Lett* 530, 9-16.
 33. Murota K. M. Y. & Terao J. (2004). Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 52 (7), 1907-12.
 34. Newton K. & Dixit V. M. (2014). Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* 343, 1357-60.
 35. Olson E. R. & Bowden G. T. (2008). Stabilization of quercetin paradoxically reduces its proapoptotic effect on UVB-irradiated human keratinocytes. *Cancer Prev Res (Phila)* 1, 362-8.

TFG- Bibliografía

36. Olso E. R. & Bowden G. T. (2010). Quercetin potentiates UVB-Induced c-Fos expression: implications for its use as a chemopreventive agent. *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 876-84.
37. Panchal S. K. & Brown L. (2012). Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic síndrome in rats. *J Nutr* 142, 1026-32.
38. Pita R. and Vidal-Asensi S. (2010). Cutaneous and Systemic Toxicology of Vesicant (Blister) Warfare Agents. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 101 (1), 7-18.
39. Roth Eugene F. & Jaffé Ernst R. (1975). Metabolic Effects of Antisickling Amounts of Nitrogen and Nor-Nitrogen Mustard on Rabbit and Human Erythrocytes. *Blood* 45.
40. Sax NI, L. R. (1993). *Hawley Diccionario de química y de productos químicos. 2ª ed. Barcelona: Omega.*
41. Schulze-Osthoff K. (1994). The Fas/APO-1 receptor and its deadly ligand. *Trends Cell Biol* 4, 421-6.
42. Shahin S. & Gray P. J. (2001). Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by sulphur mustard in keratinocytes. *Chem. Biol. Interact.* 138, 231-245.
43. Shakarjian Michael P. & Laskin Jeffrey D. (2010). Mechanisms Mediating the Vesicant Actions of Sulfur Mustard after Cutaneous Exposure. *Toxicological sciences* 114 (1), 5-19.
44. Sharma Manoj & Vijayaraghavan R. (2010). Nitrogen and sulphur mustard induced histopathological observations in mouse visceral organs. *Journal of Enviromental Biology* 31 (6), 891-905.
45. Sharma Manoj & Ganesan K. (2008). Comparison of toxicity of selected mustard agents by percutaneous and subcutaneous routes. *Indian Journal of Experimental Biology* 46, 822-830.
46. Simbulan-Rosenthal C. M. & Rosenthal D. S. (2006). Calmodulin mediates sulfur mustard toxicity in human keratinocytes. *Toxicology* 227, 21-35.
47. Smith K. J. & Hackley B. E. (1997). Histopathologic features seen with different animal models following cutaneous sulfur mustard exposure. *J. Dermatol. Sci.* 14, 126-135.

48. Smith Kathleen J. & Sidell Frederick R. (1995). Sulfurd mustard: Its continuing threat as a chemical warfare agent, the cutaneous lesions induced, progress in understanding its mechanism of action, its long-term health effects, and new developments for protection and therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 32, 765-76.
49. Suda T., & Nagata S. (1993). Molecular cloning and and expresión of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-78.
50. Szinicz L. (2005). History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214, 167-181.
51. Sede Web [Internet] Empresa Sigma-Aldrich; 2016 [citado en 2016] Disponible en la página web [www. sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
52. Sede Web [Internet] Zaragoza: Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI; 2016 [citado en 2016]. Disponible en la página web <http://sai.unizar.es/citomica/dotacion.html>
53. Welz P. S. & Pasparakis M. (2011). FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* 477, 330-4.
54. Wu W. Liu & Li J. (2012). Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 82, 249-58.

