

Yaiza Marzo Pereboom

# Protección celular por Quercetina frente a gas mostaza

Director/es

Alda Torrubia, Octavio  
Pereboom Maicas, Desirée

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>





**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**PROTECCIÓN CELULAR POR QUERCETINA  
FRENTE A GAS MOSTAZA**

Autor

**Yaiza Marzo Pereboom**

Director/es

Alda Torrubia, Octavio  
Pereboom Maicas, Desirée

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

2021



## Tesis Doctoral

# PROTECCIÓN CELULAR POR QUERCETINA FRENTE A GAS MOSTAZA

Autora

Dña. Yaiza Marzo Pereboom

Directores

D. José Octavio Alda Torrubia

Dña. Désirée Pereboom Maicas

Facultad de Medicina  
Año 2021





*Con todo mi amor para  
mis padres, José y Désirée,  
mi hermano, Adrián,  
mi marido, Alberto  
y mis hijos, Sofía y Gabriel.*





*“Dime y lo olvido,  
enséñame y lo recuerdo,  
involúcrame y lo aprendo.”*

Benjamin Franklin, científico e inventor estadounidense.



## Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al doctor José Octavio Alda Torrubia por la entusiasta labor de dirección de esta tesis. Su pasión por la fisiología ha sido una fuente de inspiración para perseverar en mi estudio y su dominio de las diferentes áreas del conocimiento una constante motivación para superarme a mí misma.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza por su asesoría y apoyo, permitiéndome alcanzar todos los objetivos de esta tesis.

Al Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de Citómica de la Universidad de Zaragoza por su profesionalidad y tiempo invertido en transmitirme los conocimientos básicos de la citometría.

A mi compañero y amigo Álvaro Casanova Flor de Lis, porque cada vez que me he encontrado con algún obstáculo él me ha enseñado cómo salvarlo, tanto por su experiencia en el laboratorio como por su dominio de la informática.

A mi amiga Cristina Cacho Nerín, la mejor cómplice y confidente. A través de tus ojos los matices de la vida siempre son más brillantes.

A mi padre por su amor incondicional, siempre velando tanto por mí como por mis dos chiquitines. Por muchas veces que me caiga tú siempre me levantas. Gracias a ti me he convertido en quien quería ser.

A mi hermano, por toda su inmensidad llena de ternura. Oído sereno y mente racional, su cariño siempre está presente y cada vez que flaquean mis fuerzas me anima, me aporta la perspectiva bonita de la vida y me permite volver al camino.

A mi marido, que llegó en el momento más inesperado para iluminar mis días y regalarme amor en sus mil formas y colores. Estar a tu lado dibuja mis sonrisas y da forma a mis sueños.

A mi hija Sofía, ya que mi corazón está completo desde que la cogí en brazos por primera vez. La dulzura de su sonrisa y devoción de su mirada trastocaron mi existencia, convirtiéndome en la persona más feliz del planeta.

A mi hijo Gabriel, porque una nueva estrella se ha encendido en mi firmamento y ha vuelto a enseñarme que el amor es infinito.

A mi madre, fuente de inspiración, paciencia, perseverancia, amor, sabiduría y templanza. Me guiaste hacia la medicina y de tu mano alcanzaré la cúspide académica. Julio Cortázar dijo hace años que *“las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”*, así que simplemente diré: gracias, mamá, mil y una veces gracias.

## Índice

<b>RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
PALABRAS CLAVE .....	14
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
KEYWORDS.....	16
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>23</b>
GAS MOSTAZA: .....	23
<i>Antecedentes históricos.....</i>	23
<i>Mecanismo de acción .....</i>	31
<i>Clínica .....</i>	34
<i>Tratamiento tras la exposición a mostazas.....</i>	38
<i>Aplicaciones terapéuticas de las mostazas .....</i>	41
QUERCETINA:.....	43
<i>Características generales.....</i>	45
<i>Metabolismo.....</i>	50
<i>Toxicidad.....</i>	51
<i>Muerte celular .....</i>	53
<i>Efectos biológicos en órganos y sistemas.....</i>	54
VITAMINA C: .....	65
<i>Características generales.....</i>	65
<i>Mecanismo de acción .....</i>	67
<i>Funciones biológicas.....</i>	69
SENESCENCIA:.....	73
<i>Características generales.....</i>	73
<i>Marcadores para identificar la senescencia.....</i>	79
<i>Citometría de imagen .....</i>	81
<i>Muerte celular y apoptosis .....</i>	89
<b>PLANTEAMIENTO .....</b>	<b>93</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>97</b>
HIPÓTESIS .....	97
OBJETIVOS: .....	97
<i>Principal .....</i>	97
<i>Parciales.....</i>	97
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
MATERIAL: .....	101
<i>Biológico .....</i>	101
<i>Reactivos para cultivo celular:.....</i>	103
<i>Fluorocromos.....</i>	106
<i>Equipos .....</i>	111
<i>Material fungible .....</i>	114
MÉTODOS: .....	115
<i>Protocolo de descongelación de fibroblastos dérmicos para cultivo celular.....</i>	116
<i>Mantenimiento del cultivo celular.....</i>	116

<i>Protocolo de tripsinización .....</i>	<i>117</i>
<i>Técnica para calcular disoluciones de mostaza nitrogenada .....</i>	<i>118</i>
<i>Técnica para calcular disoluciones de mostaza sulfurada.....</i>	<i>119</i>
<i>Protocolo para cálculo de dosis tóxica en mostazas (IC<sub>50</sub>) .....</i>	<i>120</i>
<i>Protocolo para medir la viabilidad celular con MTT.....</i>	<i>121</i>
<i>Protocolo de sustancias protectoras para medición por espectrofotometría.....</i>	<i>122</i>
<i>Protocolo de mostaza nitrogenada tras sustancias protectoras.....</i>	<i>123</i>
<i>Protocolo de mostaza sulfurada tras sustancias protectoras .....</i>	<i>124</i>
<i>Protocolo de viabilidad, apoptosis y mortalidad celular por citometría de imagen .....</i>	<i>124</i>
<i>Protocolo de senescencia.....</i>	<i>126</i>
<i>Protocolo de sustancias protectoras frente a tóxicos para medición por citometría de imagen.....</i>	<i>127</i>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>131</b>
<b>MOSTAZA SULFURADA: .....</b>	<b>131</b>
<i>Cálculo de la IC<sub>50</sub> en mostaza sulfurada .....</i>	<i>131</i>
<i>Protección celular de la quercetina frente a mostaza sulfurada .....</i>	<i>139</i>
<i>Tipos de muerte celular por exposición a mostaza sulfurada .....</i>	<i>144</i>
<i>Efectos sobre la senescencia en células expuestas a mostaza sulfurada previo tratamiento con quercetina y vitamina C .....</i>	<i>148</i>
<b>MOSTAZA NITROGENADA: .....</b>	<b>153</b>
<i>Cálculo de la IC<sub>50</sub> en mostaza nitrogenada.....</i>	<i>153</i>
<i>Protección celular de la quercetina frente a mostaza nitrogenada .....</i>	<i>156</i>
<i>Tipos de muerte celular por exposición a mostaza nitrogenada.....</i>	<i>158</i>
<i>Efectos sobre la senescencia en células expuestas a mostaza nitrogenada previo tratamiento con quercetina y vitamina C.....</i>	<i>161</i>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>165</b>
<b>MORTALIDAD INDUCIDA POR MOSTAZAS .....</b>	<b>165</b>
<b>TIPOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR MOSTAZAS.....</b>	<b>166</b>
<b>PROTECCIÓN CELULAR DE LA QUERCETINA FRENTE A MOSTAZAS.....</b>	<b>171</b>
<b>EFFECTOS DE LAS MOSTAZAS SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR .....</b>	<b>172</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>177</b>
<b>ESTÁNDARES ÉTICOS .....</b>	<b>181</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>185</b>
<b>TABLAS.....</b>	<b>185</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>185</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>191</b>

# Resumen

---





## Resumen

El gas mostaza es un agente tóxico que ha sido empleado como arma química en diferentes escenarios históricos. Su primera aplicación con fines bélicos se remonta a la Primera Guerra Mundial y, a pesar de estar recogido en la Convención de Armas Químicas, la prohibición no ha impedido su uso y existen registros sobre ataques perpetrados en Siria en el año 2016 con este agente vesicante. De hecho, la ausencia de antídotos específicos para un adecuado tratamiento en caso de exposición aguda y la escasa información sobre el mecanismo de acción de esta sustancia han motivado la investigación de esta tesis doctoral.

En este estudio se pretende analizar la toxicidad aguda de la mostaza sulfurada y nitrogenada a nivel celular, utilizando un modelo de fibroblastos humanos y cultivos celulares de queratinocitos HaCaT, ensayando posibles sustancias protectoras como quercetina y vitamina C.

Los tipos de muerte celular inducidos por la exposición a mostaza sulfurada y nitrogenada se deben a un incremento significativo de apoptosis y necroptosis, sin alterarse la necrosis de forma estadísticamente significativa.

Nuestro estudio de toxicidad en modelos celulares de la quercetina mostró efectos protectores hasta concentraciones finales de 10  $\mu\text{M}$  y un efecto tóxico al incrementar la mortalidad de forma estadísticamente significativa a concentraciones superiores a 20  $\mu\text{M}$ .

El tratamiento preventivo con quercetina, aplicado antes de la exposición aguda a mostazas, disminuye la muerte celular de forma estadísticamente significativa. Por tanto, para mostaza sulfurada la protección con quercetina 1  $\mu\text{M}$  es 56,8%, mientras que para la nitrogenada es 41,3%. El tratamiento con quercetina 2,5  $\mu\text{M}$  ofrece una protección de 67,1% para la sulfurada y 53,9% para la nitrogenada.

El efecto de las mostazas sobre la senescencia nos permite concluir que ambas tienen efecto senolítico estadísticamente significativo, disminuyendo el porcentaje de células senescentes en función de su concentración con un  $\text{IC}_{50}$  de 750  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$  para la mostaza sulfurada y nitrogenada respectivamente. Estos resultados se han obtenido cuantificando células senescentes en la población de células vivas, descartando las apoptóticas y necróticas inducidas por las mostazas.

**PALABRAS CLAVE:**

Apoptosis, citometría de flujo, especies reactivas de oxígeno, fibroblastos, gas mostaza, guerra química, mostaza nitrogenada, mostaza sulfurada, queratinocitos HaCaT, quercetina, SA- $\beta$ -Galactosidasa, senescencia, vitamina C.

## Abstract

Mustard gas is a toxic agent that has been used as a chemical weapon in different historical sceneries. Its first use goes back to World War I and, despite being banned by the Chemical Weapons Convention, its prohibition has not prevented its use and there are records about Syrian attacks in 2016 with this vesicant agent. Furthermore, the absence of a specific antidote for an appropriate treatment in case of acute exposure to mustard gas and the limited information regarding its mechanism of action have promoted the research of this doctoral thesis.

This research aims to analyze the acute toxicity of sulfur and nitrogen mustard at cellular level, using a model of human fibroblasts and HaCaT keratinocyte cell cultures. We have tested possible protective substances such as quercetin and vitamin C.

The different types of cell death induced by sulfur and nitrogen mustard exposure ascribe to a significant increase in apoptosis and necroptosis, without altering the necrosis in a statistically significant way.

Our toxicity study in quercetin cell models showed protective effects up to final concentrations of 10  $\mu\text{M}$  and a toxic effect with a statistically significant increase in mortality at concentrations above 20  $\mu\text{M}$ .

Preventive treatment with quercetin, applied before acute mustard exposure, reduces cell death in a statistically significant way. Therefore, for sulfur mustard exposure the protection with quercetin 1  $\mu\text{M}$  is 56,8%, whereas for nitrogen mustard is 41,3%. Treatment with quercetin at 2,5  $\mu\text{M}$  offers a protection of 67,1% for sulfur mustard and 53,9% for nitrogen mustard.

The effect of mustard gas on senescence allows us to conclude that both sulfur and nitrogen mustard have a statistically significant senolytic effect, decreasing the percentage of senescent cells depending on the concentration with an  $\text{IC}_{50}$  of 750  $\mu\text{M}$  for sulfur mustard and 1000  $\mu\text{M}$  for nitrogen mustard. These results have been obtained by quantifying senescent cells in the living cell populations, ruling out apoptotic and necrotic cells induced by mustard gas exposure.

**KEYWORDS:**

Apoptosis, chemical warfare, fibroblasts, flow cytometry, HaCaT keratinocytes, mustard gas, nitrogen mustard, quercetin, reactive oxygen species, SA- $\beta$ -Galactosidase, senescence, sulfur mustard, vitamin C.

# Abreviaturas

---



## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADN-SCARS</b>	Segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina que refuerzan la senescencia
<b>ALT</b>	Enzima alanina aminotransferasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AST</b>	Enzima aspartato aminotransferasa
<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina
<b>CAQ</b>	Convención sobre Armas Químicas
<b>CAS</b>	<i>Chemical Abstracts Service registry number</i>
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DAPI</b>	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate</i>
<b>DIABLO</b>	<i>Direct IAP-binding protein with low pI</i>
<b>dL</b>	Decilitro (0,1 litros)
<b>DM2</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>EPI</b>	Equipo de protección individual
<b>FDG</b>	Fluoresceín-di-β-D-galactopiranosido
<b>HDL</b>	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidad)
<b>IC<sub>50</sub></b>	<i>Half-maximal inhibitory concentration</i> (concentración media inhibitoria del 50%)
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>IV</b>	Intravenoso
<b>LD<sub>50</sub></b>	<i>Lethal dose</i> 50 (dosis letal 50%)
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baja densidad)
<b>mL</b>	Mililitro (10 <sup>-3</sup> litros)
<b>μL</b>	Micro litro (10 <sup>-6</sup> litros)
<b>μM</b>	Micromolar (10 <sup>-6</sup> molar)
<b>mM</b>	Milimolar (10 <sup>-3</sup> molar)
<b>MN</b>	Mostaza nitrogenada
<b>MPO</b>	Enzima mieloperoxidasa
<b>MS</b>	Mostaza sulfurada
<b>MSCs</b>	Células madre mesenquimales
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i> o diana de rapamicina en mamíferos
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas



<b>nm</b>	Nanómetro (10 <sup>-9</sup> metros)
<b>nM</b>	Nanomolar (10 <sup>-9</sup> molar)
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PARP</b>	Poli ADP (adenosín difosfato) ribosa polimerasa
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMA</b>	Forbol miristato acetato
<b>Q</b>	Quercetina
<b>RNS</b>	<i>Reactive nitrogen species</i> o especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> o especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revolución por minuto
<b>SA-β-Gal</b>	Senescence Associated beta Galactosidase
<b>SAHF</b>	Focos heterocromáticos asociados a senescencia
<b>SASP</b>	Fenotipo secretor asociado a la senescencia
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SIPS</b>	Senescencia prematura inducida por estrés
<b>SIRT1</b>	<i>Silent mating type Information Regulation Two</i> tipo 1 o Sirtuina tipo 1
<b>SMAC</b>	Segundo activador derivado de la mitocondria activador de caspasas
<b>SO</b>	Enzima superóxido dismutasa
<b>STAC</b>	Compuesto activador de la sirtuina
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vit. C</b>	Vitamina C

# Introducción

---



## Introducción

### **GAS MOSTAZA:**

#### *Antecedentes históricos*

Muchas civilizaciones antiguas han utilizado sustancias tóxicas con diferentes fines. Hay investigaciones arqueológicas que describen cómo el hombre del Paleolítico impregnaba las puntas de flecha en diversos venenos para facilitar la caza. Ya en el año 3.500 a.C. el emperador japonés Shen-Nung cultivaba un jardín botánico para el estudio de las plantas medicinales y tóxicas. Se conservan papiros que relatan el manejo de la alquimia por parte de los egipcios mezclando minerales hasta conseguir trióxido de arsénico u otras toxinas. Los romanos incluso crearon la figura del envenenador profesional para llevar a cabo magnicidios con discreción. Bien se obtuvieran a partir de plantas o semillas, de minerales o de origen animal a través de serpientes, arañas, ranas o alacranes, el uso de tóxicos y antídotos queda reflejado en sánscrito en los libros de Veda que posteriormente fundarían el hinduismo, así como en la Biblia o diversas mitologías (Repetto Jiménez M. and Repetto Kuhn G., 2009). De hecho, la etimología del término “toxicología” proviene del griego (τοξικόν o *toxikón* “veneno” y -λογία o *-logía* “discurso”).

Sin embargo, no fue hasta la Primera Guerra Mundial (28 de julio de 1914 hasta el 11 de noviembre de 1918) donde la escalada de hostilidades marcó el verdadero nacimiento de las armas químicas. El afán por causar el mayor número de bajas posible, tanto para matar como para incapacitar al enemigo, convirtió en prioridad su producción a nivel industrial (Chauhan et al., 2008). La industria química alemana disponía capacidad de producción a gran escala debido a sus fábricas de tintes con personal técnico cualificado y sofisticados equipos de producción. No obstante, fue Francia el primer país en utilizar sustancias químicas puesto que en 1912 empleaban bromoacetato de etilo como agente antidisturbios por su actividad lacrimógena y en 1914 lo aplicaron en el ámbito militar contra los alemanes. En 1916 los alemanes crearon la “Comunidad de intereses de la industria de tintes” con la asociación de tres grandes empresas, BASF, Hoechst y Bayer, permitiendo que los laboratorios experimentasen con múltiples sustancias: el nitrato (como fertilizante y como explosivo), el amoníaco (descubrimiento que le reportó al científico alemán Fritz Haber el Premio Nobel de Química en 1918), el cloro y el

fosgeno (agentes neumotóxicos de guerra). Los alemanes justificaban la violación de las Convenciones de la Haya de 1899 y 1907 centradas en reglamentar la guerra, alegando que los franceses ya utilizaban municiones químicas y que de este modo Alemania obtendría un final rápido para la guerra. Además, explicaban que el uso de bombonas de cloro no infringía los acuerdos de la Haya puesto que la dispersión del gas asfixiante no implicaba la utilización de proyectiles, defendiendo por otra parte que las armas químicas eran menos horribles que los explosivos ingleses porque en lugar de mutilar al combatiente le conferían una muerte rápida e indolora. Poco a poco el uso del EPI (Equipo de Protección Individual) fue cobrando mayor importancia, incluso llegaron a diseñarse máscaras para proteger a caballos, mulas o perros, animales clave dentro de las operaciones militares. El reverendo británico y capellán castrense Owen Spencer Watkins describía con terror un ataque por cloro en 1915 (Pita, 2008):

*Cuando salimos a tomar el aire durante unos momentos para aliviarnos de la agobiante atmósfera de los pabellones, nuestra atención se dirigió al fuerte fuego del norte, donde los franceses mantenían la línea. Evidentemente era una dura lucha –y ansiosamente miramos con nuestros prismáticos sobre el terreno esperando averiguar algo del progreso de la batalla–. Entonces vimos algo que hizo que nuestros corazones dejaran de latir –figuras confusas y corriendo locamente por todo el campo–.*

*“Los franceses han caído”, exclamamos. Nosotros difícilmente creíamos nuestras propias palabras... No podíamos dar crédito a la historia que nos contaban; la atribuíamos a su imaginación aterrorizada –una nube gris-verdosa había sido extendida sobre ellos, volviéndose amarilla a medida que iba pasando por todo el terreno, acabando con todo lo que tocaba, secando la vegetación–. El coraje humano no podía hacer frente a tal peligro.*

*Entonces se tambalearon entre nosotros soldados franceses, ciegos, tosiendo, con el pecho palpitando, caras con un feo color violeta –labios sin poder decir nada, llenos de agonía– y supimos que habían dejado atrás cientos de camaradas muertos y agonizando en las trincheras llenas de gas. Lo imposible se había hecho realidad.*

*Fue la cosa más diabólica y cruel que jamás he visto.*

La incorporación de la iperita, sulfuro de bis (2-cloroetilo), obligó a redefinir el concepto del EPI puesto que la mascarilla resultaba insuficiente para proteger al combatiente, haciendo necesarios uniforme y guantes especiales. Sin embargo, la producción de estos equipos era mínima, no existiendo suficientes unidades para proteger

a los combatientes. Se considera que la iverita fue sintetizada por primera vez en 1822 por Cesar-Mansuete Despretz al hacer reaccionar etileno con sulfuro de cloro. El químico alemán Viktor Meyer fue capaz de sintetizarla con mayor pureza en 1886 mediante la reacción de tiodiglicol con tricloruro de fósforo. Entre 1916 y 1917 fue producida a gran escala por Lommel y Steinkopf utilizando cloruro de tionilo. El 12 de julio de 1917 fue usada por primera vez por los alemanes en zonas de combate cercanas a la ciudad belga de Ypres, de donde deriva el nombre de “iverita”. Un año más tarde ya la utilizaban franceses, británicos y estadounidenses. Para optimizar su efecto los alemanes combinaban el uso de sustancias lacrimógenas o con efectos eméticos (por ejemplo, compuestos arsenicales como la difenilcloroarsina) para obligar al combatiente a retirarse la máscara (proyectiles “rompe-máscaras” señalizados con una cruz azul) y acto seguido diseminar fosgeno o iverita. Aunque a temperatura ambiente la iverita se encuentra en estado líquido, su alta volatilidad a temperatura relativamente baja les permite permanecer en la zona durante períodos prolongados de tiempo. Los afectados relataban que el impacto de los proyectiles cargados de iverita, señalizados con una inconfundible cruz amarilla, dispersaba vapores amarillentos con fuerte olor a ajo o mostaza, por lo que también se le otorgó la denominación de “gas mostaza”. Tras varias horas de latencia “el rey de los gases” producía múltiples lesiones al combatiente que lo incapacitaban, por lo que a nivel logístico suponía un reto mayor que en el caso de fallecidos, puesto que la asistencia al paciente implicaba un importante consumo de recursos tanto materiales como personales, requiriendo instalaciones sanitarias para la desinfección y tratamiento médico, que de media requería dos meses de hospitalización. Asimismo, los efectos psicológicos del gas causaban una sustancial merma en la operatividad del combatiente. A diferencia del cloro y el fosgeno, ampliamente utilizados en la industria de los tintes, la iverita fue el resultado de un programa de investigación y desarrollo para sintetizar una sustancia específicamente diseñada para el ámbito bélico sin ninguna aplicación industrial. La producción de la iverita constituía un serio riesgo para los trabajadores, ya que los escapes eran frecuentes y las intoxicaciones habituales cada cierto tiempo. Debido a que la sustancia se congela a 14.4 °C tuvieron que diseñarse mezclas para disminuir el punto de fusión. El llenado de los proyectiles constituía uno de los pasos más delicados, requiriendo instalaciones de seguridad para disminuir los accidentes. Debido al riesgo, las fábricas civiles rechazaron el manejo de la sustancia, debiendo construirse plantas militares dedicadas en exclusiva a su producción. Los alemanes utilizaban los proyectiles “cruz amarilla” en zonas que no les interesaba ocupar por la

persistencia del agente en el campo de batalla, dando especial importancia a la meteorología en sus manuales tácticos, puesto que el viento influía en la dispersión del agente y la temperatura en su persistencia (a bajas temperaturas la volatilización es más lenta por lo que se mantiene en el ambiente durante más tiempo, en cambio a temperaturas altas el agente se volatiliza más rápido, tabla 1). En 1903 un hallazgo accidental por parte de Julius Aloysius Nieuwland descubrió la lewisita, un líquido todavía más volátil que la iperita y con efectos inmediatos, aunque sus estudios no fueron aprovechados hasta 1918. A pesar de que ese mismo año se firmase el armisticio por parte de Alemania poniendo fin a la Primera Guerra Mundial, el estudio de agentes químicos de guerra continuó desarrollándose por parte de todos los países.

### EFFECTOS DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA DISPERSIÓN DE LOS AGENTES QUÍMICOS

INFLUENCIA DEL CLIMA EN LA DISPERSIÓN DE LAS NUBES CONTAMINADAS	INFLUENCIA DEL CLIMA EN LA DISPERSIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO
<p><b>Factores que disminuyen el</b> peligro de formación de una nube con agentes de guerra química en forma de aerosol:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dirección del viento variable.</li> <li>- Velocidad del viento alta.</li> <li>- Aire inestable (turbulencias).</li> <li>- Precipitación.</li> <li>- Temperatura baja.</li> </ul>	<p><b>Factores que disminuyen el</b> peligro de que se produzca la contaminación del suelo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperaturas altas del suelo.</li> <li>- Velocidad alta del viento.</li> <li>- Aire inestable.</li> <li>- Precipitación copiosa.</li> </ul>
<p><b>Factores que incrementan el</b> peligro de formación de una nube con agentes de guerra química en forma de aerosol:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dirección del viento estable.</li> <li>- Velocidad del viento &lt; 3 m/s.</li> <li>- Temperatura &gt; 20 °C.</li> <li>- Humedad alta.</li> <li>- No precipitación.</li> </ul>	<p><b>Factores que incrementan el</b> peligro de que se produzca la contaminación del suelo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura &lt; 0 °C.</li> <li>- Baja velocidad del viento.</li> <li>- Aire estable.</li> <li>- Lluvia muy ligera.</li> </ul>

Tabla 1. Influencia de los factores ambientales en la dispersión de los agentes químicos. Fuente: Unidad sueca de Investigación en Defensa Nacional (FOI), *Briefing Book on Chemical Weapons*, 1992.

En la Segunda Guerra Mundial (1 de septiembre de 1939, 2 de septiembre de 1945) Adolf Hitler rechazó el uso de la iperita debido a una experiencia personal de irritación ocular intensa durante un ataque dirigido hacia el Reino Unido (Pita and Vidal-Asensi, 2010). Él mismo lo relató en el Mein Kampf (Hitler A., 1925) cuando fue mensajero del 16.º Regimiento de Infantería Bávaro de Reserva en 1918. Fue durante su estancia hospitalaria cuando recibió la noticia del armisticio del 11 de noviembre de 1918 que ponía fin a la Primera Guerra Mundial.

*En la noche del 13 al 14 de octubre, los ingleses empezaron a lanzar granadas de gas en el frente sur del sector de Ypres; utilizaban gas cruz amarilla, cuyo efecto todavía nos era desconocido, ya que no lo habíamos experimentado en nuestros propios cuerpos. En esta noche lo conocería en mis propias carnes. La noche del 13 de octubre nos encontrábamos aún en un cerro al sur de Wervick envueltos por un fuego de tambor de granadas de gas que duraba ya varias horas y que continuaría con mayor o menor estruendo durante toda la noche. Ya hacia la medianoche, una parte de nosotros nos abandonó, entre ellos algunos camaradas nos dejaron para siempre. Al amanecer, también yo fui presa del dolor que de cuarto en cuarto de hora se hacía más intenso, y a las siete de la mañana, tropezando y tambaleándome con los ojos ardiendo, me dirigí a la retaguardia, llevando aún mi último parte de guerra.*

*Unas horas más tarde los ojos se me habían convertido en ascuas y a mi alrededor dominaban las tinieblas.*

*En este estado se me trasladó al hospital de Pasewalk en Pomerania, y ahí tuve que vivir la revolución.*

En esta época se produjo una liberación accidental de mostaza sulfurada en el puerto italiano de Bari. Los alemanes decidieron atacar dicho puerto porque constituía el principal centro logístico de suministros del mar Adriático para las tropas de los Aliados, que posteriormente marchaban hacia la línea Gustav de la Alemania nazi que impedía su progresión por la península itálica en dirección norte. El ataque se produjo el 2 de diciembre de 1943 y uno de los buques impactados, el estadounidense SS John Harvey, albergaba unas dos mil bombas M47A1 con iperita. La liberación de la carga no sólo afectó a los marineros del buque y a los navíos contiguos, sino que la propagación del gas llegó hasta la ciudad de Bari afectando a población civil. Como consecuencia fallecieron más de 600 militares norteamericanos y más de 1000 civiles sin apenas pérdidas para los atacantes. El incidente inicialmente trató de mantenerse en secreto para evitar que los alemanes pensasen que los aliados estaban planeando un ataque con armas químicas. Los



afectados de esta catástrofe cursaron con supresión de la médula ósea y disminución de los ganglios linfáticos (Pita, 2008). Ante este descubrimiento, los farmacéuticos Gilman y Goodman de Yale decidieron examinar los posibles efectos terapéuticos de la sustancia mediante experimentos con mostaza nitrogenada en ratones que habían recibido un trasplante de tumor linfoide. Al observar regresión del tumor convencieron a su colega Gustaf Lindskog, cirujano torácico, para que administrase mostaza nitrogenada a pacientes afectos de linfoma no Hodgkin con obstrucción severa de la vía aérea, observándose una importante regresión de las células tumorales en diversos tipos de linfoma. Debido al secretismo sobre el ataque de Bari los resultados del estudio no se publicaron hasta 1946 (tres años más tarde). A partir de entonces numerosos estudios han llevado a la síntesis de compuestos alquilantes con efectos citostáticos que se aplican en la actualidad para terapias oncológicas, incluyendo la ciclofosfamida y el clorambucilo (Schmidt et al., 2018c).

El empleo de la iperita también se llevó a cabo por otras nacionalidades (Pita, 2008): los españoles la utilizaron en la guerra del Rif (1921-1927), los italianos en la invasión de Etiopía (1935-1936), los japoneses contra China (1938-1945), los egipcios en Yemen (1962-1970), los iraquíes en Irán (1983-1988) y más recientemente el Estado Islámico en Siria (2016) (Razavi et al., 2016).

El gas mostaza (figura 1) forma parte de los agentes vesicantes de guerra (tabla 2) junto con las lewisitas (L) y la oxima de fosgeno (CX). Se trata de productos químicos que causan ampollas y quemaduras en la piel, además de irritación ocular, afectación de mucosas y de la vía respiratoria (Batal et al., 2013). La modificación de la estructura química de la mostaza sulfurada llevó a la síntesis de la mostaza nitrogenada para aumentar su eficacia con fines bélicos (Szinicz, 2005). Su proceso de fabricación es simple y barato, por lo que pueden utilizarse tanto para uso terrorista como militar (Balali-Mood and Hefazi, 2005).



Figura 1. Estructura química de la mostaza (a) sulfurada y (b) nitrogenada.

La Convención sobre Armas Químicas (CAQ) es un tratado internacional firmado en 1993 (en vigor desde 1997) que prohíbe el desarrollo, producción, almacenaje y uso de armas químicas, tipificando además su forma de destrucción. A partir de este tratado de desarme en 1997 se creó la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPAQ) con sede en La Haya, para asegurar la destrucción de las armas químicas y evitar su proliferación. El número de registro CAS (*Chemical Abstracts Service registry number*, tabla 3) es la identificación numérica oficial para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones que asigna la Sociedad Americana de Química, para almacenar todas las sustancias químicas descritas en la literatura en una base de datos.

## AGENTES QUÍMICOS DE GUERRA

### AGENTES LETALES

<b>Neumotóxicos o sofocantes:</b>	<b>Vesicantes:</b>	<b>Nerviosos o neurotóxicos:</b>	<b>Hemorrágicos o cianogénicos:</b>
- Cloro (Cl)	- Mostaza azufrada o	- <i>Serie G</i> (actúan por inhalación):	- Cianuro de
- Fosgeno (Yousefzadeh et al.)	- Mostaza nitrogenada (HN)	o Tabún (GA)	Hidrógeno (AC)
- Difosgeno (DP)	- Lewisita (L)	o Sarín (GB)	- Cloruro de
- Cloropicrina (PS).		o Somán (Srivastava et al.)	Cianógeno (CK)
		o Cyclosarin.	
		- <i>Serie V</i> (actúan por vía cutánea e inhalación de aerosoles):	
		o VX	
		o Novichok	

### AGENTES INCAPACITANTES

<b>Físicos o psicológicos:</b>	<b>Neutralizantes</b> (gases lacrimógenos cuyos efectos desaparecen cuando se deja de estar expuesto al agente):
- BZ	- CN
	- CS

Tabla 2. Agentes químicos de guerra (tabla de la autora).

## REGISTRO CAS

MOSTAZAS DE AZUFRE		MOSTAZAS NITROGENADAS	
Sustancia química	Número del CAS	Sustancia química	Número del CAS
Clorometilsulfuro de 2-cloroetilo	(2625-76-5)	HN1: Bis(2-cloroetil)etilamina	(538-07-8)
Sulfuro de bis (2-cloroetilo) (Gas mostaza)	(505-60-2)	HN2: Bis(2-cloroetil)metilamina	(51-75-2)
Bis(2-cloroetiltio)metano	(63869-13-6)	HN3: Tris(2-cloroetil)amina	(555-77-1)
1,2-bis(2-cloroetiltio)etano (Sesquimostaza)	(3563-36-8)		
1,3-bis(2-cloroetiltio)-n-propano	(63905-10-2)		
1,4-bis(2-cloroetiltio)-n-butano	(142868-93-7)		
1,5,-bis(2-cloroetiltio)-n-pentano	(142868-94-8)		
Bis(2-cloroetiltiometil)éter	(63918-90-1)		
Bis(2-cloroetiltioetil)éter (Mostaza O)	(63918-89-8)		

Tabla 3. Registro CAS de las mostazas sometidas a control (tabla de la autora).

### *Mecanismo de acción*

Es importante recalcar que los gases mostaza a pesar de otorgárseles la denominación de “gas” a temperatura ambiente se encuentran en estado líquido. Las hipótesis de estudio se basan en la experiencia de los diferentes conflictos bélicos en los que se utilizó el gas mostaza como arma química a lo largo de la historia (sobre todo en la Primera Guerra Mundial y en Iraq-Irán), por lo que todavía falta información sobre los mecanismos de acción específicos, aunque su principal efecto descrito hasta ahora en la bibliografía es la alquilación de distintas moléculas que regulan el funcionamiento celular. Algunos autores han realizado experimentos controlados en laboratorio, especialmente en ratones, dejando patente la importancia que supone el tiempo de exposición al tóxico (Greenberg et al., 2006).

Los radicales libres son inestables y altamente reactivos al contar en su estructura química con uno o más electrones que no están apareados en su orbital más externo, disponiendo de una vida media muy corta y actuando cerca del lugar donde se forman. Se estabilizan al adquirir electrones procedentes de ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos u otra molécula próxima, causando una cascada de reacciones que da lugar a daño celular y diversas patologías. Se liberan durante los procesos del metabolismo humano o pueden adquirirse por múltiples medios como por ejemplo por exposición a contaminantes ambientales (atmosféricos, acuáticos, del suelo), radiaciones, hábitos tóxicos (alcoholismo, tabaquismo, drogas, exposición a fertilizantes o pesticidas), incluso por situaciones de intenso estrés físico o psíquico. Los dos principales son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS). A mayor producción de ROS se genera mayor producción de radicales libres (Tahmasbpour Marzony et al., 2016) ocasionando un aumento de la peroxidación de los lípidos que alteran la permeabilidad de la membrana celular (Naghii, 2002) y causan estrés oxidativo (Jafari, 2007, Laskin et al., 2010).

El estrés oxidativo se asocia a nivel celular donde se ve alterado el equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies oxidativas y los mecanismos antioxidantes de los que dispone la célula. Las principales especies reactivas de oxígeno que se encuentran en el organismo son el anión superóxido ( $O_2^-$ , una molécula de oxígeno que en lugar de encontrarse en estado de oxidación -2 se encuentra a -1), el radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ , grupo funcional sin carga formado por un átomo de oxígeno y otro de hidrógeno con un electrón sin compartir), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno

singlete ( $^1\text{O}_2$ , una molécula de oxígeno en estado excitado), radicales alcoxi ( $\text{RO}^\bullet$ , grupo funcional formado por un grupo alquilo unido a un átomo de oxígeno) y radicales peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ , estado de oxidación -1) (Jabeen et al., 2018). Los radicales libres pueden clasificarse en 3 categorías: inorgánicos o primarios ( $\text{O}_2^\bullet$  y  $\text{OH}^\bullet$ , se originan al transferir un electrón sobre el átomo de oxígeno), orgánicos o secundarios (el electrón se transmite de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica como carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre, pudiendo también formarse por la reacción de dos radicales primarios entre sí) y en tercer lugar los intermediarios estables relacionados con los radicales libres de oxígeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{HClO}$ ) (Naya et al., 1997).

Diversos investigadores han estudiado la respuesta al estrés oxidativo. En modelos con una línea celular de queratinocitos HaCaT resistentes a mostaza sulfurada (expuestos a  $7,2 \mu\text{M}$  de mostaza sulfurada semanalmente) se ha observado mayor resistencia al peróxido de hidrógeno y mayor contenido en niveles intracelulares de glutatión, lo que permite a esta línea celular una mejor adaptación al estrés oxidativo (Rothmiller et al., 2018a). De hecho, esta misma línea celular ha mostrado diferencias en la expresión del miARN (micro ARN, capaz de regular la expresión de otros genes) lo que podría explicar su resistencia a la mostaza sulfurada (Rothmiller et al., 2018b). Algunos autores han estudiado el efecto beneficioso de la melatonina por su efecto antioxidante para prevenir la toxicidad de los agentes químicos de guerra como las mostazas (Pita et al., 2014). La melatonina es un excelente antioxidante que gracias a su pequeño tamaño y comportamiento anfipático (molécula con un extremo hidrofílico y otro hidrófobo) puede penetrar en todos los compartimentos subcelulares manteniendo la fluidez de las membranas biológicas (García et al., 2014). El efecto antiinflamatorio de la melatonina y sus metabolitos juega un papel importante en el pronóstico de los pacientes, ya que disminuye la toxicidad renal, la inflamación pulmonar y en general el estrés oxidativo de todo el organismo (Pita et al., 2013).

Las mostazas provocan necrosis, apoptosis e inflamación. La comparación de la toxicidad de la mostaza nitrogenada frente a la sulfurada se ha realizado en ratones mediante la administración percutánea del tóxico (Sharma et al., 2008). En estos experimentos se observó que la mostaza nitrogenada producía antes la pérdida de peso corporal respecto a la sulfurada. Ambas mostazas producían un aumento de algunas enzimas plasmáticas (ALT, AST, fosfatasa alcalina), indicando daño a nivel hepático. La mostaza nitrogenada también producía antes la fragmentación del ADN. Sin embargo, la

mostaza sulfurada, a pesar de mostrar sus efectos más tarde, resultaba más tóxica y con una progresión más desfavorable.

El aumento de temperatura y humedad favorecen la reacción de ciclación intramolecular de los iones de sulfonio (mostaza de azufre) y de los iones de imonio (mostaza nitrogenada), por lo que las zonas del cuerpo más húmedas presentan mayor susceptibilidad (tracto respiratorio, ojos y pliegues cutáneos como axila o ingle). Dichos iones son potentes alquilantes del ADN y ARN (Beigi Harchegani et al., 2018, Inturi et al., 2014), de modo que las células con mayor velocidad de división se afectarán en mayor medida (Kehe et al., 2008). La iperita tiene una especial afinidad por la N-7 guanina (Gruppi et al., 2015, Kehe et al., 2013). En estudios donde se exponían células madre a mostaza sulfurada se ha observado que había un aumento en la formación de aductos de ADN (segmentos), disminución de la capacidad de proliferación y aumento de la transición hacia la fase de senescencia (Schmidt et al., 2018a).

El aumento de radicales libres parece asociar un acortamiento de los telómeros, produciendo envejecimiento celular prematuro (Behravan et al., 2018). También pueden alquilar proteínas (Panahi et al., 2018), fosfolípidos y su capacidad para alquilar enzimas con grupos sulfidrílo deriva en un aumento del calcio intracelular y apoptosis (Balali-Mood et al., 2008).

La disminución y alteración del patrón de las selectinas L, P y E (receptores de adhesión que forman parte de las glucoproteínas integrales de la membrana) produce una alteración en la expresión de las citoquinas, alterando la inmuno regulación (Yaraee et al., 2009b). El aumento inicial en la producción de citoquinas induce también lesiones tisulares, aunque a largo plazo el efecto parece ser inverso disminuyéndose su producción. Un estudio realizado en 2009 comparó a 368 sujetos que fueron expuestos a gas mostaza 20 años antes frente a 126 sujetos no expuestos como grupo control para determinar los niveles séricos de citoquinas pro inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , il-1Ra, TNF) mediante la técnica ELISA (Yaraee et al., 2009a). Se comprobó que los sujetos expuestos mostraban niveles más bajos, principalmente de IL-1 y TNF, lo que podría justificar las complicaciones a largo plazo, pudiendo ser clave en el manejo terapéutico de este paciente crónico. Algunos estudios han evidenciado que las mostazas aumentan la apoptosis alterando la vía mitocondrial (Steinritz et al., 2014) y por una mayor actividad de las caspasas (Simbulan-Rosenthal et al., 2006).

## *Clínica*

En sujetos expuestos a gases mostaza se ha observado que el período de latencia oscila entre 2 y 48 horas, aunque existe una clara correlación entre la aparición de los síntomas con la concentración y tiempo de exposición al agente. Lo más llamativo a nivel clínico es la aparición de ampollas a nivel cutáneo, edema pulmonar por inhalación, asfixia mecánica por necrosis tisular con obstrucción de la vía aérea y efectos radiomiméticos que afectan especialmente a la médula ósea.

### **a. Tracto respiratorio**

Al parecer la toxicidad de las mostazas a nivel pulmonar, tanto en fase aguda como a largo plazo, se debe en gran medida a la liberación de macrófagos y mediadores de la inflamación (Malaviya et al., 2016). Inicialmente aparecen lesiones en la mucosa, desde la nasal hasta los bronquiolos terminales, cursando con rinorrea, ronquera y tos productiva. Posteriormente se han descrito casos de faringitis, laringitis, bronquitis crónica y fibrosis pulmonar (Khazdair et al., 2015). La formación de pseudomembranas puede producir obstrucción de la vía aérea. En casos de grave exposición puede desarrollarse edema pulmonar no cardiogénico (Hefazi et al., 2005).

### **b. Ojos**

A nivel ocular la depleción de glutatión que causan las mostazas tiene especial importancia en los mecanismos de lesión a nivel oftalmológico (Panahi et al., 2017). La aparición de irritación ocular progresa rápidamente hacia visión borrosa con disminución de la agudeza visual, sequedad ocular, conjuntivitis y queratitis, asociando fotofobia, blefaroespasma, sensación de cuerpo extraño en el ojo, lagrimeo e intenso dolor (Ghasemi et al., 2013). Muchos de estos síntomas se deben a la neo vascularización que producen las mostazas a nivel ocular. Posteriormente aparecen abrasiones, úlceras y perforaciones corneales. La patología de córnea a veces evoluciona hacia opacidad, requiriendo su trasplante. En pocos casos se ha descrito pérdida de visión permanente, principalmente por contacto directo de mostazas en estado líquido. La capacidad de las mostazas para inhibir la acetilcolinesterasa puede causar miosis y dificulta el diagnóstico diferencial con agentes neurotóxicos.

### c. **Dermis**

Las mostazas en estado líquido se absorben a través de la piel un 10-20% debido a su naturaleza lipofílica, volatilizándose el resto de la sustancia (Batal et al., 2014). En estudios con queratinocitos *in vitro* y bioingeniería de tejidos, se ha observado que en las primeras 6 horas se mantiene la estructura de la membrana celular, siendo a partir de las 24 horas de la exposición cuando aparece la separación dermis-epidermis con formación de micro vesículas, seguido por pérdida focal de la inmuno reactividad en la membrana basal, aumento agudo del infiltrado inflamatorio, alteraciones en la integridad estructural de la membrana basal y apoptosis (Greenberg et al., 2006).

En pacientes, el primer síntoma que refieren los pacientes es prurito con eritema en zonas expuestas (Kehe et al., 2009) y descamación. En la periferia de la lesión puede aparecer un halo de pequeñas ampollas (“collar de perlas”) que al confluir dan lugar a ampollas subepidérmicas de mayor tamaño que marca el inicio de la fase bullosa y posterior necrosis. El contenido líquido de las ampollas es estéril (sin agente activo). Al enlentecerse la velocidad de división de las células se dificulta la reepitelización, completándose a los 10-15 días con escasas cicatrices (Shakarjian et al., 2010). Suele persistir hiperpigmentación residual con exfoliación (principalmente en pliegues cutáneos) o incluso regiones hipocrómicas debido a la destrucción de melanocitos, xerosis, angiomas, atrofia, cicatrices hipertróficas y aumento de la sensibilidad. Se ha observado que los niños tienen más susceptibilidad para desarrollar patología cutánea y su progresión es más rápida que en adultos. Además, los pacientes que presentaban una pigmentación exfoliante solían asociar daño pulmonar severo. Los experimentos *in vivo* realizados por Goswami en ratones sin pelo SKH-1 demostraron que la exposición tópica de mostaza nitrogenada (3.2 mg) causa alteraciones cutáneas, pérdida de peso y mortalidad del 40-80%, lo que sugiere daños a nivel sistémico igual que la mostaza sulfurada. (Goswami et al., 2015)

### d. **Médula ósea**

Al afectar con mayor intensidad a las células proliferantes, en los 3 primeros días se produce leucocitosis y tras 7-10 días leucocitopenia o incluso anemia aplásica grave, esta última signo de mal pronóstico (Mahmoudi et al., 2005). A pesar de producirse una disminución de todas las líneas celulares, los granulocitos y megacariocitos son los más sensibles (McManus and Huebner, 2005).



**e. Sistema inmunológico**

Frecuentemente se produce una disminución de los niveles de IgG e IgM en las primeras semanas hasta los 6 meses de la exposición. La mostaza nitrogenada puede también aumentar el grado de inflamación, iniciando una respuesta inmune exagerada en el paciente (Au et al., 2015). El daño parece afectar principalmente a los linfocitos Natural killers, persistiendo el daño hasta 16-20 años después.

**f. Tracto gastrointestinal**

Frecuentemente aparecen náuseas, vómitos y diarrea con importante deshidratación y pérdida de electrolitos. La vía de entrada puede ser por inhalación, ingestión o absorción cutánea. Algunos autores describen gastroduodenitis con erosiones hemorrágicas, enteritis aguda descamativa y colitis necrosante hemorrágica en veteranos de la Primera Guerra Mundial (Balali-Mood et al., 2008).

**g. Sistema nervioso central**

Las convulsiones aparecen por inhalación a altas concentraciones. Posteriormente presentan postración y apatía por depresión del SNC. En exposiciones leves los pacientes desarrollaban cefalea, ansiedad, miedo, confusión y letargia.

**h. Bazo, hígado y riñón**

Los estudios realizados en ratones expuestos a mostaza nitrogenada y sulfurada han mostrado una disminución progresiva del peso corporal y alteraciones histopatológicas que incluyen degeneración granulovascular con aglutinación perinuclear tanto en el citoplasma de los hepatocitos como en las células del parénquima renal (Sharma et al., 2010). El daño se producía principalmente en riñón (congestión, hemorragia) e hígado. Otros autores como Goswami han trabajado con ratones expuestos únicamente a mostaza nitrogenada. En sangre observaron una disminución del número de leucocitos circulantes (linfocitos y monocitos), por lo que procedieron a analizar la histología esplénica, evidenciando una disminución progresiva tanto de la pulpa blanca como de la roja tras 24 horas de exposición. De ello deducen que la exposición a mostazas provoca disminución en el tamaño y peso del bazo (Goswami et al., 2015).

### **i. Efectos a largo plazo**

Diversos artículos han descrito la clínica desarrollada a lo largo de los años por los afectados de diferentes conflictos bélicos (Balali-Mood et al., 2005, Zafarghandi et al., 2013). Tras 2 años de exposición suele haber lesiones principalmente en aparato respiratorio (78%), persistiendo disnea, asma, bronquitis crónica, bronquiectasias, estenosis de la vía aérea, fibrosis pulmonar (Malaviya et al., 2020) y en menor proporción en SNC, dermis y ojos (Fakhreddin Taghaddosinejad, 2011). A los 10-20 años aparecen lesiones en tracto respiratorio (42,5%), ojos (39,3%) y piel (24,5%) (Khateri et al., 2003). Algunos autores niegan que la exposición a gas mostaza aumente la incidencia de cáncer de pulmón (Doi et al., 2011), aunque otros autores como Khateri afirman que sí aumenta la incidencia de infecciones pulmonares, tuberculosis y cáncer de pulmón.

Los cambios en la dermis, como la aparición de dermatitis atópica, tienen un gran impacto en la calidad de vida del paciente (Ghabili et al., 2010). A largo plazo la cicatrización es disfuncional ya que se altera la regeneración del tejido. Se cree que la causa está relacionada con una disminución en la migración de células madre mesenquimales por haberse alterado durante la exposición a mostazas, la celularidad de la médula ósea (Schreier et al., 2018). Estos investigadores proponen investigar en el futuro el uso de citoquinas (principalmente IL-8 e IL-6) para aumentar la migración de células madre mesenquimales para la mejora de la regeneración tisular en pacientes expuestos a mostazas.

Para observar su efecto en el aparato reproductor se han realizado estudios en ratones a los que se les administraba una inyección intravenosa de mostaza sulfurada, pero no se documentaron efectos adversos en la fertilidad (Ghanei et al., 2004). Tampoco se han observado variaciones significativas en el espermiograma de veteranos iraníes expuestos a mostazas, ni variaciones en sus niveles hormonales (Balali-Mood et al., 2008).

*Tratamiento tras la exposición a mostazas*

En la actualidad no hay ningún antídoto específico para tratar los efectos del gas mostaza (Jain et al., 2015). El antídoto disponible (dimercaprol o BAL, *Bitish Anti-Lewisite*) está dirigido a las lewisitas, otro agente vesicante (Rodríguez Fernández, 2018). Ya desde 1989 el tratamiento es únicamente sintomático según las diversas manifestaciones clínicas (Lacotte et al., 1989). La recuperación de los pacientes puede durar meses por lo que las estancias hospitalarias son prolongadas, presentándose complicaciones a largo plazo a nivel dermatológico, pulmonar y oftalmológico (Graham and Schoneboom, 2013).

La importancia del manejo clínico radica en la rápida contención del agente, prevenir exposición secundaria del personal que asiste al paciente, realizar una descontaminación rápida, implementar sistemas sanitarios de apoyo con soporte vital avanzado y el uso de antídotos específicos (Bogucki and Weir, 2002). El Regimiento de Defensa NBQ “Valencia” número 1 del Ejército de Tierra de España recalca la importancia de la “media hora de oro”, priorizando una adecuada evacuación y descontaminación de los afectados (Pita et al., 2007, Balali-Mood et al., 2016). Ha de tenerse en cuenta que el equipo sanitario debe estar preparado para recibir una gran cantidad de bajas simultáneas.

Se ha comprobado que la forma más efectiva para la descontaminación es la aplicación de un material absorbente como la tierra de Fuller o tierra de batán (Chilcott et al., 2001), arcillas muy absorbentes que en el pasado también se utilizaban para las intoxicaciones con herbicidas (Amigo and Nogue, 2014). A continuación, habrá que lavar con abundante agua con jabón neutro o una solución de hipoclorito sódico al 0,5%.

Etemad recomienda la infusión de tiosulfato de sodio (100-500 mg/kg/min) en los primeros 60 minutos tras la exposición a mostazas (Etemad et al., 2019). Para proteger la vía aérea se recomienda la administración de oxígeno humidificado pudiendo añadirse broncodilatadores, mucolíticos y, en caso de precisarse, ventilación mecánica.

Para disminuir la inflamación se han estudiado diferentes glucocorticoides y antiinflamatorios no esteroideos para comprobar cuál era más efectivo para este tóxico. Un estudio realizado con queratinocitos HaCaT y células inmuno competentes THP-1 expuestas a mostaza sulfurada (100, 200 y 300  $\mu$ M) evidenció que la dexametasona protegía ligeramente a las células disminuyendo la apoptosis. En cambio, el ibuprofeno

amplificaba intensamente tanto apoptosis como necrosis, por lo que se desaconseja su uso. El diclofenaco reducía de forma significativa la necrosis, apoptosis e inflamación, siendo el fármaco que mejores resultados obtuvo en este estudio (Menacher et al., 2018).

Se recomienda un lavado inmediato de los ojos con agua o suero fisiológico incluso en pacientes asintomáticos tras la exposición a mostaza y aplicar una fina película de vaselina en los párpados, pudiendo aplicarse también antibiótico tópico (colirio de sulfacetamida), glucocorticoide, lágrimas artificiales y evitar analgésicos tópicos (Yoram Solberg, 1997). Algunos autores han estudiado la administración tópica de diversos fármacos en modelos *ex vivo* (cultivos de tejido corneal de conejo), evidenciando que la aplicación de dexametasona, doxiciclina y silibinina (flavonoide pleiotrópico) revertía de forma significativa el daño corneal si se realizaba un lavado y tratamiento tras 2 horas de la exposición a mostazas porque disminuye la degradación epitelial, separación epitelio-estroma, apoptosis celular, además de disminuir estimulación del factor de crecimiento endotelial vascular. Cuando las sustancias se administraban tras 4 horas de la exposición, los daños ya no se revertían (Goswami et al., 2018).

El eritema deberá tratarse del mismo modo que cualquier exposición solar, administrando antiinflamatorios o incluso lociones con corticoesteroides (Longo et al., 2013) y antipruriginosos. Las lesiones cutáneas de mayor gravedad se tratarán como quemaduras, dando especial importancia a la analgesia. Las vesículas de 1-2 cm no deben manipularse y en las de mayor tamaño se deberá quitar sólo la capa superior (en algunos casos puede drenarse el contenido líquido de la vesícula, que es una solución hística estéril no tóxica). Todas las zonas expuestas requieren lavados con suero fisiológico o soluciones jabonosas cuatro veces al día, dejándolas cubiertas por antibiótico tópico y sulfadiazina argéntica o acetato de mafenida. Posteriormente debido a las alteraciones que producen las mostazas en la cicatrización pueden requerirse trasplantes autólogos de piel (el donante es el propio paciente) o tratamientos con láser. En un caso publicado en 2018 sobre un técnico de laboratorio que sufrió una fuga de mostaza sulfurada (producto intermedio en la fabricación de un nuevo tipo de plástico) sobre la bata y la camisa, los injertos de piel procedentes del muslo (tejido sano) implantados en abdomen mostraron muy buenos resultados (Schmidt et al., 2018b). Tewari-Singh realizó experimentos *in vivo* con ratones macho exponiéndolos a MS 1,4 mg/kg, aplicando un tratamiento subcutáneo de AEOL 10150 (5 mg/kg cada 4 horas) desde la primera hora post exposición a la mostaza. Tras 6-48 horas eutanasiaban a los animales para analizar el efecto del

antioxidante y demostraron eficacia contra los efectos cutáneos (Tewari-Singh et al., 2014).

La aparición de fiebre, leucocitosis, disnea y tos productiva en las primeras 12-24 horas indica neumonitis química. No debe iniciarse la antibioterapia hasta obtener los resultados de la tinción de Gram del esputo que confirmen la presencia de infección.

Para náuseas o vómitos pueden pautarse antieméticos. En caso de broncoespasmo administrar broncodilatadores y glucocorticoides (Seyed M. Razavi, 2013). Habrá que tener en cuenta que puede aparecer leucopenia por supresión de la médula ósea.

Para un óptimo tratamiento del gas mostaza hay que continuar investigando sobre posibles antídotos (Kehe and Szinicz, 2005) que por ahora se centran en el uso de barredores con actividad nucleofílica, barredores que oxiden la iperita, inhibidores de polimerasas o moduladores del calcio (Pita and Vidal-Asensi, 2010). Otros investigadores han estudiado el uso de la silibinina, una flavanona que se extrae de una planta natural, para revertir el proceso de alquilación que produce la mostaza sulfurada y disminuir principalmente su acción vesicante (Jain et al., 2015). Weinberger usa corticoesteroides y N-acetil cisteína para combatir el daño causado por las células inflamatorias y sus mediadores (citoquinas) (Weinberger et al., 2016).

La administración de omeprazol en sujetos expuestos a mostazas podría disminuir sus efectos citotóxicos ya que dicho fármaco produce una inducción de las proteínas CYP450 (Tsoutsouloupoulos et al., 2020). Estas enzimas catalizan la biotransformación de la mostaza sulfurada en sus productos oxidados. En ese mismo estudio el tratamiento con cimetidina provocó un aumento de la toxicidad de la mostaza.

Actualmente se están estudiando posibles tratamientos: niacinamida, antagonistas de la calmodulina, clobetasol, para patología dérmica doxiciclina, en patología oftalmológica bevacizumab o colchicina, en estudios animales se han utilizado la aproitina, vitaminas E y D, etc., aunque ninguno se ha probado todavía clínicamente (Etemad et al., 2019).

La inyección de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea en ratones ha mostrado efectos reparadores de la toxicidad, aliviando la inflamación y promoviendo la regeneración tisular. A nivel pulmonar se observó una disminución del edema y del infiltrado inflamatorio de los alvéolos. (Feng et al., 2019).

### *Aplicaciones terapéuticas de las mostazas*

En la actualidad el gas mostaza se está utilizando como antineoplásico. Algunos híbridos de mostaza nitrogenada con evodiamina se han utilizado por sus propiedades antiproliferativas con alta selectividad para células tumorales, produciendo apoptosis en células HL-60 y deteniendo la fase G2 a nivel mitocondrial (Hu et al., 2017). Se han diseñado 13 derivados de quinazolininas de mostaza nitrogenada por su actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo*. El compuesto 22 b se ha observado que inhibe el ciclo celular en fase S y G2/M e induce apoptosis celular. En el modelo *xenograft* (implante de tejido de una especie a otra) de HepG2, el compuesto 22 b mostraba una inhibición significativa del crecimiento del cáncer con baja toxicidad del huésped *in vivo* (Li et al., 2013).

La síntesis de derivados de mostaza nitrogenada asociados a ácido fenilacético y ácido benzoico que han demostrado en células *in vitro* inhibición del crecimiento tumoral del cáncer de ovario (Acharya and Bansal, 2017).

La síntesis de hidroxiantraquinonas (compuestos orgánicos aromáticos derivados del antraceno) colocadas en la posición 1' de los alquilantes derivados de la mostaza nitrogenada permite utilizarlas como agentes anticancerígenos, especialmente en cáncer de mama, por su acción inhibitoria del crecimiento de células tumorales MCF-7 (Zhao et al., 2015).

Para otros modelos *xenograft* se han sintetizado compuestos que combinan derivados de la mostaza con sales de amonafide para inhibir la Topoisomerasa II, que en el melanoma metastático humano han demostrado disminuir el tamaño del tumor, permitir que se mantenga el peso corporal y aumentar la supervivencia del paciente (Gilad et al., 2017).

El efecto que producen algunos derivados de mostaza nitrogenada en células T malignas de linfomas cutáneos y otras patologías inmunológicas ha demostrado que puede ser de utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin y algunos tumores cerebrales (Sharma et al., 2010).

Los derivados de las sulfonil ciclo ureas se han utilizado *in vitro* por su acción antitumor contra cuatro líneas celulares cancerígenas (A431, Jurkat U266, K562). Se ha

comparado la cito toxicidad de los nuevos derivados con el clorambucil (Cheloufi et al., 2016).

La ciclofosfamida es un quimioterápico muy utilizado que produce catabolitos de mostaza tóxicos. El ácido gallico se ha estudiado por su neurotoxicidad en ratas. Se ha comprobado que el uso del ácido gallico como adyuvante combinado con agentes quimioterápicos mejora los resultados con pocos o ningún efecto secundario (Oyagbemi et al., 2016).

Se han estudiado las propiedades del azobenceno *scaffold* (proteínas que permiten regular las vías de señalización celular), ya que actúa desactivando la estimulación de la vía mitocondrial que induce la mostaza nitrogenada por sistemas teragnósticos (moléculas unidas a isótopos radiactivos para el diagnóstico y tratamiento de patologías) para el transporte de fármacos (Verwilt et al., 2017).

En general los metabolitos de las mostazas se han usado como alquilantes del ADN para tratar linfomas, cáncer de mama, cáncer de próstata, algún tumor cerebral y enfermedades autoinmunes (Groehler et al., 2016) aunque todavía se encuentran en fase de investigación.

**QUERCETINA:**

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxilflavona) es un flavonoide típico (tabla 4) que se encuentra en altas concentraciones como metabolito secundario en frutas y verduras. Es el flavonoide más abundante y habitual en la dieta humana, encontrándose en mayor medida en la cebolla (especialmente en la variedad roja). También se puede obtener de la manzana, pimiento, ajo, té, cítricos, tomate, brócoli, espinaca, col, cerezas negras, frambuesas, moras, arándanos, té negro, té verde, alcaparras, algunas variedades de miel (de eucalipto, aceite de árbol de té), frutos secos... Incluso se puede encontrar quercetina en algunos alimentos manufacturados como pueden ser el vino tinto y el aceite de oliva.

Flavonoides	Compuestos	Fuente alimentaria
<i>Antocianidinas</i>	Cianidina, Delfinidina, Malvidina, Pelargonidina, Peonidina, Petunidina	Bayas rojas, azules y moradas, uvas rojas y moradas, manzana roja y vino tinto.
<i>Flavanoles</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Monómeros (Catequinas):</i> Catequina, Epicatequina, Epigallocatequina, Epicatequingalato, Epigallocatequingalato.</li> <li>• <i>Dímeros y polímeros:</i> Teaflavinas, Tearubiginas, Proantocianidinas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Catequinas:</i> té verde, cacao, uvas, bayas, manzanas.</li> <li>• <i>Teaflavinas y Tearubiginas:</i> té negro y oolong.</li> <li>• <i>Proantocianidinas:</i> cacao, manzanas, bayas, uvas rojas y vino tinto.</li> </ul>
<i>Flavanonas</i>	Hesperetina, Naringenina, Eriodictiol.	Cítricos (naranja, pomelo, limón, kumquat).
<i>Flavonoles</i>	<b>Quercetina</b> , Quempferol, Miricetina, Isoramnetina.	Cebolla amarilla, cebollino, col rizada, brócoli, manzana, bayas y té.
<i>Flavonas</i>	Apigenina, Luteolina	Perejil, tomillo, apio, ajo, orégano.
<i>Isoflavonas</i>	Daidzeína, Genisteína, Gliciteína.	Soja, leguminosas.

Tabla 4. Clases de flavonoides, compuestos de los mismos y procedencia (tabla de la autora).

La quercetina se cataloga como flavona dentro de las seis clases de compuestos flavonoides (figura 2) (Kelly, 2011). Los compuestos fenólicos comparten un grupo fenol



como estructura común al que se asocian diversos núcleos aromáticos y sustituyentes, predominando los grupos hidroxilo que le confieren una excelente capacidad antioxidante al poder donar electrones.

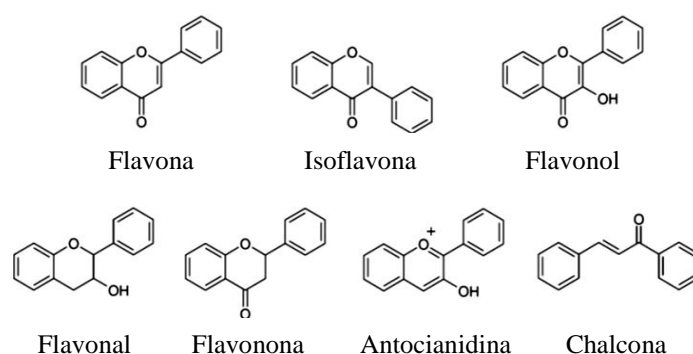


Figura 2. Estructura química de los flavonoides.

En las poblaciones occidentales se estima que la ingesta diaria de flavonas se encuentra en el rango de unos 20-50 mg/día. Estas cantidades podrían incrementarse hasta 200-500 mg/día en personas que consumen grandes cantidades de frutas y vegetales (Harwood et al., 2007). En caso de ingerirse como suplemento dietético se pueden tomar dosis diarias entre 200-1200 mg (D'Andrea, 2015). La mayor parte de la ingesta dietética es en forma de glicósidos de flavonas de la quercetina, kaempferol y miricetina en lugar de sus formas agliconadas. De éstas, alrededor de unos 13,82 mg/día es en forma de quercetina (Cao et al., 2010). Hay más de 5000 variedades de flavonoides identificados en forma de flavonas, flavonoles, antocianinas, flavanoles, flavanonas e isoflavonas, aunque la quercetina es el más ingerido (>65% de todos los flavonoides consumidos).

Flavonoles naturales	Agliconas
Astragalina	Kaempferol
Azaleína	Azaleatina
Hiperósido	Quercetina
Isoquercetina	Quercetina
Kaempferitrina	Kaempferol
Miricitrina	Miricetina
Quercitrina	Quercetina
Robinina	Kaempferol
Rutina	Quercetina
Espiraeosida	Quercetina
Amurensina	Kaempferol
Icariína	Kaempferida
Troxe Rutina	Quercetina

Tabla 5. Flavonoles naturales y ejemplos de sus agliconas.

*Características generales*

La quercetina (figura 3) se encuentra como glucósido en las plantas y presenta una coloración amarillo-verdosa. Su absorción se produce principalmente en intestino delgado en forma de aglicona (Hollman and Katan, 1999). Sin embargo en modelos con ratones algunos autores han cuantificado la absorción de quercetina por vía oral en un 60% (Chen et al., 2005). La absorción de quercetina se ve favorecida en combinación con alimentos de alto contenido graso. Al combinarse con vitamina C también se potencia su absorción. Los compuestos solubles son metabolizados en el tracto gastrointestinal. Tras su absorción en intestino delgado se unen a proteínas, principalmente albúmina, para su distribución por todo el organismo. La naturaleza lipofílica de la molécula le permite atravesar la membrana celular y también la nuclear. Sin embargo, la presencia de grupos hidroxilo le confiere cierta solubilidad que mejora cuando se emplean solventes orgánicos. Algunos autores están estudiando el uso de emulsiones ricas en ácidos grasos de cadena media (por ejemplo, los presentes en la leche de cabra o el aceite de coco) para obtener una formulación de quercetina que permita su aplicación tópica (Vélez Gómez, 2018).

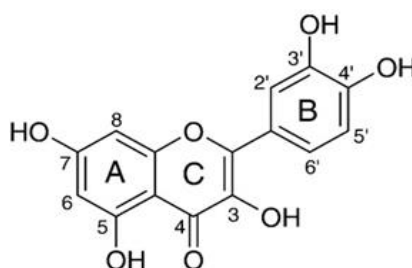


Figura 3. Estructura química de la quercetina.

Su principal acción es antioxidante, de hecho la quercetina es el flavonoide más efectivo para neutralizar los radicales libres, de hecho, 5 veces más potente como antioxidante que las vitaminas C y E. Su función antioxidante muestra efectos sinérgicos con la vitamina C, ya que el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, por lo que permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo (Martínez-Flórez et al., 2002). Bors describió la quercetina como un antioxidante muy efectivo y barredor de radicales libres debido a sus características estructurales, moleculares y conformacionales (Bors and Michel, 2002).

La producción de radicales libres es uno de los mecanismos inespecíficos propios de la inflamación que se activan para defender al organismo de cualquier agresión: física,

química, infección, proliferación tumoral, isquemia, etc. para normalizar el tejido lesionado. Los productos que se obtienen de este fenómeno son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Estos derivados tóxicos del oxígeno destruyen los microorganismos y pueden atacar también a parásitos, células tumorales e incluso afectar a células normales del propio organismo cuando se generan en gran cantidad. A nivel celular las especies reactivas de oxígeno (ROS) actúan atacando a los ácidos grasos y proteínas de las membranas celulares, causando peroxidación lipídica y alterando la permeabilidad de la membrana (Pereboom et al., 1999).

Los principales antioxidantes que existen en el medio interno de los organismos aerobios permiten neutralizar estos efectos deletéreos sobre los tejidos. Su función consiste en interactuar lo más rápido posible con los radicales libres, sacrificando su propia integridad molecular para evitar que se modifiquen otras moléculas funcionalmente imprescindibles (Reiter, 1995). Pueden actuar a nivel intracelular, extracelular o en la membrana plasmática. Su origen puede ser endógeno (enzimáticos como la catalasa, superóxido dismutasa, glucosa fosfato deshidrogenasa o NADPH-asa; o no enzimáticos como el glutatión, el NADPH, las vitaminas C y E, los carotenos o la melatonina) o bien pueden tener origen exógeno (como el etanol, la N-acetilcisteína o el dimetilsulfóxido) (Paredes Salido and Roca Fernández, 2002).

La quercetina inhibe enzimas generadoras de ROS como la ciclooxigenasa (COX), xantina oxidasa (XO), lipooxigenasa (LOX) y NADPH oxidasa. Además es capaz de estimular enzimas con acción antioxidante como la catalasa (CAT, se encuentra en los peroxisomas y requiere hierro como cofactor), superóxido dismutasa (SOD, se localiza en el compartimento extracelular, en el citosol y en las mitocondrias) y glutatión peroxidasa (GSH-Px, se encuentra en el citosol y en las mitocondrias y requiere selenio como cofactor) (Hirano et al., 2001) cuyos mecanismos de acción se reflejan en las figuras 4, 5 y 6. Los neutrófilos activados presentan un aumento de la enzima mieloperoxidasa (MPO), superóxido dismutasa (SO) y metabolitos de oxígeno, por eso tienen importancia en la actividad antimicrobiana. La sobreproducción de ROS prolonga o aumenta la liberación de MPO y otras sustancias efectivas, pero también tóxicas, interviniendo en la apoptosis y en el proceso inflamatorio (Gilaberte et al., 1997). También inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y reduce la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Manjeet and Ghosh, 1999).

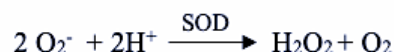


Figura 4. Acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD).



Figura 5. Acción de la enzima catalasa (Barabutis et al.) (Barabutis et al., 2017).

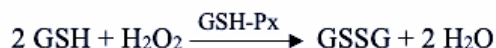


Figura 6. Acción de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Otros investigadores como Pecivova estudiaron el efecto de la quercetina en concentraciones de 0,1-100  $\mu\text{mol/L}$  después de estimular los neutrófilos con PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*). Los resultados obtenidos fueron un descenso en la producción de ROS y en la liberación de la enzima MPO en neutrófilos de sangre humana, en dependencia de la dosis utilizada. Solamente se observó en neutrófilos, ya que el resto de células sanguíneas no producen radicales libres. Estos estudios dan evidencias del efecto potencialmente beneficioso de la quercetina en la disminución del daño tisular e inflamación local por la inhibición de la disminución de la enzima MPO y del descenso en la producción de superóxido que deriva en ROS (radicales libres) (Pecivova et al., 2012).

Chwan-Fwu Lin describió que la quercetina a dosis de 30  $\mu\text{M}$  inhibe completamente la producción de anión superóxido y casi toda la liberación de elastasa, mientras que la rutina exhibe una menor inhibición. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentración que inhibe el 50% de las células) son de 3,8  $\mu\text{M}$  para la quercetina y 6,3  $\mu\text{M}$  para rutina (Lin et al., 2012).

Según Liu, el efecto inhibitorio de la quercetina en los estímulos que producen la generación de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en los neutrófilos humanos está conectada paralelamente con la supresión de la inducción por PMA debida a la fosforilación de los aminoácidos serina y threonina, así como la translocación de la proteína citosólica p47phox y p67phox de la membrana celular (Liu et al., 2005). Shakai-Kashiwabara publicó los efectos de la quercetina sobre la activación de los eosinófilos. En su estudio utiliza dos modelos experimentales: ratones BALB *in vivo* y cultivos de células peritoneales *in vitro* de esos

mismos ratones. En la primera parte de su estudio administró quercetina a los ratones BALB infectados con *Mesocetoides corti* para ver si podía reducir la eosinofilia y aumentar la cantidad de IgE en sangre. Los resultados son que la quercetina no es capaz de reducir tanto el número de eosinófilos en sangre periférica como los niveles de IgE E sanguíneos. Sin embargo, en cultivos de células peritoneales de ratones BALB, la quercetina es capaz de inhibir la activación de los eosinófilos mediada por SMC (*stem cell factor*). Esto plantea la posibilidad de que la quercetina pueda ser utilizada en procesos alérgicos como el asma, donde hay intervención de los eosinófilos (Sakai-Kashiwabara and Asano, 2013).

Boyle explicó que los flavonoides pueden regenerar otros antioxidantes donando el átomo de hidrógeno del radical y que por tanto el consumo de plantas fenólicas podría ir asociado al descenso del riesgo de enfermedades cardiovasculares debido a la estabilización y protección de las células endoteliales vasculares contra los daños oxidativos y pro inflamatorios (Boyle et al., 2000). Esta capacidad antioxidante es conferida por el alto número de sustituyentes hidroxilo en cada molécula de flavonoide, con un efecto directo en la actividad para donar átomos de hidrógeno y barrer radicales libres. La quercetina también interfiere en la señal pro inflamatoria de la trombina ocasionando una inhibición de la secreción del nucleótido adenosina que activa las plaquetas y disminuye la función de los neutrófilos (Kaneider et al., 2004).

Por tanto, la acción antiinflamatoria de la quercetina se debe a diversos factores: inhibición en macrófagos de la síntesis de TNF- $\alpha$ , (Manjeet and Ghosh, 1999), inhibición de la producción de IL8 por lipopolisacáridos en células pulmonares (Geraets et al., 2007), inhibición de los niveles de ARNm en células gliales por lipopolisacáridos y a través de IL- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  (Bureau et al., 2008), inhibición de la producción y expresión génica de TNF- $\alpha$  mediante la modulación del factor de transcripción NF-kB (Nair et al., 2002), inhibición de enzimas generadoras de ROS (COX y LOX) (Kim et al., 1998), disminución de la maduración y migración de los linfocitos T (Gardi et al., 2015), reducción de la secreción de histamina producida por basófilos y mastocitos (Middleton et al., 1981) e inhibición de células dendríticas.

La variabilidad entre individuos podría justificar el amplio rango de determinaciones publicadas tras la suplementación en voluntarios sanos. Dichas variaciones se pueden explicar por las diferencias de viabilidad de los glucósidos de quercetina presentes en las diferentes comidas y los polimorfismos de las enzimas

intestinales en humanos y en los diferentes modelos animales (Manach et al., 2005). Sin embargo, la biodisponibilidad de la quercetina no es buena porque se absorbe una baja cantidad de quercetina y en tracto digestivo los microorganismos intestinales degradan la mayor parte transformándola en productos inertes (Vicente-Vicente L. et al., 2013).

En vista del potencial uso de la molécula de quercetina, el estudio de su vida media y distribución en los diferentes tejidos podría proporcionar importante información. La vida media del metabolito es entre 11 y 28 horas, lo que sugiere la posibilidad de incrementar significativamente su concentración en plasma mediante una suplementación dietética (Boots et al., 2008). Otros autores han estimado la vida media de la quercetina en humanos entre 31 y 50 horas, con un pico de concentración en plasma a la media hora y otro a las 8 horas de la ingesta de 100 mg (Graefe et al., 2001).

### *Metabolismo*

Aunque el hígado es generalmente considerado el lugar central del metabolismo de la quercetina, la que se ingiere en la dieta también se puede metabolizar directamente en las células del epitelio intestinal (preferentemente en colon) antes de entrar en la circulación sanguínea, ya que se ha demostrado que en ratas Wistar machos la glucuronización de la quercetina se realiza en la mucosa gastrointestinal (Murota et al., 2004). Para dicho estudio los homogeneizados de mucosa de estómago, duodeno y yeyuno se incubaron con quercetina y ácido UDP (uridín-5'-difosfoglucurónico) y se observó que la actividad más alta de uridín-5'-difosfo-glucuronosiltransferasa (UDP-GT) era la quercetina conjugada con UDP de duodeno, seguido por la de yeyuno y estómago (aproximadamente 150, 70, y 60 pmoles de proteína / mg / minuto, respectivamente).

La conversión metabólica de quercetina también puede tener lugar en riñones y otros tejidos que contengan enzimas de conjugación. La excreción se realiza por vía urinaria fundamentalmente, aunque puede secretarse en menor medida a través de la bilis por intestino grueso en las heces (Harwood et al., 2007).

### *Toxicidad*

Aunque la quercetina sea una sustancia segura que se encuentra en numerosos alimentos, a determinados niveles puede provocar efectos tóxicos. A pesar de que en modelos *in vitro* cuando la quercetina se utilizaba en altas dosis se observó un aumento de la muerte celular, no ha habido correlación con modelos *in vivo*.

Ya en 1951, Sullivan y colaboradores establecieron que las dosis letales de quercetina para ratones albinos adultos de granja (sexo y tensión arterial no especificados) eran aproximadamente unos 160 mg de quercetina por kilo de peso. La quercetina disuelta en alcohol absoluto o suspendida en goma arábica o metocel (polímero de celulosa soluble en agua) se administró por vía subcutánea a los ratones y se estableció una LD<sub>50</sub> (Dosis Letal del 50%) de 100 mg/kg de peso. Cabe señalar que no se especificaron la pureza ni la fuente de quercetina de las pruebas. Posteriormente los estudios de toxicidad a largo plazo han demostrado que la quercetina se tolera a niveles de dosis que son varias veces mayores que las reflejadas por estos valores LD<sub>50</sub> (Sullivan et al., 1951).

En modelos experimentales con ratones, los síntomas de toxicidad observados después de la administración parenteral de quercetina consistían en movimientos muy atípicos, seguidos de respiración dificultosa y algunos animales morían a las 4 horas de la administración del tratamiento. También fueron tratadas con una dosis única subcutánea de quercetina un grupo adicional de 10 ratas Wistar, pero en el artículo no se especifica el nivel de dosis que resultó mortal para todas ellas y el examen anatómico patológico de varios tejidos inmediatamente después de la muerte tampoco mostró evidencias de lesiones inflamatorias significativas (Harwood et al., 2007).

Para evaluar la toxicidad de la quercetina a corto y largo plazo se llevaron a cabo pruebas de alimentación de ratas realizadas con el NTP (*National Toxicology Program* o Programa Nacional de Toxicología) de EE.UU. durante 2 años. En este estudio se administró quercetina en la dieta de las ratas a dosis de 0 (control), 30, 300 y 3.000 mg / kg de peso/ día durante un período de 28 días. En los resultados de este estudio no se documentaron variaciones de los parámetros toxicológicos estándar como el peso corporal, ingestión de alimentos y consumo de agua. Los análisis hematológicos sólo constataron pequeños descensos en los niveles de hemoglobina y hematocrito con cifras que no eran estadísticamente significativas, pero el resto de los parámetros bioquímicos en sangre fueron normales. Una vez finalizado el estudio se eutanasiaron los animales



para realizar los análisis anatómo patológicos. Se pesaron los órganos de los ratones, tanto machos como hembras, y no se observó variación alguna en peso ni consistencia, ni tampoco signos de inflamación en dichos órganos (Kelly, 2011). Los resultados de éste y otros estudios a corto y largo plazo sobre la toxicidad de la quercetina apoyan la seguridad de este flavonoide natural (Harwood et al., 2007).

En estudios más recientes los efectos tóxicos de la quercetina se han observado en dosis a partir de 40  $\mu\text{M}$  (Rafiq et al., 2015), o en el caso del uso de radiación UVB con protección mediante quercetina en dosis superiores a 20  $\mu\text{M}$  (Zhu et al., 2017). Casanova realizó la tesis doctoral en este departamento siguiendo la misma línea de investigación y su estudio *in vitro* sobre la protección de la quercetina en fibroblastos frente a radiación UV evidenció que reducía la mortalidad y aumentaba la vitalidad celular (Casanova A., 2015). Utilizando una concentración de quercetina 1  $\mu\text{M}$  conseguía una protección del 60% para radiación UVB y del 25% para UVC.

### *Muerte celular*

Según Srivastava la quercetina interviene en diferentes mecanismos: aumentando los niveles del gen p53 (proteína supresora de tumores localizada en el cromosoma 17), disminuyendo las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) y Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*), aumentando el gen pro apoptótico BAX (*Bcl-2 associated X*), aumentando algunas caspasas (3 y 9) y activando la vía intrínseca mitocondrial pro apoptótica del citocromo C con SMAC (*Second mitochondria-derived activator of caspases*) también llamado DIABLO (*Direct IAP-binding protein with low pI*) (Srivastava et al., 2016). Por tanto, según este autor la quercetina a altas dosis (10, 50, 100 y 250  $\mu$ M durante 48 horas, dosis que en otros artículos resultan tóxicas para las células) actúa como inductor de la apoptosis en líneas celulares patológicas (leucemia, cáncer de mama) y dos líneas celulares sanas, ya que modula las enzimas que intervienen en el proceso carcinogénico. En la bibliografía revisada no se han encontrado más estudios sobre la mortalidad inducida por la quercetina.

*Efectos biológicos en órganos y sistemas***a. Cerebro**

Los modelos animales de ratas sometidas a situaciones de depresión y alimentadas con dietas ricas en flavonoides confirman que la quercetina se acumula en el tejido cerebral como metabolito conjugado de la quercetina metilada (*isorhamnetin* y *tamarixetin*). Parece ser que están estructuralmente relacionados con aquellos flavonoides que actúan como antidepresivos y con la posibilidad de que la quercetina y sus metabolitos sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Esto podría sugerir que las hierbas medicinales con efectos antidepresivos deban sus propiedades a los flavonoides presentes en las mismas (Bandaruk et al., 2012).

El cerebro es muy susceptible al estrés oxidativo debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, elevado consumo de oxígeno y menor capacidad antioxidante. Por ello aumentando la capacidad antioxidante cerebral podríamos obtener protección contra la neuro degeneración, herramienta que resultaría muy útil en patologías que se agravan con el estrés oxidativo como son la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington (Hollman and Katan, 1999). Otros modelos con ratones han demostrado mejora del daño neuronal en la enfermedad de Alzheimer cuando a estos animales se les administraba quercetina, observando una disminución de los depósitos de  $\beta$ -amiloide (principal componente de las placas seniles en cerebro) y de proteína *tau* (estabilizan los microtúbulos axonales) (Sabogal-Guaqueta et al., 2015). También se observó mejoría en el área CA1 y subículo del hipocampo, en el córtex del área temporal y en la amígdala (Sriraksa et al., 2012).

Estudios más recientes sugieren que la quercetina puede actuar a nivel del SNC como ansiolítico, mejorando la función cognitiva y la velocidad de respuesta neuronal (Khan et al., 2019).

En modelos *in vitro* la quercetina ha demostrado ser útil en el manejo del ictus ya que en fase aguda mejora el flujo cerebral, previene la agregación plaquetaria y disminuye el estrés oxidativo. Posteriormente disminuye la inflamación en fase intermedia, manteniendo la integridad del endotelio. En fase crónica aumenta la apoptosis, disminuyendo el número de células muertas (Perez-Vizcaino and Duarte, 2010).

**b. Síndrome metabólico**

Su diagnóstico implica la asociación de 3 o más de los siguientes factores: obesidad ( $\text{IMC} \geq 30$ ), aumento de circunferencia abdominal (varón  $> 102$  cm, mujer  $> 88$  cm), hipertensión arterial ( $\text{TA} \geq 130 / 85$  mm Hg), dislipemia (HDL en varón  $< 40$  y mujer  $< 50$  mg/dL,  $\text{TG} \geq 150$  mg/dL) o intolerancia a la glucosa ( $\geq 110$  mg/dL en ayunas). Constituye un factor de riesgo para el desarrollo de patología cardiovascular y diabetes.

Existen estudios sobre la influencia del estrés oxidativo e inflamación en la progresión de la *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (Aharoni-Simon et al., 2016). Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno inducen apoptosis en las células  $\beta$ -pancreáticas (Wang et al., 2014). Puesto que la quercetina puede inhibir las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y glucosa-6-fosfatasa, la disminución de la apoptosis en células  $\beta$ -pancreáticas altera el metabolismo de los hidratos de carbono (Yao et al., 2019). En otros modelos con animales los suplementos dietéticos de quercetina mostraron disminución del nivel plasmático de colesterol total, aumento del colesterol HDL y mejora de la hiperglucemia en DM2 (Jeong et al., 2012).

Algunos estudios demuestran la posibilidad atenuar los riesgos del síndrome metabólico mediante el uso de la flavona quercetina que, aunque no es efectiva en la reducción del peso corporal, si es efectiva en la reducción de la circunferencia abdominal (Panchal et al., 2012) y también como protector frente a la obesidad (Ahn et al., 2008). Además la quercetina a dosis altas puede elevar los niveles plasmáticos de adiponectina, hormona que se produce en el tejido adiposo y disminuye la resistencia a la insulina (Dunaif, 1997).

Indra publicó que la quercetina puede actuar sobre la respuesta pro inflamatoria inducida por leptina (causante de disfunción endotelial en pacientes obesos). El estudio se realizó sobre células endoteliales del cordón umbilical. La administración de quercetina suprimía intensamente la fosforilación de ERK1/2 (quinasas reguladoras de señales extracelulares) y de NF- $\kappa$ B (complejo proteico de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas que controla la transcripción del ADN) y parcialmente la secreción de TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral), siendo todas las citoquinas pro inflamatorias mediadas por leptina. Esto hace pensar en el posible papel de la quercetina en la profilaxis de las enfermedades cardiovasculares (Indra et al., 2013).

### c. Aparato cardiovascular

Los flavonoides se estudian desde hace años en ensayos clínicos con humanos como tratamiento hipotensor natural. La quercetina juega un papel importante en esta posible vía terapéutica por su reducción del estrés oxidativo, su implicación en el eje renina-angiotensina-aldosterona y por mejorar la función vascular dependiente del endotelio (Larson et al., 2012). Algunos modelos experimentales con animales han demostrado que la quercetina aumenta la vasodilatación y por tanto disminuye los niveles de tensión arterial (Duarte et al., 2001).

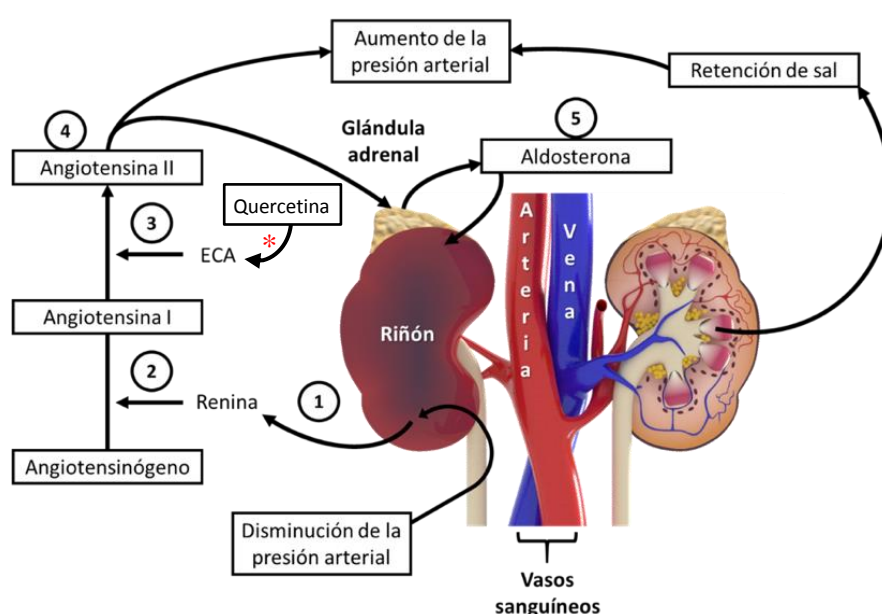


Figura 7. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (figura de la autora).

En la figura 7 podemos observar que en los pasos ① y ② la disminución de la presión arterial reduce la producción renal de renina. Paso ③: La enzima convertidora de angiotensina convierte la angiotensina I en angiotensina II. Paso ④: La angiotensina II produce vasoconstricción, aumentando la presión arterial. Paso ⑤: La angiotensina II libera aldosterona en la glándula adrenal que a nivel renal retiene sales y agua aumentando el volumen extracelular y la presión arterial.

La quercetina tiene capacidad para inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (\*), disminuyendo los niveles de angiotensina II y liberándose menos cantidad de aldosterona en la corteza suprarrenal (hormona encargada de la reabsorción de sodio a nivel renal y de la excreción de potasio). El balance de sodio-potasio altera la

osmolaridad plasmática y el volumen extracelular, que junto con la presión sanguínea componen el sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Además el endotelio secreta óxido nítrico que produce vasodilatación (Endemann and Schiffrin, 2004). La quercetina es capaz de aumentar la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, aumentando la producción de óxido nítrico endotelial (Sanchez et al., 2006). En la disfunción endotelial aumenta la producción de endotelina-1, potente vasoconstrictor, y los ensayos clínicos con humanos han demostrado que la suplementación dietética de quercetina disminuye la liberación de endotelina-1 (Loke et al., 2008).

Puesto que la quercetina es capaz de inhibir la oxidación del colesterol LDL y su citotoxicidad (Negre-Salvayre and Salvayre, 1992), en estudios con modelos animales se ha comprobado que la suplementación oral con quercetina es capaz de disminuir los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total (Kamada et al., 2005). Es por ello que la quercetina también juega un papel importante en el tratamiento de la aterosclerosis. Por otra parte en modelos animales con ratas Wistar ha quedado manifiesto que los complementos dietéticos de quercetina con  $\alpha$ -tocoferol mejoran la disfunción contráctil y reducen el tamaño del tejido infartado en los procesos de isquemia miocárdica (Punithavathi and Prince, 2010).

#### **d. Inhibición de la carcinogénesis**

Los compuestos polifenólicos poseen propiedades antioxidativas y anticarcinogénicas. La quercetina y otros flavonoides alteran la iniciación, promoción y progresión de las diferentes fases moleculares de la carcinogénesis, por lo que podrían ser útiles en la prevención del cáncer. La quercetina concretamente altera la apoptosis, detiene el crecimiento de varias fases del ciclo celular, inhibe la síntesis de ADN y modula varias vías de transducción de señales (Yang et al., 2001).

#### **e. Ojos**

Algunos flavonoides podrían tener importantes efectos a la hora de reducir el riesgo de formación de cataratas (Stefek, 2011) y también como posibles antiinflamatorios, teniendo en cuenta que reducen la producción de especies reactivas de oxígeno producidas en la conjuntivitis.

#### f. Dermis

Para poder aplicar la quercetina en piel es indispensable que la manipulación no modifique sus efectos biológicos. Vicentini utilizó micro emulsiones de agua en aceite (3:1) incorporando la isoflavona quercetina para estudiar el daño inducido por ultravioleta B en piel de animal vivo. Para este estudio se utilizaron ratones sin pelo de 3 meses de edad, a los que se les aplicó por vía tópica en la zona dorsal 300 mg de quercetina en emulsión durante 1 hora y 5 minutos antes de irradiar al animal. La irradiación se realizó con una lámpara UVB a longitud de onda de 313 nm y a 20 cm de distancia de la piel. La dosis calculada corresponde a 2,87 Julios/cm<sup>2</sup> de piel. Los ratones son eutanasiados 6 horas después para analizar las muestras histológicas de las zonas irradiadas. Estos autores publicaron las fotografías de microscopía con objetivo 40X de los cortes histológicos, donde se observa que las muestras de ratones irradiados sin quercetina presentan eritema a las 3 horas de la irradiación, hiperplasia de epidermis y proliferación de colágeno propia del daño por la radiación UVB, mientras que los cortes histológicos de ratones irradiados tras la protección con quercetina presentan menor adelgazamiento de la piel, menor hiperplasia de epidermis (se reduce un 30%), así como menor proliferación de colágeno y fibras elásticas (Vicentini et al., 2010).

Estos mismos autores realizaron el estudio de quercetina *in vitro* en una línea celular continua L929 de fibroblastos de ratón, incrementando las dosis de esta isoflavona de 50 a 400 µg/mL (150-1200 µM) durante las 24 horas previas a la irradiación con UVB (2,87 Julios/cm<sup>2</sup>). La determinación de la vitalidad celular se realizó con el test MTT (ensayo que se basa en la reacción colorimétrica en azul por la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo). Las conclusiones son que la quercetina reducía la mortalidad celular inducida por la radiación ultravioleta. Dado que la quercetina protegía tanto *in vivo* como *in vitro*, estos autores sugirieron que estas micro emulsiones podrían utilizarse como agentes fotoprotectores en piel humana (Vicentini et al., 2010).

Se ha estudiado cómo la quercetina en liposomas puede aumentar la viabilidad celular y reducir los niveles de radicales libres. Estos resultados son mejores que en la quercetina en solución, demostrando una mayor eficacia para penetrar en las células. Liu utilizó un cultivo *in vitro* de queratinocitos HaCaT cultivados con DMEM y 10% de suero de ternera fetal y los irradió con UVB en dosis de 0,02 Julios/cm<sup>2</sup>. Posteriormente al administrar dosis crecientes de quercetina se observó un aumento de la viabilidad celular

con el test MTT. Las conclusiones fueron que la quercetina presentada como liposomas incrementaba la vitalidad celular y disminuía los niveles de radicales libres del oxígeno y de malonil dialdeído inducidos por los UVB (Liu et al., 2013).

En condiciones fisiológicas, la exposición prolongada de UVB en la piel activa la ruta metabólica PI3K de proliferación de queratinocitos y facilita su progresión a células escamosas, dando lugar a lesiones actínicas precancerosas (Olson et al., 2008, Olson et al., 2010). Olson trabajó con cultivos celulares de queratinocitos incubados en medio DMEM al que añadió quercetina con ácido ascórbico consiguiendo una disminución en la inducción de apoptosis por UVB debido a la inhibición de la ruta de señalización PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa).

Patil estudió el efecto protector ante radiaciones  $\gamma$  de la quercetina y la rutina tienen potencial protección ante radiaciones  $\gamma$ . Para ello utilizó ratones suizos *Stain A* a los que irradió 4,5 Gy con bomba de  $^{60}\text{Co}$  diariamente durante 5 días y les administró 10 mg/kg de rutina y 20 mg/kg de quercetina. Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de los radicales libres inducidos por radiaciones ionizantes al inhibir el estrés oxidativo (Patil et al., 2013).

También se ha visto que la quercetina y sus derivados tienen efectos protectores frente a radiaciones ionizantes. En el estudio de Lata se irradiaron ratones suizos albinos *Stain A* con radiación  $\gamma$  a dosis letal del 100% y a dosis letal del 50%. Este estudio plantea la posibilidad de conseguir efectos radioprotectores en otros mamíferos ante radiaciones ionizantes (Lata et al., 2009).

Zuyi Weng describió que la quercetina inhibía la secreción de histamina y la liberación de sustancias por los linfocitos T en dermatitis por contacto. Su mecanismo de acción era reducir la liberación de citoquinas por parte de los mastocitos y bloquear la activación de la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de la IL-8 y TNF. En este estudio se comparó la quercetina con el cromoglicato, que es actualmente el tratamiento utilizado como estabilizador de los mastocitos. Pacientes diagnosticados de fotosensibilidad o dermatitis por contacto fueron tratados con dosis de quercetina y cromoglicato de manera profiláctica, observando una reducción de las lesiones cutáneas en ambas patologías de manera significativa, y una disminución del prurito resistente a antihistamínicos, obteniendo mejores resultados con quercetina que con cromoglicato. De este estudio se deducía que la quercetina era un prometedor inhibidor de la



degranulación de los mastocitos para procesos alérgicos e inflamatorios, especialmente en las fórmulas farmacológicas que presentan una buena absorción oral (Weng et al., 2012).

En modelos *in vitro* con fibroblastos humanos el tratamiento con rutina, un glucósido de la quercetina, demostró propiedades antioxidantes, por lo que se decidió aplicarlo *in vivo* a nivel tópico mediante una crema que los sujetos a estudio se aplicaron durante 4 semanas, disminuyendo los niveles de ROS, mejorando la elasticidad de la piel y disminuyendo el número de arrugas (Choi et al., 2016).

#### **g. Síndrome de ovario poliquístico (SOP)**

El aumento en los niveles de insulina y de hormona luteinizante (LH) junto con la disminución de la hormona transportadora de globulina (SHB) crea un estado de hiperandrogenismo por hipertrofia de la teca (Agarwal et al., 2005). El estrés oxidativo puede provocar hiperplasia a nivel del ovario, causado preeclampsia, endometriosis, aborto y disminución de la fertilidad y la suplementación oral con quercetina puede mejorar las alteraciones hormonales y metabólicas del SOP (Jahan et al., 2018).

#### **h. Próstata**

Shoskes realizó un estudio clínico prospectivo aleatorizado de doble ciego y control con placebo para evaluar el efecto potencial de la quercetina en el Síndrome de Prostatitis Crónica III. Un grupo de 30 hombres fue inscrito inicialmente en el estudio con un diagnóstico de categoría III (dolor, molestias miccionales y descenso de la calidad de vida). Se asignó al azar una mitad del grupo con tratamiento de placebo y la otra mitad con quercetina en cápsulas de 500 mg dos veces al día para una persona de 60 kg durante 1 mes (la dosis aproximada era 16,7 mg/kg/día). Además, se realizó un estudio clínico abierto con seguimiento de 17 hombres cuyo tratamiento consistió en ingerir 2 cápsulas diarias del fármaco *Prosta-Q* (500 mg de quercetina, bromelina y papaína). La puntuación media de los síntomas de los pacientes que tomaron quercetina mejoró un 25%. Los efectos secundarios durante el tratamiento fueron cefalea en la primera dosis de un paciente y parestesias leves en extremidades que afectó a otro paciente. Ambos efectos cesaron al final del tratamiento. En el estudio clínico abierto el 82% de los 17 hombres observaron una mejoría de al menos el 25 %. Los exámenes del líquido prostático en 4 pacientes revelaron una disminución sustancial en los niveles de 8-iso-

prostaglandina F2a desde un nivel basal de 1365 pg/mL a 179 pg/mL (Shoskes et al., 1999).

Hace cuatro años se realizó otro estudio en los que hombres con niveles persistentes de PSA > 4 ng/dL (antígeno prostático específico) con biopsia prostática negativa recibieron un tratamiento con quercetina durante tres meses y se logró una disminución de los niveles de PSA < 4 ng/dL (Gallo, 2016).

En modelos animales con ratas la administración oral de quercetina durante 4 semanas disminuyó la expresión de citoquinas pro inflamatorias, reduciendo el estrés oxidativo y mejorando los cambios histopatológicos que se presentan en la prostatitis (Meng et al., 2018).

#### **i. Infecciones**

Actualmente hay varios estudios sobre posibles aplicaciones de la quercetina en diversas infecciones ya que parece inhibir la capacidad del virus para infectar otras células, inhibiendo así mismo la replicación de células ya infectadas. Los flavonoides demostraron efectos antivirales contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Concretamente la quercetina *in vitro* es capaz de inhibir la transcriptasa reversa y la ADN polimerasa del VIH, aunque no llegaron a probarse sus efectos en humanos infectados (Ng et al., 1997). Al inhibir la replicación del ARN de los virus *Influenza A* e *Influenza B* a través de la ARN polimerasa, hay estudios que demuestran su utilidad frente a estos virus (Gansukh et al., 2016). En el caso del virus respiratorio sincitial el uso de raíces de *Scutellaria baicalensis* en ratones demostró efectos antivirales y antiinflamatorios (Shi et al., 2016). En modelos *in vitro* con hepatocitos humanos la quercetina inhibe la replicación del genoma e infectividad del virus de la hepatitis C (Rojas et al., 2016). Otro estudio posterior relativo a la hepatitis B demostró que en modelos celulares el uso de *Guiera senegalensis* (una planta medicinal con alto contenido en quercetina) presenta actividad antiviral (Alam et al., 2017). Frente al adenovirus los compuestos fenólicos presentes en el té negro también han demostrado actividad antiviral (Karimi et al., 2016). En el caso del enterovirus la quercetina inhibe la actividad viral y bloquea su replicación en modelos *in vitro* (Yao et al., 2018). Para el herpes el uso de *Bacharis dracunculifolia* (producto natural con alto contenido en quercetina) en modelos *in vivo* con ratones se comprobó mejoría de las lesiones y disminución de la morbilidad (Ferreira et al., 2018). Otros modelos con ratones han demostrado protección frente a dos especies del

virus del ébola, pudiendo constituir una futura vía de investigación para tratamientos profilácticos de esta infección (Qiu et al., 2016). En el virus del Zika la quercetina también ha mostrado acciones antivirales en primates (Wong et al., 2017).

#### **j. Estudios clínicos de la quercetina**

Ya en 1999, Bardi realizó un estudio clínico administrando quercetina a 10 voluntarios sanos (7 hombres y 3 mujeres, edad media entre 33,5 y 37,5 años) con una dosis oral única de 8,5 mg/kg del peso corporal. El objetivo era estudiar el potencial de inducción de la liberación de adenosina. Las muestras de sangre se recogieron inmediatamente antes de la administración de quercetina (control negativo) y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la ingestión de la quercetina. Los resultados obtenidos fueron aumento constante en los niveles de adenosina en los 30 minutos posteriores a la administración del tratamiento, no observándose efectos adversos (Cureton et al., 2009).

Desde hace varios años se han llevado a cabo numerosos estudios clínicos publicados por Henson (Henson et al., 2008), Dumke (Dumke et al., 2009) y Cureton (Cureton et al., 2009). En todos estos estudios se han investigado los diversos efectos de la quercetina en la función inmune y estrés oxidativo inducido por el ejercicio, así como posibles efectos secundarios adversos. Los resultados obtenidos reflejan que la ingestión de quercetina en sujetos sanos a dosis diarias de 600 mg a 1 g durante 1 a 6 semanas nunca produce efectos adversos.

MacRae realizó un estudio clínico aleatorizado de doble ciego y cruzado en 11 ciclistas de élite masculinos (edad sin especificar) para poner a prueba los efectos de la suplementación diaria con antioxidantes, vitaminas esenciales y 600 mg de quercetina (300 mg dos veces al día). Los autores llegaron a la conclusión de que tras 6 semanas de suplementación con quercetina el rendimiento en la prueba de ciclismo de alta intensidad mejoró significativamente en potencia de salida. En este mismo estudio se echa en falta el registro de los posibles efectos adversos (MacRae and Mefferd, 2006).

Quindry realizó un estudio de doble ciego del rendimiento físico con 40 ciclistas varones entrenados (rango de edad 26-29 años). Al azar administró un suplemento diario de quercetina (n = 20) y placebo (n = 20). Los grupos ingieren un total de quercetina de 1000 mg/día o, en su defecto, placebo. El estudio se realizó durante 3 semanas antes, 3 días antes y 2 semanas después de que los sujetos pedalearan durante 3 horas/día aproximadamente al 57% de su potencia máxima. Las muestras de sangre y saliva se

recogieron antes y después de cada una de las sesiones de ejercicio y las biopsias musculares se obtuvieron antes y después de la primera y tercera sesión. Los resultados fueron que el tratamiento con quercetina no provocó mayor rendimiento (potencia, frecuencia cardíaca y consumo de oxígeno). Los resultados no modificaron las medidas de la función inmune o muscular y no aportaron ninguna modificación en las cifras de análisis sanguíneos: Natural Killer (NK), proliferación de linfocitos y fitohemaglutinina (PHA), actividad oxidativa, IgA salival, NF-kB (factor de transcripción nuclear kappa B), citoquinas y ciclooxigenasa-2. Pero por otra parte estos autores reseñan que no se registraron efectos adversos en ninguno de los sujetos tratados con quercetina.

Queda mucho por investigar con este flavonoide, pero es un producto de origen botánico con efectos beneficiosos demostrados en dietas y sin ningún tipo de efectos secundarios que pueda perjudicar a los pacientes. Cabe destacar que en septiembre de 2020 el doctor Michel Chrétien del Instituto de Investigación Clínica de Montreal propuso el uso de quercetina para el tratamiento de la COVID-19 para inhibir la replicación del virus (bloqueando la endocitosis del virus en las células huésped en fase temprana, bloqueando la transcripción del genoma viral, incrementando el aclaramiento viral al mejorar la respuesta mitocondrial y reduciendo la inflamación asociada a la infección). Al parecer su equipo ha comenzado la fase de ensayos clínicos en pacientes chinos para comprobar la acción antiviral de este flavonoide.



## VITAMINA C:

### *Características generales*

La vitamina C es un potente antioxidante para el ser humano que también presenta propiedades antiinflamatorias y es fundamental para el sistema inmunológico. Se trata de una molécula hidrofílica de sabor ácido con un amplio espectro de acción, ya que es un excelente barredor de radicales libres como el peróxido, superóxido, hidroxilo y peroxinitrilo. Entre los antioxidantes hay varias familias de principios activos que incluyen los fitoestrógenos (principalmente los flavonoides de los que hemos hablado en el capítulo previo) y los polifenoles (los taninos presentes en el vino) (Coronado H et al., 2015).

Es un componente esencial para los seres humanos que debe ser ingerido diariamente a través de la dieta en sus dos variantes biológicas (figura 8): ácido ascórbico (su forma reducida, a lo que comúnmente denominamos vitamina C) o ácido dehidroascórbico (forma oxidada). Las principales fuentes alimentarias son los tomates, acelga, cítricos, fresa, kiwi, zanahoria, espinacas, ajo, cebolla, avena, menta, etc. Su carencia determina múltiples patologías, siendo la más conocida el escorbuto, ampliamente documentada por las expediciones hacia el continente americano donde los marinos no disponían de fruta o verdura fresca durante meses, produciéndose una alteración en la síntesis del colágeno que cursaba con púrpuras y equimosis que progresaban hacia hemorragias, infecciones secundarias y finalmente la muerte. Fueron los ingleses en el siglo XVIII los que finalmente consiguieron paliar la enfermedad gracias al zumo de limón mezclado con destilados de ron y ginebra, aunque hay algún tratado español de frailes agustinos ya en el siglo XV donde se recogen remedios con cítricos abordo.

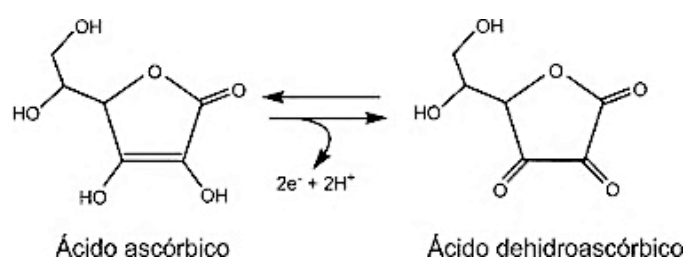


Figura 8. Reacción de oxidación de la vitamina C (ácido L-ascórbico) hacia su forma reducida (ácido dehidroascórbico).

En pacientes críticos se ha observado que una dosis alta intravenosa de vitamina C en fases tempranas da lugar a un pronóstico más favorable y prevención de la posterior hipovitaminosis (de Grooth et al., 2018). Para pacientes muy graves podrían requerirse dosis IV de 3-6 g/día para restablecer sus concentraciones plasmáticas que suelen tolerarse adecuadamente mejorando la vascularización y las lesiones a nivel celular. En modelos animales con ratas expuestas a nanopartículas de óxido de zinc, el suplemento vitamínico de ácido ascórbico inhibía la toxicidad pulmonar aguda al suprimir la producción de especies reactivas de oxígeno y disminuir la inflamación a nivel pulmonar, todo ello atribuible a su acción antioxidante y quelante (Fukui et al., 2017).

### *Mecanismo de acción*

La vitamina C se absorbe por transporte activo y difusión pasiva. Su forma oxidada se absorbe mejor, ya que a pH fisiológico no se encuentra ionizada y al ser menos hidrófila atraviesa mejor las membranas celulares. En plasma se encuentra principalmente en forma reducida (ácido ascórbico) a concentraciones que varían entre 30-60  $\mu\text{M}$ . Las células y tejidos también contienen ácido ascórbico, concentrándose incluso 100 veces más en glándulas adrenales, pituitaria, cerebro, bazo e hígado. Por ejemplo, el ácido ascórbico no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, es el ácido dehidroascórbico el que penetra en las neuronas (Oudemans-van Straaten et al., 2014).

Sus funciones biológicas se desarrollan fundamentalmente a nivel intracelular. Para ello hace falta la colaboración de transportadores de membrana que la capten del plasma para meterla en el interior de las células. Son pocos los mamíferos incapaces de sintetizar su propia vitamina C y el humano está incluido entre ellos junto con algunos primates y varias especies de cerdo guineano debido a una mutación genética; no obstante, todos ellos disponen de transportadores específicos. El resto de mamíferos pueden sintetizarla a nivel del páncreas e hígado. Hay dos tipos de transportadores de membrana para la vitamina C en función de si captan ácido ascórbico (cotransportadores de sodio-ascorbato o SVCTs) o ácido dehidroascórbico (glucotransportadores o GLUTs que actúan por difusión facilitada). Sin embargo, sólo puede detectarse la forma reducida (ácido ascórbico) en el plasma y a nivel intracelular porque su forma oxidada (ácido dehidroascórbico) se excreta o hidroliza rápidamente (Rivas et al., 2008).

En un estudio *in vitro* realizado con fibroblastos humanos fetales de pulmón se indujo senescencia para determinar los niveles de vitamina C según la edad de las células. Al añadir concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico, la cantidad intracelular aumentaba en todas las células y en mayor medida en las células más viejas (1,5 veces más). Si se añadían 100  $\mu\text{M}$  de ácido dehidroascórbico también aumentaban los niveles intracelulares pero un 80% menos que en el caso del ácido ascórbico, acumulándose también a mayores concentraciones en las células más viejas. Paradójicamente al añadir ácido dehidroascórbico lo que aumentaba eran los niveles intracelulares de ácido ascórbico. Por lo tanto, se dedujo que las células senescentes tienen mayor habilidad para introducir y acumular el ácido ascórbico a nivel intracelular respecto a las células jóvenes, ya que tienen mayores niveles de especies reactivas de oxígeno, teniendo mayor facilidad



de entrada el ácido ascórbico (5 veces más) respecto al ácido dehidroascórbico (Saitoh et al., 2018).

Los requerimientos mínimos para mantener una concentración normal en plasma de 50  $\mu\text{M}$  son de 100 mg al día en adultos. El déficit de vitamina C se establece en una concentración plasmática  $< 20 \mu\text{M/L}$ . Por ejemplo, en el escorbuto se observan niveles inferiores a 11  $\mu\text{M/L}$ . Sin embargo, la dosis oral está limitada por la absorción intestinal y por un mecanismo de transporte activo que se satura y depende de la energía, del sodio y de la dosis (Torres et al., 2014). La concentración plasmática depende de la absorción, volumen de distribución, captación celular, consumo, reabsorción y excreción renal. En casos de patologías graves como sepsis, hemorragias o fallo multiorgánico habrá hipovitaminosis debido al alto consumo atribuible al estrés oxidativo y agotamiento por parte de leucocitos y granulocitos.

La reposición externa de vitamina C es muy baja (aproximadamente un 5%) debido al excelente mecanismo de reciclaje, siendo la principal ruta de eliminación la excreción urinaria. Una ingesta oral excesiva conlleva acidificación de la orina, favoreciendo la formación de cálculos renales (mayoritariamente de oxalato), pudiendo llegar a irritar el tubo digestivo (Torres et al., 2014).

### *Funciones biológicas*

#### **a. Acción antioxidante**

Como ya se ha explicado previamente, la capacidad de la vitamina C para capturar radicales libres la convierte en un potente antioxidante eliminando radicales superóxido e hidroxilo. Su acción antioxidante resulta fundamental en todos los órganos y sistemas. Han realizado estudios en modelos *in vivo* con animales, por ejemplo en ratones transgénicos, sobre la obstrucción pulmonar crónica y fibrosis quística. El tratamiento con otro antioxidante (N-acetil cisteína) mejoraba el enfisema y la disfunción pulmonar. En cambio, la depleción de otro antioxidante (en este caso la vitamina C) causado por una disrupción genética de la enzima sintetizadora de vitamina C (SMP30 de los ratones transgénicos C57/BL6J- $\beta$ ENAC) producía fenotipos pulmonares exagerados, demostrando que el desequilibrio proteasa-antiproteasa y el estrés oxidativo exacerban los fenotipos pulmonares en este tipo de ratones y que quizás podría guardar relación con el humano (Shuto et al., 2016).

Además, la participación de la vitamina C en reacciones redox es esencial para múltiples funciones, ya que interviene por ejemplo en la oxidación de la fenilalanina, en la oxidación de la tirosina, en la conversión de triptófano a serotonina, la transformación de dopamina en norepinefrina.... También se encarga de reducir el hierro férrico a ferroso para permitir su absorción intestinal.

#### **b. Función endotelial**

La disfunción endotelial mediada por las especies reactivas de oxígeno se manifiesta con isquemia o alteraciones en la perfusión que pueden llegar a la sepsis. La administración intravenosa de vitamina C a altas dosis en pacientes con sepsis o a nivel preoperatorio en casos de isquemia ha demostrado mejorar el estrés oxidativo a nivel endotelial, mejorando la perfusión y oxigenación del tejido y en consecuencia mejorando la disfunción endotelial (Oudemans-van Straaten et al., 2014).

En otro estudio realizado con pacientes con sepsis el tratamiento combinado de hidrocortisona con vitamina C ha demostrado ser útil para revertir la disfunción endotelial a nivel pulmonar (Barabutis et al., 2017).

En un modelo *in vitro* de células miocárdicas sometidas a estrés térmico el tratamiento previo con vitamina C protegía a las células para adaptarse mejor al estrés oxidativo (Yin et al., 2018).

**c. Síntesis de hormonas**

Al actuar como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas es fundamental en la biosíntesis de catecolaminas, vasopresina y otras hormonas. También interviene en la biosíntesis de carnitina que permite transportar ácidos grasos hasta el interior de los orgánulos celulares para producir energía.

**d. Síntesis de colágeno**

Su participación en la hidroxilación de la lisina y prolina resulta fundamental para la síntesis de colágeno. La máxima expresión de la alteración en la síntesis del colágeno se produce en el escorbuto.

**e. Sistema inmunológico**

Su función en el sistema inmunológico no está bien definida, pero ha demostrado ofrecer resistencia a las infecciones al aumentar la actividad inmunológica de los linfocitos, aumentar la producción de interferón y reforzar la integridad de las membranas a nivel de las mucosas. También influye en la actividad de los macrófagos regulando la fagocitosis. Actúa como bacteriostático inhibiendo el crecimiento bacteriano.

**f. Acción despigmentante**

Su intervención en el metabolismo de la tirosinasa produce una disminución de la formación de melanina. La vitamina C al ser un compuesto inestable se ha estudiado en combinación con otros agentes despigmentantes como la soja o el regaliz, que aplicados tópicamente han resultado útiles en el tratamiento de la hiperpigmentación asociada al fotoenvejecimiento. Se ha demostrado que la combinación de tirosina, zinc y vitamina C aumenta hasta 20 veces la biodisponibilidad de esta vitamina (Telang, 2013). También protege frente a la fotocarcinogénesis al estabilizar las fibras de colágeno, aumentando su síntesis y disminuyendo su degradación. La vitamina C actúa sinérgicamente con la vitamina E, por lo que tiene amplias aplicaciones clínicas en el campo de la dermatología (Al-Niaimi and Chiang, 2017).

**g. Actividad antineoplásica**

Ya desde 1991 se demostró una correlación directa de la vitamina C con la prevención del cáncer, principalmente de esófago, cavidad oral, estómago y páncreas, aunque también ofrece efectos protectores en cáncer de cérvix, recto y mama. Los carotenoides muestran efectos protectores frente al cáncer de pulmón. Su mecanismo de acción se atribuye al papel antioxidante y por su acción *scavenger* para radicales libres (moléculas eliminadoras que se oxidan al neutralizar el radical libre, también denominadas “moléculas suicidas”) a nivel del plasma, activando la regeneración de vitamina E en membranas lipídicas (Block, 1991). Además, el ácido ascórbico bloquea la formación de nitrosaminas.



**SENESCENCIA:***Características generales*

Ya en 1961 un profesor de anatomía de la Universidad de Stanford (California, EE.UU.), el doctor Leonard Hayflick, describió el proceso de la senescencia celular gracias a un estudio sobre el crecimiento *in vitro* de fibroblastos humanos. Allí pudo observar que a pesar de mezclar células jóvenes con células que ya llevaban varias fases de replicación (más viejas), los fibroblastos podían recordar el número de replications que habían llevado a cabo, siendo éste un número finito (término que bautizó como senescencia replicativa o “fenómeno de Hayflick”). De esta investigación dedujo que la senescencia celular era una detención irreversible de la división celular que se asocia al envejecimiento de los seres vivos y las únicas células somáticas que pueden escapar de la senescencia son las cancerígenas. Tanto la apoptosis como la senescencia celular son buenos parámetros biológicos a estudiar en cultivos celulares, ya que aportan información sobre la fisiología, morfología, bioquímica y genética de la célula (Martínez Salazar, 2009).

La senescencia replicativa se produce por una erosión telomérica progresiva asociada a la acumulación de daños en el ADN (Singh and Piekorz, 2013). Los telómeros, extremos de los cromosomas, son regiones de ADN no codificante altamente repetitivas que dan estabilidad estructural protegiendo al cromosoma; su desgaste a lo largo de los ciclos celulares impide la protección del ADN, volviéndolo inestable, incapaz de duplicarse e iniciando procesos de apoptosis (muerte celular programada). Además hay diversos factores de estrés, incluidos los estímulos hipermitogénicos como las proteínas Ras (oncogenes que actúan como interruptores o reguladores de diversas rutas de transmisión celulares y que suelen asociarse a tumores malignos), las especies reactivas de oxígeno y drogas citotóxicas que producen daño en el ADN, así como disfunciones del huso mitótico y la aneuploidía (alteración de la dotación cromosómica normal del cariotipo) que pueden desencadenar y acelerar una respuesta antiproliferativa conocida como senescencia prematura inducida por estrés (SIPS).

La senescencia actúa protegiendo a la célula, ya que suprime los procesos tumorales a un nivel de pre malignidad. Sin embargo, constituye un detrimento cuando causa un agotamiento de la proliferación de células madre o cuando promueve procesos inflamatorios ligados al fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). No obstante,

aunque las células senescentes paran su proliferación, se siguen manteniendo metabólicamente activas.

La senescencia inducida por oncogenes (OIS) es una respuesta antiproliferativa que cesa el crecimiento de algunos tumores benignos y protege de la progresión al cáncer mediante los oncogenes inductores de apoptosis (Chandek and Mooi, 2010). Por ejemplo, los OIS impiden la progresión de neoplasias pre malignas hacia carcinomas invasivos en las neoplasias intraepiteliales pancreáticas murinas mediante la adquisición de mutaciones supresoras de tumores (Caldwell et al., 2012).

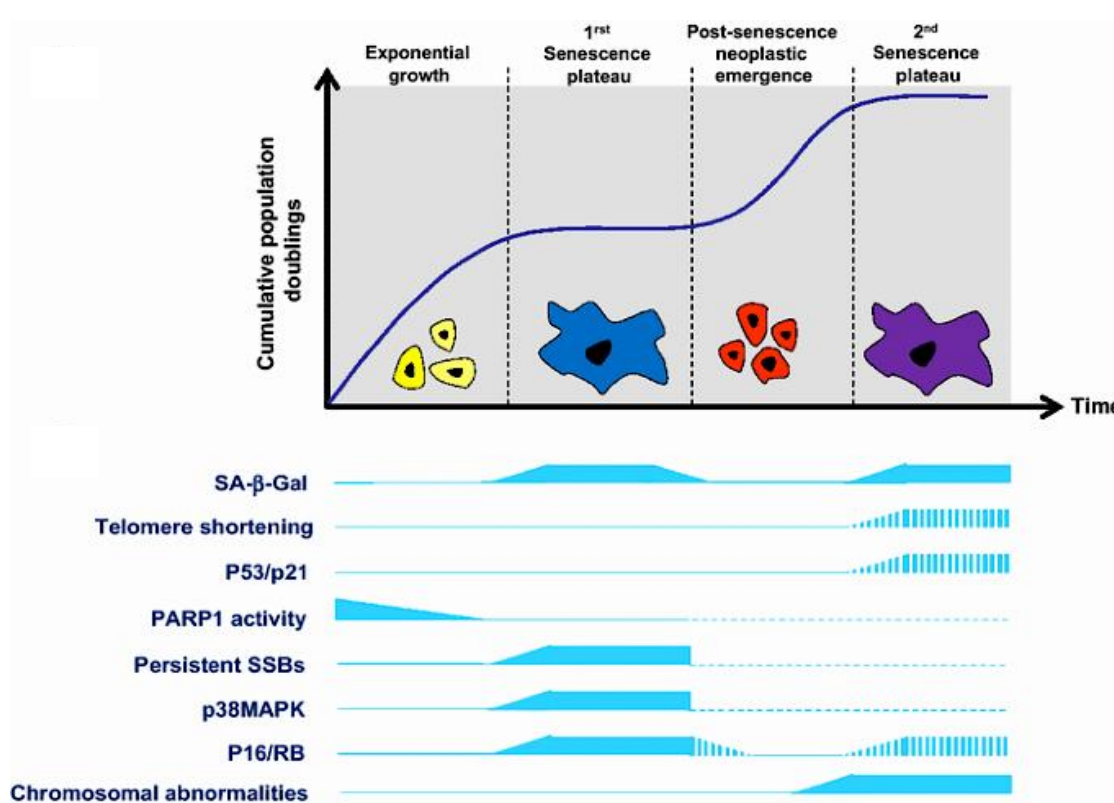


Figura 9. Esquema de las fases de la senescencia *in vitro* en queratinocitos y células epiteliales mamarias humanas (Abbadie et al., 2017).

En la piel el envejecimiento puede producirse por factores extrínsecos derivados de factores ambientales (radiación ultravioleta, tabaquismo, abuso de alcohol, deficiencias nutricionales) o por factores intrínsecos que dependen del contexto genético y del natural paso del tiempo. Concretamente la radiación UV contribuye en un 80% en el envejecimiento celular induciendo daños en el ADN (fotoenvejecimiento) y activando diversos oncogenes. Para reparar dichos daños del material genético las células epiteliales tienen sistemas coordinados que asocian paradas en las diferentes fases de los

ciclos celulares, reparación del ADN, la apoptosis y la senescencia prematura (Choi et al., 2018). Los estudios *in vitro* se han llevado a cabo fundamentalmente en modelos con fibroblastos, aunque concretamente en cultivos de células epiteliales mamarias y queratinocitos se observó que la senescencia se desarrolla atípicamente en dos pasos (figura 9). Primero se producía una detención del crecimiento celular tras 10-20 duplicaciones de la población celular (senescencia temprana independiente de los telómeros) con cambios morfológicos típicos consistentes en un aumento del tamaño celular asociando aplanamiento, aumento de la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, secreción de citoquinas pro inflamatorias y detención del ciclo celular en fase G1 (aunque todavía de forma reversible en algunas células). Solamente una de cada 10.000 células es capaz de escapar espontáneamente la senescencia, perdiendo la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa y volviendo a iniciar el ciclo celular, aumentando sus clones y consiguiendo de 5-45 duplicaciones de su población celular. Estas células post senescentes dan lugar a un segundo paso denominado “agonescencia” caracterizado por una propagación celular, aumento de tamaño, elevación de la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal (*Senescence associated beta Galactosidase*), expresión de un secretoma específico y aumento de la muerte celular.

La detención del ciclo celular puede influir en numerosos procesos biológicos incluido el desarrollo embrionario, la reparación y regeneración tisular, supresión tumoral y el envejecimiento (Noren Hooten and Evans, 2017). De hecho es la propia acumulación de células senescentes en tejidos y órganos lo que determina el envejecimiento del organismo, por tanto la identificación, cuantificación y caracterización de estas células resulta fundamental para la comprensión de la función que desempeña la senescencia en el envejecimiento, la patogénesis y el desarrollo de posibles intervenciones terapéuticas (Biran et al., 2017).

Las principales patologías ligadas a la edad en las que la senescencia juega un papel fundamental para su progresión son: obesidad y *diabetes mellitus* (la senescencia aumenta la resistencia a la insulina), esteatosis hepática no alcohólica (las mitocondrias de las células senescentes no metabolizan los ácidos grasos adecuadamente, favoreciendo su acúmulo), hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática (las células senescentes disminuyen la expresión de los factores pro inflamatorios dificultando la resolución de la fibrosis), osteoartritis y génesis de tumores (aunque las células senescentes pueden inhibir



el crecimiento tumoral, el SASP puede promover el crecimiento de neoplasias y además ofrecer resistencia a las terapias oncológicas) (Wei and Ji, 2018).

Se han realizado pocas investigaciones sobre la senescencia *in vivo*. Algunos investigadores han trabajado con ratones para estudiar terapias basadas en los telómeros con el objetivo de combatir el envejecimiento. El TA-65 es un producto natural derivado de un activador de la telomerasa (enzima que replica el ADN en los extremos de los cromosomas eucarióticos, permitiendo el alargamiento de los telómeros) que provoca un descenso de células senescentes del sistema inmune, aumentando los niveles de telomerasa en el tejido del ratón y mejorando indicadores de salud. Sin embargo, hasta ahora no ha logrado ninguna repercusión en la esperanza de vida de los animales (de Magalhaes and Passos, 2018). Otros fármacos comúnmente denominados “senolíticos” como la combinación de quercetina con Dasatinib (inhibidor de la tirosina quinasa para impedir la fusión de las proteínas BCR-ABL que se utiliza como tratamiento habitual en la leucemia mieloide crónica y en algunas leucemias linfoblásticas agudas) han demostrado reducción en el número de células senescentes expuestas a radiación, mejorando diversos parámetros de salud de los ratones, reparando la función vasomotora en hipercolesterolemia, fibrosis pulmonar idiopática y esteatosis hepática. También hay hipótesis de trabajo con ratones centradas en retrasar la senescencia celular para frenar el envejecimiento y posponer las enfermedades asociadas a él, siendo la gerontología un campo que podría beneficiarse ampliamente con el desarrollo de fármacos capaces de retrasar la demencia o el cáncer (Stipp, 2012).

La hipótesis sobre la senescencia multi paso que propone van Deursen (figura 10) parte de una célula quiescente (en fase fisiológica G0, estado vegetativo sin replicación celular) que puede volver al ciclo celular a través de la diferenciación, o bien progresar hacia una detención del ciclo celular mediante la activación del p16<sup>INK4a</sup> y/o las vías p53-p21 que le permiten alcanzar la fase de senescencia temprana (o pre senescencia). El factor de transcripción p53 regula más de 500 genes diana, por lo que además de estar implicado en la senescencia influye en otros procesos como la adaptación metabólica, reparaciones del ADN, paradas del ciclo celular y apoptosis (Bourgeois and Madl, 2018). Posteriormente se podrá llegar a la fase de senescencia completa disminuyendo la producción de la proteína lamina-B1 (encargada de la estabilidad nuclear, estructura de la cromatina y expresión de genes) y otros estímulos que produzcan el SASP (fenotipo secretor asociado a senescencia), en el esquema de la figura 10 las diferentes sustancias

secretadas se representan mediante círculos de diversos colores. El paso a senescencia tardía dependerá de factores genéticos y cambios epigenéticos (mecanismos que regulan la expresión de genes sin modificar la secuencia del ADN) que parecen depender de la heterogeneidad del SASP y justifican la variedad de células senescentes. La eliminación de las células senescentes puede llevarse a cabo mediante aclaramiento inmunitario en cualquiera de las fases de senescencia al ser fagocitadas por macrófagos que también se activarán por el SASP.

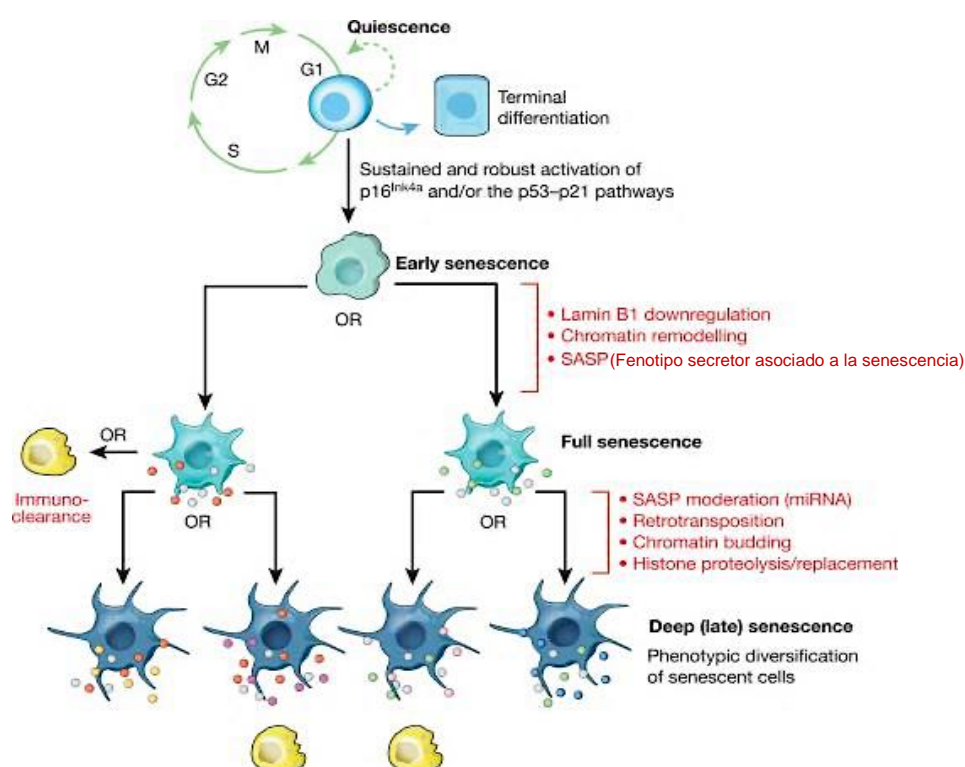


Figura 10. Hipótesis de senescencia multi-paso (van Deursen, 2014).

La señal pro inflamatoria del SASP puede atenuarse en la fase tardía de la senescencia. La autofagia es un mecanismo esencial para eliminar la célula en el que organelas y proteínas degradadas se autofagocitan en el lisosoma. El aumento de la actividad lisosomal se refleja en un consecuente aumento de la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal localizada en los lisosomas, constituyendo el marcador más utilizado para la determinación de la senescencia (Wiley and Campisi, 2016).

Los componentes del SASP influyen en las células próximas y en su microambiente, por tanto, el SASP es un fenómeno que vincula la senescencia celular con el envejecimiento celular y patologías dependientes de la edad. Cuando disminuye

la expresión de Sirtuina1 (SIRT1 o *Silent mating type Information Regulation Two* tipo 1, enzima NAD-dependiente que regula la expresión de ciertos genes), aumenta la expresión de los componentes del SASP en la senescencia, produciéndose un acúmulo de IL-6 e IL-8 que favorece la expansión de células senescentes. De modo que en la situación inversa donde se produce un aumento de SIRT1 obtendríamos protección contra el envejecimiento y patologías relacionadas con la edad, ya que se produce supresión del SASP a través de regulación epigenética (Hayakawa et al., 2015). Aunque se han descrito 7 tipos distintos de sirtuinas en los mamíferos, tan sólo la SIRT1 y SIRT6 han demostrado utilidad en la disminución de la inflamación y en la protección cardiovascular (disminuyen el envejecimiento vascular, las cardiopatías y el desarrollo de placas ateroscleróticas) (D'Onofrio et al., 2018).

Hay estudios centrados en la fisetina (un tipo de flavona bioactiva) ya que parece suprimir la diferenciación de los preadipocitos en fases iniciales e inducir la expresión de SIRT1. Por tanto, la fisetina al potenciar los niveles de SIRT1 acaba produciendo supresión de la adipogénesis (Kim et al., 2015). De hecho, para activar la SIRT1 se utilizan STACs (compuestos activadores de las sirtuinas 1 y 2). Dos STACs muy estudiados y que derivan de plantas son precisamente la fisetina y el resveratrol, que tienen poca toxicidad para células humanas y en modelos *in vitro* han demostrado mejorar la esperanza de vida de la levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* (hongo unicelular) (Yang et al., 2007). Además la fisetina que se ingiere por vía oral se ha demostrado que aumenta los niveles de glutatión, activa vías de señalización celular y reduce la producción de eicosanoides (lípidos que se producen por la oxidación de ácidos grasos esenciales y actúan como mediadores del SNC, en la inflamación y en la respuesta inmune). Así que la fisetina también tiene la habilidad de reducir el impacto de patologías neurológicas relacionadas con la edad (Maher, 2015). En el caso de investigaciones con ratas macho tratadas con cisplatino y fisetina se comprobó que para el daño renal que asociaba alteraciones histopatológicas, la fisetina mejoraba los niveles de creatinina, urea y otros marcadores, por lo que debería estudiarse como posibilidad de tratamiento combinado al cisplatino para mejorar las herramientas terapéuticas contra la nefrotoxicidad derivada de la quimioterapia (Sahu et al., 2014).

### *Marcadores para identificar la senescencia*

Hay diversos métodos de determinación de la senescencia celular como el aplanamiento de la morfología celular con aumento de la superficie de la célula, la detención proliferativa, resistencia a la apoptosis, alteración de la expresión génica de los micro ARN y activación de vías supresoras de tumores (p53-p21 WAF, p53-Dec1, p16<sup>INK4a</sup>). En el núcleo de la célula se forman ADN-SCARS (segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina que refuerzan la senescencia), SAHF (focos heterocromáticos asociados a senescencia, dominios de heterocromatina especializados en silenciar los genes que promueven la proliferación), activación de factores de transcripción (Sp1) y aumento de factores secretados (SASP). Todo ello reprime los genes encargados de la proliferación produciendo una ausencia de BrdU (bromodesoxiuridina, nucleótido sintético halogenado con un grupo bromuro análogo a la timidina frecuentemente utilizado en tratamientos oncológicos), detención del ciclo celular principalmente en fase G1, aumento de la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal lisosomal con un consecuente aumento de la masa lisosomal, enriquecimiento de citoquinas pro inflamatorias y remodeladores de la matriz extracelular (Abbadie et al., 2017). Otras hipótesis proponen que el SASP influye en la homeostasis de los tejidos, ya que provoca su reorganización celular (Cahu, 2013). La secreción de algunos factores del SASP se puede modificar a través de la inhibición de la proteína mTOR (*mammalian Target of Rapamycin* o diana de rapamicina en mamíferos), una vía de señalización que al activarse produce inhibición de la autofagia, inhibe la apoptosis, controla el inicio de la transcripción del ARN mensajero y promueve la síntesis de proteínas y glucosa. El uso de rapamicina, inmunosupresor natural que se aísla a partir de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, permite que en pacientes trasplantados se inhiba la vía mTOR para que en dosis bajas se induzca senescencia en líneas celulares normales y en altas concentraciones se produzca autofagia de una línea celular transformada (Fernández Larrosa et al., 2011).

La ausencia de marcadores específicos para la detección de senescencia ha centrado el estudio de diversas características celulares semi-selectivas como el aumento de los niveles de p16<sup>INK4a</sup> (gen supresor de tumores que inhibe la biogénesis de ribosomas e inicia la detención del ciclo celular y la apoptosis), p21 (gen que codifica un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina que a su vez regula el avance de la fase S del ciclo celular), macroH2A que es una histona (proteína básica que forma parte de la cromatina)

que influye en la represión de genes (impidiendo la transcripción) y en la heterocromatinización (formación de segmentos cromosómicos muy condensados), IL-6 (interleuquina secretada por macrófagos, monocitos, linfocitos T y B, células endoteliales y fibroblastos con actividad antiinflamatoria y pro inflamatoria que estimulan la producción de proteínas de fase aguda así como la producción de anticuerpos), p38 MAPK fosforilada (proteína quinasa activada por mitógenos), DSBs (*double-strand breaks* o roturas de doble hebra) y la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal.

Es precisamente la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal el marcador más utilizado, ya que cataliza la hidrólisis de las  $\beta$ -galactosidasas en monosacáridos de células senescentes, siendo activa a un pH de 6 (Kurz et al., 2000). Sin embargo esta actividad lisosomática puede detectarse en células no senescentes a un pH de 4 (Kuilman et al., 2010). Otro método de detección de esta actividad es mediante la alcalinización de los lisosomas con carbonato amónico y tinción con el fluorocromo C<sub>12</sub>-FDG, molécula que atraviesa la membrana celular y se hidroliza por la acción de la SA- $\beta$ -Gal y emite fluorescencia a 525 nm en color verde (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

La falta de selectividad de la tinción histoquímica impide distinguir células senescentes de otro tipo de células, debiendo tenerse en cuenta además la posibilidad de obtener falsos positivos (por ejemplo, en cultivos con alta confluencia celular la actividad de la SA- $\beta$ -Gal estará aumentada) o falsos negativos (cuando hay insuficiente inducción de la senescencia). El gen encargado de codificar la actividad de la  $\beta$ -D-galactosidasa (activa con un pH ácido de 4,5) que a su vez determina la actividad de la SA- $\beta$ -Gal es el GLB1. Por ello la supresión de dicho gen disminuye su actividad (Lee et al., 2006).

Para medir la senescencia en 2004 publicaron una técnica en *Analytical biochemistry* donde utilizaban el sustrato X-Gal a pH de 6 para aumentar la senescencia en fibroblastos (aumentando la actividad de la SA- $\beta$ -Gal). Para ello sembraban los fibroblastos en placas de 96 pocillos, añadían el fluorocromo FDG a concentración de 2 mM e incubaban durante 24 horas. La fluorescencia se medía con un fluorímetro, utilizando un láser con longitud de onda de excitación de 485 nm y recogiendo la emisión a 535 nm. Este método demostró que la SA- $\beta$ -Gal aporta información cualitativa y cuantitativa referente al envejecimiento celular (Yang and Hu, 2004).

### *Citometría de imagen*

La **citometría de flujo convencional** permite la obtención simultánea de datos morfométricos (cantidad de células y su fenotipo), cuantificar la división celular y detectar la expresión de múltiples proteínas mediante tinciones celulares. En senescencia permite observar las diversas fases de la diferenciación celular (Luk et al., 2017). Al tratarse de un análisis celular multiparamétrico permite la medición de fluorescencias múltiples y de dispersión de luz en una suspensión de partículas microscópicas mientras fluyen de forma alineada, focalizándose por un haz de luz láser dentro de un compartimento de detección (cámara de flujo) (O'Connor et al., 2001).

La medición de numerosos parámetros biológicos convierte a los citómetros de flujo en herramientas básicas para los hospitales para técnicas rutinarias de conteo celular en hematología, determinación de anticuerpos monoclonales en inmunología, análisis de marcadores tumorales en oncología, estudio del ADN en biología celular y otros ámbitos científicos como la toxicología, microbiología o biotecnología (Valet et al., 2004, Janossy, 2004).

La **citometría de imagen** combina la citometría convencional con microscopía confocal, proporcionando una gran cantidad de imágenes digitales y múltiples parámetros estadísticos, proporcionando información morfológica muy precisa a través de las fotografías de las células (Barteneva et al., 2012).

Los experimentos de esta tesis doctoral se han realizado en el Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de Citómica de la Universidad de Zaragoza, con un citómetro de imagen AMNIS® modelo ImageStream X (figura 11). Este instrumento dispone de dos cámaras de alta resolución posicionadas a distinto nivel para obtener hasta 12 fotografías simultáneas de cada célula y tres objetivos de microscopía de 20, 40 y 60 aumentos. El registro de los datos se realiza a través de histogramas monoparamétricos y biparamétricos. El citómetro (figura 12) cuenta con 5 láseres en estado sólido: láser ultravioleta (375 nm), azul (488 nm), naranja (658 nm), infrarrojo (785 nm) y luz blanca (830 nm).

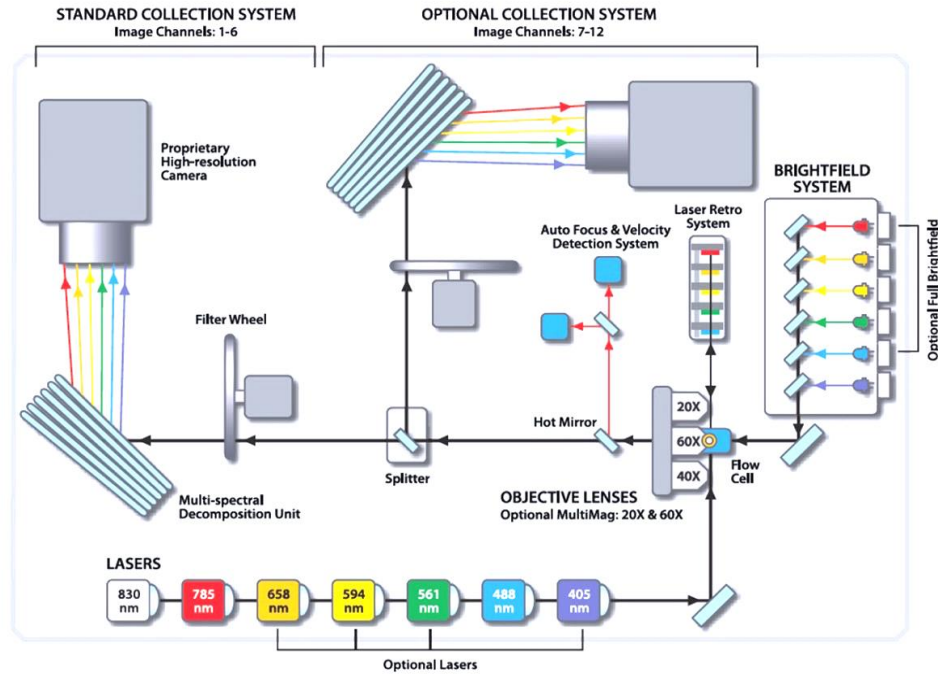


Figura 11. Esquema de la configuración de un citómetro de imagen AMNIS®.



Figura 12. Citómetro de imagen AMNIS®, modelo ImageStream X del SAI Citómica.

El Servicio de Citómica ha diseñado la **técnica APO 5** para determinar las 5 poblaciones celulares de apoptosis y necrosis que identifica su citómetro de imagen (figura 13):

- Doble negativo: **Células vivas**. Membrana nuclear intacta. Sin tinción.
- Anexina V positivo: **Células apoptóticas tempranas**. Al tratarse de apoptosis (muerte celular programada) se invierte la membrana celular, por lo que la fosfatidil serina migra desde el citoplasma celular hasta la membrana celular. Allí se une a Anexina V con FITC (fluorescencia verde).
- Doble positivo: Membrana celular perforada, por lo que el IP entra hasta el núcleo tiñendo el ADN (fluorescencia roja). La fosfatidil serina al haber migrado a la membrana celular se une a Anexina V con FITC (fluorescencia verde). En el citómetro de imagen según la morfología de cada célula podremos distinguir entre:
  - ♦ **Células necroptóticas**: Membrana celular perforada y nuclear intacta. Proceso combinado de apoptosis y necrosis con permeabilización de la membrana y liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular e inflamación del tejido sin que el ADN se vea fragmentado.
  - ♦ **Células apoptóticas tardías**: Membrana celular perforada. Núcleo desestructurado.
- IP positivo: **Células necróticas**. Membrana celular perforada y ADN teñido con IP (fluorescencia roja).

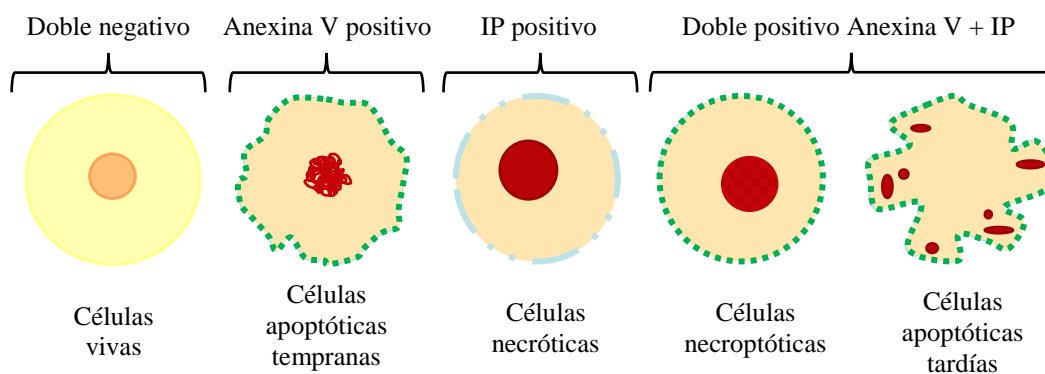


Figura 13. Esquema de poblaciones celulares que permite diferenciar la técnica APO 5 (figura de la autora).



La técnica APO 5 se puede realizar con otros fluorocromos como Anexina V unida a Ficoeritrina y DAPI. La figura 14 es un esquema de un histograma biparamétrico: en abscisas se representa la apoptosis y en ordenadas la muerte celular.

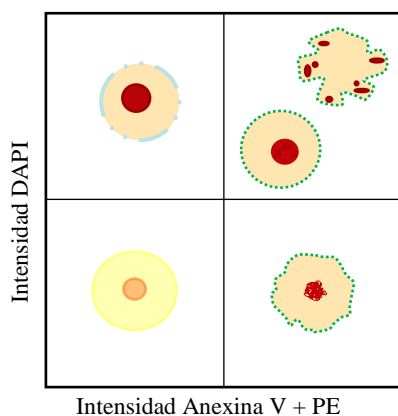


Figura 14. Esquema de un histograma biparamétrico del citómetro sobre apoptosis y muerte celular (figura de la autora).

En la figura 15 se observa un histograma biparamétrico del citómetro con una muestra control de queratinocitos HaCaT. En el cuadrante inferior izquierdo se representan las células vivas (97,8%). En el cuadrante inferior derecho las apoptóticas tempranas (0,28%). En el cuadrante superior izquierdo las muertas (0,16%). Y en el cuadrante superior derecho las apoptóticas tardías y necroptóticas (APO 5 1,76%).

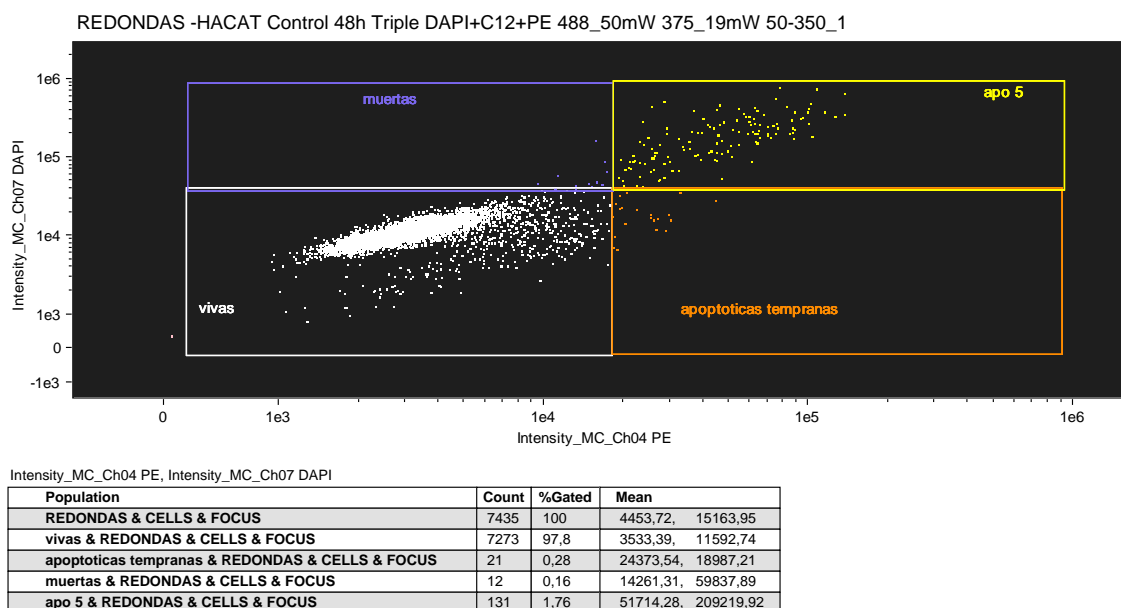


Figura 15. Ejemplo de histograma biparamétrico del citómetro. Muestra control de queratinocitos HaCaT.

A partir del histograma previo se amplía la información del cuadrante superior derecho y se analizan las poblaciones celulares según su morfología (figura 16). En abscisas se visualizan las células necroptóticas (núcleo prácticamente intacto, membrana celular rota unida a Anexina V) y en ordenadas las apoptóticas tardías (membranas nucleares y celulares rotas).

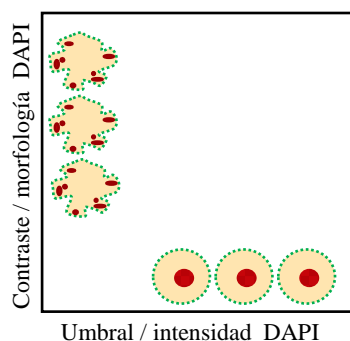


Figura 16. Esquema de un histograma biparamétrico del citómetro sobre la morfología en células apoptóticas y necroptóticas (figura de la autora).

La figura 17 es un ejemplo de un histograma biparamétrico del citómetro con una muestra de queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada 3000  $\mu\text{M}$  durante 1 hora. Para diferenciar la morfología de las células únicamente se representa el fluorocromo que tiñe el núcleo (yoduro de propidio o DAPI). En el eje de abscisas se representa el contraste y en ordenadas la intensidad de la fluorescencia. De esta manera se puede distinguir si el núcleo está intacto, granulado o fragmentado. Las necroptóticas tienen el núcleo sin fragmentar, mientras que en las apoptóticas tardías el ADN se encuentra roto.

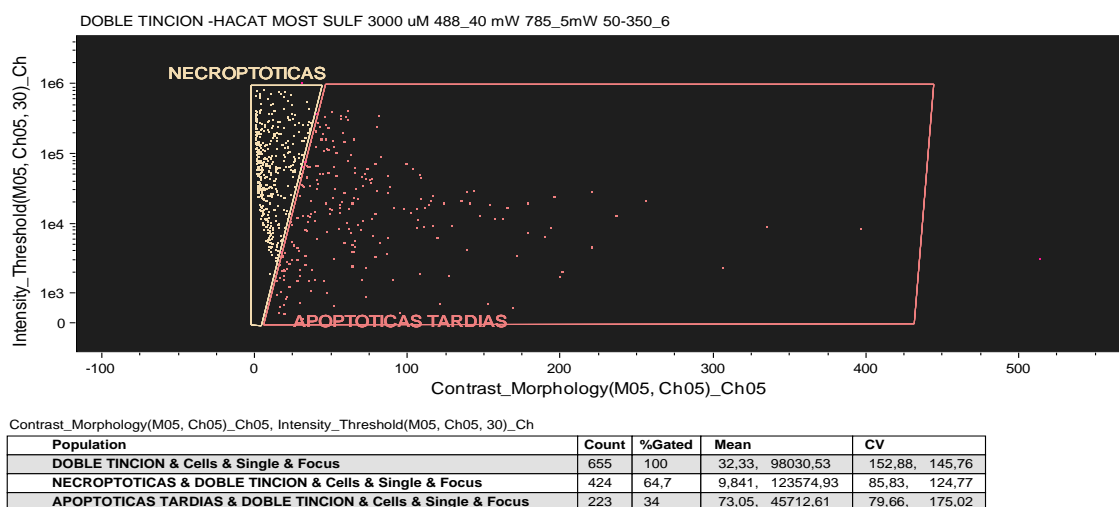


Figura 17. Ejemplo de un histograma biparamétrico del citómetro. Muestra de queratinocitos HaCaT expuestos a mostaza sulfurada 3000  $\mu\text{M}$  durante 1 hora.

La figura 18 son fotografías de fibroblastos y queratinocitos HaCaT que se han analizado en el citómetro de imagen AMNIS<sup>®</sup>, enfocados con el objetivo de 40 aumentos del microscopio confocal. Para la fotografía se han seleccionado en el citómetro los canales (*Channel*) 1 (*brightfield* o campo claro), 2 (525 nm), 4 (560 nm) y 7 (360 nm).

- (a) Células vivas: No se han teñido con ningún fluorocromo. Pueden distinguirse la membrana íntegra y la granulosidad de la célula.
- (b) Apoptóticas tempranas: ADN teñido con anexina + ficoeritrina (canal 4) en color naranja y la membrana celular comienza a dañarse.
- (c) Necroptóticas: Doble tinción, ya que el ADN no está fragmentado pero se tiñe con DAPI (canal 7) en color azul/violeta y la membrana celular perforada se tiñe con anexina + ficoeritrina (canal 4). En este caso, la fila superior muestra una célula teñida con C<sub>12</sub> - FDG (canal 2) en color verde porque está senescente. Para los estudios de senescencia este tipo de células no se han contabilizado porque sólo interesan las células vivas (no en proceso de muerte celular programada).
- (d) Apoptóticas tardías: También son doble tinción porque la membrana celular perforada se tiñe con anexina + ficoeritrina (canal 4) y el núcleo desestructurado se tiñe con DAPI (canal 7).
- (e) Necróticas: Membrana celular rota pero sin invertir (no es muerte celular programada), por lo que sólo se tiñe el ADN con DAPI.
- (f) Senescentes: Se mide la SA- $\beta$ -Gal de los lisosomas teñida con el fluorocromo C<sub>12</sub> – FDG (canal 2) en color verde. Para el estudio de la senescencia de esta tesis se han seleccionado este tipo de células por no haber iniciado ningún proceso de apoptosis o necrosis.

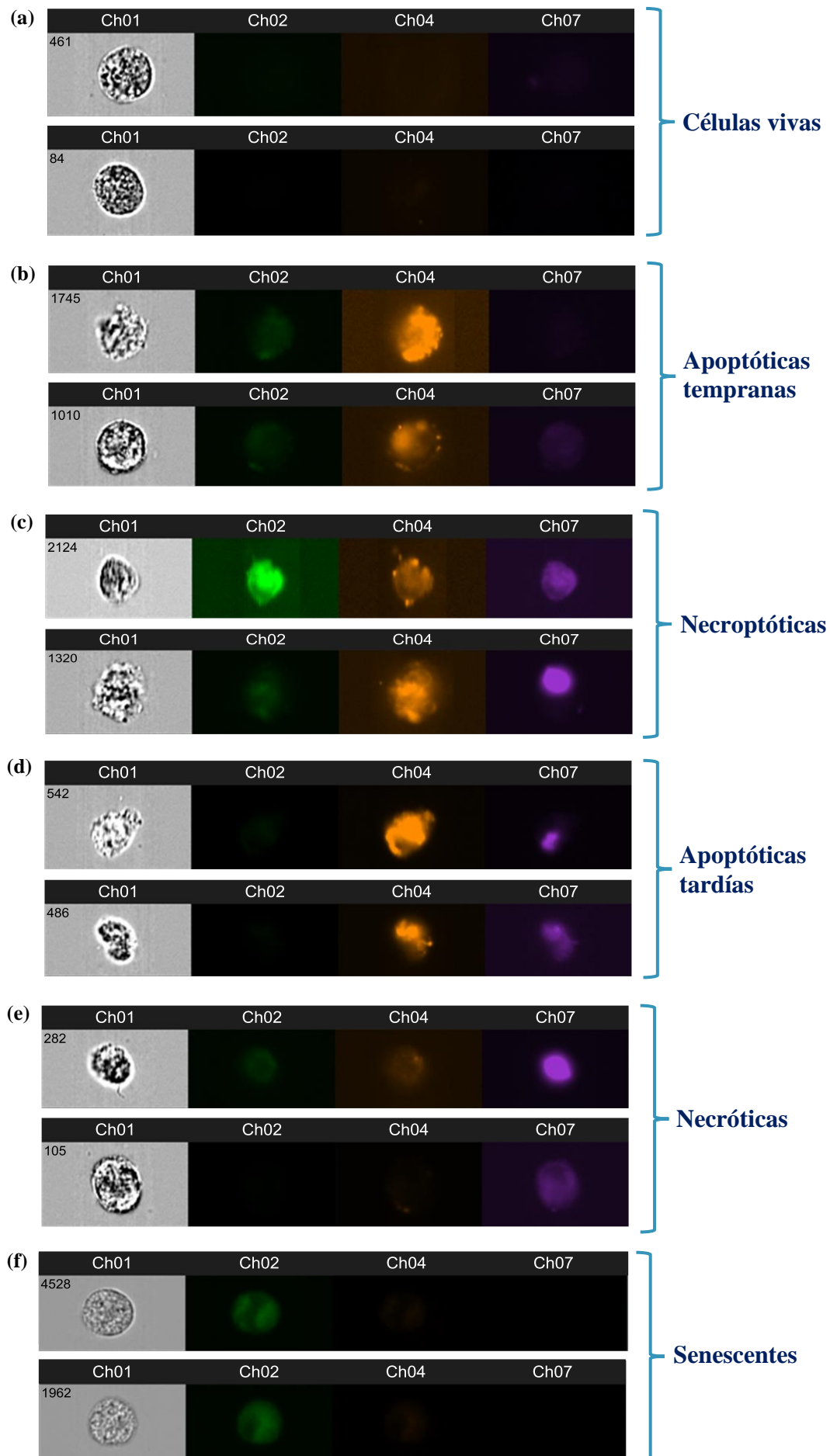


Figura 18. Células fotografiadas con el citómetro AMNIS®. (a) Células vivas. (b) Apoptóticas tempranas. (c) Necroptóticas. (d) Apoptóticas tardías. (e) Necróticas. (f) Senescentes.

La técnica para cuantificación de apoptosis y necrosis por citometría de flujo fue descrita en 2015 en el *Journal of Immunological Methods* por el grupo de investigación de Pietkiewicz. Utilizaban un citómetro de flujo clásico y para cuantificar la apoptosis teñían las células con Anexina V unida a FITC, mientras que las células necróticas se marcaban con yoduro de propidio. En los histogramas biparamétricos se teñían las células con verde (Anexina V) y rojo (FITC). La población teñida con ambos colorantes no definía las poblaciones celulares porque únicamente se representaban puntos rojos y verdes (Pietkiewicz et al., 2015). El citómetro de imagen AMNIS<sup>®</sup> no aporta puntos, sino que se ve una fotografía de la célula distinguiéndose la localización celular de la tinción (núcleo rojo, membrana celular verde en apoptosis). En esta tesis doctoral se ha usado DAPI en lugar de IP, así como PE (*Phycoerythrin* o ficoeritrina) en lugar de FITC.

Las aplicaciones científicas de la citometría de flujo combinada con inmunofluorescencia aportan mucha sensibilidad sobre el daño celular y la apoptosis. Una investigación llevada a cabo sobre el Síndrome de progeria atípico (que incluía el Síndrome de Werner atípico, un envejecimiento precoz que cursa con cataratas juveniles bilaterales y cambios esclerodermiformes cutáneos) en un modelo *in vitro* con fibroblastos se determinó que el estrés oxidativo y la radiación ultravioleta A generaban mutaciones en el gen lamina A (progerina) de los fibroblastos, causando un envejecimiento prematuro. Mediante citometría se comprobó que aumentaban las células apoptóticas tempranas y especies reactivas de oxígeno intracelular, induciendo un aumento de apoptosis y necrosis (Motegi et al., 2016).

Otro estudio de Noppe combina senescencia y citometría mediante la determinación de la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal en fibroblastos para diferenciar las diferentes poblaciones celulares. Se comprobó que los fibroblastos más viejos expresaban mayor actividad de la SA- $\beta$ -Gal según los diferentes grados de senescencia (Noppe et al., 2009).

*Muerte celular y apoptosis*

La muerte celular puede producirse por dos vías: apoptosis y necrosis (tabla 6). La necrosis celular es un proceso desordenado e independiente de energía con cambios irreversibles en el núcleo (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática. Se produce disfunción mitocondrial, aumento del volumen celular y desencadena citólisis para a continuación liberar todo el contenido citoplasmático al exterior, originando inflamación y necrosis del tejido afecto.

La apoptosis en cambio se produce de forma ordenada sin liberar el material celular al exterior, ya que se encapsula para que lo eliminen otras células mediante fagocitosis. Según Elmore se trata de “un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas denominadas ‘caspasas’ (*cysteiny aspartate-specific proteases*) y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula” (Elmore, 2007). Durante la apoptosis se producen múltiples interacciones proteicas (entrecruzamientos, roturas, síntesis, degradación) y un reordenamiento de las estructuras celulares. Esto implica un aumento del consumo de energía por parte de la célula hasta que se degrada y puede ser “reciclada” por parte de otras células. La iniciación de la apoptosis se puede producir de dos maneras: la vía de señalización intrínseca o la extrínseca.

Características	APOPTOSIS	NECROSIS
Número de células	Células individuales o pequeños grupos de células	Generalmente grandes cantidades
Volumen celular	Encogimiento celular	Hinchamiento celular, citólisis
Efecto en la integridad de la membrana plasmática	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
Efecto en el citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
Efecto en el núcleo	Condensación de la cromatina (picnosis)	Fragmentación del núcleo y la cromatina
Procesos de inflamación tisular	No hay presencia de inflamación	Generalmente inflamación presente

Tabla 6. Principales diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis (Martínez Salazar, 2009).

En el caso de la vía de señalización extrínseca hará falta la interacción de varias citoquinas con sus receptores transmembranales: el TNF (factor de necrosis tumoral) que se unirá al receptor de TNF, el TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) que a su vez se unirá a los receptores DR4 (*Death Receptor-4*) y el FasL (*Fatty acid synthase Ligand*) unido al FasR (*Fatty acid synthase Receptor*). La asociación de dichas citoquinas acabará activando las caspasas iniciadoras y a continuación las caspasas ejecutoras de la apoptosis.

La vía de señalización intrínseca depende de estímulos intracelulares principalmente a nivel mitocondrial para liberar al citosol sustancias pro apoptóticas: citocromo C, Smac (Segundo activador derivado de la mitocondria activador de caspasas)/DIABLO (*Direct IAP-binding protein with low pI*) y serín-proteasa HtrA2/Omi. Su liberación también activará la vía de las caspasas. En el núcleo se producirá fragmentación del ADN. En la superficie de la membrana plasmática se expresarán marcadores de apoptosis como la fosfatidilserina (excelente biomarcador de apoptosis ya que en condiciones normales se encuentra en el citoplasma pero durante la apoptosis se localiza en la membrana celular), ofreciendo un mecanismo de reconocimiento para las células fagocíticas (Martínez Salazar, 2009).

# Planteamiento

---





## Planteamiento

Los gases mostaza son agentes sintéticos altamente tóxicos que se han utilizado con fines bélicos en los siglos XX y XXI. Se trata de sustancias vesicantes que se absorben principalmente a través de la piel y mucosas produciendo ampollas, edema, irritación, ulceraciones y quemaduras, aunque también pueden penetrar en el organismo a través de la conjuntiva y por vía respiratoria. Para su mecanismo de acción se ha sugerido la producción de especies reactivas de oxígeno que ocasionan la alquilación de diversos componentes celulares, incluido el ADN, además de mecanismos inflamatorios y mutaciones en el material genético que terminan alterando la división celular y en última instancia, la muerte celular. Cabe destacar que la acción antiproliferativa de las mostazas ha permitido que en la actualidad se utilicen con fines terapéuticos para tratamientos oncológicos. Su implicación en el estrés oxidativo y la liberación de radicales libres ha sido el objeto a estudio de esta tesis doctoral.

Dada la implicación de los radicales libres en el mecanismo de acción de la mostaza sulfurada y nitrogenada, en este trabajo se ha propuesto estudiar los efectos protectores de las sustancias quercetina y vitamina C por ser potentes anti radicales libres con efectos en líquidos extracelulares, citoplasmáticos e incluso nucleares en el caso de la quercetina. Para ello se han puesto en marcha modelos celulares de cultivos primarios de fibroblastos humanos y queratinocitos HaCaT por tratarse de células clave en la principal puerta de entrada de este tóxico.

Los agentes protectores que se han estudiado contra las mostazas han sido la quercetina (flavonoide con capacidad antioxidante y barredor de radicales libres debido a sus características estructurales, moleculares y conformacionales) y la vitamina C (molécula hidrofílica con potente acción antioxidante que también destaca por ser un excelente barredor de radicales libres). La quercetina puede encontrarse en altas concentraciones como metabolito secundario en frutas, verduras y algunos alimentos manufacturados como el vino tinto o el aceite de oliva. Es necesaria una aportación externa mínima de 100 mg al día de vitamina C (en forma de ácido ascórbico o ácido dehidroascórbico) ya que el humano no es capaz de sintetizarla por sí mismo.

Nuestra investigación estudia así mismo, los efectos de la mostaza sulfurada y nitrogenada en la senescencia, un proceso celular que se define como la detención irreversible de la división celular que se asocia al envejecimiento de los seres vivos con

cambios moleculares, metabólicos y morfológicos que pueden observarse tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Aunque las células senescentes no puedan replicarse continúan siendo metabólicamente activas e interfieren con las células de su entorno y la matriz. El acúmulo de células senescentes en los diferentes tejidos del organismo se relaciona con la progresión de patologías relacionadas con la edad.

# Hipótesis y objetivos



## Hipótesis y objetivos

### **HIPÓTESIS**

Tras una revisión bibliográfica sistemática podemos elaborar una serie de reflexiones de las que deriva la hipótesis de esta tesis doctoral que se centra en que las sustancias anti radicales libres muy permeables a través de las membranas celulares previenen y atenúan el daño, disminuyendo la mortalidad provocada por la mostaza sulfurada y nitrogenada.

### **OBJETIVOS:**

#### *Principal*

Analizar la toxicidad aguda de la mostaza sulfurada y nitrogenada a nivel celular, utilizando un modelo de fibroblastos humanos y cultivos celulares de queratinocitos HaCaT, ensayando posibles sustancias protectoras como quercetina y vitamina C.

#### *Parciales*

- Evaluar y medir la toxicidad de la mostaza sulfurada y nitrogenada sobre fibroblastos humanos y cultivos celulares de queratinocitos HaCaT.
- Cuantificar el posible efecto protector preventivo de la quercetina en fibroblastos y queratinocitos HaCaT expuestos a mostaza sulfurada y nitrogenada.
- Determinar los efectos protectores de la vitamina C en el mismo tipo de células expuestas a los mismos tóxicos.
- Estudiar el efecto simultáneo de ambas sustancias (quercetina y vitamina C) para comprobar si se potencian entre sí y dan mayor grado de protección frente a los tóxicos.
- Estudiar los efectos de la quercetina y vitamina C sobre los diversos tipos de muerte celular inducidos por mostaza sulfurada y nitrogenada.
- Diseñar un nuevo protocolo de estudio de senescencia celular asociada a la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal utilizando el fluorocromo C<sub>12</sub>-FDG y cuantificándolo en células vivas por citometría de imagen.
- Estudiar los efectos de la mostaza sulfurada y nitrogenada sobre la senescencia celular.



# Material y métodos

---





## Material y métodos

### **MATERIAL:**

#### *Biológico*

El uso de cultivos *in vitro* de células animales y humanas constituye un modelo experimental eficaz cuando se realiza bajo estándares de calidad y manteniendo la rigurosidad del método científico. La puesta en marcha del cultivo se hace a partir de **fibroblastos dérmicos** procedentes de cultivos primarios de piel humana que se conservan congelados a -80 °C en nitrógeno líquido dentro de criotubos con un 90% de suero fetal bovino (SFB) como nutriente y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) como crioconservante de las membranas celulares. Los fibroblastos son las células fundamentales de la dermis y tejidos conectivos. Sintetizan diferentes tipos de fibras (colágeno, elastina y reticulina) y producen sustancia fundamental (proteínas donde se fijan sales minerales dando lugar a un gel de ácido hialurónico, proteoglicanos y glicoproteínas) permitiendo de este modo el mantenimiento de la matriz extracelular. Los fibroblastos son células muy activas con morfología heterogénea de huso o estrellada, dotados de un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado encargado de sintetizar las moléculas precursoras de las fibras conectivas (Saalbach et al., 1996). Además, se pueden encontrar fibrocitos de tamaño más pequeño, con una capacidad de secreción relativamente baja, desprovistos de actividad metabólica y localizados en los tejidos conectivos maduros. Los fibroclastos en cambio tienen la capacidad de fagocitar colágeno. Los miofibroblastos actúan en la cicatrización y mediante microscopía electrónica se pueden visualizar en su interior miofilamentos, actina muscular lisa y desmina (Eyden, 2001).

El otro sustrato celular utilizado es una línea continua de **queratinocitos humanos HaCaT** que se transforma espontáneamente en línea celular de queratinocitos inmortales aneuploides (número de cromosomas anormal). Los queratinocitos conforman el 90-95% de las células de la epidermis y se distribuyen en diferentes estratos que varían según la zona del cuerpo. Se forman a partir de células madre de la capa basal y durante su migración hacia capas más superficiales se van diferenciando hasta su eliminación a los 30 días (Ishida-Yamamoto and Iizuka, 1998). Su morfología varía dependiendo de la capa epidérmica en la que se encuentra. En la capa basal tienen forma cúbica o columnar,

citoplasma basófilo y núcleo grande, alineándose de forma perpendicular a la membrana basal a la que se anclan a través de hemidesmosomas. Cuando se encuentran en la capa espinosa son más grandes, poligonales, con citoplasma eosinofílico y núcleo vesicular. En la capa granulosa se aplanan disponiéndose paralelamente a la piel y alargándose, presentando gránulos poligonales basófilos de queratohialina y queratina. En cambio, en la capa córnea se aplanan todavía más con forma hexagonal, adquieren tonalidad eosinófila, se desprenden de la superficie cutánea, núcleo y organelas citoplasmáticas para cumplir su función de barrera pasando a llamarse corneocitos.

*Reactivos para cultivo celular:*

- a. **Anfotericina B:** 250 µg/mL. Fungizone®, Gibco BRL®, n° ref. 043-05290D, 20 mL. Antibiótico y antifúngico utilizado para preservar el medio de cultivo DMEM.
- b. **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 4.5 g bajo en glucosa (1000 mg/L *Glucose*, 4.00 mM *L-Glutamine*, 110 mg/L *Sodium Pyruvate*), Cultek®, n° ref. H3BE12-604F, 500 mL. Medio de cultivo que permite el mantenimiento de las células promoviendo su desarrollo y actuando también como sistema tampón que permite el control del pH gracias a la fenolftaleína de color rosa (pH = 7,4) que en condiciones de pH ácido (pH = 6) vira hacia color amarillo y en pH alcalino (pH = 8) se torna azul o violeta. En los experimentos se utilizó medio DMEM enriquecido.
- c. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. Merck®, n° ref. 200-664-3, 100 mL. Líquido orgánico incoloro utilizado para disolver los cristales de formazán del reactivo MTT y como conservante para las células congeladas en nitrógeno líquido.
- d. **Isopropanol:** CH<sub>3</sub>CHOHCH<sub>3</sub>. PM 60,10 g/mol. PanReac®, AppliChem, n° ref. 131090.1214. Alcohol, disolvente orgánico utilizado en la técnica con MTT y reactivo del citómetro AMNIS®.
- e. **Mostaza nitrogenada:** Bis (2-cloroetil) amina clorhidrato. C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N-HCl. PM 178,49 g/mol. Sigma-Aldrich®, n° ref. B38503-25G, Lote S38713V. Reactivo en polvo. Al tratarse de una sustancia tóxica irritante, el manejo del reactivo requiere EPI y cabina de seguridad.
- f. **Mostaza sulfurada:** Bis (2-Cloroetil) sulfuro. C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>ClS. PM 124,63 g/mol. Sigma-Aldrich®, n° ref. 242640-5G, Lote MKBR5494V. Ficha técnica: compuesto carcinógeno de primera categoría, mutagénico en células germinales. Estado líquido, color amarillo pálido casi incoloro. Pureza 97,5%. Densidad relativa: 1,07 g/cm<sup>3</sup> a 25 °C. Conservar refrigerado entre 2 y 8 °C. La Comunidad Europea lo clasifica como líquido inflamable de categoría 3 con punto de inflamabilidad a 52 °C, corrosivo en metales, piel (categoría 1B) y ojos. Al tratarse de una sustancia tóxica irritante, el manejo del reactivo requiere EPI y cabina de seguridad.

- g. **MTT:** *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*. Sigma<sup>®</sup>, n°. Ref. M5655-1G. Sal de tetrazolio soluble en agua de color amarillo que permite medir proliferación y viabilidad celular. El MTT al reducirse se convierte en formazano de color púrpura e insoluble en agua (figura 19). Es un ensayo colorimétrico que permite medir viabilidad celular. Para su cuantificación se utilizan disolventes orgánicos como el DMSO o el isopropanol.

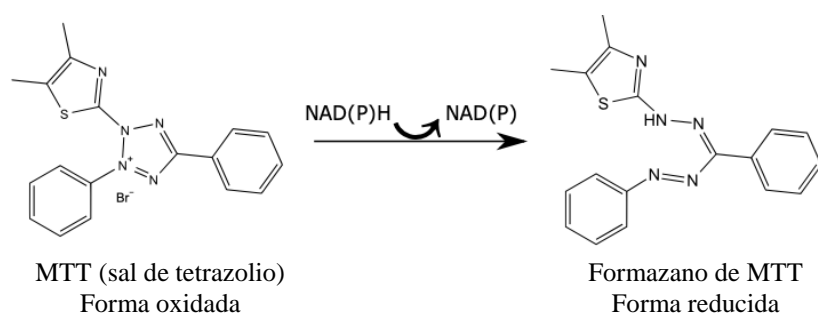


Figura 19. Acción de la coenzima NADP<sup>+</sup>.

- h. **Penicilina con estreptomina:** Penicilina 5,000 Unidades/mL, Estreptomina 5.000 µg/mL. Gibco BRL<sup>®</sup>, n° ref. 15070-063, 100 mL. Asociación antibiótica sinérgica de amplio espectro bactericida utilizada para la conservación del medio de cultivo DMEM.
- i. **RPMI: 1640:** D-Glucosa 2000 mg/L, Glutación 1 mg/L, *Rouge de Phénol* 5 mg/L. Biological industries<sup>®</sup>, n° ref. 01-100-1A, 500 mL. Medio de cultivo con gran cantidad de fosfatos, diseñado para ser utilizado en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.
- j. **PBS:** *Phosphate Buffered Saline*. Tampón fosfato salino estéril para cultivo celular. En este estudio se ha comprado específicamente sin calcio ni magnesio. Lonza BioWhittaker<sup>®</sup>, n° ref. BE17-516Q, 1 L. Su acción tampón permite regular el pH y al tener una osmolaridad similar al líquido extracelular de los mamíferos y ser isotónico es inocuo para las células.
- k. **SFB:** Suero fetal bovino. Cultek<sup>®</sup>, n° ref. 91S1810-500, 500 mL. Complemento para medios de cultivo que aporta bajo nivel de anticuerpos y contiene factores de crecimiento.
- l. **Tripsina con EDTA:** EDTA 200 mg/L, Tripsina 170.000 U/L. Lonza BioWhittaker<sup>®</sup>, n° ref. BE17-161E, 100 mL. Enzima de origen porcino empleada

para despegar células adheridas y romper uniones intercelulares. El EDTA, sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético, se utiliza como quelante de iones calcio y magnesio.

- m. **WST-1 Sal soluble de tetrazolio:** *Cell Proliferation Reagent WST-1*. Roche®, n° ref. 05015944001, 800 tests. También se ha utilizado WST-1, Sigma Aldrich®, n° ref. 11644807001, 25 mL. En células viables la enzima deshidrogenasa mitocondrial lo transforma en formazán (figura 20) que puede determinarse colorimétricamente mediante espectrofotometría de placas en color rojo oscuro (450 y 630 nm). Cuanto mayor es la proliferación, mayor es la actividad mitocondrial, resultando en una mayor hidrólisis del reactivo.

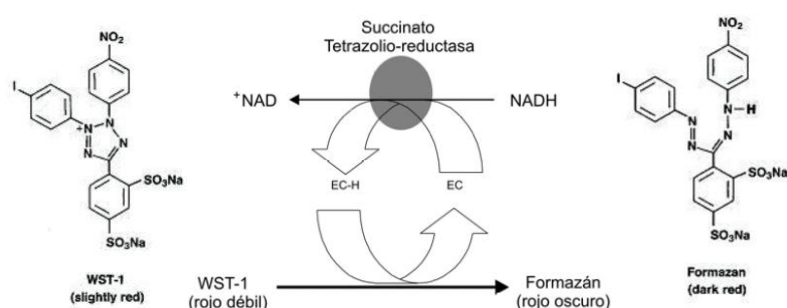


Figura 20. Acción de la enzima succinato tetrazolio-reductasa.

### Fluorocromos

Moléculas capaces de absorber energía en una longitud de onda específica (tabla 7) y volver a emitirla en una longitud de onda mayor (con menos energía). Casi todos los fluorocromos que se han utilizado se encuentran unidos a Anexina V, proteína celular utilizada en citometría de flujo para detectar células apoptóticas por su capacidad de unirse a fosfatidilserina. Los fluorocromos utilizados deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C, protegidos de la luz.

Radiación		Longitud de onda
<b>Ultravioleta</b>	Tipo C	100-280 nm
	Tipo B	280-315 nm
	Tipo A	315-400 nm
<b>Espectro visible</b>	Violeta	400-455 nm
	Azul	455-490 nm
	Verde	490-570 nm
	Amarillo	570-590 nm
	Naranja	590-620 nm
	Rojo	620-780 nm
<b>Infrarroja</b>	Tipo A	780-1400 nm
	Tipo B	1400-3000 nm
	Tipo C	3000 nm -1 mm

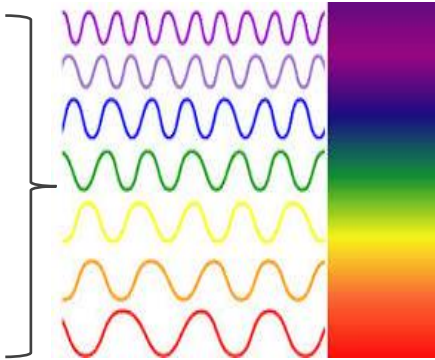


Tabla 7. Espectro electromagnético (tabla de la autora).

- a. **Anexina V con Alexa Fluor:** *Annexin V and Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 conjugate*, Thermo Fisher®, n° ref. A13201, 500 µL (figura 21). Fluorescencia verde. Método de detección de la externalización de la fosfatidilserina como indicador precoz de apoptosis. En la gráfica encontramos en abscisas la longitud de onda (nm), en ordenadas la intensidad relativa (%), la línea discontinua representa la curva de excitación, la línea continua la curva de emisión, el pico de excitación se sitúa a 488 nm y el pico de emisión a 520 nm (verde). Inicialmente se realizaron experimentos con este fluorocromo pero los resultados fueron confusos, por lo que se descartó su uso.

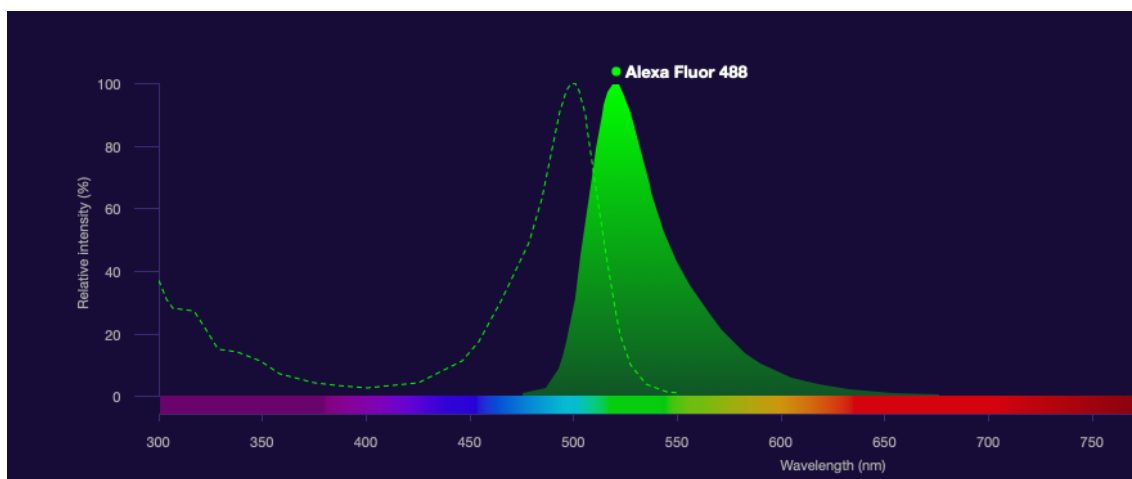


Figura 21. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo AlexaFluor 488.

- b. **Anexina V con FITC:** *Annexin V and FITC conjugate*, Thermo Fisher®, n° ref. A13199, 500  $\mu$ L (figura 22). Fluorescencia verde. Permite estudiar la externalización de la fosfatidilserina como indicador precoz de la apoptosis. En abscisas se representa la longitud de onda (nm), en ordenadas la intensidad relativa (%), la línea discontinua representa la curva de excitación, la línea continua es la curva de emisión, el pico de excitación se sitúa a 488 nm y el pico de emisión a 517 nm (verde).

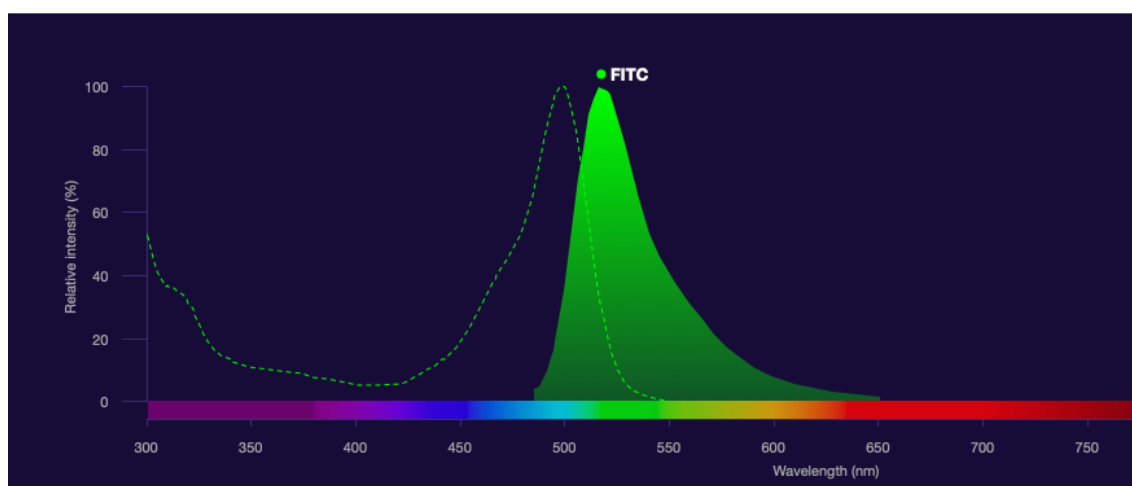


Figura 22. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo FITC.



- c. **Anexina V con Alexa Fluor<sup>TM</sup> + IP:** *Annexin V and PI* (Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 and Propidium Iodide), Thermo Fisher®, n° ref. V13241, 50 assays (figura 23). Así mismo también se ha utilizado Annexin V, *Apoptosis Detection Kit with PI*, BioLegend®, n° ref. 640914, 100 tests. Fluorescencia verde y roja. La Anexina V unida a Alexa Fluor<sup>TM</sup> detecta la apoptosis temprana y el yoduro de propidio la mortalidad. PM yoduro de propidio 668.4 g/mol. En abscisas se representa la longitud de onda (nm), en ordenadas la intensidad relativa (%), la línea discontinua es la curva de excitación la línea continua es la curva de emisión, los picos de excitación se encuentran a 305 y 500 nm y los picos de emisión a 619 y 675 nm (rojo).

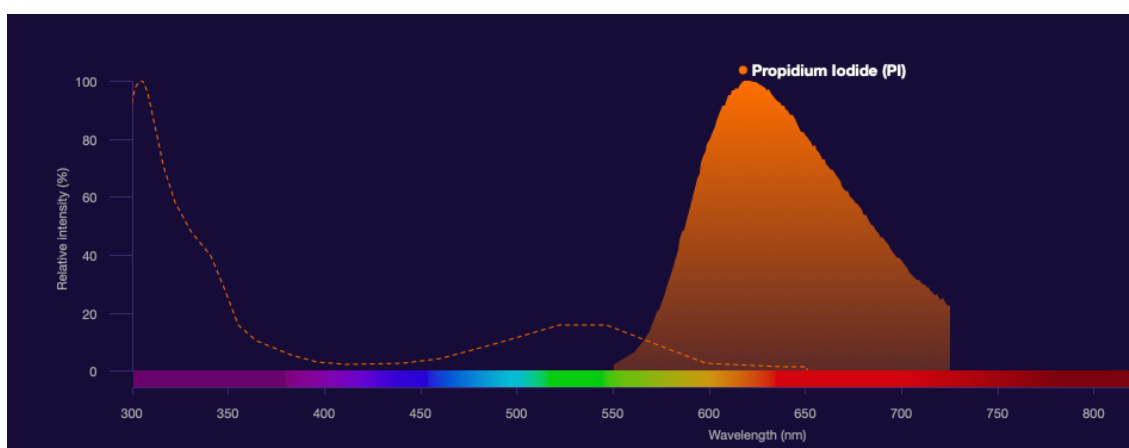


Figura 23. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo yoduro de propidio.

- d. **Anexina V con FITC + IP:** *Annexin V Dy634 Kit (Apoptosis detection kit)*, ImmunoStep®, n° ref. 681116, 100 tests (figura 24). Así mismo se ha utilizado otro kit de un laboratorio diferente, *FITC Annexin V (Apoptosis detection kit) with PI*, BioLegend®, n° ref. 640914, 100 tests. Fluorescencia verde y roja. La anexina V con FITC mide la apoptosis en fluorescencia verde y el yoduro de propidio mide la mortalidad celular en fluorescencia roja. En abscisas se representa la longitud de onda (nm), en ordenadas la intensidad relativa (%), la línea discontinua representa la curva de excitación, la línea continua la curva de emisión, el pico de excitación del FITC (verde) se sitúa a 488 nm y su pico de emisión a 517 nm (verde), los picos de excitación del yoduro de propidio (rojo) se sitúan a 305 y 500 nm y los picos de emisión a 619 y 675 nm (rojo).

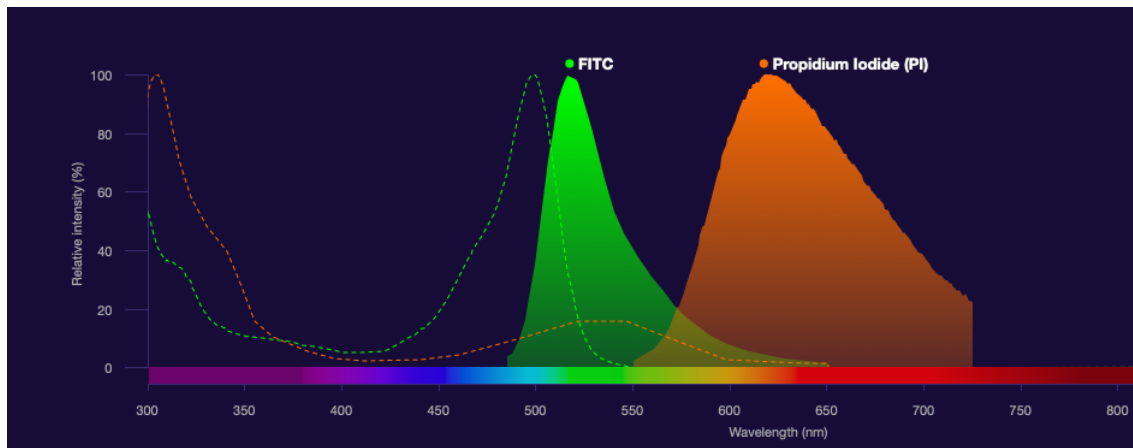


Figura 24. Espectro de excitación y emisión de los fluorocromos FITC y yoduro de propidio.

- e. **Anexina V con PE (Ficoeritrina) + 7-AAD:** *Annexin V and PE, Apoptosis Detection Kit with 7-AAD*, BioLegend®, n° ref. 640934, 100 tests (figura 25). Fluorescencia naranja. La anexina V se une a ficoeritrina y permite diferenciar células apoptóticas con fluorescencia amarilla a 590 nm y el 7-AAD identifica las células necróticas con fluorescencia roja a 650 nm (el colorante se acumula en el citoplasma). En abscisas se representa la longitud de onda (nm), en ordenadas la intensidad relativa (%), la línea discontinua es la curva de excitación, la línea continua es la curva de emisión, los picos de excitación de la Ficoeritrina (amarillo) se sitúan a 496 y 566 nm, el pico de emisión a 575 nm (amarillo), el pico de excitación del 7-ADD (rojo) se sitúa a 550 nm y el pico de emisión a 650 nm (rojo). Inicialmente se realizaron experimentos con este fluorocromo, pero los resultados fueron mejor con el yoduro de propidio, por lo que se descartó el uso del 7-ADD.

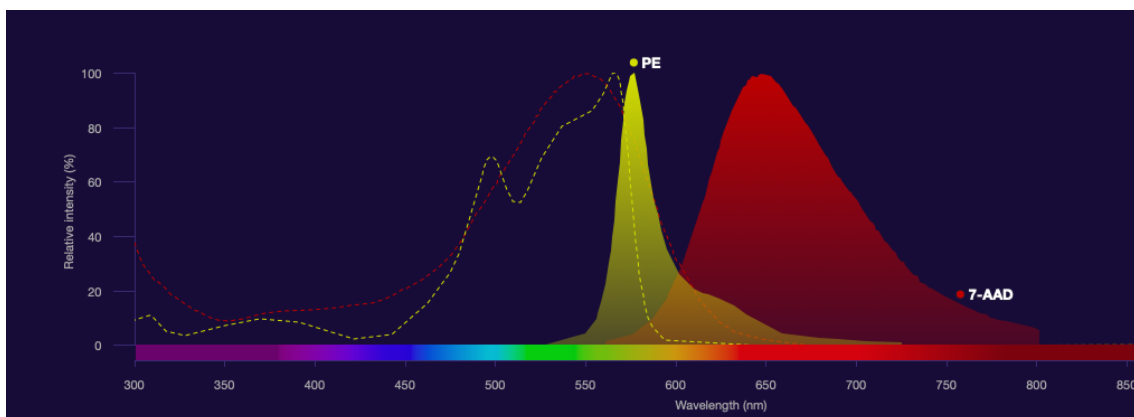


Figura 25. Espectro de excitación y emisión de los fluorocromos Ficoeritrina (PE) y 7-ADD.

- f. **DAPI** (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate): *DAPI*, BioLegend®, n° ref. 422801, liofilizado (en polvo) (figura 26).  $C_{16}H_{15}N_5$ . PM 277.324 g/mol. En abscisas se representa la longitud de onda (nm), en ordenadas la intensidad relativa (%), la línea discontinua representa la curva de excitación, la línea continua la curva de emisión, el pico de excitación del DAPI se sitúa a 355 nm (láser ultravioleta) y el pico de emisión a 360 nm (azul).

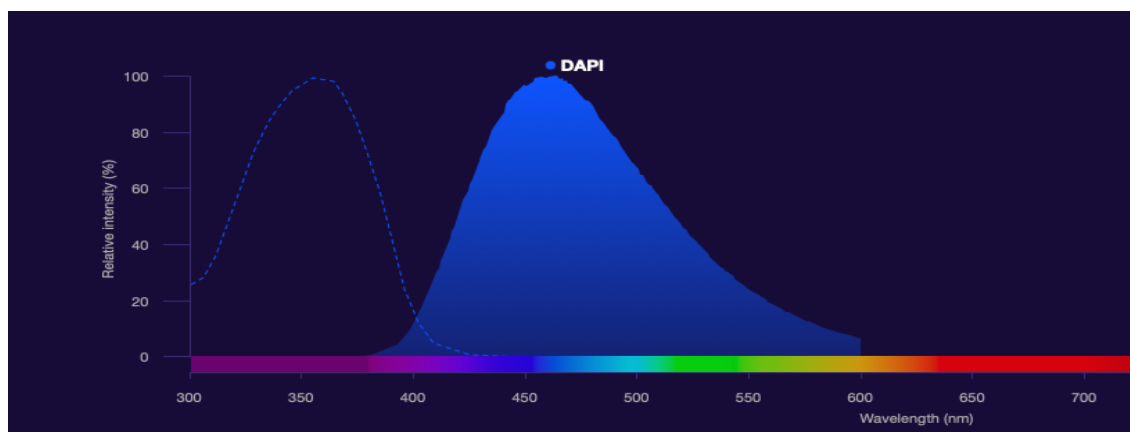


Figura 26. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo DAPI.

- g. **FDG**: Fluoresceín-di-β-D-galactopiranósido. Biosynth Carbosynth®, n° ref. ED03235, 5 mg (figura 27).  $C_{12}$ -FDG. PM 853,9 g/mol. Reactivo en polvo. Fluorescencia verde. Pico de excitación a 488 nm (láser ultravioleta), pico de emisión a 520 nm (verde).

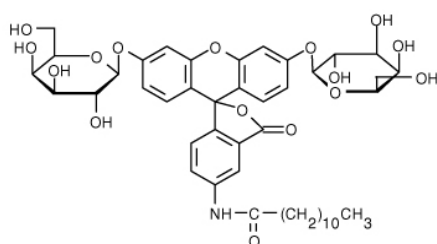


Figura 27. Estructura química del  $C_{12}$ -FDG.

Molécula permeable a la membrana e hidrolizable por acción de la SA-β-Gal, enzima que se encuentra en mayor cantidad en las células senescentes (lisosomas). Al hidrolizarse y excitarse con el láser emite fluorescencia verde proporcional a la actividad enzimática y detectable por espectrofotometría.

## Equipos

- a. **Agitador de mezclas Vortex, Heidolph®, Reax top:** Permite agitar tubos de ensayo evitando el deslizamiento (figura 28 a).
- b. **Agitador orbital, Optic Ivymen System®:** Permite un mezclado estable y continuo durante varios días con control de temperatura (figura 28 b).
- c. **Balanza electrónica, AND®, HR-120:** Permite pesar hasta 120 g con una resolución de 0,0001 g (figura 28 c).

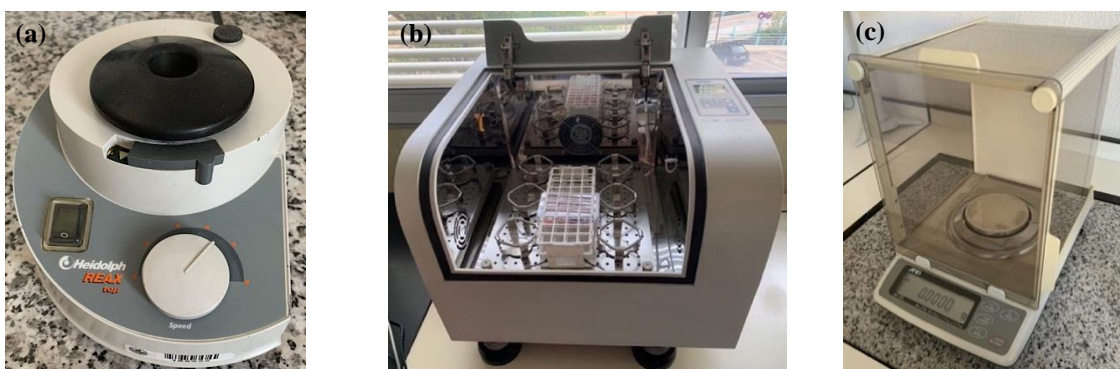


Figura 28. (a) Agitador de mezclas Vortex, Heidolph®. (b) Agitador orbital, Optic Ivymen System®. (c) Balanza electrónica, AND®.

- d. **Baño termostático, JP Selecta®, Unitronic Or:** Permite mantener las células a temperatura constante (figura 29 a).
- e. **Cabina de seguridad microbiológica clase II, Telstar®, Bio-II-A:** En cumplimiento con la norma europea EN 12469 sobre cabinas de seguridad microbiológica, garantiza trabajar con tóxicos de forma segura (figura 29 b).
- f. **Centrífuga, Eppendorf®, 5810R** (figura 29 c).



Figura 29. (a) Baño termostático, JP Selecta®. (b) Cabina de seguridad clase II, Telstar®. (c) Centrífuga, Eppendorf®.

- g. **Citómetro de imagen, AMNIS<sup>®</sup>, ImageStream X** (figura 30): Permite el seguimiento electrónico de células en movimiento (citometría de flujo) que combinado con un sistema de microscopía confocal (lentes de 20, 40 y 60 aumentos) caracteriza morfológicamente las células conforme van pasando por delante de los láseres obteniendo, hasta doce fotografías de cada célula.



Figura 30. Citómetro de imagen, AMNIS<sup>®</sup>, SAI Citómica, Universidad de Zaragoza. (a) Fotografía del aparato. (b) Cámara de flujo con los tres objetivos del microscopio confocal (20, 40 y 60 aumentos). (c) Láseres de 785, 658, 488 y 375 nm.

- h. **Espectrofotómetro de microplacas termostatzado, BioTeK<sup>®</sup>, EonTM** (figura 31 a): Microplacas de 6, 12 ó 96 pocillos según la necesidad del experimento. Permite medir la absorbancia con longitud de onda comprendida entre 200 y 900 nm (los trabajos realizados se han utilizado preferentemente a 450 y 630 nm). Permite variaciones de 1 nm y control de temperatura.
- i. **Estufa de cultivo, Binder<sup>®</sup>** (figura 31 b): Para mantenimiento de cultivos celulares a temperatura de 37 °C y con aporte de CO<sub>2</sub> al 5%.



- j. **Microscopio de contraste de fases, Nikon<sup>®</sup>, Eclipse TE2000** (figura 32 a): Permite visualizar los frascos de cultivo con mayor comodidad con objetivos de 10, 20, 40 y 100 aumentos.

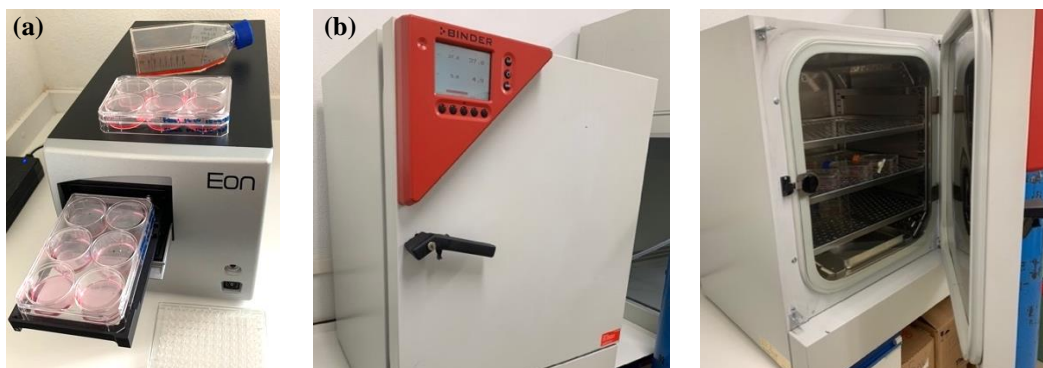


Figura 31. (a) Espectrofotómetro de microplacas, BioTeK<sup>®</sup>. (b) Estufa de cultivo, Binder<sup>®</sup>.

- k. **pHmetro, Crison<sup>®</sup>, micropH 2002** (figura 32 b): Permite la medición del pH de las disoluciones con una resolución de 0,01 pH.

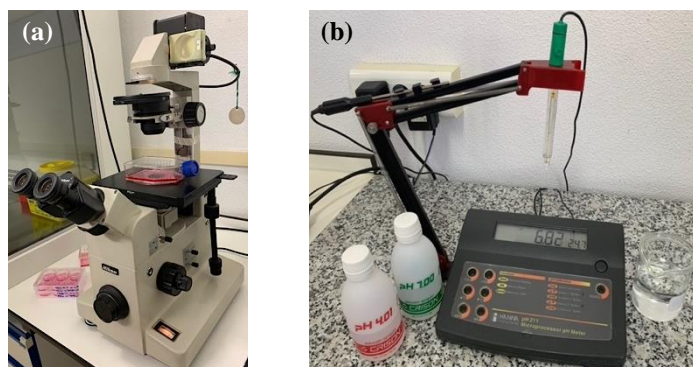


Figura 32. (a) Microscopio de contraste de fases, Nikon<sup>®</sup>. (b) pHmetro, Crison<sup>®</sup>

### Material fungible

- a. **Tubos de ensayo** (figura 33 a): Diferentes tipos, capacidades y marcas (Eppendorf®, Falcon®).
- b. **Frascos para conservación de cultivos celulares, Falcon® y Nunc®** (figura 33 b): Capacidad de 25 cm<sup>2</sup> (50 mL) y 75 cm<sup>2</sup> (250 mL).
- c. **Placas de cultivo, Corning Incorporated®, Falcon® y Thermo Scientific®** (figura 33 c): 6, 12 y 96 pocillos.

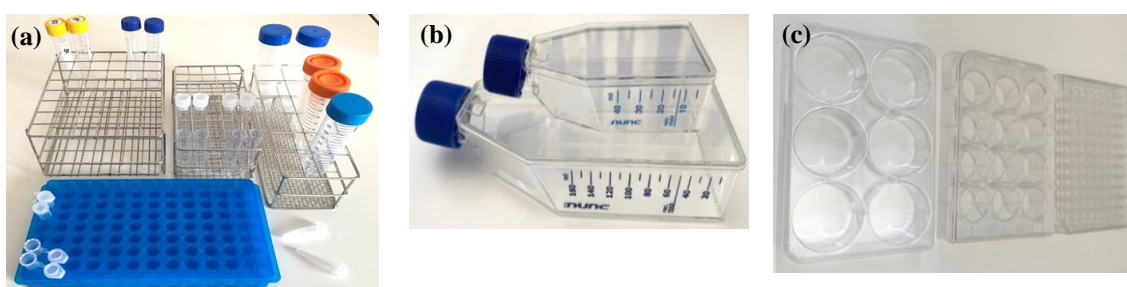


Figura 33. (a) Tubos de ensayo. (b) Frascos de cultivo. (c) Placas de 6, 12 y 96 pocillos

- d. **Micro pipetas automáticas, Labnet® y Gilson®**: 2, 20, 200, 1000 y 5000 µL (figura 34 a).
- e. **Pipetas multicanal, Rainin®, Pipet-Lite™ XLS™**: Pipetas de 8 canales de 1-10 y de 20-200 µL (figura 34 b).
- f. **Puntas de pipetas de precisión desechables, Gilson® (micropipetas) y Rainin®(multicanal)**: Para micropipetas automáticas puntas de 5, 10 y 25 mL. Para pipetas multicanal puntas LTS BioCleanUltra™ de 1-20 y 20-200 µL (figura 34 c).

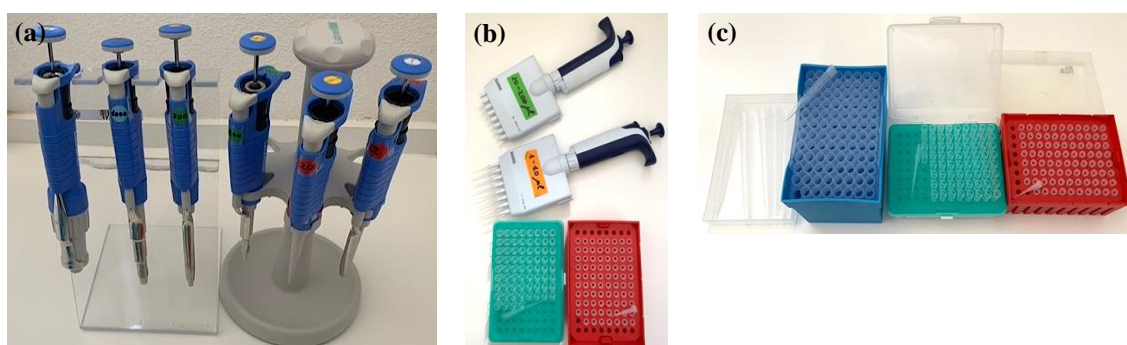


Figura 34. (a) Micro pipetas automáticas, Labnet®. (b) Pipetas multicanal, Rainin®. (c) Puntas de pipetas

## MÉTODOS:

El estudio se inició con una **búsqueda bibliográfica sistemática** de documentos, revisiones y estudios científicos sobre la mostaza sulfurada y nitrogenada, quercetina, vitamina C y senescencia. Las bases de datos utilizadas incluyen Medline (Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos), Biblioteca Cochrane (base de datos sobre ensayos clínicos controlados en medicina y ciencias de la salud) y Scielo (revistas científicas latinoamericanas y españolas sobre ciencias de la salud). Los tesauros utilizados fueron: *mustard gas*, *quercetin*, *flavonoids*, *antioxidant*, *vitamin C*, *ascorbic acid*, *senescence* y *apoptosis*. Además, se analizaron las referencias bibliográficas de algunos artículos para completar la búsqueda con otros estudios en esa área. Se han incluido artículos cuyo título y *abstract* se adecuaba al tema a estudio, encontrándose la mayoría en inglés y alguno en castellano. En la búsqueda se excluyeron artículos con antigüedad superior a 23 años a excepción de 3 artículos por interés histórico. Finalmente se utilizaron 94 artículos sobre mostazas, 88 artículos sobre quercetina, 40 artículos sobre senescencia, 15 artículos sobre vitamina C y 3 de miscelánea, sumando un total de 240 artículos. Se ha utilizado el gestor bibliográfico **EndNote** (versión X9.3.3), organizando las referencias mediante el estilo Harvard que emplea el sistema “(autor, año)” a lo largo del cuerpo del texto sin notas a pie de página.

El **análisis estadístico** se ha realizado mediante los programas Microsoft Excel®. Los gráficos también han sido diseñados mediante el programa Microsoft Excel®. En cada apartado se ha realizado un análisis descriptivo obteniendo la media y desviación estándar de cada grupo. Posteriormente, se ha aplicado la prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar el ajuste de las distribuciones, verificando que las variables siguiesen la normalidad en la distribución. En caso de no seguir la normalidad se ha aplicado la prueba de la U de Mann-Whitney, valorando las diferencias estadísticas significativas de dos muestras cuantitativas con distribución no paramétrica. Cuando el análisis ha implicado tres o más muestras se ha aplicado la prueba de Kruskal-Wallis para comprobar si algún grupo de datos provenía de la misma población y, a continuación, la U de Mann-Whitney en cada pareja de muestras. El nivel de significación estadística (*p*) en todas las hipótesis de trabajo ha sido 0,05.

Los experimentos se han repetido tres o más veces. A continuación, se reflejan los principales **protocolos** que se han llevado a cabo en el laboratorio.



### *Protocolo de descongelación de fibroblastos dérmicos para cultivo celular*

- 1) Colocar los criotubos al baño María a 37 °C. Tras 2 ó 3 minutos se logra que pasen a fase líquida.
  - 2) Centrifugar a 800 rpm durante 3 minutos.
  - 3) Eliminar el sobrenadante que contiene DMSO (tóxico para el crecimiento celular).
  - 4) Recoger el *pellet* celular con pipeta automática e introducir en un frasco de cultivo con medio DMEM enriquecido (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 4,5 g bajo en glucosa, el bote del fabricante contiene 500 mL).
- DMEM enriquecido: Añadirle un 10% de SFB (50 mL) + 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (5 mL) + 1% de antifúngico anfotericina B (5 mL).

### *Mantenimiento del cultivo celular:*

Las células provienen de un cultivo de fibroblastos primarios (células indiferenciadas con cariotipo original no modificado, supervivencia aproximada de varios meses) y una línea celular de queratinocitos HaCaT que se preservan en frascos con superficie de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup>.

Los fibroblastos se pueden mantener con medio de cultivo DMEM enriquecido o RPMI y los queratinocitos HaCaT se mantienen mejor con medio RPMI. Se han cultivado en una estufa de cultivo Binder® a 37 °C con gas carbógeno (5% de CO<sub>2</sub> + 95% de O<sub>2</sub>).

Cuando alcanzan un 90-95% de confluencia celular se procede a tripsinizar para subcultivar según la necesidad de muestras: nuevos frascos de cultivo, placas de 6 pocillos (2 mL/pocillo), 12 pocillos (1 mL/pocillo) ó 96 pocillos (100 µL/pocillo). En caso de tiempos prolongados entre experimentos las células se congelan a -80 °C o en nitrógeno líquido, en un medio para congelación con 90% de SFB y 10% de DMSO.

*Protocolo de tripsinización:* Permite la separación celular.

- 1) Retirar con la pipeta estéril el medio de cultivo para evitar que sus proteínas bloqueen la tripsina.
- 2) Lavar las células con PBS (2 minutos). Eliminar el PBS. Repetir este proceso.
- 3) En placas de 6 pocillos, añadir en cada pocillo 1 mL de tripsina + EDTA (200 mg/L) precalentada a 37 °C en fibroblastos y 2 mL en queratinocitos HaCaT (estas células se encuentran en mosaico con una capa de queratina superficial que dificulta la separación celular). Incubar los fibroblastos y queratinocitos durante 5 y 10 minutos respectivamente. Observar el despegamiento celular en microscopio, moviendo suavemente el frasco para favorecer la separación.
- 4) Para bloquear la tripsinización añadir SFB frío, colocando el frasco o placa de cultivo sobre hielo picado.
- 5) Retirar las células (Lucien et al., 2014) con pipeta y depositarlas en tubos estériles Falcon® de 5 ó 50 mL según la cantidad. Agitar levemente en *vortex*.
- 6) Centrifugar a 850 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante con pipeta y al *pellet* añadirle medio de cultivo DMEM enriquecido hasta el borde del tubo.
- 7) Agitar manualmente y centrifugar de nuevo las células. Desechar el sobrenadante.
- 8) En caso de querer conservar las células en la estufa, añadir al pellet medio de cultivo (DMEM enriquecido o RPMI) y sembrar las células en placas o frascos. En caso de placas de 6 pocillos añadiremos 6 mL de medio de cultivo al tubo, agitar brevemente y distribuir 1 mL en cada pocillo. En caso de placas con 12 pocillos habrá que añadir también 6 mL de medio al tubo pero se distribuirán 0,5 mL de la mezcla por pocillo. Para las placas de 96 pocillos añadir 10 mL al tubo y sembrar 0,1 mL por pocillo.
- 9) Si se desea realizar algún experimento se procederá a realizar el protocolo de los protectores celulares, toxicidad con mostazas, apoptosis o senescencia. Si se va a trabajar con fluorocromos habrá que alicuotar en tubos Eppendorf® de 1,5 mL aptos para el citómetro AMNIS® (el citómetro requiere 200 µL/tubo).

*Técnica para calcular disoluciones de mostaza nitrogenada:* La mostaza nitrogenada se suministra como reactivo en polvo, por lo que su manejo requiere conversión a soluciones líquidas a diferentes concentraciones. En cada experimento debe realizarse nuevamente la disolución porque tiene un índice de volatilidad alto que no permite su conservación hasta el día siguiente. El PM es 178,49 g/mol. Al tratarse de un tóxico irritante, su manejo requiere EPI adecuado y cabina de seguridad.

- 1) Para calcular los gramos por experimento, aplicar la siguiente fórmula:

$$M = \frac{\frac{g}{PM}}{L}$$

M: Molaridad  
g: Gramos de sustancia (g)  
PM: Peso molecular (g/mol)  
L: Litros (L)

- Por lo que de la fórmula anterior se deduce que:

$$g = M \times PM \times L$$

- 2) Revisando la bibliografía se decide trabajar con una solución *stock* 50 mM (0,05 M), fabricando cada vez 4 mL (0,04 L) de solución. Aplicando la fórmula previa deducimos que:
  - $g = 0,05 \times 178,49 \times 0,04 = 0,03569$
- 3) Disolver 0,03569 g de mostaza nitrogenada en 4 mL de agua destilada para obtener la solución *stock* 50 mM.
- 4) A partir de esta solución *stock* se fabricaron concentraciones celulares finales de 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 2500  $\mu$ M y 5000  $\mu$ M para el cálculo del IC<sub>50</sub>.

*Técnica para calcular disoluciones de mostaza sulfurada:* La mostaza sulfurada se suministra en estado líquido (conservación entre 2 y 8 °C), por lo que se diluyó para obtener diferentes concentraciones. Esta mostaza todavía es más irritante que la nitrogenada puesto que su punto de inflamación es a 52 °C y su manejo también requiere EPI adecuado y cabina de seguridad. El PM es 124,63 g/mol. En el frasco del fabricante se especifica que la concentración del líquido es 1,07 g/mL, sin indicar su molaridad.

- 1) Para calcular la molaridad se aplica la siguiente fórmula:

$$M = \frac{\frac{g}{PM}}{L}$$

M: Molaridad  
g: Gramos de sustancia (g)  
PM: Peso molecular (g/mol)  
L: Litros (L)

- Por lo que se deduce que:

$$M = \frac{\frac{1,07}{124,63}}{0,001} = 8,58541$$

Dado que 8,585 M es una solución muy concentrada y revisando la bibliografía las concentraciones finales celulares son en micromoles (200 a 2000 µM) se procedió a hacer una solución *stock* diluida 300 mM (0,3 M).

- 2) Para fabricar 5 mL de solución de MS a concentración 300 mM se partió de la solución original 8,585 M. Tuvo que diluirse 28,6 veces, por lo que se mezclaron 0,175 mL de MS y 5 mL de agua destilada.
- 3) A partir de esta solución *stock* 300 mM se fabricaron las concentraciones celulares finales de 250 µM, 1000 µM, 2500 µM y 5000 µM para el cálculo del IC<sub>50</sub>.

*Protocolo para cálculo de dosis tóxica en mostazas (IC<sub>50</sub>):* Medición de la dosis capaz de matar a la mitad de las células del cultivo.

- 1) Tras aplicar el protocolo de tripsinización (página 117), sembrar las células en placas de 6, 12 ó 96 pocillos según el experimento. Una vez sembradas, los fibroblastos requieren una semana de crecimiento en estufa para alcanzar el 100% de confluencia celular. En caso de queratinocitos HaCaT deben cultivarse durante dos semanas.
- 2) Retirar el medio de cultivo.
- 3) Para trabajar con fibroblastos añadir en cada pocillo 1 mL de medio DMEM enriquecido. En experimentos con HaCaT añadir 2 mL de medio RPMI.
- 4) Añadir en cada pocillo el tóxico a estudio (mostaza sulfurada o nitrogenada, figura 35). Para calcularlo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\blacksquare V \times C = V' \times C'$$

V: Volumen del tóxico en solución *stock* (μL)

C: Concentración del tóxico en solución *stock* (μM)

V': Volumen del tóxico para añadir en cada pocillo (μL)

C': Concentración final del tóxico en células (μM)

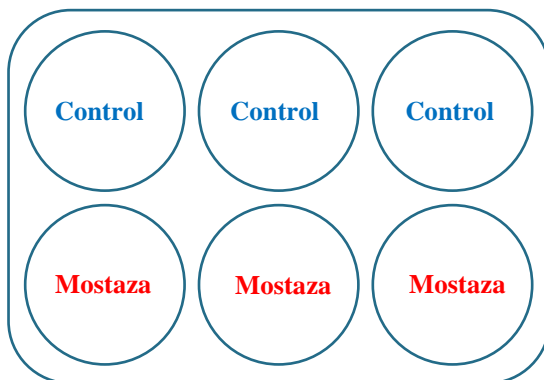


Figura 35. Placa para testar IC<sub>50</sub> en mostazas (figura de la autora).

- 5) Para averiguar el IC<sub>50</sub> de las mostazas se realizaron experimentos con distintos tiempos de incubación (30 minutos, 1 hora, 2 horas o 24 horas).
- 6) Retirar el medio con el tóxico.
- 7) Añadir medio de cultivo nuevo (repetir paso número 3).
- 8) Mantener en estufa durante 24 horas.
- 9) Analizar las células en el citómetro para valorar apoptosis y necrosis o en el lector de placas Eon<sup>®</sup> para viabilidad con MTT.

*Protocolo para medir la viabilidad celular con MTT:*

- 1) Cultivar las células en dos placas de 96 pocillos (una placa de control y otra de tóxicos), dejando la primera y la última columna (1 y 12) sin sembrar células (blancos) (figura 36). En la placa de controles habrá que añadir sustancias protectoras a diferentes concentraciones. En la placa de tóxicos habrá que añadir concentraciones crecientes de mostaza según la columna e incubar durante 1 hora.

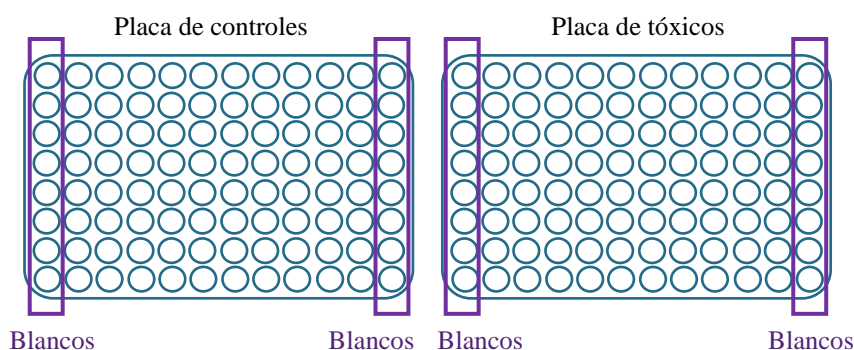


Figura 36. Placas para medir viabilidad celular con MTT (figura de la autora).

- 2) Preparar el MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, reactivo en polvo). Disolver 5 mg en 1 mL de agua destilada. Este reactivo se almacena a 4 °C, por lo que para su uso debe calentarse a 37 °C y mezclarlo suavemente.
- 3) Retirar el medio de cultivo de los pocillos con la pipeta multicanal.
- 4) Añadir 100 µL de DMEM + 20 µL de solución MTT (5 mg/mL) en cada pocillo, incluidos los pocillos blancos.
- 5) Incubar las placas en estufa a 37 °C durante 3 horas.
- 6) Añadir 150 µL de DMSO en cada pocillo. Al añadir el DMSO se forman los cristales de formazán de color púrpura (figura 37).
- 7) Cubrir con papel de aluminio.
- 8) Mezclar en el agitador orbital durante 15 minutos.
- 9) Realizar la lectura de la absorbancia a 590 nm con un filtro de referencia de 620 nm en el espectrofotómetro Eon®.



Figura 37. Placa de viabilidad celular con MTT.

*Protocolo de sustancias protectoras para medición por espectrofotometría: Quercetina y vitamina C.*

- 1) En la placa de 96 pocillos retirar el medio de cultivo DMEM enriquecido.
- 2) Lavar con PBS.
- 3) Añadir en cada pocillo las sustancias protectoras a estudio:
  - Controles: 100  $\mu$ L de medio DMEM enriquecido.
  - Quercetina: Partiendo de solución *stock* (100  $\mu$ M):
    - Para conseguir una concentración 1  $\mu$ M: Quercetina *stock* 1  $\mu$ L + 99  $\mu$ L DMEM enriquecido.
    - Para conseguir una concentración 2,5  $\mu$ M: Quercetina *stock* 2,5  $\mu$ L + 97,5  $\mu$ L DMEM enriquecido.
  - Vitamina C: Partiendo de solución *stock* (200 mM, pH 7,16):
    - Para conseguir concentración 10 mM: Vit. C *stock* 5  $\mu$ L + 95  $\mu$ L DMEM enriquecido.
  - Quercetina + vitamina C:
    - Quercetina 1 $\mu$ M + Vit. C 10 mM: 1  $\mu$ L Quercetina + 5  $\mu$ L Vit. C + 94  $\mu$ L DMEM enriquecido.
    - Quercetina 2,5  $\mu$ M + Vit. C 10 mM: 2,5  $\mu$ L Quercetina + 5  $\mu$ L Vit. C + 92,5  $\mu$ L DMEM enriquecido.
- 4) Distribuir por columnas según el siguiente esquema (figura 38):

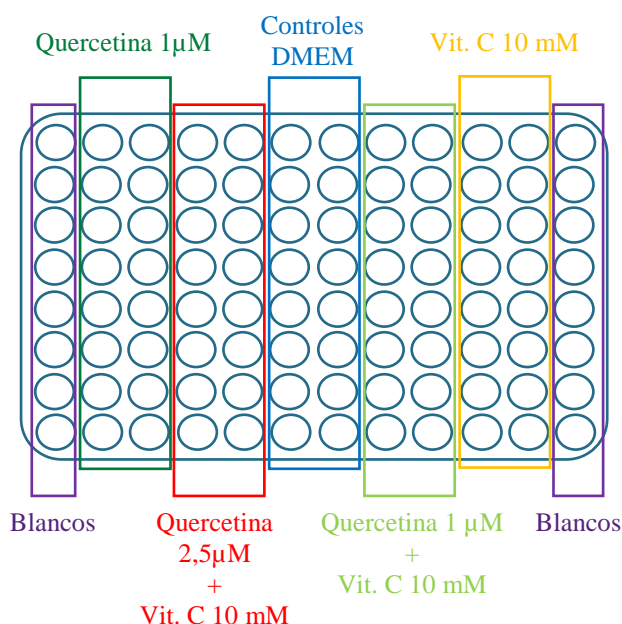


Figura 38. Placa de sustancias protectoras (figura de la autora).

- 5) Incubar durante 1 hora y medir en el lector de placas Eon<sup>®</sup>.

*Protocolo de mostaza nitrogenada tras sustancias protectoras:* Tras realizar el protocolo para el cálculo de dosis tóxica en mostazas (página 120) se estimó inicialmente una  $IC_{50}$  entre 2000 y 3000  $\mu M$ , que posteriormente demostró ser una cifra mayor como se desarrolla en los resultados.

- 1) Realizar el protocolo de sustancias protectoras (página 122).
- 2) Partiendo de una solución *stock* de MN 50 mM, mezclar para conseguir una concentración final celular 2 mM. Añadir en todos los pocillos salvo a los controles y blancos (columnas 1, 6, 7 y 12) (figura 39):
  - 4  $\mu L$  de solución *stock* + 96  $\mu L$  de DMEM enriquecido.

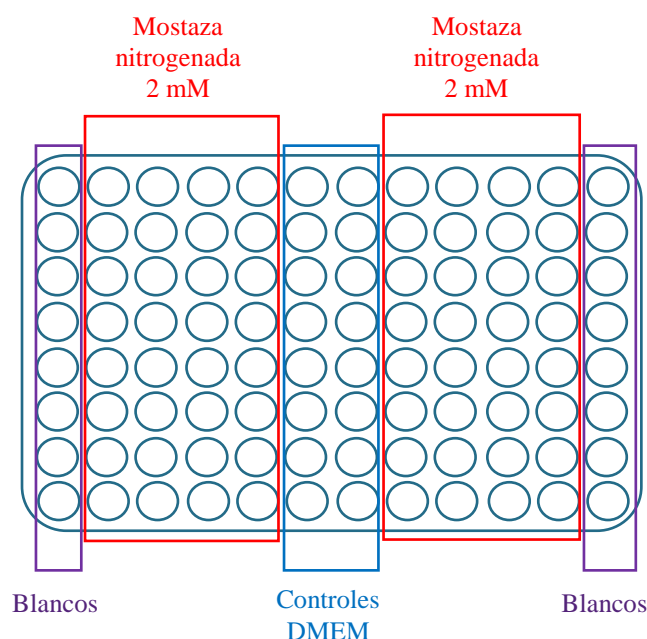


Figura 39. Placa de sustancias protectoras + mostaza nitrogenada (figura de la autora).

- 3) Incubar en estufa durante 1 hora.
- 4) Retirar el medio. Añadir 100  $\mu L$  de DMEM enriquecido en cada pocillo.
- 5) Cultivar en estufa durante 24 horas.
- 6) Para análisis en el citómetro, extraer las células de los pocillos alicuotándolas en tubos Eppendorf® de 1,5 mL. Aplicar el protocolo de viabilidad, apoptosis y mortalidad celular por citometría de imagen (técnica APO 5, página 124).
- 7) Para medir en el lector de placas, retirar el sobrenadante y añadir 20  $\mu L$  por pocillo de colorante MTT (realizar el protocolo para medir la viabilidad celular con MTT, página 121). Utilizar una placa de sustancias protectoras (quercetina + vitamina C) como placa de control y la placa descrita en este protocolo (sustancias protectoras + mostaza nitrogenada) como placa de tóxicos.



*Protocolo de mostaza sulfurada tras sustancias protectoras:* Tras realizar el protocolo para el cálculo de dosis tóxica en mostazas (página 120) se estimó inicialmente una  $IC_{50}$  entre 3000 y 4000  $\mu M$ , que posteriormente demostró ser una cifra que se encontraba en ese rango como se desarrolla en los resultados. El procedimiento es el mismo que el descrito previamente para mostaza nitrogenada, pero aplicando los valores específicos de la sulfurada.

*Protocolo de viabilidad, apoptosis y mortalidad celular por citometría de imagen:* Técnica APO 5, página 83.

- 1) Lavar las células con PBS o con el *binding buffer* que aporta el kit de Anexina V + FITC + IP.
- 2) Centrifugar a 800 rpm durante 4 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.
- 3) Resuspender las células en 100  $\mu L$  de PBS o *binding buffer* a una concentración de 10 millones de células / mL.
- 4) Para visualizar la apoptosis celular en citómetro se utilizará Anexina V que puede ir unida a dos fluorocromos: FITC (verde) o ficoeritrina (naranja) (figura 40). Añadir 5  $\mu L$  de Anexina. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.



Figura 40. Esquema de fluorocromos en células apoptóticas (figura de la autora).

- 5) Para determinar la mortalidad celular se pueden utilizar dos fluorocromos: DAPI (azul) o yoduro de propidio (rojo) (figura 41).

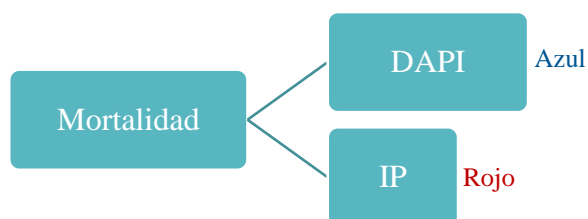


Figura 41. Esquema de fluorocromos en células muertas (figura de la autora).

La elección del fluorocromo para cuantificar la mortalidad depende de cuál se elige para la apoptosis a fin de evitar solapamiento de fluorescencias con colores similares (rojo/naranja) (figura 42). Si posteriormente se va a determinar senescencia con C<sub>12</sub>-FDG (verde) es necesario utilizar PE con DAPI. Para yoduro de propidio añadir 10 µL. En caso de DAPI añadir 5 µL a [10 µM] / 100 µL de células. En ambos casos agitar suavemente en el *vortex* e incubar durante 3 minutos.

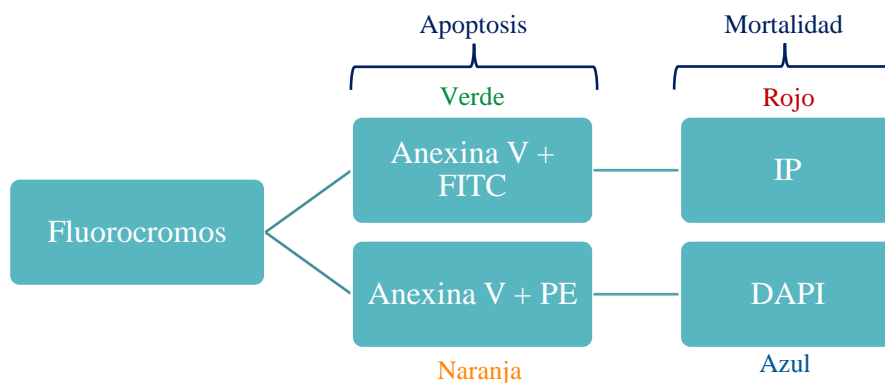


Figura 42. Fluorocromos para medir apoptosis + mortalidad (figura de la autora).

- 6) Medir con el citómetro de imagen AMNIS<sup>®</sup>. Se obtienen 5 tipos de poblaciones según la técnica APO 5: células vivas, células apoptóticas tempranas, células necroptóticas, células apoptóticas tardías y células necróticas (página 83).

*Protocolo de senescencia:* En estado fisiológico el pH citoplasmático es 7,2, pero los lisosomas tienen pH de 4. Sin embargo, en células senescentes el pH es 6 debido a un mayor contenido en lisosomas (Kurz et al., 2000). Para calcular la actividad de la enzima beta galactosidasa asociada a senescencia previamente habrá que alcalinizar el pH lisosomal con carbonato de amonio. Para ello habrá que realizar el protocolo anterior de apoptosis y mortalidad. Tras realizar el paso 3 se procede a:

- 1) Alcalinizar el pH lisosomal de cada tubo con carbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{CO}_3$ , PM 79,06 g/mol) a concentración *stock* 1 M (7,9 g de la sal en 100 mL de agua destilada). Para conseguir una concentración 20 mM en cada tubo (2 mL) habrá que añadir 40  $\mu\text{L}$  de [1 M]. Otros autores en lugar de carbonato de amonio han utilizado bafilomicina A1 (Debacq-Chainiaux et al., 2009) o cloruro de amonio (Lucien et al., 2014) en lugar del carbonato de amonio.
- 2) Incubar en estufa a 37 °C bajando el  $\text{CO}_2$  a 1% (en lugar de 5%) durante 30 minutos para conseguir pH de 7.
- 3) Determinar la SA- $\beta$ -Gal asociada a senescencia mediante el fluorocromo  $\text{C}_{12}$ -FDG que es capaz de atravesar la membrana celular (figura 43).



Figura 43. Esquema de fluorocromos en células senescentes (figura de la autora).

- Preparar el reactivo en polvo para su uso en solución celular 2 mM: Disolver 2 mg de  $\text{C}_{12}$ -FDG en 117  $\mu\text{L}$  de DMSO, obteniendo una solución *stock* a concentración 20 mM. A continuación, habrá que diluir 100  $\mu\text{L}$  de la solución *stock* con 900  $\mu\text{L}$  de PBS para obtener la solución de trabajo 2 mM.
- 4) Añadir 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_{12}$ -FDG a concentración 2 mM por pocillo.
  - 5) Incubar en estufa durante 1 hora y 15 minutos.
  - 6) Añadir los fluorocromos de la apoptosis explicados en el protocolo previo (Anexina V + ficoeritrina con DAPI). Incubar 15 minutos.
  - 7) Analizar las muestras en el citómetro de imagen teniendo en cuenta que el fluorocromo DAPI emite en azul (mortalidad), el  $\text{C}_{12}$ -FDG verde (senescencia) y la PE naranja (apoptosis).

*Protocolo de sustancias protectoras frente a tóxicos para medición por citometría de imagen:* Siendo quercetina y vitamina C las sustancias protectoras.

- 1) En dos placas de 6 pocillos retirar el medio de cultivo DMEM enriquecido.
- 2) Lavar con PBS.
- 3) Añadir en cada pocillo 2 mL de DMEM enriquecido.
- 4) En la placa control añadir quercetina y vitamina C según el esquema de la figura 44. Para conseguir quercetina 1  $\mu\text{M}$  + vitamina C 10 mM habrá que añadir en el pocillo correspondiente 20  $\mu\text{L}$  de quercetina 100  $\mu\text{M}$  (solución *stock*) y 40  $\mu\text{L}$  de vitamina C 250 mM.

La placa de cultivo se cubre con Parafilm® para evitar la difusión de la mostaza sulfurada a los pocillos contiguos durante la incubación en la estufa de cultivo a 37 °C (punto de inflamación de la MS es 52 °C).

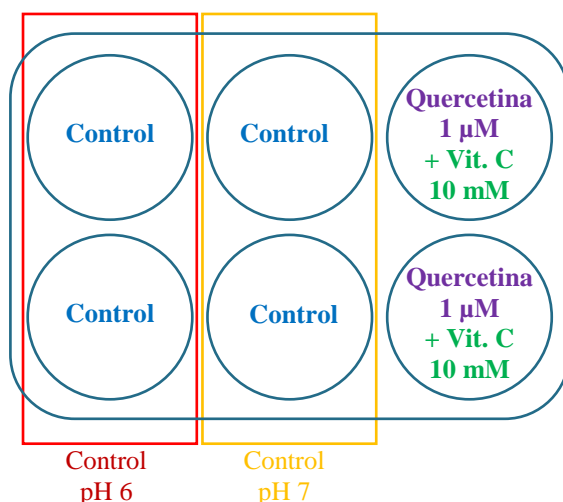


Figura 44. Placa de control de sustancias protectoras para medición por citometría de imagen (figura de la autora).

- 5) Dejar actuar la quercetina y vitamina C durante 30 minutos para que ejerzan su efecto protector. A continuación, añadir los tóxicos en los pocillos que corresponda.
- 6) En la placa de tóxicos habrá que calcular la dosis para añadir 3000  $\mu\text{M}$  de mostaza sulfurada en cada pocillo: partiendo de una solución *stock* en estado líquido 8,585 M, vamos a preparar una solución de trabajo de mostaza sulfurada 300 mM. Para ello añadimos 175  $\mu\text{L}$  a concentración 8,585 M en 5 mL de agua destilada. De la solución de trabajo 300 mM obtenida, añadir 20  $\mu\text{L}$  en cada pocillo (figura 45).

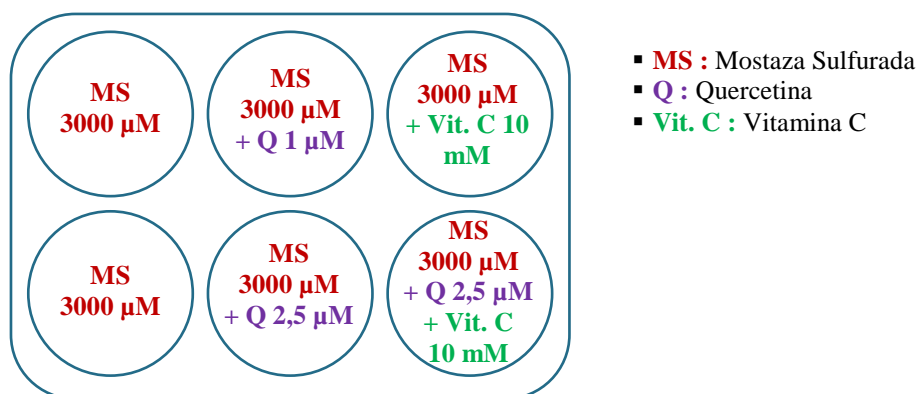


Figura 45. Placa de tóxicos con sustancias protectoras para medición por citometría de imagen (figura de la autora).

- 7) Dejar actuar los tóxicos durante 1 hora.
- 8) Eliminar los tóxicos retirando con pipeta el líquido de los pocillos, dejando las células en la base. Añadir 2 mL de medio de cultivo DMEM enriquecido en cada pocillo.
- 9) Cultivar ambas placas (control y tóxicos) en estufa de cultivo durante 3 días para medir senescencia, apoptosis y muerte celular.
- 10) Recoger con pipeta las células muertas que hay flotando en el DMEM (sobrenadante) de cada pocillo en tubos etiquetados de 5 mL. Reservar para medirlo posteriormente y cuantificar las células muertas.
- 11) El resto de las células están pegadas en el fondo de los pocillos, por lo que habrá que despegarlas siguiendo el protocolo de tripsinización (página 117).
- 12) Una vez que tenemos el pellet de las células en cada tubo, se enrasa el tubo añadiendo DMEM hasta conseguir 2 mL de volumen en cada tubo.
- 13) Realizar el protocolo previo para determinar senescencia.
- 14) Medir en el citómetro.

# Resultados

---



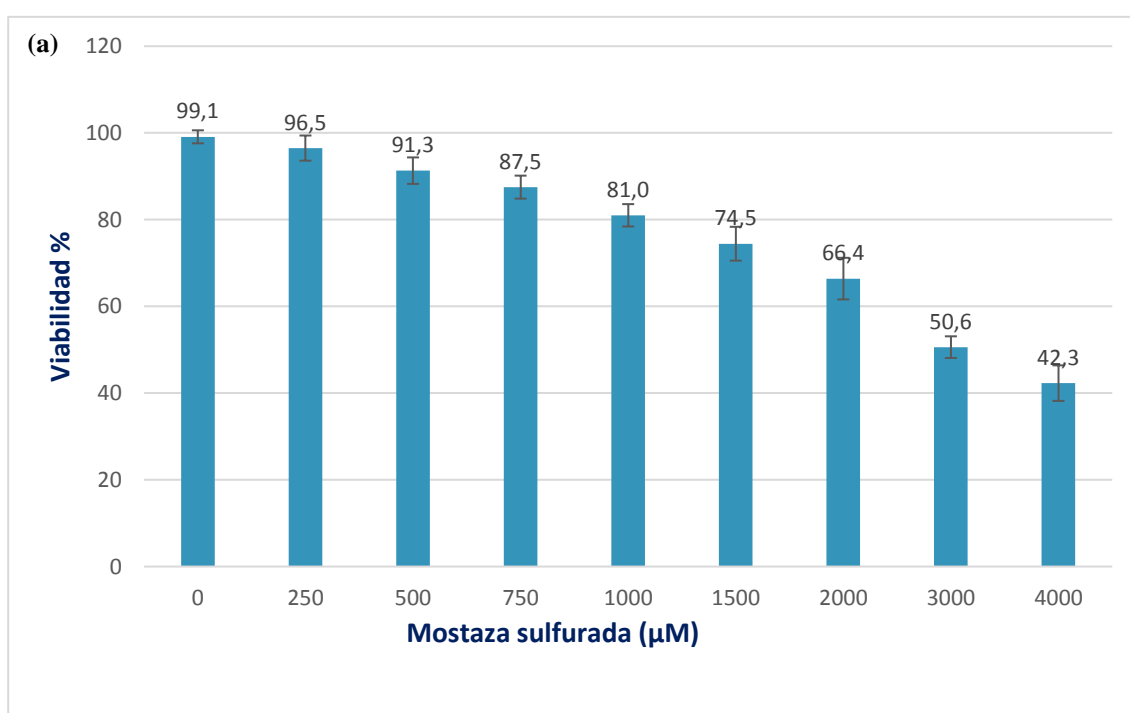
## Resultados

La investigación se organizó en dos bloques de experimentos. La primera etapa se centró en el estudio de los efectos tóxicos a nivel celular de la mostaza sulfurada y nitrogenada. La segunda fase combinó el efecto preventivo de las sustancias protectoras quercetina y vitamina C con la posterior exposición a los tóxicos, averiguando qué variaciones se producían en la viabilidad y mortalidad, especificando qué tipos de muerte celular se observaban, así como el efecto senolítico que inducían.

### MOSTAZA SULFURADA:

#### *Cálculo de la IC<sub>50</sub> en mostaza sulfurada*

Tras hacerse una revisión sistemática de la bibliografía relativa a mostaza sulfurada, las cifras concernientes a su letalidad eran muy dispares, por lo que se diseñaron varios experimentos para calcular la IC<sub>50</sub> (concentración media inhibitoria para el 50% de las células). El modelo elegido se desarrolló tanto en fibroblastos como en queratinocitos HaCaT.





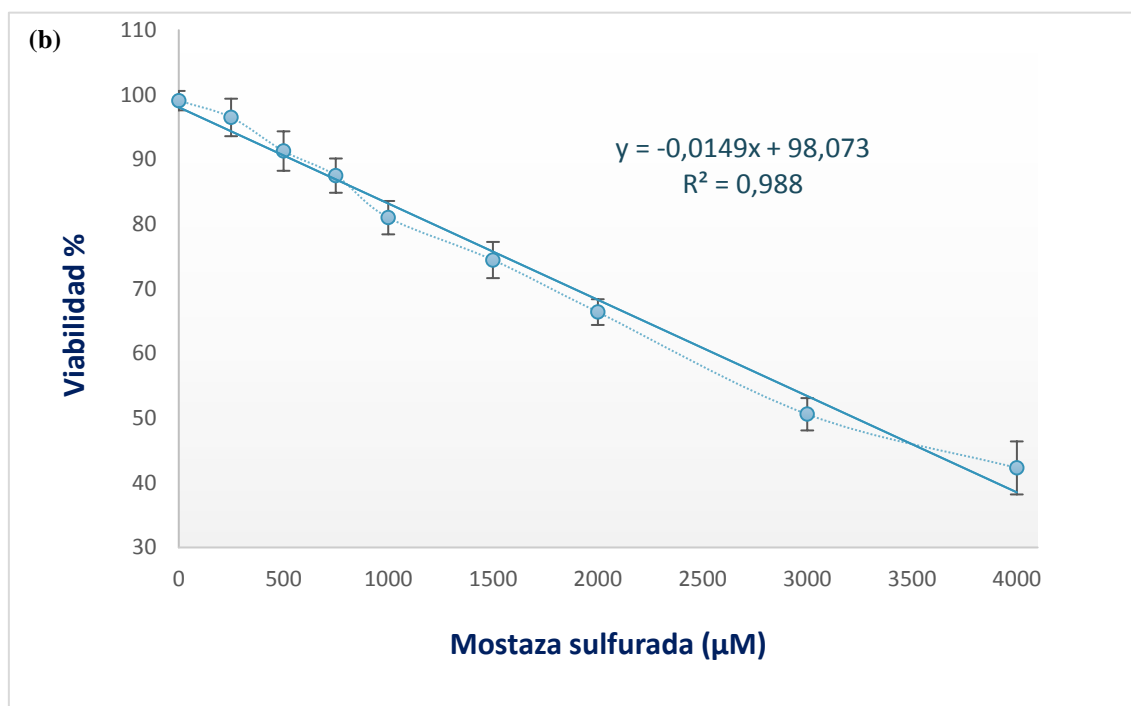


Figura 46. (a) Efecto de la exposición a mostaza sulfurada durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables (queratinocitos HaCaT) determinadas por MTT. Se muestran los valores promedio y desviación estándar de 8 experimentos. (b) Estudio de la tendencia. Sustituyendo en la ecuación  $y = 50$  se calcula para queratinocitos una concentración celular letal  $IC_{50} = 3226 \pm 192 \mu M$ .

El ensayo de viabilidad mediante MTT mide la actividad metabólica de la sal de tetrazolio (amarilla, hidrosoluble) que al ser internalizada en células vivas entra en las mitocondrias y se reduce a cristales de formazán (violeta, insoluble en agua, cuantificable mediante su disolución en disolvente orgánico DMSO), permitiendo el análisis en el lector de placas para titular la proporción de células vivas por pocillo. Los resultados se reflejan en la figura 46 a, de la que se obtiene la recta de regresión del apartado b.

Los datos muestran la pérdida de vitalidad determinada por MTT en queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada durante una hora. Experimentos similares para determinar la mortalidad con el fluorocromo yoduro de propidio y DAPI (la incorporación a la célula indica que está muerta) dieron valores idénticos en células no viables ( $100 - \text{células viables}$ ), representados en el apartado b. Ambos datos fueron utilizados para calcular la concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ). Los ensayos se realizaron tanto en fibroblastos como en queratinocitos.

A partir de la recta de regresión del gráfico 2 se calcula la IC<sub>50</sub> para queratinocitos:

$$y = -0,0149 x + 98,073$$

Sustituyendo en la ecuación  $y = 50$  se obtiene el IC<sub>50</sub>:

$$50 = -0,0149 x + 98,073; x = 3226,37$$

Por tanto, considerando que las células se exponen a mostaza sulfurada durante una hora se deduce que:

- IC<sub>50</sub> en fibroblastos:  $2960 \pm 188 \mu\text{M}$  con 8 experimentos realizados.
- IC<sub>50</sub> en queratinocitos:  $3226 \mu\text{M} \pm 192 \mu\text{M}$  con 8 experimentos realizados.

La figura 47 representa los distintos tipos de información que aporta el citómetro de las muestras analizadas:

- (a) Histograma biparamétrico del citómetro que cuantifica el porcentaje de células vivas (93,6%) y muertas (6,45%) de una muestra control de queratinocitos HaCaT. En lugar de yoduro de propidio (rojo) se utilizó el fluorocromo DAPI de color violeta para señalar muerte celular evitando solapamiento con la ficoeritrina (naranja) que señala la apoptosis. En esta muestra no se visualiza apoptosis celular porque son células control.
- (b) Fotografías de queratinocitos del citómetro. En el caso del canal 1 (Ch01) pueden observarse células vivas sin tinción con la membrana celular íntegra. En el canal 7 hay células muertas con el núcleo teñido de violeta por el fluorocromo DAPI.
- (c) Histograma monoparamétrico con los datos de fluorescencia emitida por el yoduro de propidio de células muertas con un 60,6% de células vivas y 38,7% de muertas tras exposición a mostaza sulfurada (2000 mM) durante 1 hora.
- (d) Histograma monoparamétrico de células control sin exposición a mostaza, donde se representan las células vivas DAPI negativas (sin tinción) y las DAPI positivas (muertas).

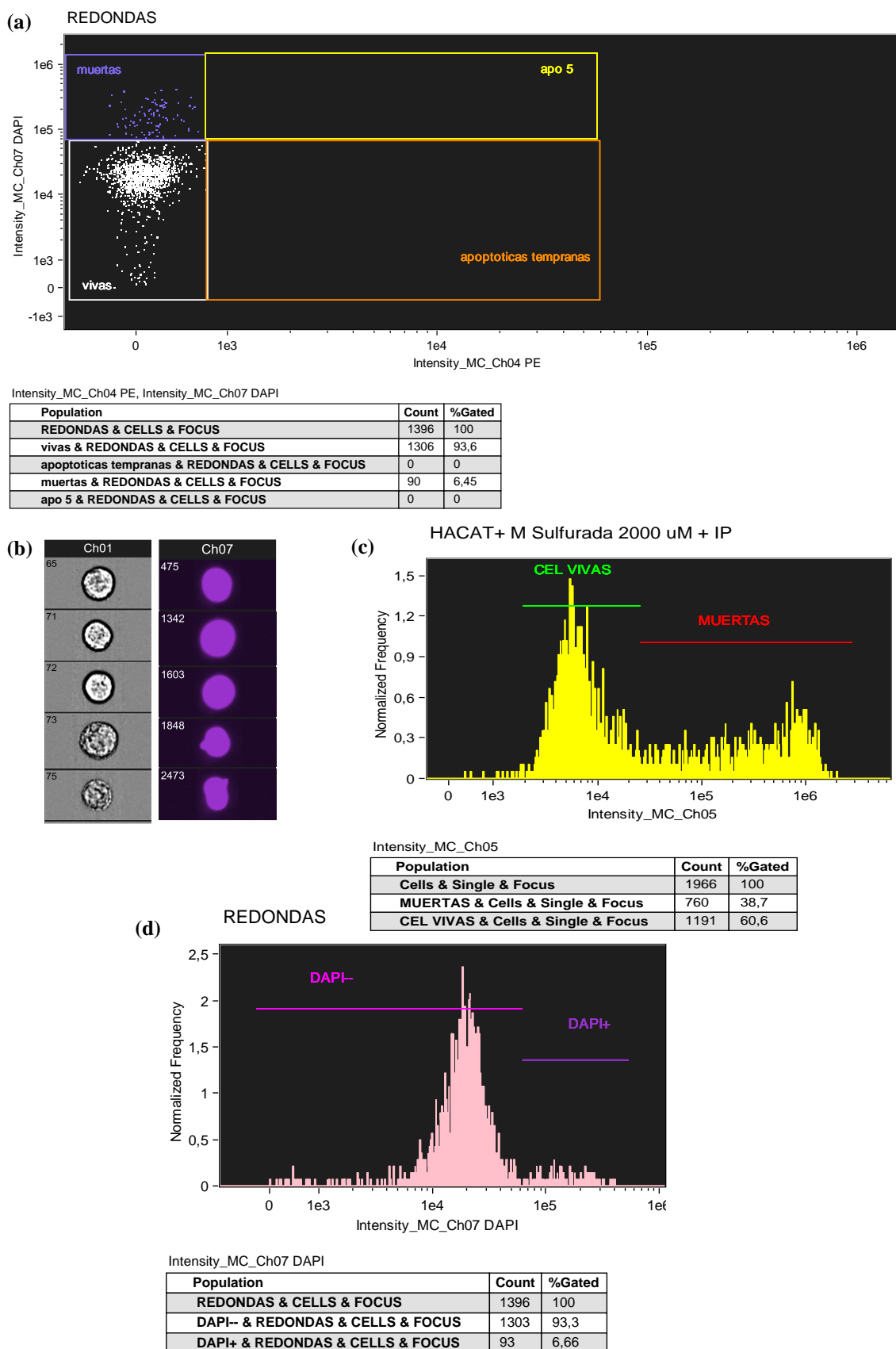


Figura 47. Histogramas y fotos de células control sin exposición a mostaza. **(a)** Histograma biparamétrico con porcentaje de células vivas y muertas de una muestra control de queratinocitos HaCaT. **(b)** Fotos de queratinocitos. **(c)** Histograma monoparamétrico de células muertas con yoduro de propidio. **(d)** Histograma monoparamétrico de células muertas con DAPI.

En la figura 48 apartado (a) se visualizan en el microscopio de contraste de fases con un objetivo 10X las células de un pocillo de una placa de cultivo de controles, donde se distinguen queratinocitos HaCaT con morfología poligonal y una confluencia de prácticamente el 100%. En el apartado (b) se ha utilizado un objetivo de 20 aumentos.

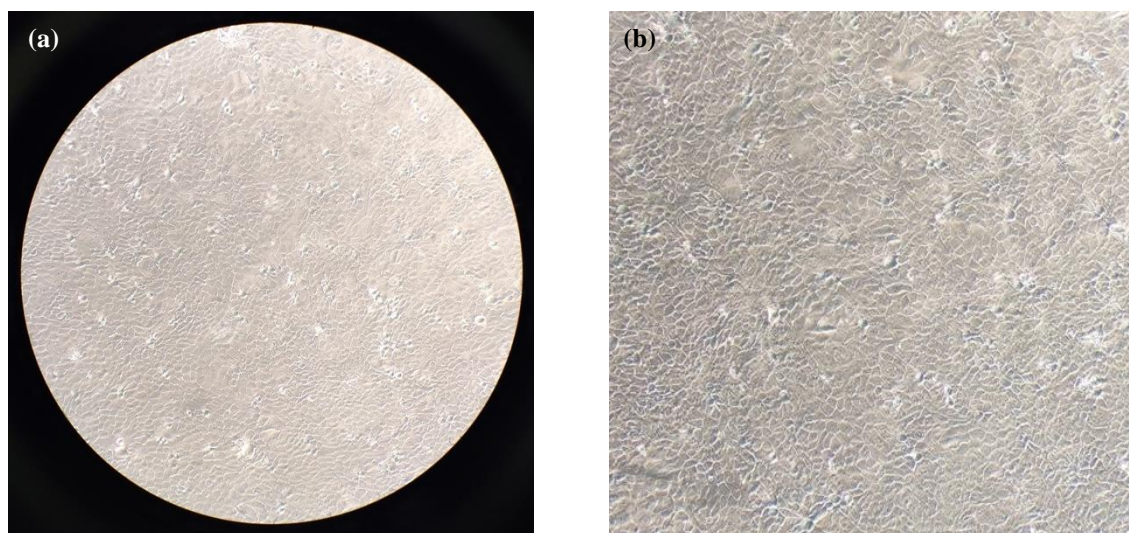


Figura 48. Queratinocitos HaCaT control con el 98% de células vivas. **(a)** Objetivo 10X. **(b)** Objetivo 20X.

Para la realización de los experimentos las células se exponían a mostaza sulfurada durante 1 hora, retirándose el tóxico y añadiendo DMEM para posteriormente analizarlas a las 24, 48 ó 72 horas, tal y como se describe en material y métodos.

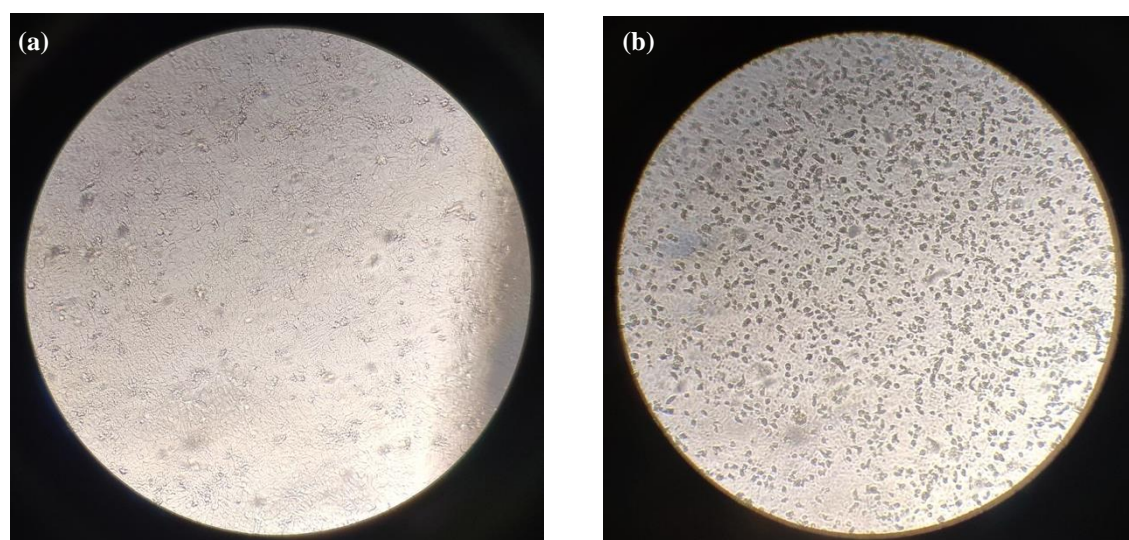


Figura 49. Queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada 3200 µM. Objetivo 10X. **(a)** Fotografía tomada a las 24 horas de exposición. **(b)** Fotografía tomada tras 72 horas de exposición.



La figura 49 son dos fotografías de queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada 3200  $\mu\text{M}$ . La foto del apartado (a) se realizó a las 24 horas y se observan muy pocos cambios en la morfología de las células. El apartado (b) se tomó tras 72 horas de la exposición y se aprecian alteraciones tanto en la confluencia (menor celularidad) como en la morfología (núcleo y citoplasma tienen mayor contraste debido a que han comenzado la apoptosis y necrosis).

En la figura 50 se observan queratinocitos control a los que se añadió tripsina para separar las células y realizar la lectura en el citómetro. Puede distinguirse su morfología esférica puesto que están en suspensión, no adheridos al pocillo.

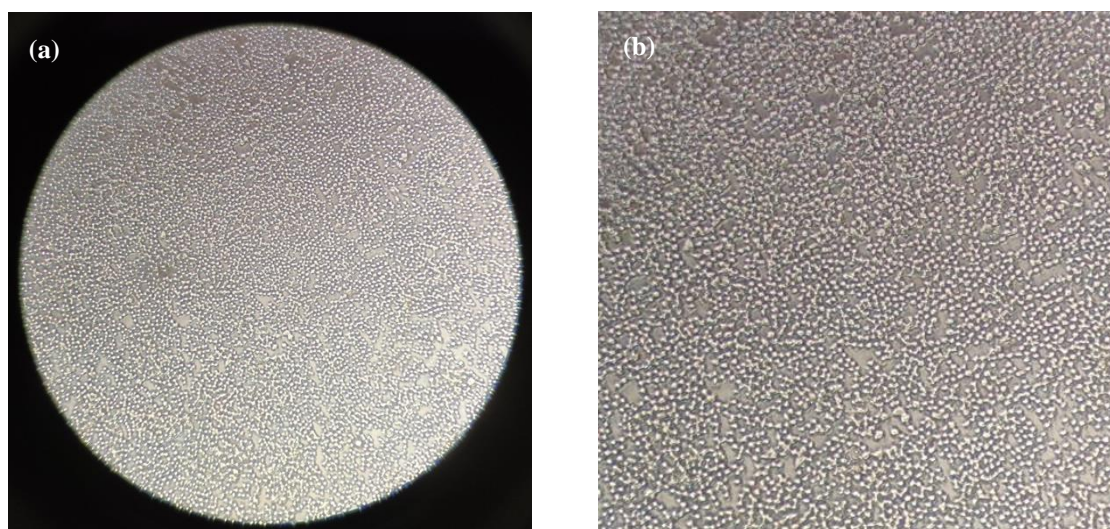


Figura 50. Queratinocitos control en medio líquido tras despegarse con tripsina. (a) Objetivo 10X. (b) Objetivo 20X.

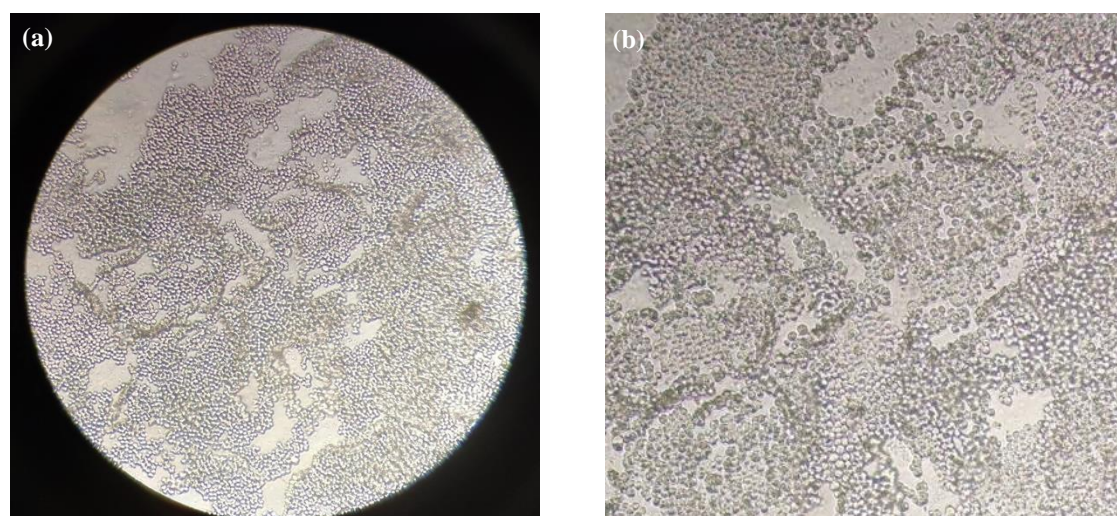


Figura 51. Queratinocitos tripsinizados tras 48 horas de exposición a mostaza sulfurada 3200  $\mu\text{M}$ . (a) Objetivo 10X. (b) Objetivo 20X.

La figura 51 muestra queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada 3200  $\mu\text{M}$ . Tras 72 horas de incubación se añadió tripsina y en la fotografía se puede comprobar que las células no se han despegado de forma uniforme como en los controles, sino que se separan formando capas.

La muestra analizada en la figura 52 corresponde a un pocillo de una placa de cultivo que contiene unas 10.000 células vivas. Si se observan las células, todas presentan la membrana íntegra y se colorean con fluorocromo verde porque están vivas. El citómetro realiza fotografías célula a célula. En la primera columna se visualiza el campo claro (similar al microscopio). En la segunda columna está la tinción vital con CFDA (fluorocromo que emite en verde a 528 nm). En la tercera columna se observan las células muertas (en esta muestra no hay). La cuarta columna muestra la granulosidad de las células. La última columna es una fusión de la primera y la segunda.

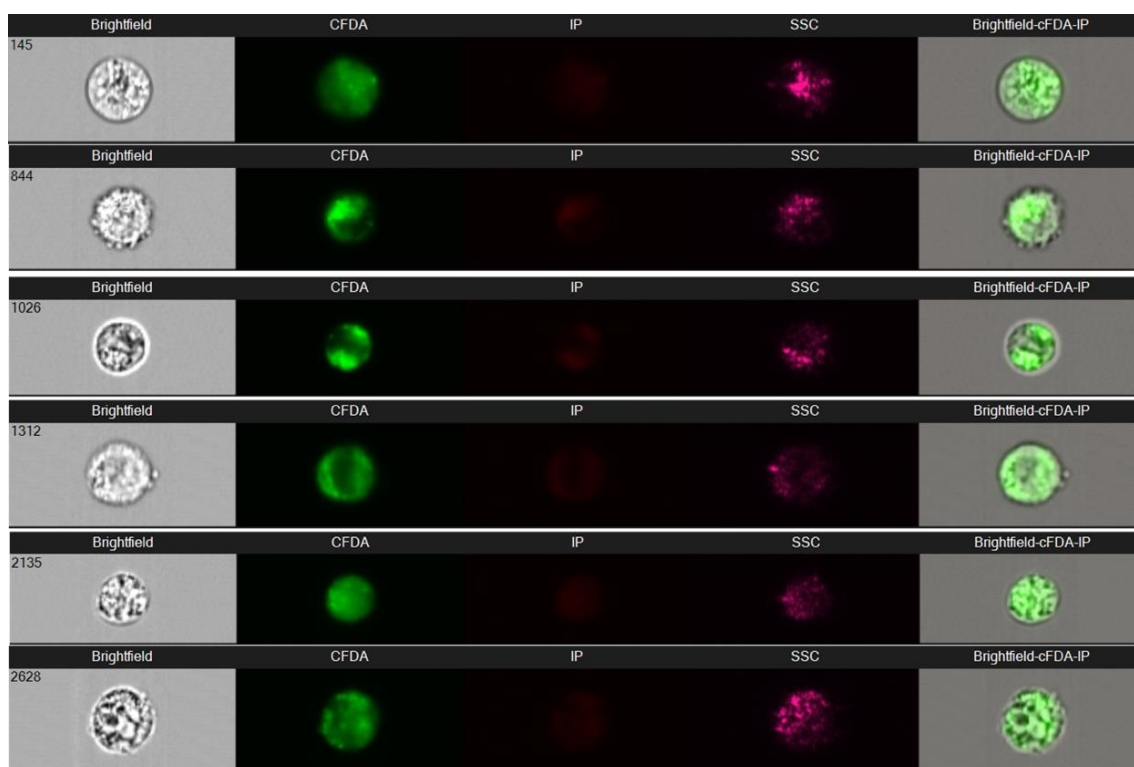


Figura 52. Imagen de fibroblastos obtenidos mediante el citómetro AMNIS® ImageStream X. Muestra con alto contenido de células vivas.

En cambio, en la figura 53 se observan fotografías de células con la membrana desestructurada y rota. La mayoría de los fibroblastos han muerto porque han sido expuestos a mostaza sulfurada. Por ello el fluorocromo yoduro de propidio ha penetrado en las células, uniéndose al ADN y tiñendo el núcleo de color rojo (emisión a 620 nm). En la primera columna se visualiza el campo claro. En la segunda columna están las células vivas (en esta muestra no hay). En la tercera columna se ven las células muertas (tinción roja con yoduro de propidio) con la membrana celular rota. La cuarta columna muestra la granulosidad de las células. La quinta columna representa la fusión de la primera y la tercera.

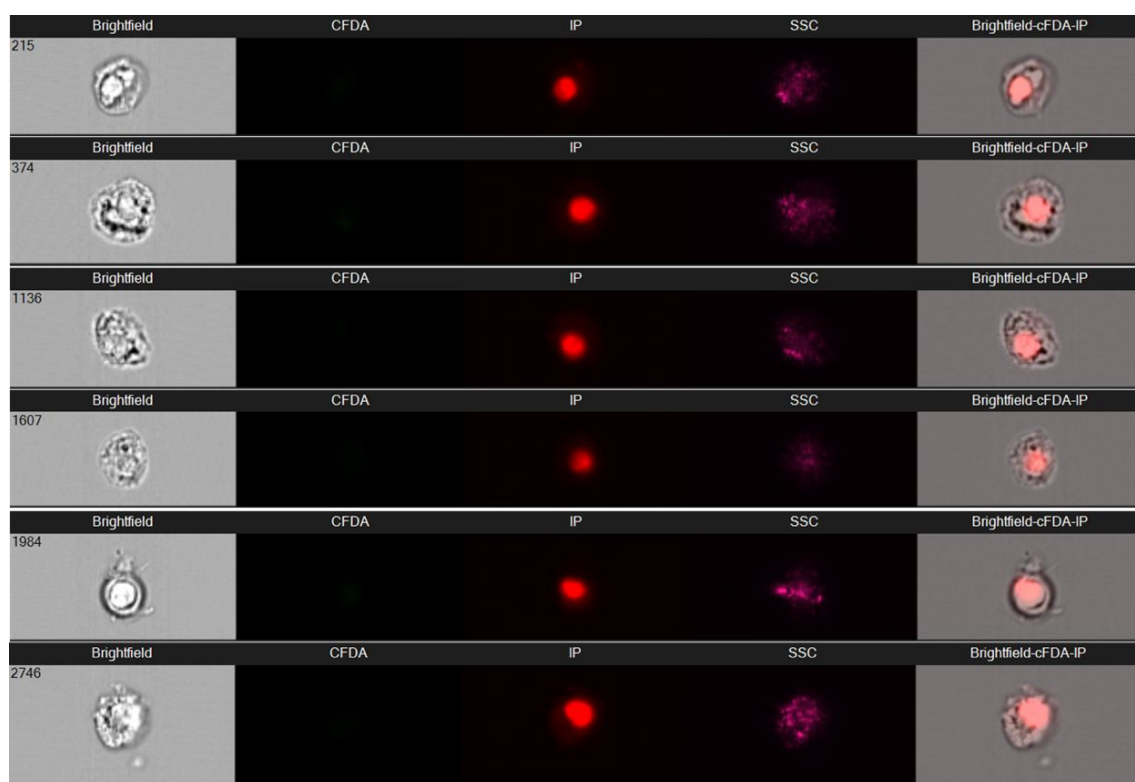


Figura 53. Imagen de fibroblastos obtenida por el citómetro AMNIS® ImageStream X. Muestra con alto contenido de células muertas.

### *Protección celular de la quercetina frente a mostaza sulfurada*

Para valorar el posible papel protector de la quercetina se buscaron las dosis a aplicar (figura 54), examinando sus efectos a diversas concentraciones directamente sobre el cultivo de fibroblastos y queratinocitos HaCaT comprobándose que las dosis para causar el mismo efecto eran muy similares en ambas extirpes celulares. El cálculo de la mortalidad se determinó por la incorporación de yoduro de propidio o DAPI en las células muertas, midiéndose por citometría.

En esta gráfica se comprobó la toxicidad celular de la quercetina a concentraciones de 1 a 100  $\mu\text{M}$  en cultivos de fibroblastos expuestos durante 24 horas. Se observa una mortalidad alrededor del 9% a concentraciones inferiores a 10  $\mu\text{M}$  y un aumento significativo de la mortalidad a concentraciones superiores a 20  $\mu\text{M}$ .

Ya que la quercetina no demostró efectos nocivos a concentraciones inferiores a 20  $\mu\text{M}$ , se propuso estudiar su protección a concentraciones de 1 y 2,5  $\mu\text{M}$ . La adición de vitamina C previamente tamponada, no mostró toxicidad en los cultivos para concentraciones inferiores a 50 mM.

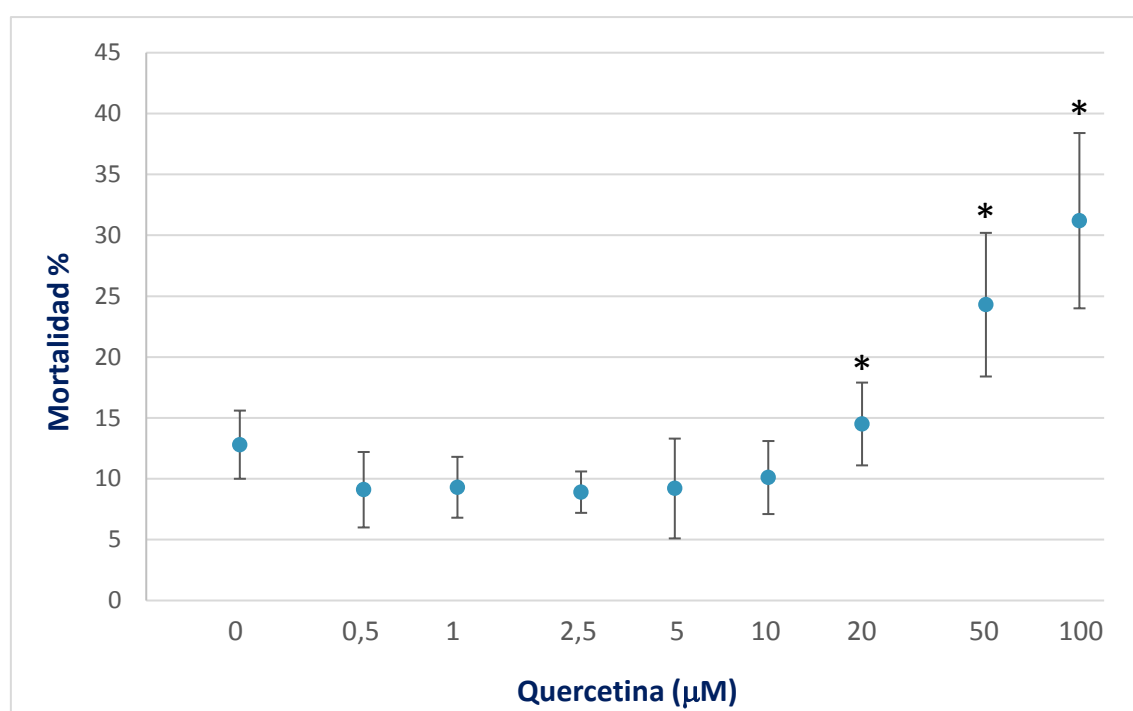


Figura 54. Efecto de la exposición a quercetina durante 24 horas sobre el porcentaje de células muertas. Se muestran los valores promedio y desviación estándar de 8 experimentos. \* Se encontraron diferencias significativas respecto al control con  $p < 0,05$ .



Los efectos protectores de la quercetina y vitamina C frente a mostaza sulfurada a concentración media inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) de 3200  $\mu$ M sobre la viabilidad celular se muestran en la figura 55. Las placas de los experimentos se distribuyen por filas de pocillos control, quercetina y vitamina C a diferentes concentraciones que posteriormente son expuestas a mostaza sulfurada. Al cultivar las células a 37 °C la MS se volatilizaba y difundía a los pocillos contiguos, contaminándolos. Por tanto, en las placas de MS todos los pocillos se cubrieron con Parafilm®.

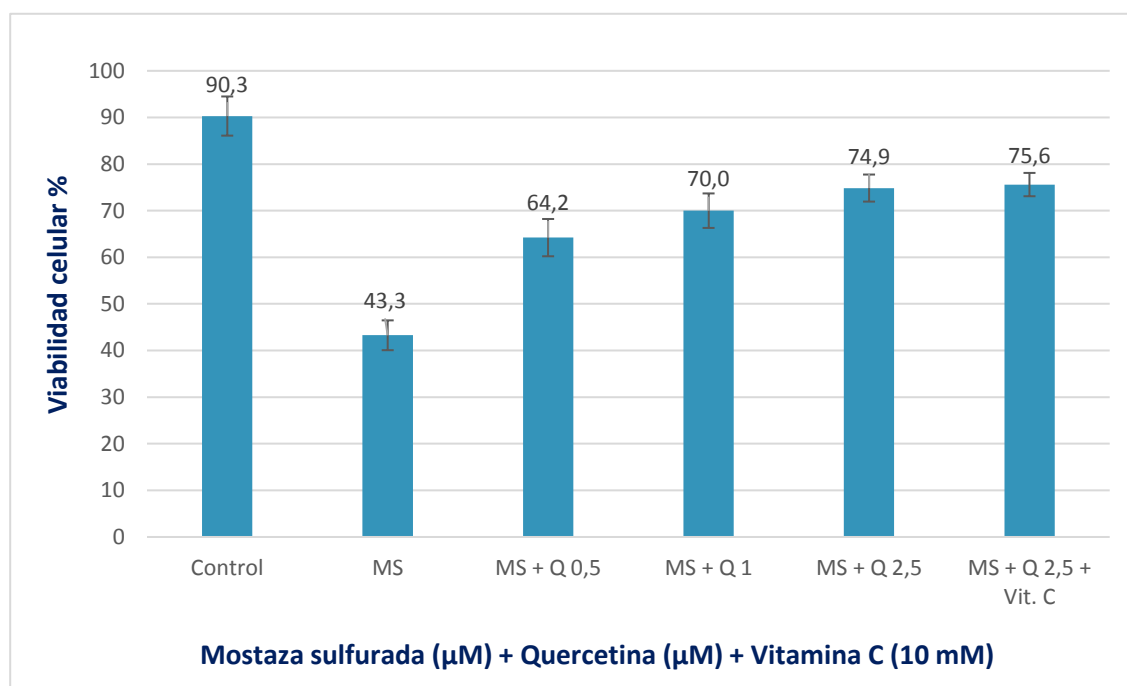


Figura 55. Efecto de la exposición a mostaza sulfurada (3200  $\mu$ M) durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables determinadas con DAPI por citometría después de añadir distintas concentraciones de quercetina y vitamina C.

En la figura 56 el apartado (a) muestra un histograma biparamétrico del citómetro con queratinocitos vivos (74,2%) y muertos (27,4%) tras la exposición a mostaza sulfurada 3200  $\mu$ M y previo tratamiento con sustancias protectoras. El apartado (b) son fotografías de los queratinocitos muertos teñidos con DAPI. La condensación violeta corresponde a la tinción del ADN. El apartado (c) es un histograma monoparamétrico de la fluorescencia emitida por DAPI (el cursor negativo, 75,1%, representa las células vivas no teñidas y el cursor positivo, 25,3%, las muertas).

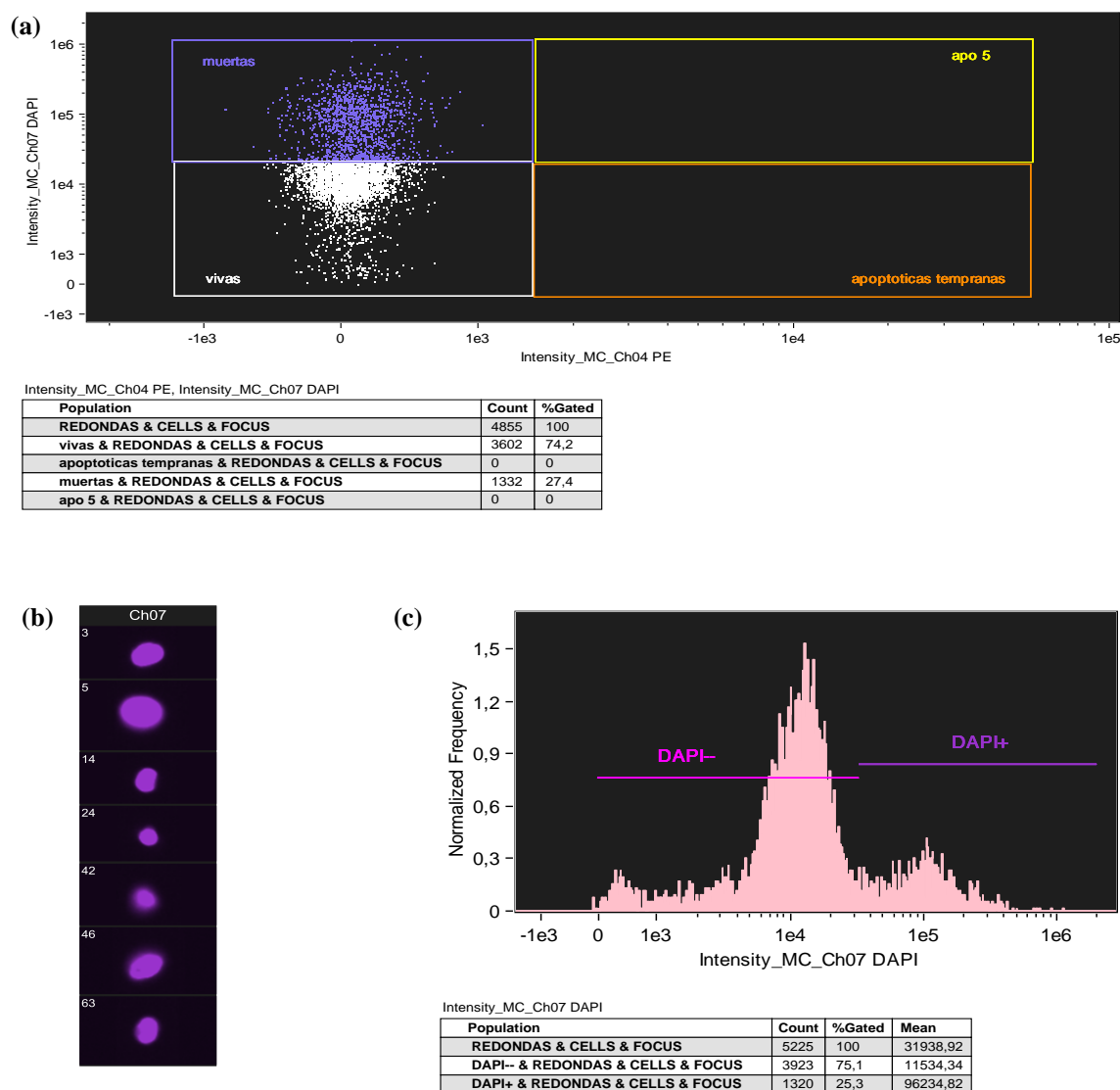


Figura 56. Histogramas y fotos de células expuestas a mostaza sulfurada 3200  $\mu\text{M}$  previo tratamiento con quercetina 2,5  $\mu\text{M}$  y vitamina C 10 mM (a) Histograma biparamétrico con porcentaje de células vivas y muertas de una muestra de queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada. (b) Fotos de queratinocitos. (c) Histograma monoparamétrico del DAPI.

El porcentaje de protección de la quercetina sobre la mortalidad inducida por mostaza sulfurada a 3200  $\mu\text{M}$  se muestra en la figura 57, observándose un buen efecto protector de hasta un 67,1 % con 2,5  $\mu\text{M}$ , mejorando ligeramente con la adición de vitamina C 10 mM.

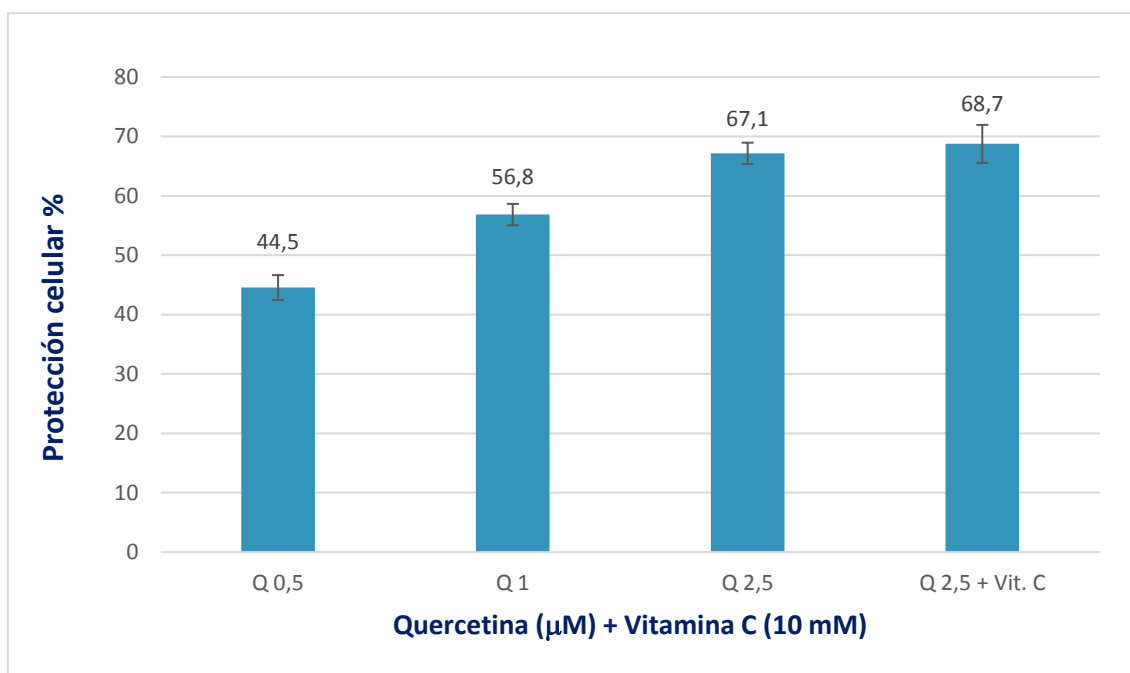


Figura 57. Porcentaje de protección de quercetina y vitamina C frente a mortalidad inducida por mostaza sulfurada a 3200 µM.

En la figura 58 se observan fotografías de queratinocitos vistos al microscopio. A mayor concentración de quercetina en el tratamiento preventivo, hay mayor celularidad.

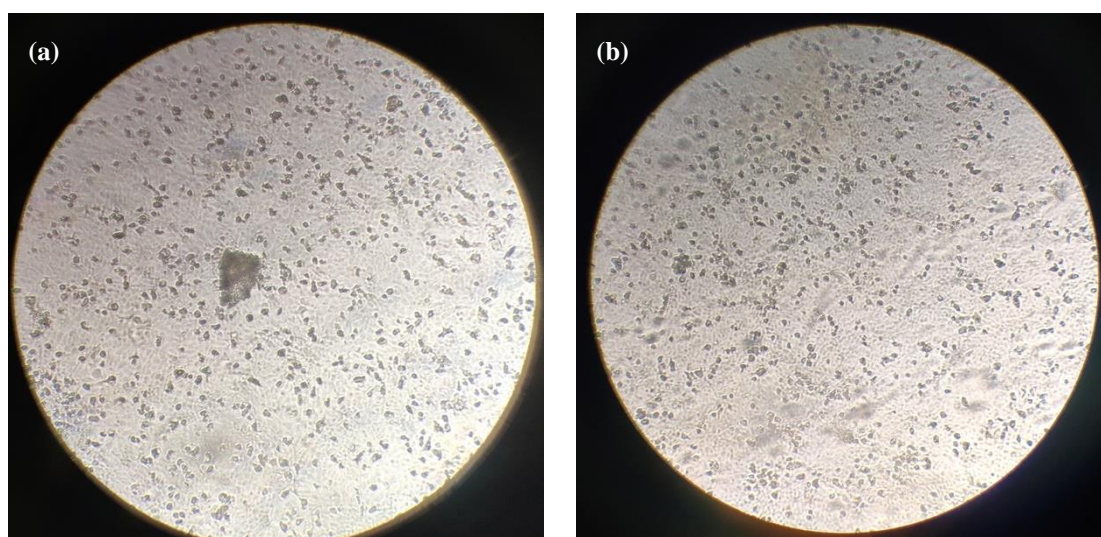


Figura 58. Queratinocitos a las 48 horas de la exposición a mostaza sulfurada 3200 µM previo tratamiento con quercetina. Objetivo 10X. (a) Quercetina 1 µM. (b) Quercetina 2,5 µM.

La figura 59 son queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada previo tratamiento protector combinado de quercetina y vitamina C. Los acúmulos de células y regiones oscuras corresponden a células en necrosis.

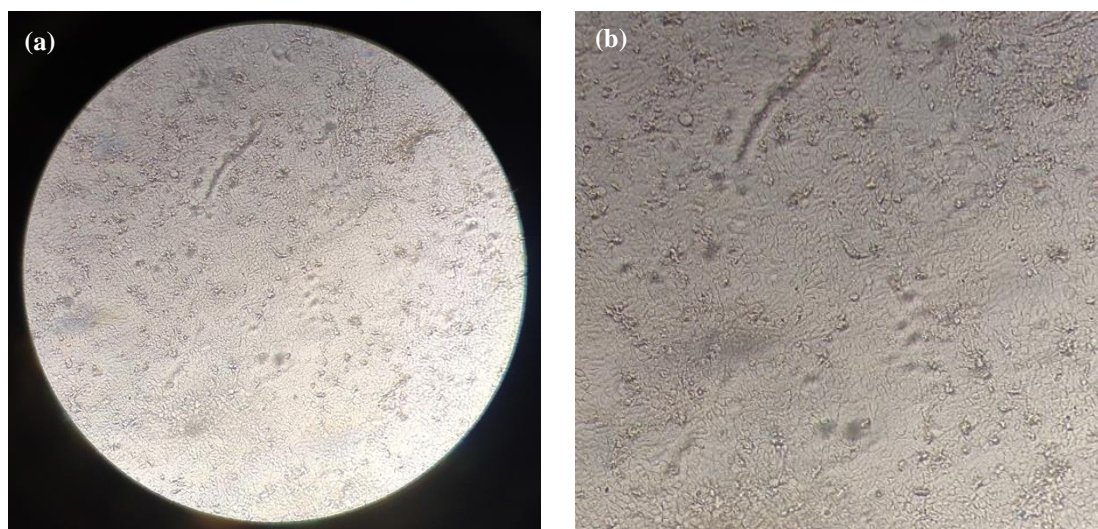
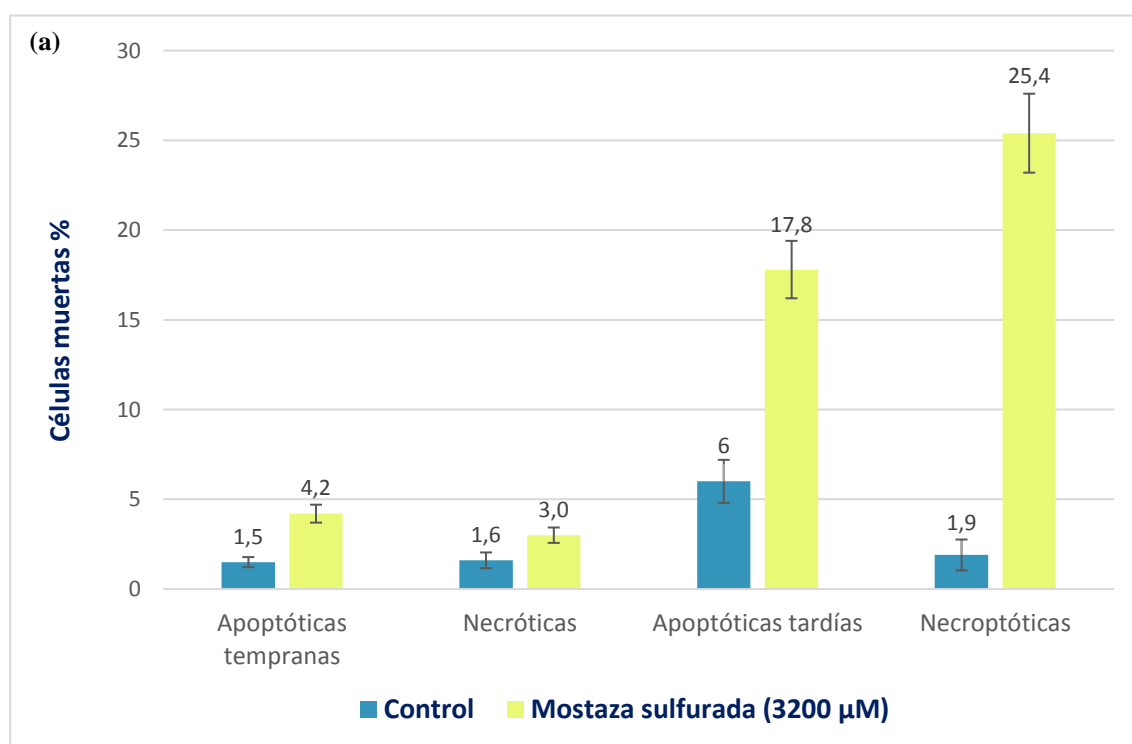


Figura 59. Queratinocitos tras 48 horas de la exposición a mostaza sulfurada 3200  $\mu$ M previo tratamiento con quercetina 2,5  $\mu$ M y vitamina C 10 mM. (a) Objetivo 10X. (b) Objetivo 20X.

*Tipos de muerte celular por exposición a mostaza sulfurada*

El análisis del tipo de muerte inducida por mostaza sulfurada en comparación con controles no tratados se muestra en la figura 60, observándose un incremento significativo de la apoptosis tardía y necroptosis por efecto del tóxico. El apartado (a) está clasificado por tipos de muerte celular, mientras que en el apartado (b) se comparan los controles con células expuestas al tóxico. En las células control la mortalidad total es un 11%, siendo la apoptosis tardía (6%) la predominante. Las células expuestas al tóxico suman el 50,4% de mortalidad total como corresponde a la dosis  $IC_{50}$ , predominando la necroptosis (25,4%) y apoptosis tardía (17,8%). La necroptosis al ser un proceso combinado de apoptosis (muerte celular programada) y necrosis se caracteriza por permeabilización de la membrana, liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular con inflamación del tejido sin que el ADN se vea fragmentado.



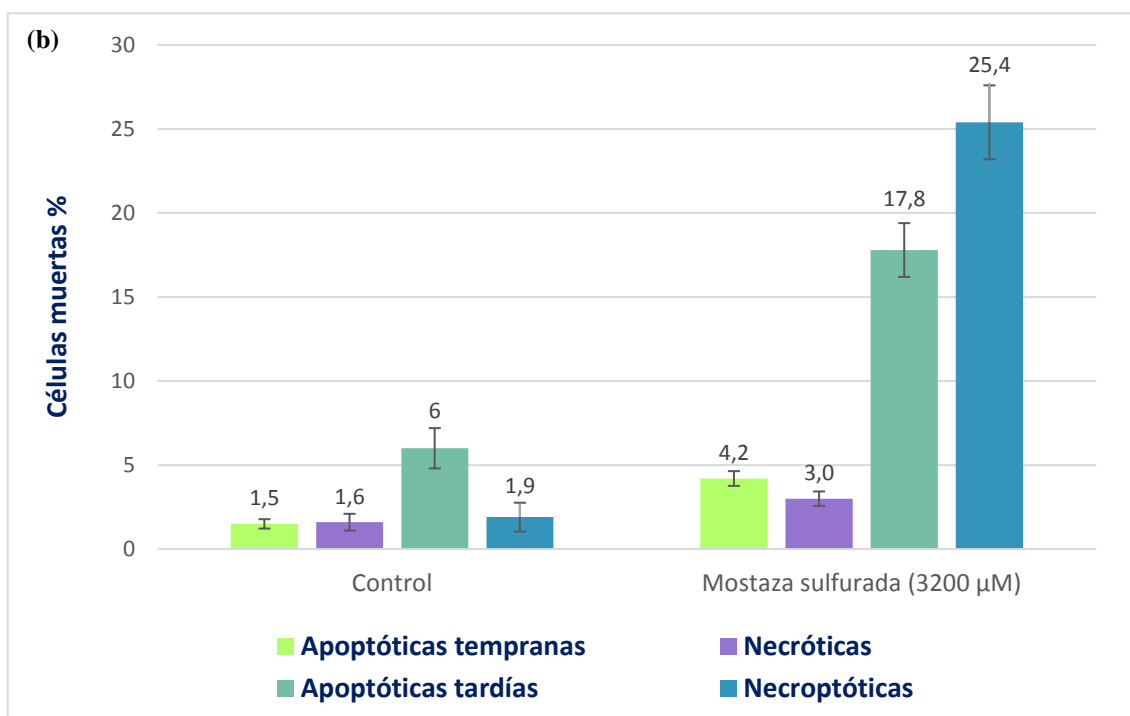


Figura 60. Efectos tóxicos de la mostaza sulfurada 3200 µM en los diferentes tipos de mortalidad. (a) Variaciones en cada tipo de muerte celular. (b) Diferencias entre controles y expuestas.

Dado que hay un aumento muy significativo de la muerte celular se investigó el tipo de protección que ofrecen la quercetina y vitamina C en cultivos de fibroblastos y queratinocitos HaCaT incubados durante 1 hora con la concentración media inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) de mostaza sulfurada (3200 µM). Para ello se añadió quercetina a concentraciones fisiológicas (1 y 2,5 µM) y vitamina C (10 mM) durante 30 minutos para que ejercieran su efecto protector. Transcurrido este tiempo se añadió el tóxico, retirándolo 1 hora después tal y como se describe en el protocolo de sustancias protectoras (página 122).

En la figura 61 se representan los valores de cada tipo de mortalidad inducida por MS 3200 µM de 6 experimentos tras descontar los controles, observándose una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de las poblaciones celulares en fase de apoptosis temprana, tardía y necroptosis, mientras que en la población de necrosis la variación no es significativa. Los resultados indican que gracias a la quercetina disminuyen todos los tipos de muerte celular en los que la membrana ha sufrido procesos de apoptosis.

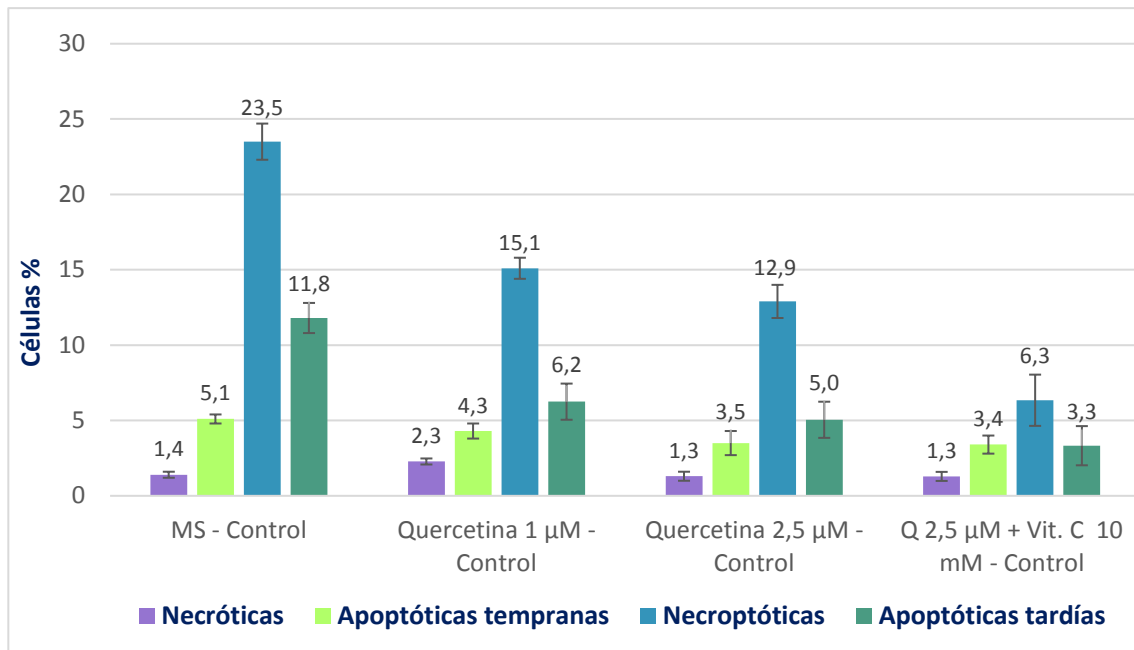


Figura 61. Protección por quercetina ( $\mu\text{M}$ ) y vitamina C (10 mM), frente a la mortalidad total y sus tipos (necrosis, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necroptosis) inducida por mostaza sulfurada 3200  $\mu\text{M}$  ( $n = 6$ ).

En la figura 62 se observa un histograma del citómetro de imagen AMNIS® (a) de queratinocitos HaCaT control con doble tinción APO 5 (página 83) de anexina con FITC (apoptosis) + yoduro de propidio (células muertas). En el cuadrante inferior izquierdo se observan las células vivas sin tinción. En el cuadrante inferior derecho las apoptóticas tempranas (anexina). En el cuadrante superior izquierdo las necróticas (yoduro de propidio). En el cuadrante superior derecho las de doble tinción (anexina + yoduro de propidio) que se analizan a continuación en el histograma (b) para diferenciar las necroptóticas de las apoptóticas tardías según su morfología. Las necroptóticas tienen el núcleo entero y la membrana celular algo desestructurada, mientras que las apoptóticas tardías tienen el núcleo fragmentado y la membrana muy rota. Estas células, a pesar de ser control sin tóxico, al encontrarse en pocillos contiguos de la misma placa que las células expuestas a mostaza sulfurada, el gas difundió y contaminó los controles (células vivas de la muestra 87,2% en lugar de un 98% que se suelen encontrar cuando se siembran en placas independientes). Por lo tanto a raíz de estos resultados, en los experimentos posteriores con MS todos los pocillos se cubrieron con Parafilm®.

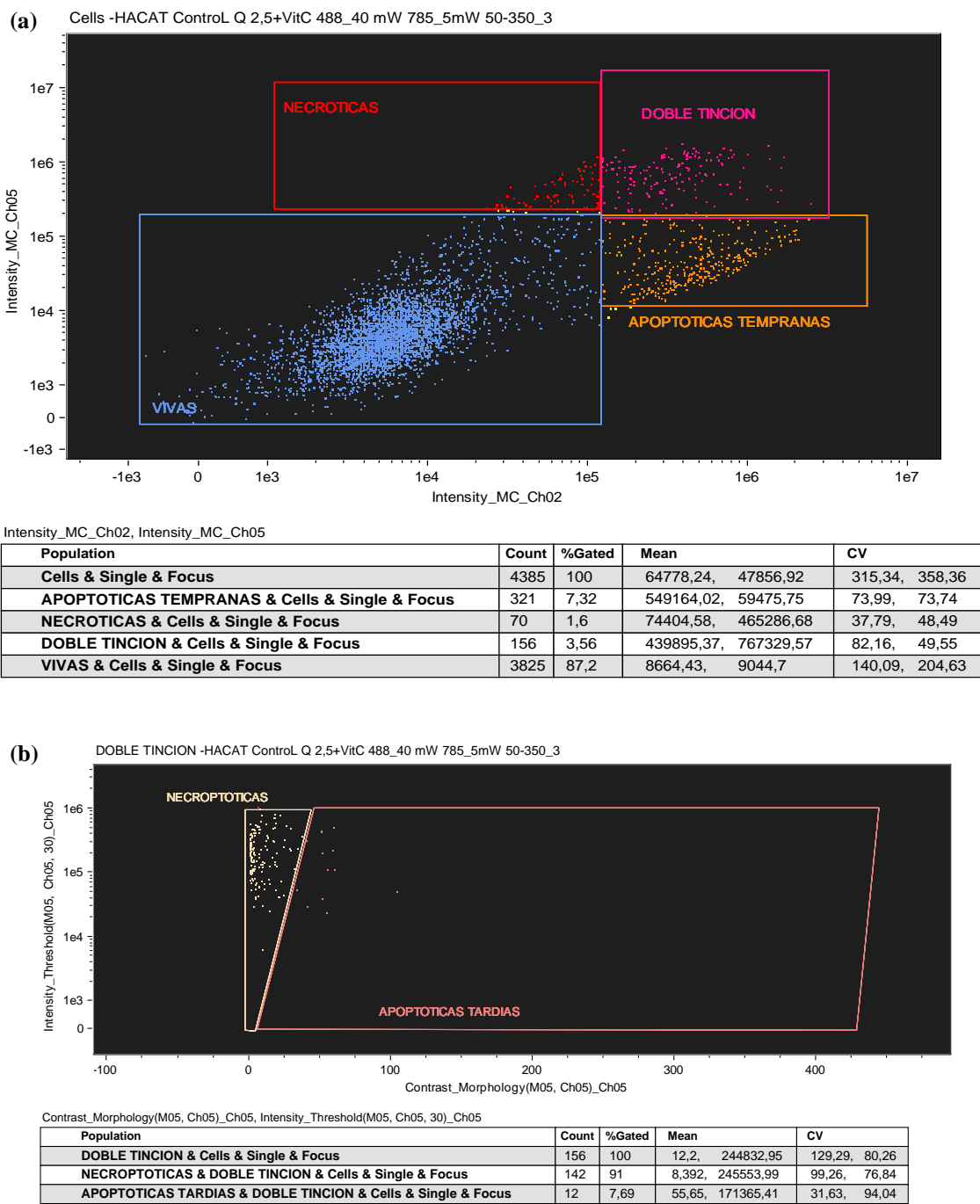


Figura 62. **(a)** Histograma biparamétrico de queratinocitos control con tinción APO 5. **(b)** Cuantificación del cuadrante superior derecho para diferenciar las células apoptóticas tardías y necroptóticas según su morfología.



*Efectos sobre la senescencia en células expuestas a mostaza sulfurada previo tratamiento con quercetina y vitamina C*

El estudio se realizó con células muy envejecidas con más de 20 pases (procesos de tripsinización) para obtener cultivos con predominio de células senescentes. En la figura 63 se estudia el efecto de la mostaza sulfurada (células expuestas durante 1 hora a 3200  $\mu\text{M}$ ) sobre la senescencia. Las placas se cultivaron durante 72 horas para permitir el envejecimiento celular. La senescencia se cuantificó mediante la actividad SA- $\beta$ -Gal en células vivas después de descartar las muertas. Esta enzima se encuentra principalmente en células senescentes, por lo que es un marcador ampliamente estudiado para valorar el envejecimiento celular. Con la exposición a mostaza sulfurada (3200  $\mu\text{M}$ ) se observa que casi desaparecen las células senescentes (de 39,2% del control disminuyen a 8,85% con el tóxico), lo que indica una posible actividad senolítica de la MS. Respecto al aumento que se observa en la senescencia de los cultivos tratados con quercetina y vitamina C (de 3,85% pasa a 26,1%), podría explicarse por el efecto protector de estas sustancias al inhibir la actividad de la MS.

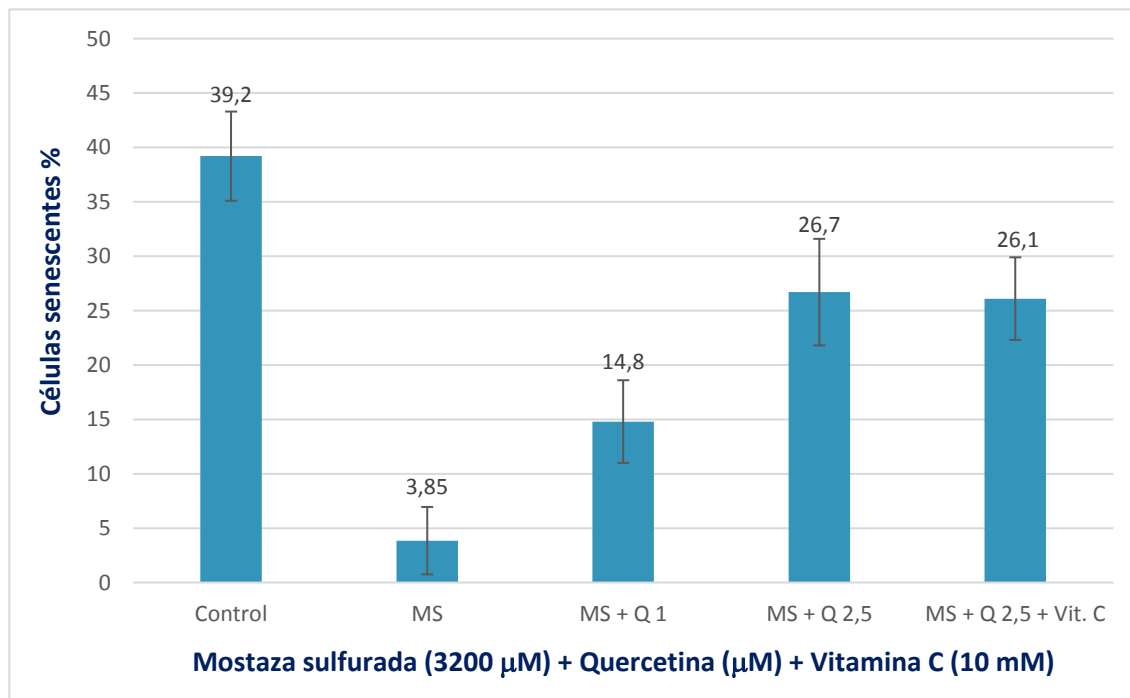


Figura 63. Senescencia en células vivas seleccionadas (excluyendo las células apoptóticas y necróticas) en cultivo de queratinocitos HaCaT expuestos a mostaza sulfurada a 3200  $\mu\text{M}$  (n =4).

En la figura 64 se exponen los resultados de 3 experimentos para medir la actividad senolítica en fibroblastos con exposición a dosis crecientes de mostaza sulfurada (500, 750, 1000, 2000, 3000  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. Tras 72 horas de incubación en estufa se determinaron simultáneamente apoptosis, necrosis y senescencia, seleccionando únicamente las células vivas para contabilizar la senescencia, excluyendo apoptóticas y necróticas. Se observa que en los controles había un 36,8% de células senescentes y que tras la exposición a MS a concentración 3000  $\mu\text{M}$  disminuían hasta cifras de  $2,8 \pm 2$ .

El cálculo sobre la  $\text{IC}_{50}$  de senescencia para mostaza sulfurada es 750  $\mu\text{M}$ .

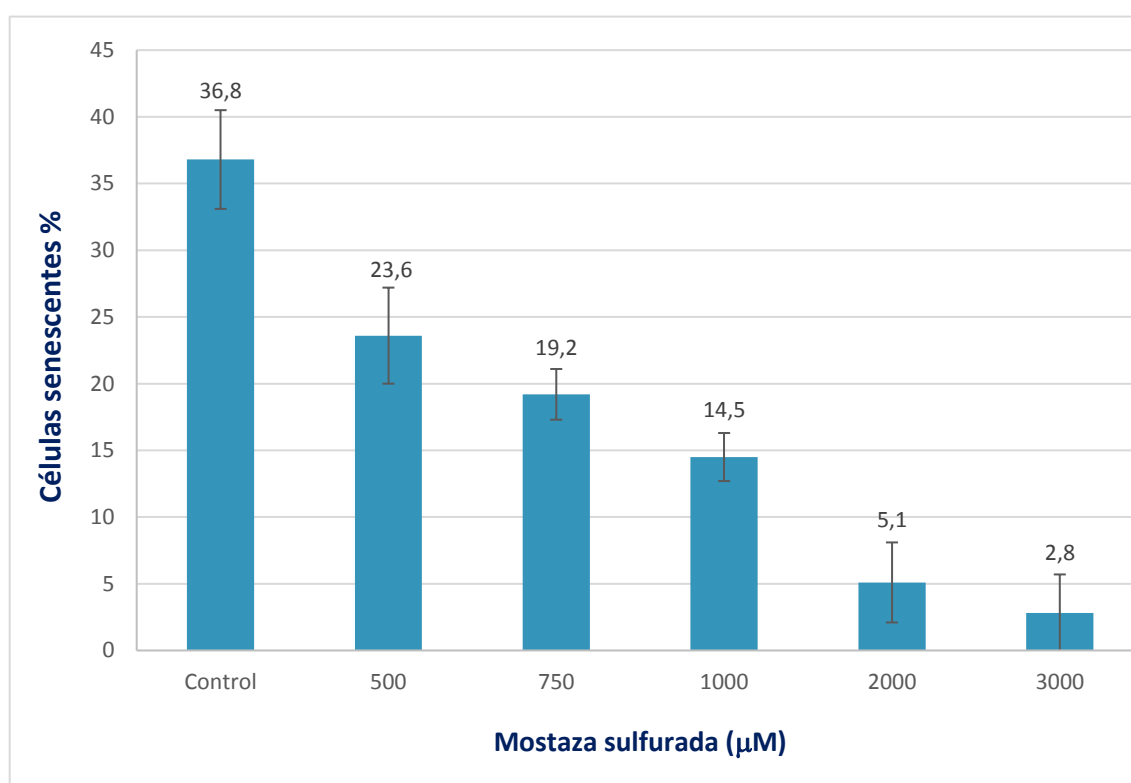


Figura 64. Disminución de la senescencia en fibroblastos provocado por la exposición a diferentes concentraciones de mostaza sulfurada durante 1 hora, seleccionando exclusivamente células vivas y excluyendo apoptóticas y necróticas. Los resultados representan la media y desviación estándar de 3 experimentos.

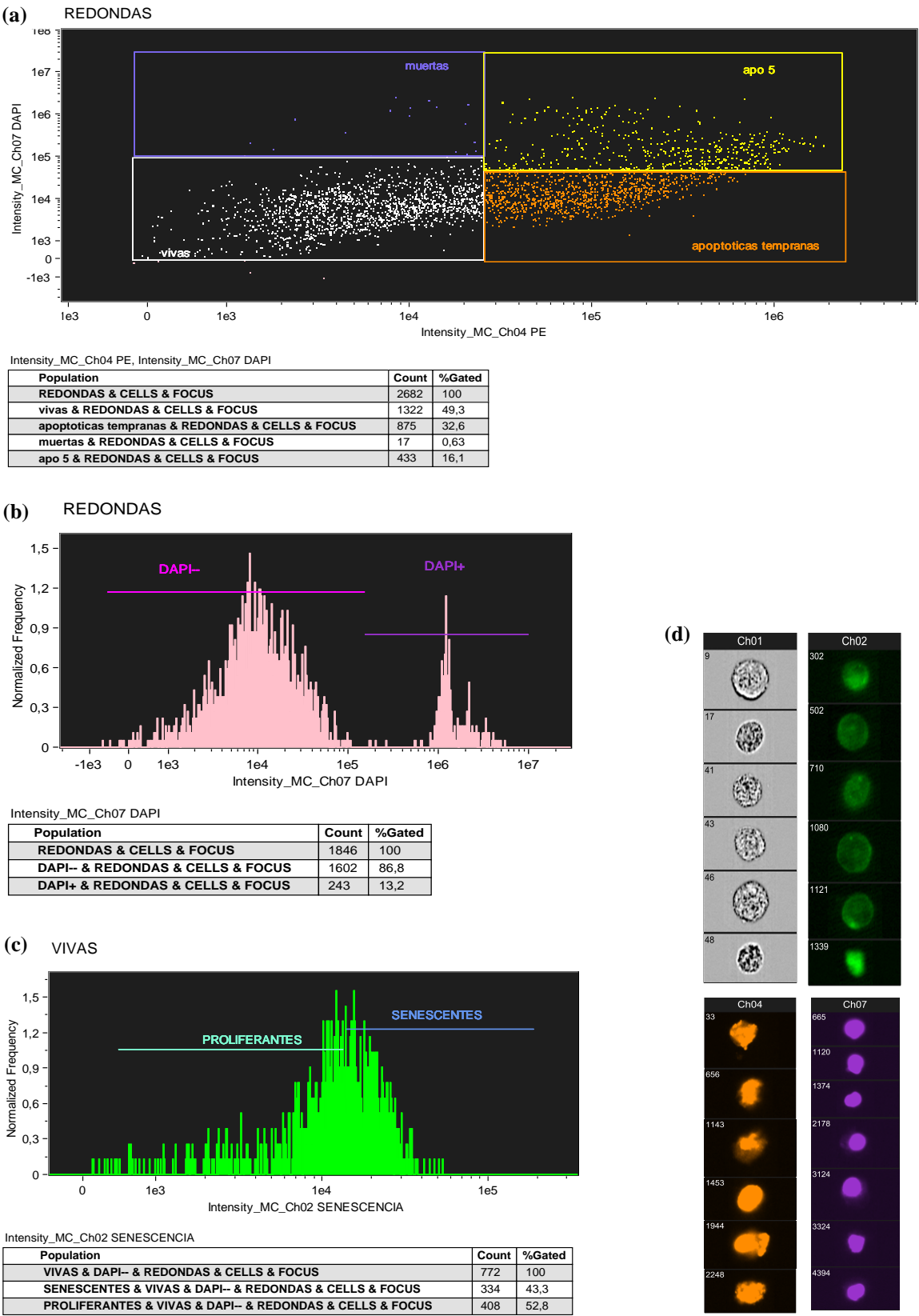


Figura 65. (a) Histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a mostaza sulfurada (3200  $\mu$ M) durante 1 hora. (b) Histograma monoparamétrico para calcular células muertas. (c) Histograma monoparamétrico para cuantificar células senescentes. (d) Fotografías de células vivas, senescentes, apoptóticas y necróticas.

La figura 65 muestra información aportada por el citómetro sobre experimentos con mostaza sulfurada:

- (a) Histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a MS 3200  $\mu\text{M}$  que cuantifica células vivas 49,3%, apoptóticas tempranas 32,6% (teñidas con anexina + ficoeritrina), necróticas 0,63% (teñidas con DAPI) y las APO 5 16,1% (doble tinción con anexina y DAPI) de las que según su morfología se calculan las necroptóticas y apoptóticas tardías.
- (b) Histograma monoparamétrico de fibroblastos expuestos a MS 3200  $\mu\text{M}$  previo tratamiento con quercetina 2,5  $\mu\text{M}$  que analiza las células vivas 86,8% (DAPI negativo) y las muertas 13,2% (DAPI positivo).
- (c) Histograma monoparamétrico con los datos de senescencia tras la exposición a MS 2000  $\mu\text{M}$  durante 1 hora. Para ello se han contabilizado únicamente las células vivas (fibroblastos) no teñidas con DAPI. El porcentaje de células senescentes es 43,3%, dato que se corresponde con una exposición a MS 1000  $\mu\text{M}$  explicado en la gráfica previa.
- (d) Fotografías de las células en el citómetro. En el canal 1 (Ch01) se visualizan queratinocitos HaCaT vivos sin tinción, en el 2 células senescentes teñidas con C12 (verde), en el canal 4 células apoptóticas con ficoeritrina (naranja) y en el 7 células muertas con DAPI.



**MOSTAZA NITROGENADA:***Cálculo de la IC<sub>50</sub> en mostaza nitrogenada*

Del mismo modo que se calculó la concentración media inhibitoria para el 50% de las células (IC<sub>50</sub>) de la mostaza sulfurada, se determinó el efecto de la nitrogenada en la viabilidad y mortalidad celular representado en la figura 66 (a).

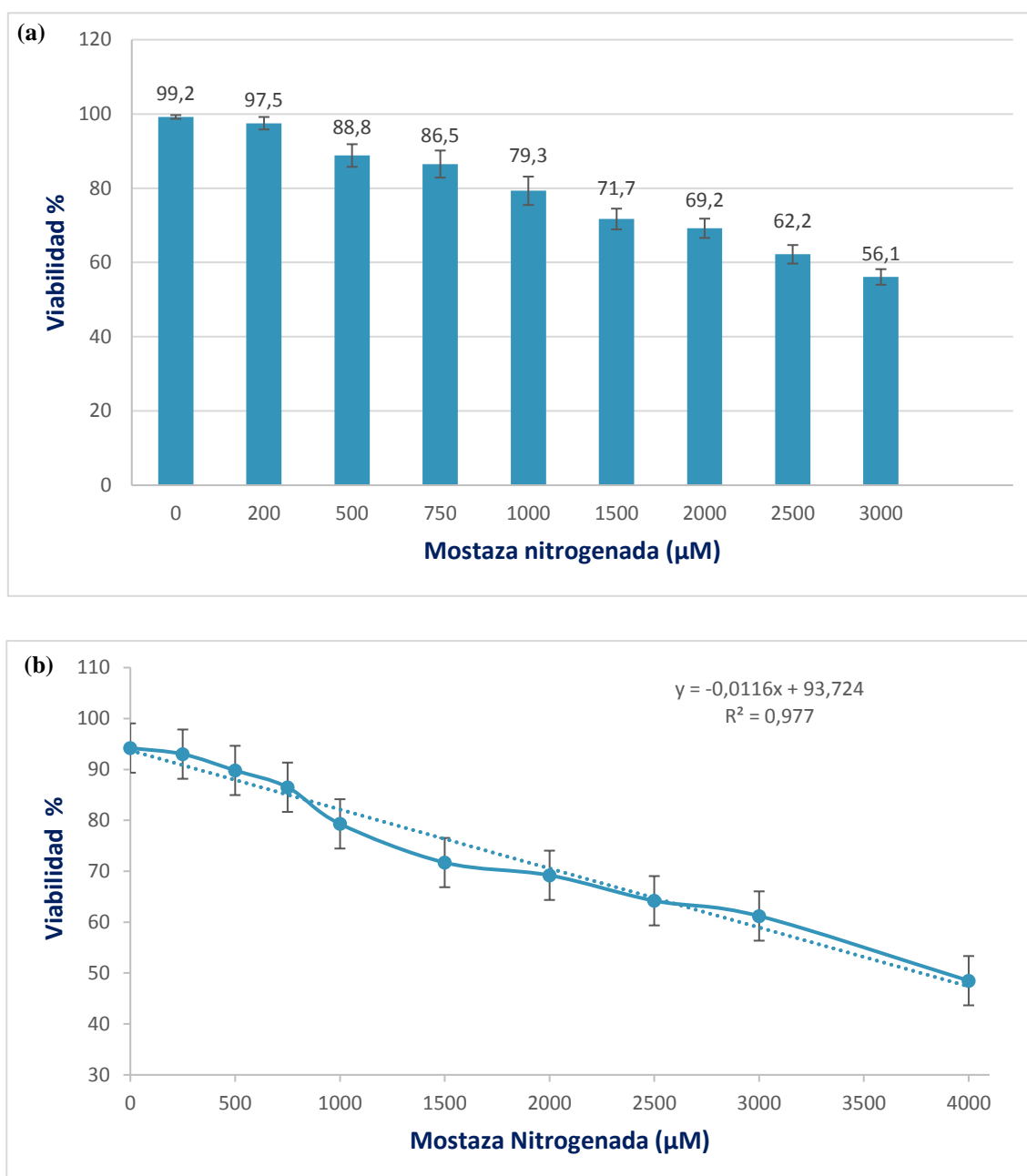


Figura 66. (a) Efecto de la exposición a mostaza nitrogenada durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables determinadas por MTT. Se muestran los valores promedio y desviación estándar de 8 experimentos. (b) Estudio de la tendencia. Sustituyendo en la ecuación  $y=50$  se extrae para fibroblastos una IC<sub>50</sub> = 3770 ± 184 µM.

En las gráficas anteriores se observa la pérdida de vitalidad celular mediante la técnica MTT en fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada durante una hora. Los experimentos en los que se utilizó yoduro de propidio para medir la mortalidad mediante citometría de imagen dieron resultados idénticos para las células no viables. La combinación de ambos datos permitió el cálculo de la concentración media inhibitoria para el 50% (IC<sub>50</sub>). Los ensayos se realizaron tanto en fibroblastos como en queratinocitos.

A partir de la recta de regresión de la figura 66 (b) se calcula la IC<sub>50</sub>:

$$y = -0,0116 x + 93,724$$

Sustituyendo en la ecuación  $y = 50$  se obtiene el IC<sub>50</sub>:

$$50 = -0,0116 x + 93,724; x = 3769,3$$

Por tanto, se calculó que la IC<sub>50</sub> de la aplicación de MN durante una hora es:

- IC<sub>50</sub> en fibroblastos:  $3770 \pm 184 \mu\text{M}$  con 8 experimentos realizados.
- IC<sub>50</sub> en queratinocitos:  $4015 \mu\text{M} \pm 244 \mu\text{M}$  con 6 experimentos realizados.

La figura 67 son fotografías de placas de fibroblastos vistos en el microscopio de contraste de fases. El apartado (a) es un control donde se visualiza su característica forma fusiforme. El medio de cultivo (DMEM) todavía conserva el color rosado. La fotografía (b) se realizó a las 24 horas de la exposición a MN y se aprecian pocos cambios, principalmente deshidratación.

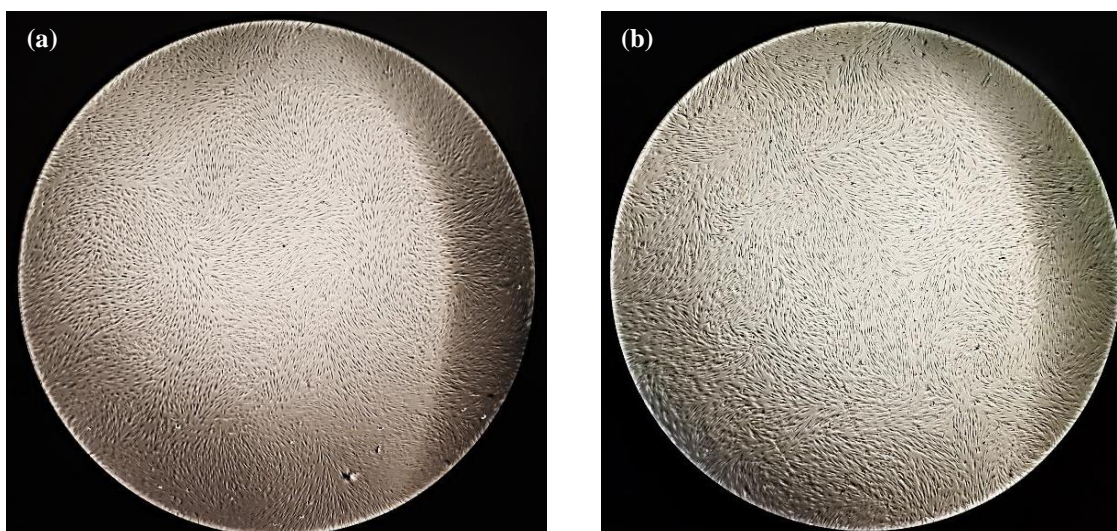


Figura 67. (a) Fibroblastos control. Objetivo 10X. (b) Fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada  $3800 \mu\text{M}$  durante 1 hora. Fotografía realizada a las 24 horas. Objetivo 10X.

La figura 68 apartado (a) se realizó a las 48 horas de la exposición y ya se distingue la disminución de la celularidad, apreciándose regiones vacías. El apartado (b) al haber recibido tratamiento preventivo con quercetina 1  $\mu$ M todavía conserva alta confluencia celular.

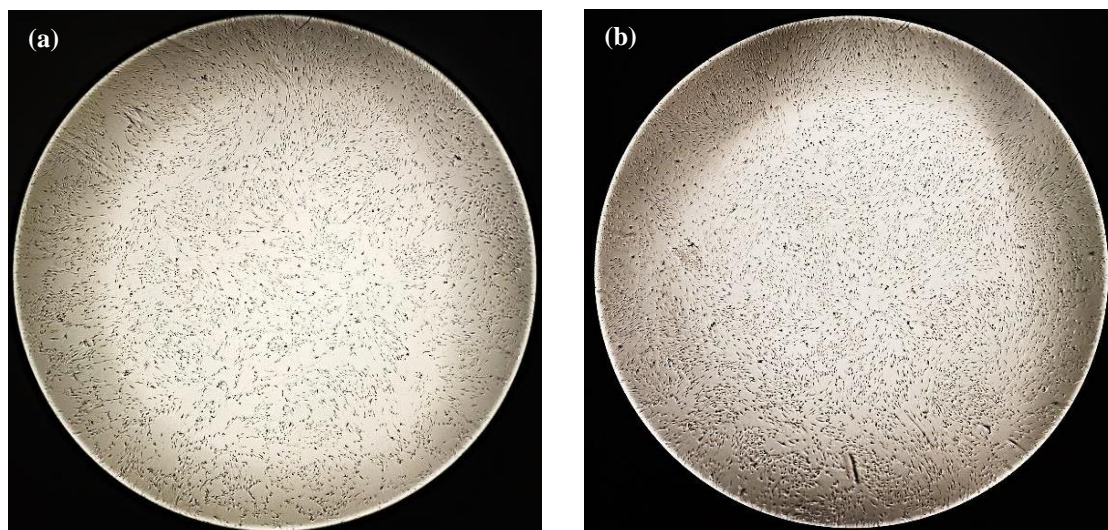


Figura 68. Fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada 3800  $\mu$ M durante 1 hora. Objetivo 10X. Fotografías realizadas a las 48 horas. (a) Sin tratamiento protector. (b) Con tratamiento preventivo de quercetina 1  $\mu$ M.



*Protección celular de la quercetina frente a mostaza nitrogenada*

En la figura 69 se calcula el efecto protector de quercetina a dosis crecientes y vitamina C frente a MN 3800  $\mu$ M. La MN no se difundía a otros pocillos, por lo que los controles se dejaron contiguos a los pocillos expuestos al tóxico. Partiendo de un 40,4% de células vivas tras la exposición a MN, con el tratamiento preventivo de quercetina la vitalidad aumentaba significativamente (61,8% con 1  $\mu$ M, 68,3% con 2,5  $\mu$ M). Al utilizar tratamiento combinado de quercetina 2,5  $\mu$ M con vitamina C 10 mM la vitalidad mejoraba ligeramente (70,6%), pero la vitamina C por sí sola no ofrecía tanta protección (48,2%).

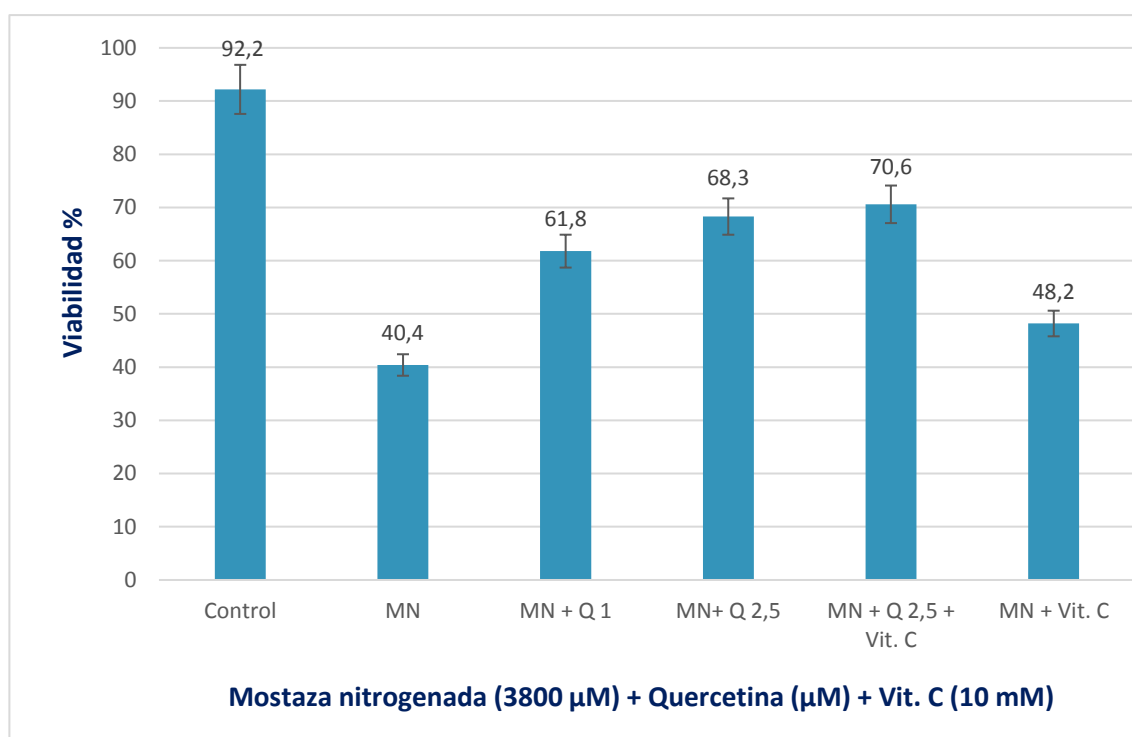


Figura 69. Efecto de la exposición a mostaza nitrogenada 3800  $\mu$ M durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables después de añadir diversas concentraciones de quercetina y vitamina C.

Para estudiar los beneficios de la quercetina se trataron los cultivos con diferentes concentraciones y posteriormente se expusieron a MN 3800  $\mu$ M durante 1 hora. Teniendo en cuenta la mortalidad celular de los cultivos medida en el citómetro de imagen, se calculó el porcentaje de protección que muestra la figura 70.

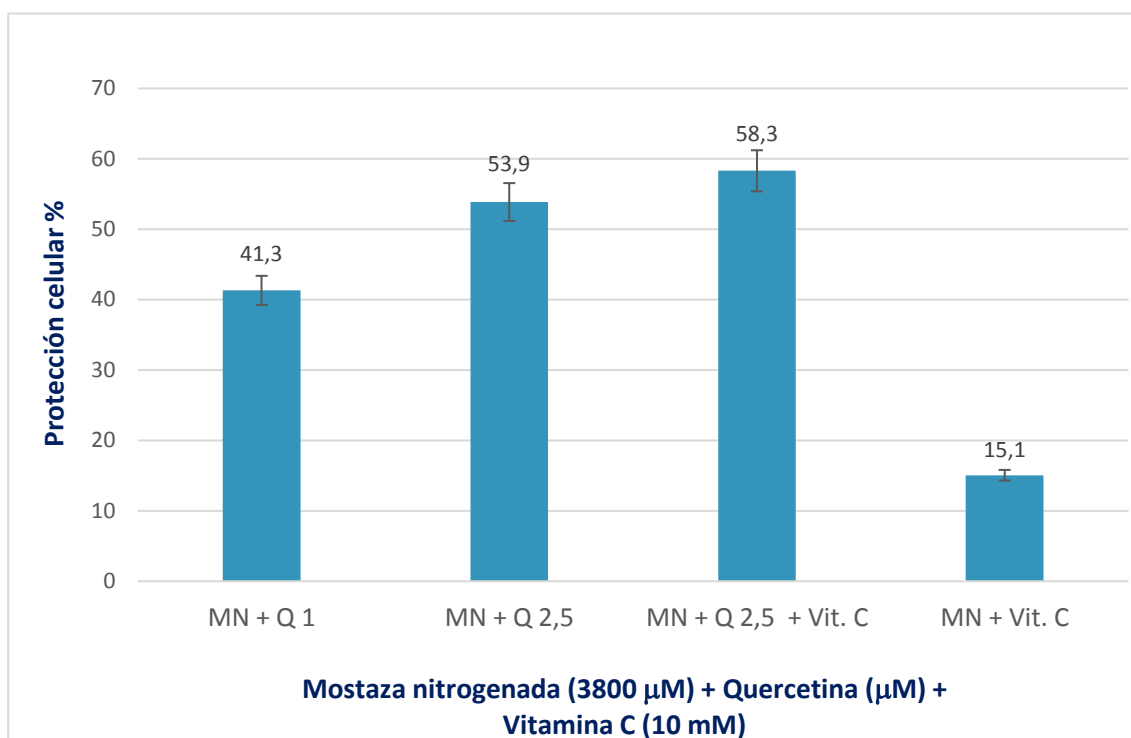


Figura 70. Porcentaje de protección por quercetina (µM) y vitamina C (mM) frente a la mortalidad en fibroblastos inducida por mostaza nitrogenada (3800 µM).

### *Tipos de muerte celular por exposición a mostaza nitrogenada*

La mortalidad de la mostaza nitrogenada (3800  $\mu\text{M}$ ) en función de dosis crecientes de sustancias protectoras está desglosada según los tipos de muerte celular en la figura 71.

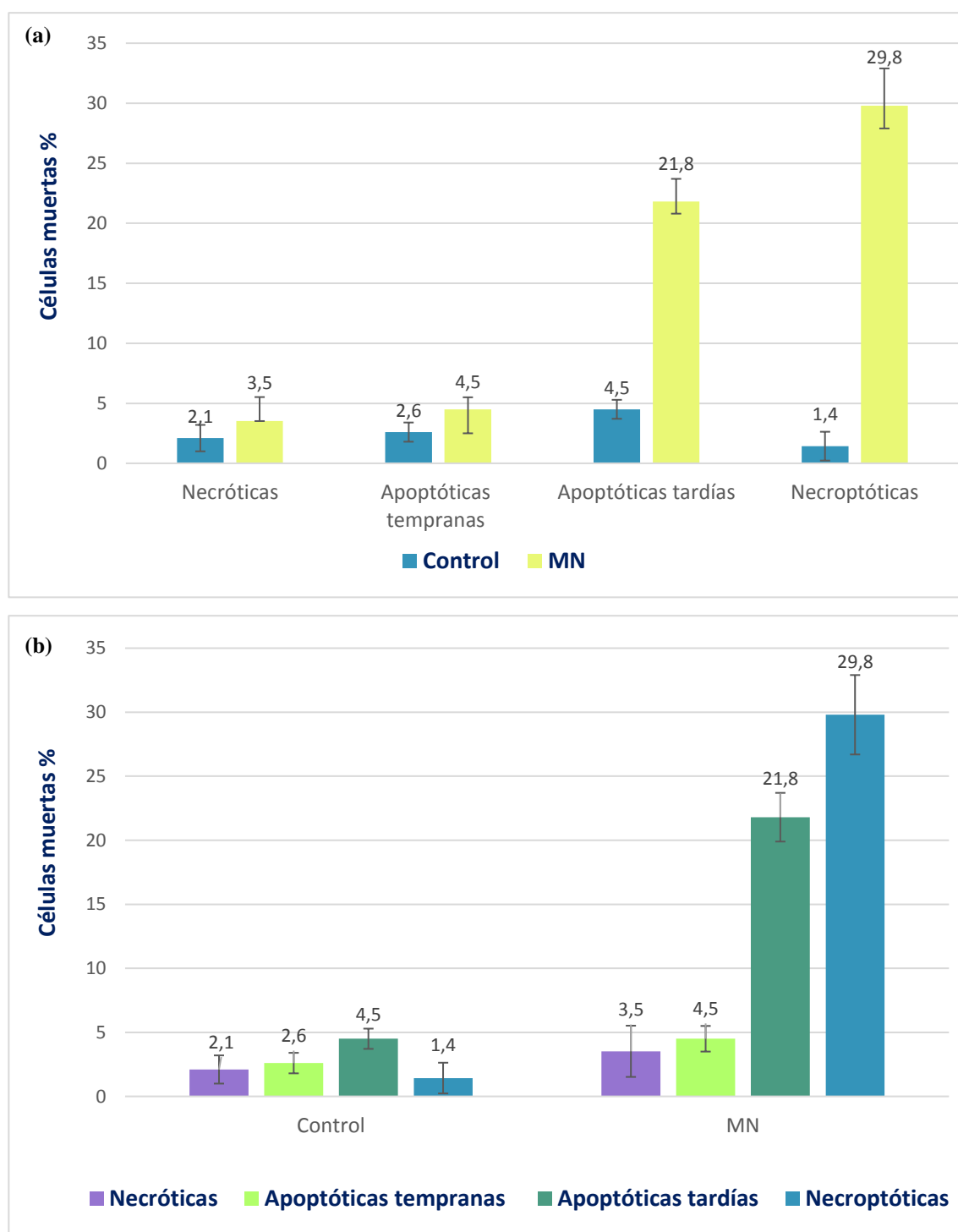


Figura 71. Efectos tóxicos de la mostaza nitrogenada 3800  $\mu\text{M}$  en los diferentes tipos de mortalidad. (a) Variaciones en cada tipo de muerte celular. (b) Diferencias entre controles y expuestas.

En las gráficas previas se observa un aumento significativo de la apoptosis tardía y necroptosis ( $p < 0,01$ ), igual que en la mostaza sulfurada.

En la figura 72 se observa el tipo de protección, concretamente el tipo de muerte celular prevenida por la adición de quercetina o vitamina C. Se observa que los efectos de la quercetina disminuyen la inducción de apoptosis y necroptosis de manera significativa.

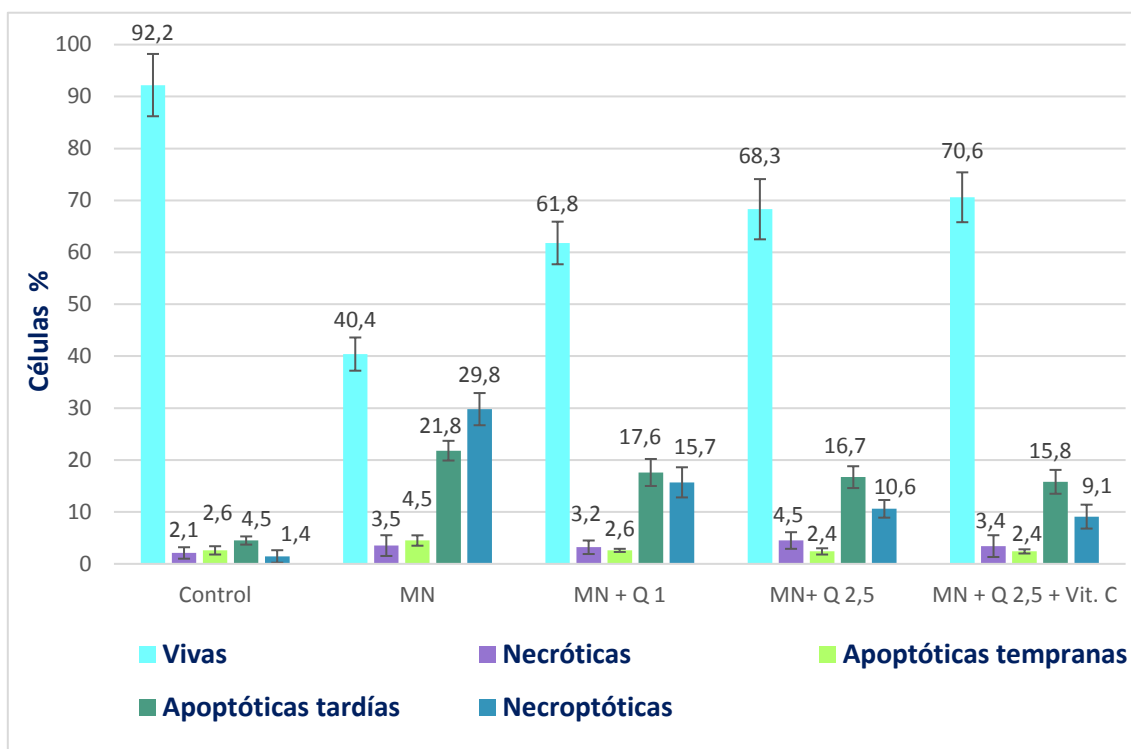


Figura 72. Efecto de la quercetina ( $\mu\text{M}$ ) y vitamina C (10 mM) en fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada (3800  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora cuantificando los tipos de muerte celular. Medido por citometría de imagen las 72 horas tras la aplicación del tóxico.

En la figura 73 se observa un histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a MN 3800  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) sin tratamiento protector con datos obtenidos por citometría. Con el fluorocromo ficoeritrina se señalizan las células apoptóticas tempranas en el cuadrante inferior derecho (4,63%) y con DAPI las células muertas en el cuadrante superior izquierdo (4,44%). Las células vivas sin teñir se localizan en el cuadrante inferior izquierdo (41,5%). Las APO 5 (48,9%) del cuadrante superior derecho corresponden a las células apoptóticas tardías y necroptóticas que deberán diferenciarse posteriormente según su morfología.

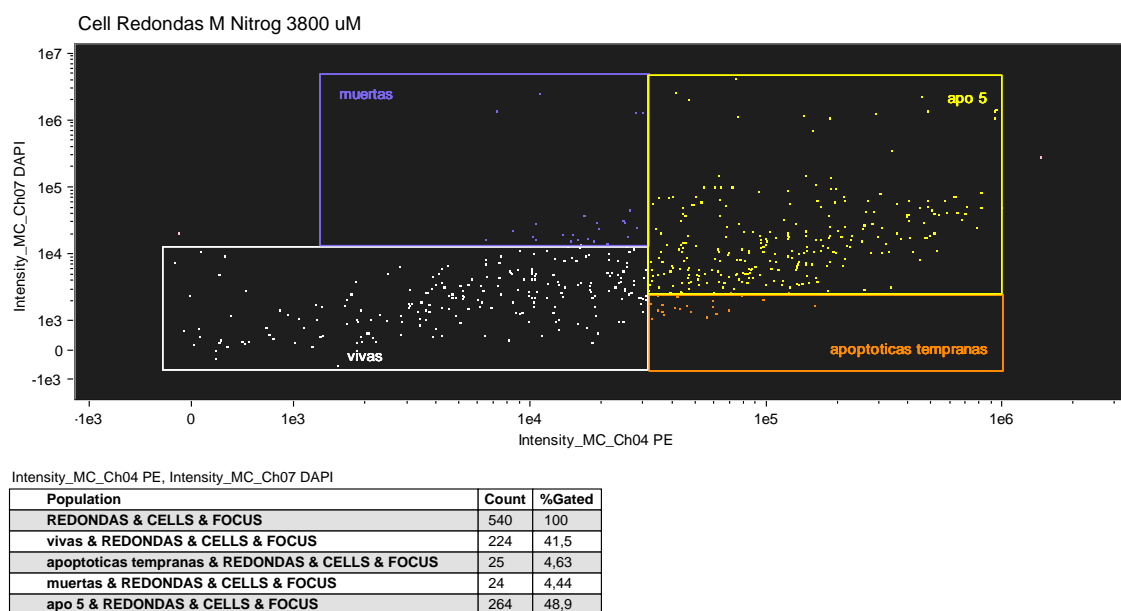


Figura 73. Histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada 3800  $\mu$ M marcados con ficoeritrina y DAPI.

La figura 74 es un histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a MN 3800  $\mu$ M previo tratamiento protector con quercetina 1  $\mu$ M. Se visualizan un 61,4% de células vivas, 3,49% de apoptóticas tempranas, 5,82% de muertas y 28,8% de células clasificadas como APO 5 que posteriormente se cuantifican en apoptóticas tardías o necroptóticas.

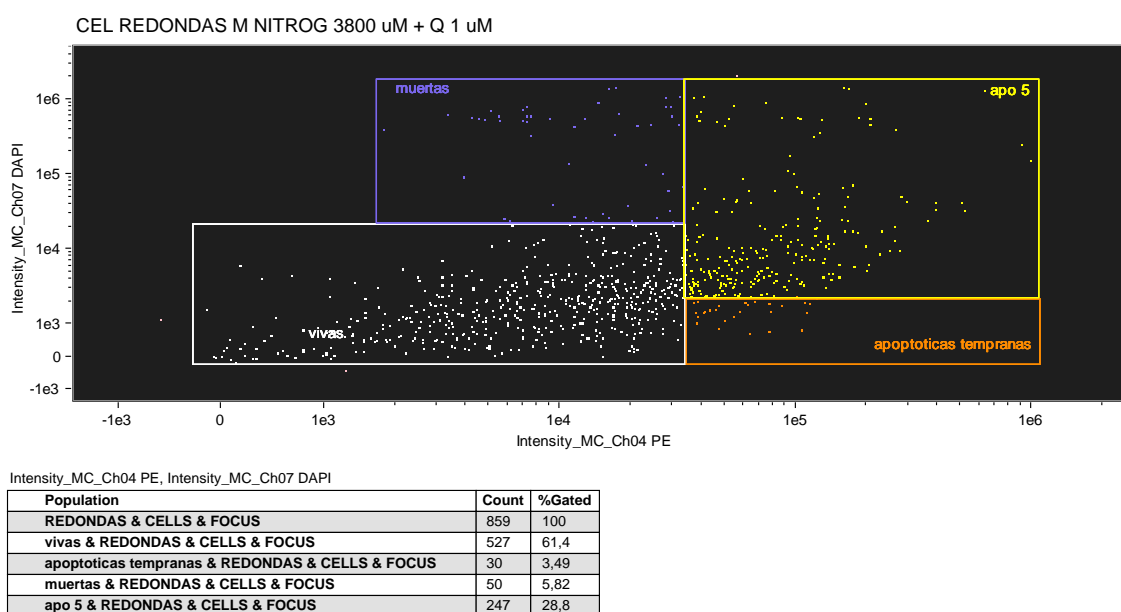


Figura 74. Histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada 3800  $\mu$ M previo tratamiento con quercetina 1  $\mu$ M y marcados con ficoeritrina y DAPI.

*Efectos sobre la senescencia en células expuestas a mostaza nitrogenada previo tratamiento con quercetina y vitamina C*

Para el estudio de la senescencia se han utilizado células muy envejecidas con más de 20 pases para obtener cultivos con alto contenido en células senescentes. El efecto protector de la quercetina sobre la senescencia celular inducida por MN a 3800  $\mu\text{M}$  se muestra en la figura 75, observándose un aumento del porcentaje de células senescentes de 19,4% y 24,5% para concentraciones de quercetina de 1 y 2,5  $\mu\text{M}$  respectivamente. Respecto a la vitamina C (10 mM) los resultados no son estadísticamente significativos en comparación con quercetina 2,5  $\mu\text{M}$ .

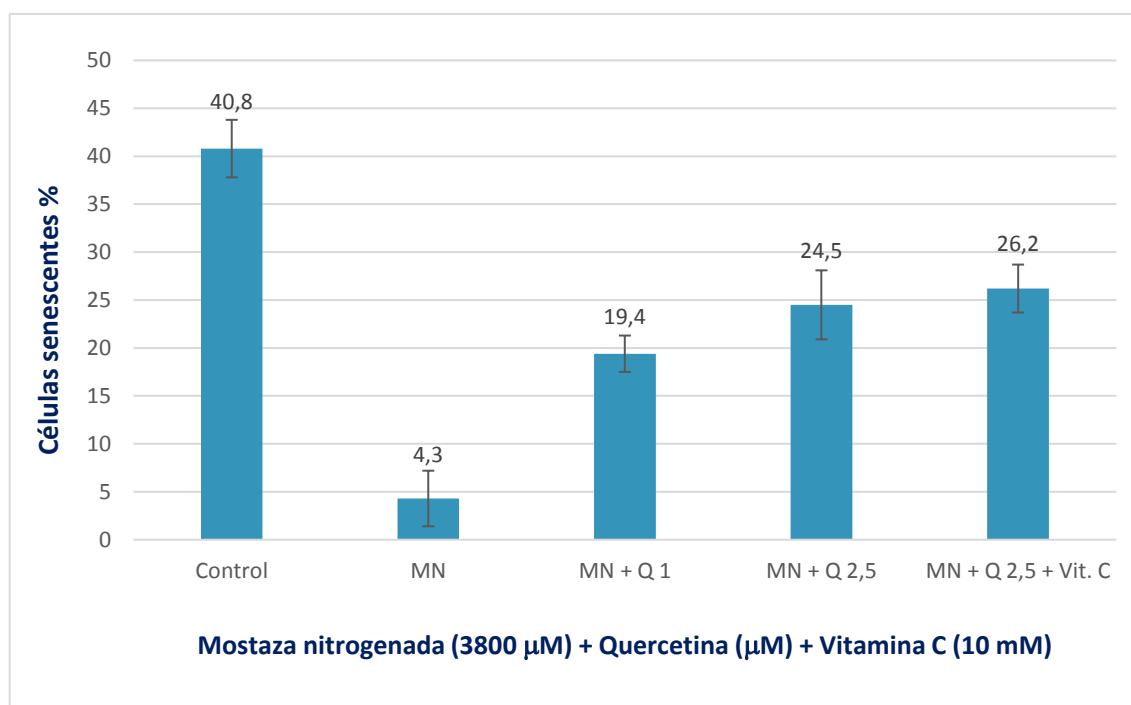


Figura 75. Efecto de la mostaza nitrogenada (3800  $\mu\text{M}$ ) sobre la senescencia previo tratamiento con quercetina y vitamina C.

En la figura 76 se exponen los resultados de 3 experimentos para medir la actividad senolítica en fibroblastos con exposición a dosis crecientes de MN (1000, 3000 y 3800  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. Tras 72 horas de incubación en estufa se determinaron simultáneamente apoptosis, necrosis y senescencia. Sólo se contabilizaron las células vivas para la senescencia (cuadrante inferior izquierdo de los histogramas biparamétricos del citómetro), restando apoptóticas y necróticas. Partiendo de un 40,3% de células

senescentes en el control (valor similar a la MS) se observa que tras la exposición a MN 1000  $\mu\text{M}$  baja a 19,1%, a concentración 3000  $\mu\text{M}$  disminuye hasta 4,6% y a dosis de 3800  $\mu\text{M}$  hasta 3,1%. Sólo se testaron hasta 3800  $\mu\text{M}$  porque corresponde a la  $\text{IC}_{50}$ .

El cálculo sobre la  $\text{IC}_{50}$  de senescencia para mostaza nitrogenada es 1000  $\mu\text{M}$ .

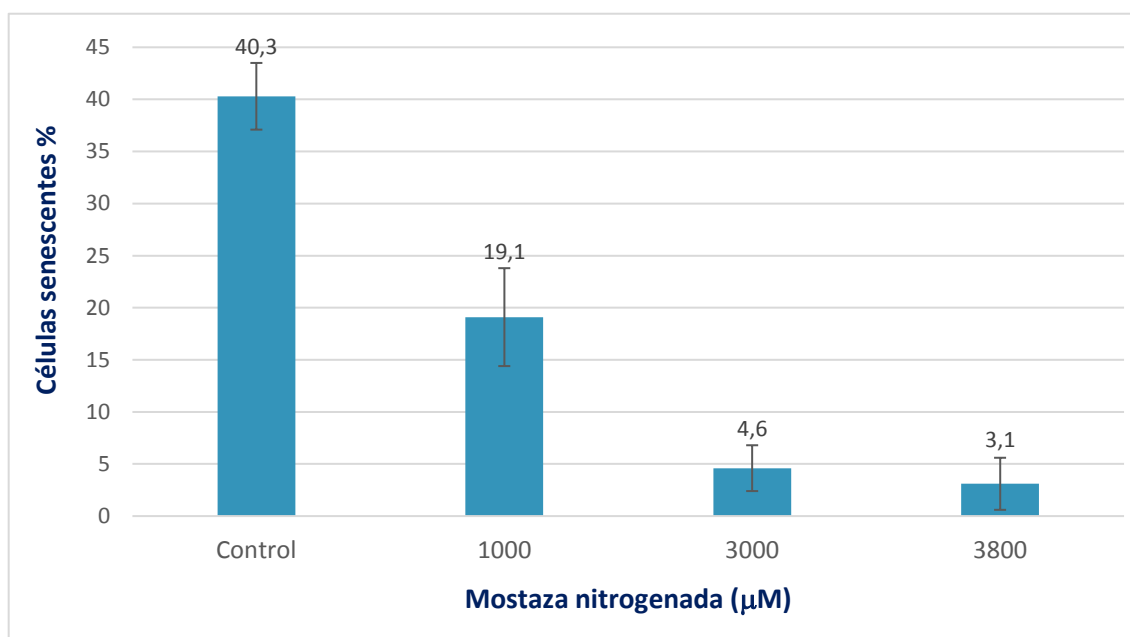


Figura 76. Disminución de la senescencia provocado por la exposición de fibroblastos a diferentes concentraciones de mostaza nitrogenada durante 1 hora, seleccionando exclusivamente células vivas y excluyendo apoptóticas y necróticas. Los resultados representan la media y desviación estándar de 3 experimentos.

# Discusión

---





## Discusión

Tal y como se describe en la introducción, el estudio de la mostaza sulfurada y nitrogenada comenzó por su interés militar y continúa por su uso como quimioterápico. En esta discusión se abordan los resultados de las mostazas comparándolos con los datos publicados en la bibliografía revisada.

### **MORTALIDAD INDUCIDA POR MOSTAZAS**

Los experimentos para medir la mortalidad celular de las figuras 46 y 66 nos dan una concentración media inhibitoria del 50% ( $IC_{50}$ ) para mostaza sulfurada de  $3226 \pm 192 \mu M$  y para la nitrogenada de  $3770 \pm 184 \mu M$ . Estos resultados se han conseguido en un modelo de fibroblastos y queratinocitos HaCaT, siendo la sulfurada un 20% más letal.

Dabrowska sometió células endoteliales a concentraciones crecientes de MS durante 3 horas encontrando una  $IC_{50}$  de  $1000 \mu M$  e  $IC_{20}$  de  $500 \mu M$ . Nuestros resultados a una tercera parte del tiempo de exposición requieren aproximadamente el triple de dosis para inducir la misma mortalidad (Dabrowska et al., 1996).

Inturi trabajó con células epidérmicas JB6 y añadió MN  $0,75 \mu M$  durante 96 horas y encontró un 25 % de mortalidad, además de una gran disminución de la proliferación celular (Inturi et al., 2014). Otros resultados muy poco comparables son los de Rothmiller con queratinocitos que expuso a MN durante 5 días y encontró un  $IC_{50}$  de  $5,9 \mu M$ . Sin embargo, la gran duración del tratamiento no es comparable a una exposición aguda de 1 hora (Rothmiller et al., 2018a).

Groehler expuso células cultivadas de fibrosarcoma humano (HT1080) a MN y encontró una  $IC_{50}$  de  $2800 \mu M$  con exposición durante 3 horas (Groehler et al., 2016), concentración que está en la línea del  $IC_{50}$  de  $3770 \mu M$  durante 1 hora de exposición que se ha estudiado en esta memoria (figura 66).

Con estos resultados se puede concluir que la mostaza sulfurada es más tóxica que la nitrogenada, ya que a menor concentración produce mayor letalidad.

## TIPOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR MOSTAZAS

Comparando los resultados de los tipos de muerte celular obtenidos tras la exposición a mostaza sulfurada (figura 60) y nitrogenada (figura 71) durante 1 hora, obtenemos las diferencias que se aprecian en la siguiente figura:

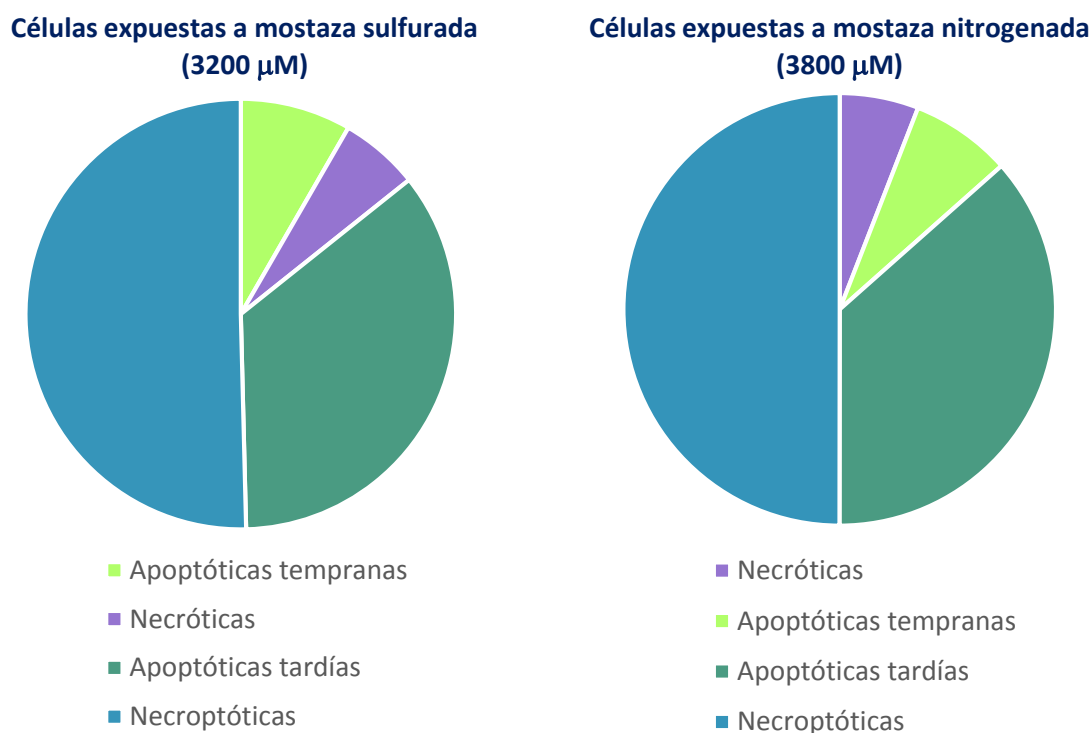


Figura 77. Comparativa de los distintos tipos de muerte celular causados por la exposición a mostaza sulfurada (3200 µM) y nitrogenada (3800 µM) durante 1 hora.

El efecto de ambas mostazas es similar, siendo la población de necroptóticas la más cuantiosa (MS 25,4%, MN 29,8%) seguida de las apoptóticas tardías (MS 17,8%, MN 21,8%). Las células en apoptosis tardía predominan sobre las apoptóticas tempranas porque se han determinado 4 días después de la exposición a mostazas y en conjunto representan un 22% para la MS y un 26,3% para la MN. Respecto a la necrosis cabe destacar que se observaron cifras muy bajas (MS 3%, MN 3,5%). Dado que la muerte por necrosis implica la rotura de la membrana celular, los datos sugieren que estos tóxicos no actúan por degradación directa de la membrana celular, sino que la mayor parte de su efecto letal lo realizan por inducción de apoptosis, probablemente por la generación de radicales libres que activan las vías de las caspasas.

Dabrowska utilizó cultivos de células endoteliales expuestos a MS (0-1000 µM) de 2 a 3 horas. La exposición al tóxico a concentración  $\leq 250$  µM durante 3 horas dio lugar a un 3% de células apoptóticas, durante 6 horas un 19% y durante 24 horas un 50%. A

concentración de 500  $\mu\text{M}$  durante 6 horas obtuvieron un 80% de células necróticas y un 20% de apoptóticas (Dabrowska et al., 1996). En esta tesis doctoral se han utilizado concentraciones de MS mayores (3200  $\mu\text{M}$ ) porque el tiempo de incubación ha sido menor (1 hora). La medición de la apoptosis se realizó a las 48 horas, obteniendo cifras de necrosis menores (2%) y mayores de apoptosis (47,4%).

El equipo de Rothmiller investigó con una línea celular de queratinocitos HaCaT, estudiando la resistencia de estas células al exponerlas semanalmente a MS (dosis crecientes desde 0,2 hasta 500  $\mu\text{M}$  durante 5 días cada semana). Posteriormente medían radicales libres y glutatión (Rothmiller et al., 2018a). Nosotros hemos utilizado dosis crecientes desde 2000  $\mu\text{M}$  hasta 4000  $\mu\text{M}$  pero con tiempos de exposición desde 30 minutos hasta una hora. En la figura 46 se calculó la concentración media inhibitoria del 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) medida por la técnica MTT, mediante 8 experimentos.

Batal investigó el efecto de la MS y observó que por su naturaleza lipofílica se absorbía a través de la piel en un 10-20%, volatilizándose el resto de la sustancia (corroborado por Kehe en 2005). Analizó los queratinocitos y fibroblastos de ratones expuestos (2, 6 y 60 mg/kg) y comprobó que en las primeras 6 horas tras la aplicación del tóxico se mantenía la estructura de la membrana celular. A partir de las 24 horas se alteraba la integridad de la membrana basal y comenzaba la apoptosis, corroborando las teorías de Greenberg (Batal et al., 2014). En esta tesis doctoral se comprobó que antes de las 24 horas en el microscopio no se observaba ninguna variación de la morfología celular, mientras que a partir del segundo día ya se observaban alteraciones morfológicas.

Greenberg estudió los distintos tiempos de exposición a la MS en animales y línea continua de queratinocitos. Las dosis de trabajo del tóxico fueron determinadas en base al tiempo de exposición al gas (5, 8, 10 y 12 minutos), eutanasiando los animales a las 6 ó 24 horas de la exposición para evaluar los efectos producidos (analizan los tipos de muerte celular con DAPI y apoptosis con anexina V + FITC). En los resultados de este artículo se especificó que el periodo de latencia era entre 24 y 48 horas con aparición de los síntomas clínicos y celulares en ese tiempo. Concretaron que había una clara correlación entre la aparición de los síntomas con la concentración y tiempo de exposición al agente. Estos autores no especificaron en ningún momento la concentración final celular de MS, sólo indicaron que trabajaron con este tóxico en estado gaseoso (Greenberg et al., 2006). Para esta tesis se partió del reactivo mostaza sulfurada en estado

líquido a 8,58 M, comercializado por el laboratorio Sigma-Aldrich®. A partir de esta concentración se prepararon las sucesivas diluciones con agua destilada para hallar la concentración celular final deseada.

Se comprobó que cuando los controles (sin mostaza) estaban en la misma placa que los pocillos con el tóxico, al incubar las células en estufa a 37 °C y teniendo en cuenta que el punto de inflamación de la mostaza sulfurada es 52 °C, el tóxico de los pocillos problema se evaporaba y contaminaba los pocillos contiguos de la misma placa. Por eso al trabajar con mostaza sulfurada todos los pocillos se cubrieron con Parafilm®.

El grupo de Pohl estudió el efecto agudo de las mostazas en modelos de cocultivos con epitelio bronquial (HBEC) y fibroblastos pulmonares formando bicapas en las placas de cultivo tras 31 días de diferenciación. Posteriormente los exponía a diferentes concentraciones de MS (30, 100, 300 y 500 µM) durante 30 minutos y los cultivaba en estufa durante 24 horas antes de la lectura con el lector de placas (proteínas generadas por la apoptosis), voltímetro de precisión EVOM (resistencia eléctrica transepitelial) y microscopía electrónica. Se comprobó que la MS producía cambios *in vitro* (a las 24 horas la resistencia y permeabilidad de la membrana disminuía en un 75% a concentración de 500 µM y se producía un aumento del espacio intercelular, disminución de la adhesión de la matriz con la célula, aumento de la producción ciliar de moco y disminución del movimiento de los cilios), justificando estos cambios la aparición de patología *in vivo*. Estos autores a otras concentraciones de MS demostraron que los efectos no eran estadísticamente significativos respecto a los controles (Pohl et al., 2009). Para esta tesis se ha trabajado a concentración 500 µM y la IC<sub>50</sub> era únicamente del 10% respecto a los controles, pero hay que tener en cuenta que la estirpe celular no era pulmonar.

Kehe y colaboradores llevan muchos años publicando sus estudios sobre MS. En la revisión que realizaron en 2005 especificaron que los efectos vesicantes aparecían a concentraciones superiores de 50 µM con detención del ciclo celular en fase G1. Su grupo determinó que la MS alquilaba la enzima hexoquinasa, reaccionando con el glutatión, aumentando las especies reactivas de oxígeno, alquilando la guanina que además de alterar la síntesis de proteínas producía una detención del ciclo celular causando la muerte celular por apoptosis (Kehe and Szinicz, 2005). En 2013 publicaron otro artículo donde utilizaron un modelo de queratinocitos HaCaT expuestos a MS entre

0.3 y 300  $\mu\text{M}$  durante 60 ó 120 minutos para medir alquilación y aductos del ADN (segmentos), sin medir apoptosis. Especificaban que los soldados iraníes expuestos a MS mostraban alquilación de sus leucocitos similar a un experimento previo suyo con concentraciones de 0,9  $\mu\text{M}$ . En otro de sus experimentos *in vitro*, la apoptosis inducida por la exposición de queratinocitos a 100  $\mu\text{M}$  se consideraba equivalente al mecanismo de acción del efecto vesicante a nivel cutáneo (Kehe et al., 2013).

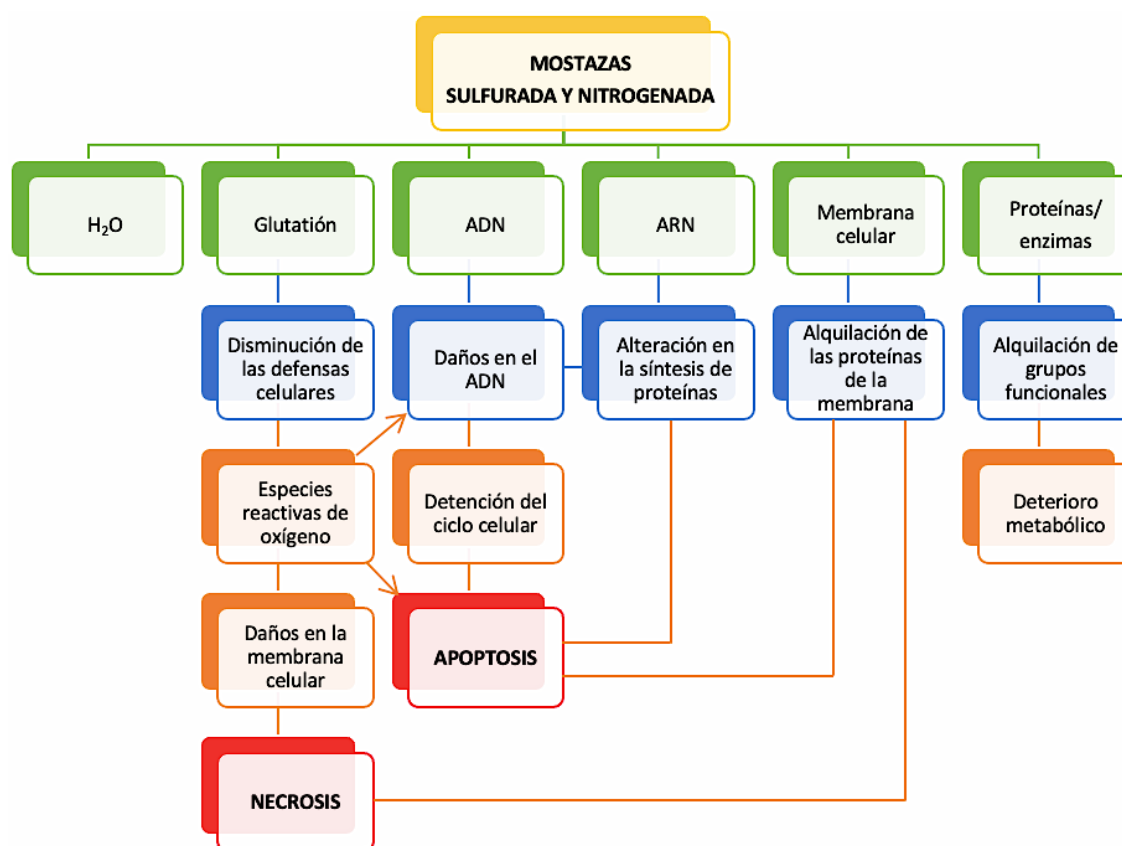


Figura 78. Mecanismo de acción de la mostaza sulfurada y nitrogenada (figura de la autora).

Otros autores como Smith, Arroyo, Shahin y Simbulan-Rosenthal también realizaron experimentos con queratinocitos expuestos a MS entre 100 y 300  $\mu\text{M}$ , evaluando la citotoxicidad *in vitro* que desencadenaba la cascada de alteraciones que se muestra en la figura 78, pero sin especificar cuál era la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) (Smith et al., 1997, Simbulan-Rosenthal et al., 2006, Arroyo et al., 2000, Shahin et al., 2001). Para la realización de esta tesis se ha partido como uno de los objetivos principales calcular la IC<sub>50</sub>, ya que tras una revisión sistemática de la bibliografía no se ha encontrado ningún autor que lo haya publicado puesto que las cifras celulares concernientes a la letalidad

eran muy dispares. El modelo elegido se desarrolló tanto en fibroblastos como en queratinocitos HaCaT, siendo los resultados muy similares en ambas estirpes celulares. En la figura 46 se calculó la IC<sub>50</sub> de la MS en queratinocitos expuestos a 8 concentraciones diferentes (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 y 4000  $\mu$ M) durante 1 hora.

## PROTECCIÓN CELULAR DE LA QUERCETINA FRENTE A MOSTAZAS

Una vez hallada la  $IC_{50}$  alrededor de 3200  $\mu M$  se realizaron varios experimentos con la finalidad de demostrar la protección frente al daño celular que causaba la mostaza sulfurada. Las sustancias protectoras utilizadas fueron quercetina y vitamina C, obteniendo un efecto protector de 56,8% de la quercetina a concentración 1  $\mu M$  y del 67,1% a 2,5  $\mu M$ . La combinación de quercetina con vitamina C 10 mM aumentaba la protección hasta el 68,7% como se observa en la figura 57.

Fukui estudió el efecto protector de la vitamina C en células pulmonares administrando ácido ascórbico a concentraciones de 1 ó 5 mM. Tras 6 horas de incubación añadían nanopartículas de óxido de zinc para causar daño pulmonar agudo y observaron que la vitamina C disminuía la inflamación y producción de especies reactivas de oxígeno respecto a los controles (Fukui et al., 2017). Dado que las mostazas producen muchos radicales libres, se decidió aplicar este fenomenal anti radical libre a una concentración mayor (10 mM) pero sólo durante 30 minutos, consiguiendo efectos parecidos a este autor.

La protección celular anti radicales libres conseguida por la vitamina C sola o asociada a quercetina es menor que la obtenida por la quercetina. Dado que ambas comparten mecanismo de acción, su asociación permite que la quercetina a bajas concentraciones (lejos de los niveles tóxicos) tenga más disponibilidad.

Jost y su grupo de investigación realizaron un modelo de estudio de células pulmonares en cultivo expuestas a una concentración 50  $\mu M$  de MN durante 72 horas. Como protector de los efectos tóxicos utilizó el reactivo antioxidante 2-mercatoetanol sulfonato de sodio (MESNA) y lo añadió 30 minutos antes de exponer las células a la mostaza para estudiar el efecto antioxidante, demostrando que protegen del daño en el ADN (Jost et al., 2017). En esta memoria se han incubado las células con quercetina y vitamina C durante los 30 minutos previos a la exposición con mostazas, observando unos buenos niveles de protección de un 15% con vitamina C sola y de hasta un 58,3% cuando se aplicaba de forma conjunta quercetina 2,5  $\mu M$  + vitamina C (figura 70).



## EFFECTOS DE LAS MOSTAZAS SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR

Schmidt encontró aumento de la senescencia por efecto de la mostaza sulfurada (1, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ ) similar al nuestro cuando realizamos la determinación de senescencia en todo el cultivo sin analizar el tipo de muerte celular (Schmidt et al., 2018a). Los resultados de las dos mostazas sobre la senescencia son similares, aunque más potentes los de la sulfurada. La determinación de células senescentes en fibroblastos y HaCaT tratados de forma aguda con mostazas durante 1 hora provoca un aumento de células senescentes si la determinación se realiza en todo el cultivo (incluyendo apoptóticas, necróticas y necroptóticas). En cambio, si la determinación sólo se realiza en las células vivas (figuras 64 y 76) muestra una disminución estadísticamente significativa en función de la concentración de mostaza. Por tanto, podemos concluir que sobre las células vivas ambas mostazas tienen un débil efecto senolítico.

Saitoh trabajó con una línea de cultivo de fibroblastos de tejido pulmonar fetal y determinó senescencia celular asociada a la enzima SA- $\beta$ -Gal con el fluorocromo C<sub>12</sub>-FDG, concluyendo que la suplementación con ácido ascórbico mitigaba la producción de radicales libres asociados a senescencia (Saitoh et al., 2018).

Trabajando con células mesenquimales, Rothmiller encontró recientemente incrementos de senescencia inducidos por MS a concentraciones muy bajas (10 a 40  $\mu\text{M}$ ) y con tiempos de exposición muy largos (de 5 a 31 días). Esta autora cuantificó células senescentes en todas las poblaciones sin excluir las células muertas y apoptóticas (Rothmiller et al., 2021). Estos resultados no son comparables a los encontrados en esta memoria, ya que la exposición a MS se realizó durante 1 hora y la cuantificación de células senescentes sólo se determinó en poblaciones de células vivas.

Los resultados de senescencia, obtenidos después de aplicar mostaza sulfurada y nitrogenada sobre la totalidad del cultivo celular (figura 79), recogen un incremento significativo “concentración dependiente”. El estudio por poblaciones mostró que las células en apoptosis y necroptosis eran positivas con el marcador de senescencia utilizado, por lo que se decidió seleccionar exclusivamente la población de células vivas, descartando células apoptóticas y necroptóticas.

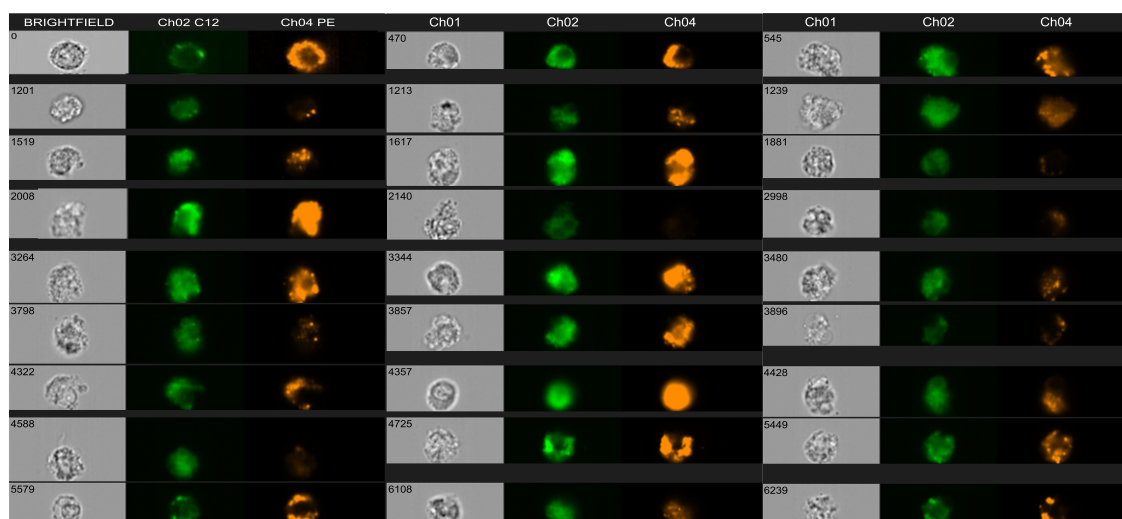


Figura 79. Fotografías de fibroblastos senescentes y apoptóticos, tomadas con el microscopio del citómetro AMNIS®.

La figura 79 es una población de fibroblastos senescentes (teñidos con el marcador C<sub>12</sub>-FDG en verde, canal 2) que además están apoptóticas (tinción con anexina + ficoeritrina de color naranja, canal 4). Algunas células presentan la membrana plasmática íntegra, mientras que en otros casos está desestructurada, lo que indica que están en distintas fases de apoptosis temprana o tardía.

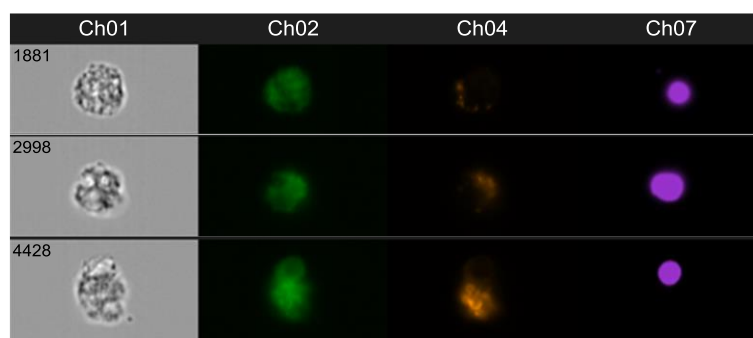


Figura 80. Fotografías de fibroblastos en senescencia y necrosis.

En la figura 80 los dos primeros fibroblastos están senescentes y necróticos, mientras que el inferior está senescente y necroptosis. Las células de las figuras 79 y 80 no se han considerado vivas para las mediciones de senescencia al haber iniciado algún tipo de muerte celular.



# Conclusiones

---



## Conclusiones

La exposición aguda durante una hora a mostaza sulfurada produce muerte celular con una  $IC_{50}$  en fibroblastos de  $2960 \pm 188 \mu M$  y en queratinocitos  $3226 \pm 192 \mu M$ . En el caso de mostaza nitrogenada la  $IC_{50}$  para fibroblastos es  $3770 \pm 184 \mu M$  y en queratinocitos  $4015 \mu M \pm 244 \mu M$ .

Los tipos de muerte celular inducidos por la exposición a mostaza sulfurada y nitrogenada se deben a un incremento significativo de apoptosis y necroptosis, sin alterarse la necrosis de forma estadísticamente significativa.

Nuestro estudio de toxicidad en modelos celulares de la quercetina muestra efectos protectores hasta concentraciones finales de  $10 \mu M$  y un efecto tóxico con incremento de la mortalidad estadísticamente significativo a concentraciones superiores a  $20 \mu M$ .

El tratamiento preventivo con quercetina a  $1 \mu M$ , aplicado antes de la exposición aguda a mostazas, disminuye la muerte celular de forma estadísticamente significativa. Para mostaza sulfurada la protección es 56,8% y para nitrogenada 41,3%.

El tratamiento preventivo con quercetina  $2,5 \mu M$  protege de la exposición a mostazas hasta un 67,1% para la sulfurada y 53,9% para la nitrogenada. En el caso del tratamiento combinado de quercetina  $2,5 \mu M$  con vitamina C  $10 mM$  la protección se incrementa levemente, un 68,7% para la sulfurada y 58,3% para la nitrogenada.

El efecto de las mostazas sobre la senescencia nos permite concluir que ambas tienen efecto senolítico estadísticamente significativo, disminuyendo el porcentaje de células senescentes en función de su concentración con una  $IC_{50}$  en senescencia de  $750 \mu M$  y  $1000 \mu M$  para la mostaza sulfurada y nitrogenada respectivamente. Este resultado se ha obtenido cuantificando células senescentes en la población de células vivas, tras descartar las apoptóticas y necróticas inducidas por las mostazas.

El desarrollo de tratamientos preventivos con quercetina y vitamina C de absorción rápida ayudarán a prevenir las lesiones por exposición aguda a mostaza sulfurada y nitrogenada.



Estándares éticos

---





## Estándares éticos

La autora declara no tener ningún conflicto de intereses relativo al contenido e investigación de esta tesis doctoral.



# Índice de tablas y figuras

---



## Índice de tablas y figuras

**TABLAS:**

<i>Tabla 1. Influencia de los factores ambientales en la dispersión de los agentes químicos.</i>	
<i>Fuente: Unidad sueca de Investigación en Defensa Nacional (FOI), Briefing Book on Chemical Weapons, 1992.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 2. Agentes químicos de guerra (tabla de la autora).....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 3. Registro CAS de las mostazas sometidas a control (tabla de la autora). ....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 4. Clases de flavonoides, compuestos de los mismos y procedencia (tabla de la autora). 43</i>	
<i>Tabla 5. Flavonoles naturales y ejemplos de sus agliconas. ....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 6. Principales diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis (Martínez Salazar, 2009). ....</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 7. Espectro electromagnético (tabla de la autora).....</i>	<i>106</i>

**FIGURAS:**

<i>Figura 1. Estructura química de la mostaza (a) sulfurada y (b) nitrogenada. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 2. Estructura química de los flavonoides.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 3. Estructura química de la quercetina. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 4. Acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 5. Acción de la enzima catalasa (Barabutis et al.) (Barabutis et al., 2017). ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 6. Acción de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px). ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 7. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (figura de la autora). ....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 8. Reacción de oxidación de la vitamina C (ácido L-ascórbico) hacia su forma reducida (ácido dehidroascórbico). ....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 9. Esquema de las fases de la senescencia in vitro en queratinocitos y células epiteliales mamarias humanas (Abbadie et al., 2017). ....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 10. Hipótesis de senescencia multi-paso (van Deursen, 2014). ....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 11. Esquema de la configuración de un citómetro de imagen AMNIS® ..... 82</i>	
<i>Figura 12. Citómetro de imagen AMNIS®, modelo ImageStream X del SAI Citómica..... 82</i>	
<i>Figura 13. Esquema de poblaciones celulares que permite diferenciar la técnica APO 5 (figura de la autora).....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 14. Esquema de un histograma biparamétrico del citómetro sobre apoptosis y muerte celular (figura de la autora). ....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 15. Ejemplo de histograma biparamétrico del citómetro. Muestra control de queratinocitos HaCaT.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 16. Esquema de un histograma biparamétrico del citómetro sobre la morfología en células apoptóticas y necroptóticas (figura de la autora).....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 17. Ejemplo de un histograma biparamétrico del citómetro. Muestra de queratinocitos HaCaT expuestos a mostaza sulfurada 3000 µM durante 1 hora.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 18. Células fotografiadas con el citómetro AMNIS®. (a) Células vivas. (b) Apoptóticas tempranas. (c) Necroptóticas. (d) Apoptóticas tardías. (e) Necróticas. (f) Senescentes. ....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 19. Acción de la coenzima NADP<sup>+</sup>. ....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 20. Acción de la enzima succinato tetrazolio-reductasa.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 21. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo AlexaFluor 488. ....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 22. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo FITC. ....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 23. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo yoduro de propidio.....</i>	<i>108</i>
<i>Figura 24. Espectro de excitación y emisión de los fluorocromos FITC y yoduro de propidio. ..</i>	<i>109</i>

Figura 25. Espectro de excitación y emisión de los fluorocromos Ficoeritrina (PE) y 7-ADD. ...	109
Figura 26. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo DAPI. ....	110
Figura 27. Estructura química del C <sub>12</sub> -FDG. ....	110
Figura 28. <b>(a)</b> Agitador de mezclas Vortex, Heidolph®. <b>(b)</b> Agitador orbital, Optic Ivymen System®. <b>(c)</b> Balanza electrónica, AND®. ....	111
Figura 29. <b>(a)</b> Baño termostático, JP Selecta®. <b>(b)</b> Cabina de seguridad clase II, Telstar®. <b>(c)</b> Centrífuga, Eppendorf®. ....	111
Figura 30. Citómetro de imagen, AMNIS®, SAI Citómica, Universidad de Zaragoza. <b>(a)</b> Fotografía del aparato. <b>(b)</b> Cámara de flujo con los tres objetivos del microscopio confocal (20, 40 y 60 aumentos). <b>(c)</b> Láseres de 785, 658, 488 y 375 nm. ....	112
Figura 31. <b>(a)</b> Espectrofotómetro de microplacas, BioTek®. <b>(b)</b> Estufa de cultivo, Binder®. ...	113
Figura 32. <b>(a)</b> Microscopio de contraste de fases, Nikon®. <b>(b)</b> pHmetro, Crison®. ....	113
Figura 33. <b>(a)</b> Tubos de ensayo. <b>(b)</b> Frascos de cultivo. <b>(c)</b> Placas de 6, 12 y 96 pocillos. ....	114
Figura 34. <b>(a)</b> Micro pipetas automáticas, Labnet®. <b>(b)</b> Pipetas multicanal, Rainin®. <b>(c)</b> Puntas de pipetas. ....	114
Figura 35. Placa para testar IC <sub>50</sub> en mostazas (figura de la autora). ....	120
Figura 36. Placas para medir viabilidad celular con MTT (figura de la autora). ....	121
Figura 37. Placa de viabilidad celular con MTT. ....	121
Figura 38. Placa de sustancias protectoras (figura de la autora). ....	122
Figura 39. Placa de sustancias protectoras + mostaza nitrogenada (figura de la autora). ....	123
Figura 40. Esquema de fluorocromos en células apoptóticas (figura de la autora). ....	124
Figura 41. Esquema de fluorocromos en células muertas (figura de la autora). ....	124
Figura 42. Fluorocromos para medir apoptosis + mortalidad (figura de la autora). ....	125
Figura 43. Esquema de fluorocromos en células senescentes (figura de la autora). ....	126
Figura 44. Placa de control de sustancias protectoras para medición por citometría de imagen (figura de la autora). ....	127
Figura 45. Placa de tóxicos con sustancias protectoras para medición por citometría de imagen (figura de la autora). ....	128
Figura 46. <b>(a)</b> Efecto de la exposición a mostaza sulfurada durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables (queratinocitos HaCaT) determinadas por MTT. Se muestran los valores promedio y desviación estándar de 8 experimentos. <b>(b)</b> Estudio de la tendencia. Sustituyendo en la ecuación y =50 se calcula para queratinocitos una concentración celular letal IC <sub>50</sub> = 3226 ± 192 µM. ....	132
Figura 47. Histogramas y fotos de células control sin exposición a mostaza. <b>(a)</b> Histograma biparamétrico con porcentaje de células vivas y muertas de una muestra control de queratinocitos HaCaT. <b>(b)</b> Fotos de queratinocitos. <b>(c)</b> Histograma monoparamétrico de células muertas con yoduro de propidio. <b>(d)</b> Histograma monoparamétrico de células muertas con DAPI. ....	134
Figura 48. Queratinocitos HaCaT control con el 98% de células vivas. <b>(a)</b> Objetivo 10X. <b>(b)</b> Objetivo 20X. ....	135
Figura 49. Queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada 3200 µM. Objetivo 10X. <b>(a)</b> Fotografía tomada a las 24 horas de exposición. <b>(b)</b> Fotografía tomada tras 72 horas de exposición. ....	135
Figura 50. Queratinocitos control en medio líquido tras desprenderse con tripsina. <b>(a)</b> Objetivo 10X. <b>(b)</b> Objetivo 20X. ....	136
Figura 51. Queratinocitos tripsinizados tras 48 horas de exposición a mostaza sulfurada 3200 µM. <b>(a)</b> Objetivo 10X. <b>(b)</b> Objetivo 20X. ....	136
Figura 52. Imagen de fibroblastos obtenidos mediante el citómetro AMNIS® ImageStream X. Muestra con alto contenido de células vivas. ....	137
Figura 53. Imagen de fibroblastos obtenida por el citómetro AMNIS® ImageStream X. Muestra con alto contenido de células muertas. ....	138

Figura 54. Efecto de la exposición a quercetina durante 24 horas sobre el porcentaje de células muertas. Se muestran los valores promedio y desviación estándar de 8 experimentos. * Se encontraron diferencias significativas respecto al control con $p < 0,05$ . ....	139
Figura 55. Efecto de la exposición a mostaza sulfurada (3200 $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables determinadas con DAPI por citometría después de añadir distintas concentraciones de quercetina y vitamina C.....	140
Figura 56. Histogramas y fotos de células expuestas a mostaza sulfurada 3200 $\mu\text{M}$ previo tratamiento con quercetina 2,5 $\mu\text{M}$ y vitamina C 10 mM <b>(a)</b> Histograma biparamétrico con porcentaje de células vivas y muertas de una muestra de queratinocitos expuestos a mostaza sulfurada. <b>(b)</b> Fotos de queratinocitos. <b>(c)</b> Histograma monoparamétrico del DAPI. ....	141
Figura 57. Porcentaje de protección de quercetina y vitamina C frente a mortalidad inducida por mostaza sulfurada a 3200 $\mu\text{M}$ . ....	142
Figura 58. Queratinocitos a las 48 horas de la exposición a mostaza sulfurada 3200 $\mu\text{M}$ previo tratamiento con quercetina. Objetivo 10X. <b>(a)</b> Quercetina 1 $\mu\text{M}$ . <b>(b)</b> Quercetina 2,5 $\mu\text{M}$ ... 142	142
Figura 59. Queratinocitos tras 48 horas de la exposición a mostaza sulfurada 3200 $\mu\text{M}$ previo tratamiento con quercetina 2,5 $\mu\text{M}$ y vitamina C 10 mM. <b>(a)</b> Objetivo 10X. <b>(b)</b> Objetivo 20X. ....	143
Figura 60. Efectos tóxicos de la mostaza sulfurada 3200 $\mu\text{M}$ en los diferentes tipos de mortalidad. (a) Variaciones en cada tipo de muerte celular. (b) Diferencias entre controles y expuestas.....	145
Figura 61. Protección por quercetina ( $\mu\text{M}$ ) y vitamina C (10 mM), frente a la mortalidad total y sus tipos (necrosis, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necroptosis) inducida por mostaza sulfurada 3200 $\mu\text{M}$ ( $n = 6$ ). ....	146
Figura 62. <b>(a)</b> Histograma biparamétrico de queratinocitos control con tinción APO 5. <b>(b)</b> Cuantificación del cuadrante superior derecho para diferenciar las células apoptóticas tardías y necroptóticas según su morfología. ....	147
Figura 63. Senescencia en células vivas seleccionadas (excluyendo las células apoptóticas y necróticas) en cultivo de queratinocitos HaCaT expuestos a mostaza sulfurada a 3200 $\mu\text{M}$ ( $n = 4$ ). ....	148
Figura 64. Disminución de la senescencia en fibroblastos provocado por la exposición a diferentes concentraciones de mostaza sulfurada durante 1 hora, seleccionando exclusivamente células vivas y excluyendo apoptóticas y necróticas. Los resultados representan la media y desviación estándar de 3 experimentos. ....	149
Figura 65. <b>(a)</b> Histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a mostaza sulfurada (3200 $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. <b>(b)</b> Histograma monoparamétrico para calcular células muertas. <b>(c)</b> Histograma monoparamétrico para cuantificar células senescentes. <b>(d)</b> Fotografías de células vivas, senescentes, apoptóticas y necróticas. ....	150
Figura 66. <b>(a)</b> Efecto de la exposición a mostaza nitrogenada durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables determinadas por MTT. Se muestran los valores promedio y desviación estándar de 8 experimentos. <b>(b)</b> Estudio de la tendencia. Sustituyendo en la ecuación $y = 50$ se extrae para fibroblastos una $\text{IC}_{50} = 3770 \pm 184 \mu\text{M}$ . ....	153
Figura 67. <b>(a)</b> Fibroblastos control. Objetivo 10X. <b>(b)</b> Fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada 3800 $\mu\text{M}$ durante 1 hora. Fotografía realizada a las 24 horas. Objetivo 10X. ...	154
Figura 68. Fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada 3800 $\mu\text{M}$ durante 1 hora. Objetivo 10X. Fotografías realizadas a las 48 horas. <b>(a)</b> Sin tratamiento protector. <b>(b)</b> Con tratamiento preventivo de quercetina 1 $\mu\text{M}$ .....	155
Figura 69. Efecto de la exposición a mostaza nitrogenada 3800 $\mu\text{M}$ durante 1 hora sobre el porcentaje de células viables después de añadir diversas concentraciones de quercetina y vitamina C. ....	156
Figura 70. Porcentaje de protección por quercetina ( $\mu\text{M}$ ) y vitamina C (mM) frente a la mortalidad en fibroblastos inducida por mostaza nitrogenada (3800 $\mu\text{M}$ ). ....	157



<i>Figura 71. Efectos tóxicos de la mostaza nitrogenada 3800 <math>\mu</math>M en los diferentes tipos de mortalidad. (a) Variaciones en cada tipo de muerte celular. (b) Diferencias entre controles y expuestas.....</i>	<i>158</i>
<i>Figura 72. Efecto de la quercetina (<math>\mu</math>M) y vitamina C (10 mM) en fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada (3800 <math>\mu</math>M) durante 1 hora cuantificando los tipos de muerte celular. Medido por citometría de imagen las 72 horas tras la aplicación del tóxico.....</i>	<i>159</i>
<i>Figura 73. Histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada 3800 <math>\mu</math>M marcados con ficoeritrina y DAPI. ....</i>	<i>160</i>
<i>Figura 74. Histograma biparamétrico de fibroblastos expuestos a mostaza nitrogenada 3800 <math>\mu</math>M previo tratamiento con quercetina 1 <math>\mu</math>M y marcados con ficoeritrina y DAPI. ....</i>	<i>160</i>
<i>Figura 75. Efecto de la mostaza nitrogenada (3800 <math>\mu</math>M) sobre la senescencia previo tratamiento con quercetina y vitamina C.....</i>	<i>161</i>
<i>Figura 76. Disminución de la senescencia provocado por la exposición de fibroblastos a diferentes concentraciones de mostaza nitrogenada durante 1 hora, seleccionando exclusivamente células vivas y excluyendo apoptóticas y necróticas. Los resultados representan la media y desviación estándar de 3 experimentos. ....</i>	<i>162</i>
<i>Figura 77. Comparativa de los distintos tipos de muerte celular causados por la exposición a mostaza sulfurada (3200 <math>\mu</math>M) y nitrogenada (3800 <math>\mu</math>M) durante 1 hora. ....</i>	<i>166</i>
<i>Figura 78. Mecanismo de acción de la mostaza sulfurada y nitrogenada (figura de la autora). ....</i>	<i>169</i>
<i>Figura 79. Fotografías de fibroblastos senescentes y apoptóticos, tomadas con el microscopio del citómetro AMNIS®. ....</i>	<i>173</i>
<i>Figura 80. Fotografías de fibroblastos en senescencia y necrosis.....</i>	<i>173</i>

# Referencias bibliográficas

---



## Referencias bibliográficas

- ABBADIE, C., PLUQUET, O. & POURTIER, A. 2017. Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses? *Cell Mol Life Sci*, 74, 4471-4509.
- ACHARYA, P. C. & BANSAL, R. 2017. Synthesis of androstene oxime-nitrogen mustard bioconjugates as potent antineoplastic agents. *Steroids*, 123, 73-83.
- AGARWAL, A., GUPTA, S. & SHARMA, R. K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 28.
- AHARONI-SIMON, M., SHUMIATCHER, R., YEUNG, A., SHIH, A. Z., DOLINSKY, V. W., DOUCETTE, C. A. & LUCIANI, D. S. 2016. Bcl-2 Regulates Reactive Oxygen Species Signaling and a Redox-Sensitive Mitochondrial Proton Leak in Mouse Pancreatic beta-Cells. *Endocrinology*, 157, 2270-81.
- AHN, J., LEE, H., KIM, S., PARK, J. & HA, T. 2008. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 373, 545-9.
- AL-NAIMI, F. & CHIANG, N. Y. Z. 2017. Topical Vitamin C and the Skin: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J Clin Aesthet Dermatol*, 10, 14-17.
- ALAM, P., PARVEZ, M. K., ARBAB, A. H. & AL-DOSARI, M. S. 2017. Quantitative analysis of rutin, quercetin, naringenin, and gallic acid by validated RP- and NP-HPTLC methods for quality control of anti-HBV active extract of *Guiera senegalensis*. *Pharm Biol*, 55, 1317-1323.
- AMIGO, M. & NOGUE, S. 2014. [The Fuller's earth and other digestive decontamination measures in the treatment of poisoning]. *Med Clin (Barc)*, 142, 135.
- ARROYO, C. M., SCHAFER, R. J., KURT, E. M., BROOMFIELD, C. A. & CARMICHAEL, A. J. 2000. Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard: cytokine release. *J Appl Toxicol*, 20 Suppl 1, S63-72.
- AU, L., MEISCH, J. P., DAS, L. M., BINKO, A. M., BOXER, R. S., WEN, A. M., STEINMETZ, N. F. & LU, K. Q. 2015. Suppression of Hyperactive Immune Responses Protects against Nitrogen Mustard Injury. *J Invest Dermatol*, 135, 2971-2981.
- BALALI-MOOD, B., MATHEWS, R., PITA, R., RICE, P., ROMANO, J., THIERMANN, H. & WILLEMS, J. 2016. Guía práctica para la gestión médica de bajas de guerra química. In: QUÍMICAS, O. P. L. P. D. L. A. (ed.). División de Asistencia y Cooperación Internacional.
- BALALI-MOOD, M. & HEFAZI, M. 2005. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. *Fundam Clin Pharmacol*, 19, 297-315.
- BALALI-MOOD, M., HEFAZI, M., MAHMOUDI, M., JALALI, E., ATTARAN, D., MALEKI, M., RAZAVI, M. E., ZARE, G., TABATABAEE, A. & JAAFARI, M. R. 2005. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundam Clin Pharmacol*, 19, 713-21.
- BALALI-MOOD, M., MOUSAVI, S. & BALALI-MOOD, B. 2008. Chronic health effects of sulphur mustard exposure with special reference to Iranian veterans. *Emerg Health Threats J*, 1, e7.
- BANDARUK, Y., MUKAI, R., KAWAMURA, T., NEMOTO, H. & TERAOKA, J. 2012. Evaluation of the inhibitory effects of quercetin-related flavonoids and tea catechins on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. *J Agric Food Chem*, 60, 10270-7.

- BARABUTIS, N., KHANGOORA, V., MARIK, P. E. & CATRAVAS, J. D. 2017. Hydrocortisone and Ascorbic Acid Synergistically Prevent and Repair Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Endothelial Barrier Dysfunction. *Chest*, 152, 954-962.
- BARTENEVA, N. S., FASLER-KAN, E. & VOROBYEV, I. A. 2012. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *J Histochem Cytochem*, 60, 723-33.
- BATAL, M., BOUDRY, I., MOURET, S., CLERY-BARRAUD, C., WARTELLE, J., BERARD, I. & DOUKI, T. 2014. DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicol Appl Pharmacol*, 278, 39-44.
- BATAL, M., BOUDRY, I., MOURET, S., WARTELLE, J., EMORINE, S., BERTONI, M., BERARD, I., CLERY-BARRAUD, C. & DOUKI, T. 2013. Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulfur mustard-exposed skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 644-50.
- BEHRAMAN, E., MOALLEM, S. A., KALALINIA, F., AHMADIMANESH, M., BLAIN, P., JOWSEY, P., KHATERI, S., FORGHANIFARD, M. M. & BALALIMOOD, M. 2018. Telomere shortening associated with increased levels of oxidative stress in sulfur mustard-exposed Iranian veterans. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 834, 1-5.
- BEIGI HACHEGANI, A., TAHMASBPOUR, E., BORNA, H., IMAMY, A., GHANEI, M. & SHAHRIARY, A. 2018. Free Radical Production and Oxidative Stress in Lung Tissue of Patients Exposed to Sulfur Mustard: An Overview of Cellular and Molecular Mechanisms. *Chem Res Toxicol*, 31, 211-222.
- BIRAN, A., ZADA, L., ABOU KARAM, P., VADAI, E., ROITMAN, L., OVADYA, Y., PORAT, Z. & KRIZHANOVSKY, V. 2017. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*, 16, 661-671.
- BLOCK, G. 1991. Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *Am J Clin Nutr*, 54, 1310S-1314S.
- BOGUCKI, S. & WEIR, S. 2002. Pulmonary manifestations of intentionally released chemical and biological agents. *Clin Chest Med*, 23, 777-94.
- BOOTS, A. W., HAENEN, G. R. & BAST, A. 2008. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585, 325-37.
- BORS, W. & MICHEL, C. 2002. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci*, 957, 57-69.
- BOURGEOIS, B. & MADL, T. 2018. Regulation of cellular senescence via the FOXO4-p53 axis. *FEBS Lett*, 592, 2083-2097.
- BOYLE, S. P., DOBSON, V. L., DUTHIE, S. J., HINSELWOOD, D. C., KYLE, J. A. & COLLINS, A. R. 2000. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Eur J Clin Nutr*, 54, 774-82.
- BUREAU, G., LONGPRE, F. & MARTINOLI, M. G. 2008. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res*, 86, 403-10.
- CAHU, J. 2013. SASP: roadblock for tissue re-organization. *Aging (Albany NY)*, 5, 641-2.
- CALDWELL, M. E., DENICOLA, G. M., MARTINS, C. P., JACOBETZ, M. A., MAITRA, A., HRUBAN, R. H. & TUVESON, D. A. 2012. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene*, 31, 1599-608.

- CAO, J., ZHANG, Y., CHEN, W. & ZHAO, X. 2010. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr*, 103, 249-55.
- CASANOVA A. 2015. *Estudio del efecto de la radiación ultravioleta sobre fibroblastos y su protección por quercetina*. Universidad de Zaragoza.
- CHANDECK, C. & MOOI, W. J. 2010. Oncogene-induced cellular senescence. *Adv Anat Pathol*, 17, 42-8.
- CHAUHAN, S., CHAUHAN, S., D'CRUZ, R., FARUQI, S., SINGH, K. K., VARMA, S., SINGH, M. & KARTHIK, V. 2008. Chemical warfare agents. *Environ Toxicol Pharmacol*, 26, 113-22.
- CHELOUFI, H., BELHANI, B., OUK, T. S., ZERROUKI, R., AOUF, N. E. & BERREDJEM, M. 2016. Synthesis and antitumor evaluation of novel sulfonylcycloureas derived from nitrogen mustard. *Mol Divers*, 20, 399-405.
- CHEN, X., YIN, O. Q., ZUO, Z. & CHOW, M. S. 2005. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm Res*, 22, 892-901.
- CHILCOTT, R. P., JENNER, J., HOTCHKISS, S. A. & RICE, P. 2001. In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J Appl Toxicol*, 21, 279-83.
- CHOI, S. J., LEE, S. N., KIM, K., JOO DA, H., SHIN, S., LEE, J., LEE, H. K., KIM, J., KWON, S. B., KIM, M. J., AHN, K. J., AN, I. S., AN, S. & CHA, H. J. 2016. Biological effects of rutin on skin aging. *Int J Mol Med*, 38, 357-63.
- CHOI, S. Y., BIN, B. H., KIM, W., LEE, E., LEE, T. R. & CHO, E. G. 2018. Exposure of human melanocytes to UVB twice and subsequent incubation leads to cellular senescence and senescence-associated pigmentation through the prolonged p53 expression. *J Dermatol Sci*, 90, 303-312.
- CORONADO H, M., VEGA Y LEÓN, S., GUTIÉRREZ T, R., VÁZQUEZ F, M. & RADILLA V, C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42, 206-212.
- CURETON, K. J., TOMPOROWSKI, P. D., SINGHAL, A., PASLEY, J. D., BIGELMAN, K. A., LAMBOURNE, K., TRILK, J. L., MCCULLY, K. K., ARNAUD, M. J. & ZHAO, Q. 2009. Dietary quercetin supplementation is not ergogenic in untrained men. *J Appl Physiol (1985)*, 107, 1095-104.
- D'ANDREA, G. 2015. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 106, 256-71.
- D'ONOFRIO, N., SERVILLO, L. & BALESTRIERI, M. L. 2018. SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection. *Antioxid Redox Signal*, 28, 711-732.
- DABROWSKA, M. I., BECKS, L. L., LELLI, J. L., JR., LEVEE, M. G. & HINSHAW, D. B. 1996. Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 141, 568-83.
- DE GROOTH, H. J., MANUBULU-CHOO, W. P., ZANDVLIET, A. S., SPOELSTRADÉ MAN, A. M. E., GIBES, A. R., SWART, E. L. & OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M. 2018. Vitamin C Pharmacokinetics in Critically Ill Patients: A Randomized Trial of Four IV Regimens. *Chest*, 153, 1368-1377.
- DE MAGALHAES, J. P. & PASSOS, J. F. 2018. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev*, 170, 2-9.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J. D., CAMPISI, J. & TOUSSAINT, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4, 1798-806.

- DOI, M., HATTORI, N., YOKOYAMA, A., ONARI, Y., KANEHARA, M., MASUDA, K., TONDA, T., OHTAKI, M. & KOHNO, N. 2011. Effect of mustard gas exposure on incidence of lung cancer: a longitudinal study. *Am J Epidemiol*, 173, 659-66.
- DUARTE, J., PEREZ-PALENCIA, R., VARGAS, F., OCETE, M. A., PEREZ-VIZCAINO, F., ZARZUELO, A. & TAMARGO, J. 2001. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 133, 117-24.
- DUMKE, C. L., NIEMAN, D. C., UTTER, A. C., RIGBY, M. D., QUINDRY, J. C., TRIPLETT, N. T., MCANULTY, S. R. & MCANULTY, L. S. 2009. Quercetin's effect on cycling efficiency and substrate utilization. *Appl Physiol Nutr Metab*, 34, 993-1000.
- DUNAIF, A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*, 18, 774-800.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ENDEMANN, D. H. & SCHIFFRIN, E. L. 2004. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 15, 1983-92.
- ETEMAD, L., MOSHIRI, M. & BALALI-MOOD, M. 2019. Advances in treatment of acute sulfur mustard poisoning - a critical review. *Crit Rev Toxicol*, 49, 191-214.
- EYDEN, B. 2001. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct Pathol*, 25, 39-50.
- FAKHREDDIN TAGHADDOSINEJAD, A. F. F., BEHNAM BEHNOUSH 2011. Pulmonary complications of mustard gas exposure: a study on cadavers. *Acta Medica Iranica*, 49.
- FENG, Y., XU, Q., YANG, Y., SHI, W., MENG, W., ZHANG, H., HE, X., SUN, M., CHEN, Y., ZHAO, J., GUO, Z. & XIAO, K. 2019. The therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the acute lung injury induced by sulfur mustard. *Stem Cell Res Ther*, 10, 90.
- FERNÁNDEZ LARROSA, P. N., RUIZ GRECCO, M., ALVARADO, C. V., MICENMACHER, S., AGUIRRE, C., MARTÍNEZ NOEL, G., COSTAS, M. A. & RUBIO, M. F. 2011. [Rapamycin effect on senescence and autophagy processes in human cell lines]. *Medicina (B Aires)*, 71, 238-42.
- FERREIRA, C. G. T., CAMPOS, M. G., FELIX, D. M., SANTOS, M. R., CARVALHO, O. V., DIAZ, M. A. N., FIETTO, J. L. R., BRESSAN, G. C., SILVA-JUNIOR, A. & ALMEIDA, M. R. 2018. Evaluation of the antiviral activities of *Bacharis dracunculifolia* and quercetin on Equid herpesvirus 1 in a murine model. *Res Vet Sci*, 120, 70-77.
- FUKUI, H., IWAHASHI, H., NISHIO, K., HAGIHARA, Y., YOSHIDA, Y. & HORIE, M. 2017. Ascorbic acid prevents zinc oxide nanoparticle-induced intracellular oxidative stress and inflammatory responses. *Toxicol Ind Health*, 33, 687-695.
- GALLO, L. 2016. The Effect of a Pure Anti-inflammatory Therapy on Reducing Prostate-specific Antigen Levels in Patients Diagnosed With a Histologic Prostatitis. *Urology*, 94, 198-203.
- GANSUKH, E., KAZIBWE, Z., PANDURANGAN, M., JUDY, G. & KIM, D. H. 2016. Probing the impact of quercetin-7-O-glucoside on influenza virus replication influence. *Phytomedicine*, 23, 958-67.
- GARCIA, J. J., LOPEZ-PINGARRON, L., ALMEIDA-SOUZA, P., TRES, A., ESCUDERO, P., GARCIA-GIL, F. A., TAN, D. X., REITER, R. J., RAMIREZ, J. M. & BERNAL-PEREZ, M. 2014. Protective effects of melatonin in reducing

- oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res*, 56, 225-37.
- GARDI, C., BAUEROVA, K., STRINGA, B., KUNCIROVA, V., SLOVAK, L., PONIST, S., DRAFI, F., BEZAKOVA, L., TEDESCO, I., ACQUAVIVA, A., BILOTTO, S. & RUSSO, G. L. 2015. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Arch Biochem Biophys*, 583, 150-7.
- GERAETS, L., MOONEN, H. J., BRAUERS, K., WOUTERS, E. F., BAST, A. & HAGEMAN, G. J. 2007. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J Nutr*, 137, 2190-5.
- GHABILI, K., AGUTTER, P. S., GHANEI, M., ANSARIN, K. & SHOJA, M. M. 2010. Mustard gas toxicity: the acute and chronic pathological effects. *J Appl Toxicol*, 30, 627-43.
- GHANEI, M., RAJAEI, M., KHATERI, S., ALAEDDINI, F. & HAINES, D. 2004. Assessment of fertility among mustard-exposed residents of Sardasht, Iran: a historical cohort study. *Reprod Toxicol*, 18, 635-9.
- GHASEMI, H., OWLIA, P., JALALI-NADOUSHAN, M. R., POURFARZAM, S., AZIMI, G., YARMOHAMMADI, M. E., SHAMS, J., FALLAHI, F., MOAIEDMOHSENI, S., MOIN, A., YARAEI, R., VAEZ-MAHDAVI, M. R., FAGHIHZADEH, S., MOHAMMAD HASSAN, Z., SOROUSH, M. R., NAGHIZADEH, M. M., ARDESTANI, S. K. & GHAZANFARI, T. 2013. A clinicopathological approach to sulfur mustard-induced organ complications: a major review. *Cutan Ocul Toxicol*, 32, 304-24.
- GILABERTE, Y., PEREBOOM, D., CARAPETO, F. J. & ALDA, J. O. 1997. Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 13, 43-9.
- GILAD, Y., TUCHINSKY, H., BEN-DAVID, G., MINNES, R., GANCZ, A., SENDEROWITZ, H., LUBOSHITS, G., FIRER, M. A. & GELLERMAN, G. 2017. Discovery of potent molecular chimera (CM358) to treat human metastatic melanoma. *Eur J Med Chem*, 138, 602-615.
- GOSWAMI, D. G., KANT, R., TEWARI-SINGH, N. & AGARWAL, R. 2018. Efficacy of anti-inflammatory, antibiotic and pleiotropic agents in reversing nitrogen mustard-induced injury in ex vivo cultured rabbit cornea. *Toxicol Lett*, 293, 127-132.
- GOSWAMI, D. G., KUMAR, D., TEWARI-SINGH, N., ORLICKY, D. J., JAIN, A. K., KANT, R., RANCOURT, R. C., DHAR, D., INTURI, S., AGARWAL, C., WHITE, C. W. & AGARWAL, R. 2015. Topical nitrogen mustard exposure causes systemic toxic effects in mice. *Exp Toxicol Pathol*, 67, 161-70.
- GRAEFE, E. U., WITTIG, J., MUELLER, S., RIETHLING, A. K., UEHLEKE, B., DREWELOW, B., PFORTE, H., JACOBASCH, G., DERENDORF, H. & VEIT, M. 2001. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, 41, 492-9.
- GRAHAM, J. S. & SCHONEBOOM, B. A. 2013. Historical perspective on effects and treatment of sulfur mustard injuries. *Chem Biol Interact*, 206, 512-22.
- GREENBERG, S., KAMATH, P., PETRALI, J., HAMILTON, T., GARFIELD, J. & GARLICK, J. A. 2006. Characterization of the initial response of engineered human skin to sulfur mustard. *Toxicol Sci*, 90, 549-57.



- GROEHLER, A. T., VILLALTA, P. W., CAMPBELL, C. & TRETYAKOVA, N. 2016. Covalent DNA-Protein Cross-Linking by Phosphoramidate Mustard and Nornitrogen Mustard in Human Cells. *Chem Res Toxicol*, 29, 190-202.
- GRUPPI, F., HEJAZI, L., CHRISTOV, P. P., KRISHNAMACHARI, S., TURESKY, R. J. & RIZZO, C. J. 2015. Characterization of nitrogen mustard formamidopyrimidine adduct formation of bis(2-chloroethyl)ethylamine with calf thymus DNA and a human mammary cancer cell line. *Chem Res Toxicol*, 28, 1850-60.
- HARWOOD, M., DANIELEWSKA-NIKIEL, B., BORZELLECA, J. F., FLAMM, G. W., WILLIAMS, G. 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.
- HAYAKAWA, T., IWAI, M., AOKI, S., TAKIMOTO, K., MARUYAMA, M., MARUYAMA, W. & MOTOYAMA, N. 2015. SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS One*, 10, e0116480.
- HEFAZI, M., ATTARAN, D., MAHMOUDI, M. & BALALI-MOOD, M. 2005. Late respiratory complications of mustard gas poisoning in Iranian veterans. *Inhal Toxicol*, 17, 587-92.
- HENSON, D., NIEMAN, D., DAVIS, J. M., DUMKE, C., GROSS, S., MURPHY, A., CARMICHAEL, M., JENKINS, D. P., QUINDRY, J., MCANULTY, S., MCANULTY, L., UTTER, A. & MAYER, E. 2008. Post-160-km race illness rates and decreases in granulocyte respiratory burst and salivary IgA output are not countered by quercetin ingestion. *Int J Sports Med*, 29, 856-63.
- HIRANO, R., SASAMOTO, W., MATSUMOTO, A., ITAKURA, H., IGARASHI, O. & KONDO, K. 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 47, 357-62.
- HITLER A. 1925. *Mein Kampf*, Alemania, Franz Eher Nachfolger.
- HOLLMAN, P. C. & KATAN, M. B. 1999. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res*, 31 Suppl, S75-80.
- HU, X., WANG, Y., XUE, J., HAN, T., JIAO, R., LI, Z., LIU, W., XU, F., HUA, H. & LI, D. 2017. Design and synthesis of novel nitrogen mustard-evodiamine hybrids with selective antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 27, 4989-4993.
- INDRA, M. R., KARYONO, S., RATNAWATI, R. & MALIK, S. G. 2013. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes*, 6, 275.
- INTURI, S., TEWARI-SINGH, N., AGARWAL, C., WHITE, C. W. & AGARWAL, R. 2014. Activation of DNA damage repair pathways in response to nitrogen mustard-induced DNA damage and toxicity in skin keratinocytes. *Mutat Res*, 763-764, 53-63.
- ISHIDA-YAMAMOTO, A. & IIZUKA, H. 1998. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol*, 7, 1-10.
- JABEEN, H., SALEEMI, S., RAZZAQ, H., YAQUB, A., SHAKOOR, S. & QURESHI, R. 2018. Investigating the scavenging of reactive oxygen species by antioxidants via theoretical and experimental methods. *J Photochem Photobiol B*, 180, 268-275.
- JAFARI, M. 2007. Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology*, 231, 30-9.

- JAHAN, S., ABID, A., KHALID, S., AFSAR, T., QURAT UL, A., SHAHEEN, G., ALMAJWAL, A. & RAZAK, S. 2018. Therapeutic potentials of Quercetin in management of polycystic ovarian syndrome using Letrozole induced rat model: a histological and a biochemical study. *J Ovarian Res*, 11, 26.
- JAIN, A. K., TEWARI-SINGH, N., INTURI, S., KUMAR, D., ORLICKY, D. J., AGARWAL, C., WHITE, C. W. & AGARWAL, R. 2015. Flavanone silibinin treatment attenuates nitrogen mustard-induced toxic effects in mouse skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 285, 71-8.
- JANOSSY, G. 2004. Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A*, 58, 87-97.
- JEONG, S. M., KANG, M. J., CHOI, H. N., KIM, J. H. & KIM, J. I. 2012. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutr Res Pract*, 6, 201-7.
- JOST, P., FIKROVA, P., SVOBODOVA, H., PEJCHAL, J. & STETINA, R. 2017. Protective potential of different compounds and their combinations with MESNA against sulfur mustard-induced cytotoxicity and genotoxicity. *Toxicol Lett*, 275, 92-100.
- KAMADA, C., DA SILVA, E. L., OHNISHI-KAMEYAMA, M., MOON, J. H. & TERAOKA, J. 2005. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res*, 39, 185-94.
- KANEIDER, N. C., MOSHEIMER, B., REINISCH, N., PATSCH, J. R. & WIEDERMANN, C. J. 2004. Inhibition of thrombin-induced signaling by resveratrol and quercetin: effects on adenosine nucleotide metabolism in endothelial cells and platelet-neutrophil interactions. *Thromb Res*, 114, 185-94.
- KARIMI, A., MORADI, M. T., ALIDADI, S. & HASHEMI, L. 2016. Anti-adenovirus activity, antioxidant potential, and phenolic content of black tea (*Camellia sinensis* Kuntze) extract. *J Complement Integr Med*, 13, 357-363.
- KEHE, K., BALSZUWEIT, F., STEINRITZ, D. & THIERMANN, H. 2009. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology*, 263, 12-9.
- KEHE, K., RAITHEL, K., KREPPPEL, H., JOCHUM, M., WOREK, F. & THIERMANN, H. 2008. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) influences the mode of sulfur mustard (SM)-induced cell death in HaCaT cells. *Arch Toxicol*, 82, 461-70.
- KEHE, K., SCHRETTL, V., THIERMANN, H. & STEINRITZ, D. 2013. Modified immunoslotblot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts. *Chem Biol Interact*, 206, 523-8.
- KEHE, K. & SZINICZ, L. 2005. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*, 214, 198-209.
- KELLY, G. S. 2011. Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev*, 16, 172-94.
- KHAN, M. S., ALI, T., KIM, M. W., JO, M. H., CHUNG, J. I. & KIM, M. O. 2019. Anthocyanins Improve Hippocampus-Dependent Memory Function and Prevent Neurodegeneration via JNK/Akt/GSK3beta Signaling in LPS-Treated Adult Mice. *Mol Neurobiol*, 56, 671-687.
- KHATERI, S., GHANEI, M., KESHAVARZ, S., SOROUSH, M. & HAINES, D. 2003. Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *J Occup Environ Med*, 45, 1136-43.

- KHAZDAIR, M. R., BOSKABADY, M. H. & GHORANI, V. 2015. Respiratory effects of sulfur mustard exposure, similarities and differences with asthma and COPD. *Inhal Toxicol*, 27, 731-44.
- KIM, H. P., MANI, I., IVERSEN, L. & ZIBOH, V. A. 1998. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 58, 17-24.
- KIM, S. C., KIM, Y. H., SON, S. W., MOON, E. Y., PYO, S. & UM, S. H. 2015. Fisetin induces Sirt1 expression while inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 467, 638-44.
- KUILMAN, T., MICHALOGLOU, C., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*, 24, 2463-79.
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 20), 3613-22.
- LACOTTE, B., CEUTERICK, M., GEERTS, M. L. & WILLEMS, J. 1989. [Cutaneous burns caused by Yperite. Apropos of 2 new cases]. *J Chir (Paris)*, 126, 315-8.
- LARSON, A. J., SYMONS, J. D. & JALILI, T. 2012. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv Nutr*, 3, 39-46.
- LASKIN, J. D., BLACK, A. T., JAN, Y. H., SINKO, P. J., HEINDEL, N. D., SUNIL, V., HECK, D. E. & LASKIN, D. L. 2010. Oxidants and antioxidants in sulfur mustard-induced injury. *Ann N Y Acad Sci*, 1203, 92-100.
- LATA, M., PRASAD, J., SINGH, S., KUMAR, R., SINGH, L., CHAUDHARY, P., ARORA, R., CHAWLA, R., TYAGI, S., SONI, N. L., SAGAR, R. K., DEVI, M., SHARMA, R. K., PURI, S. C. & TRIPATHI, R. P. 2009. Whole body protection against lethal ionizing radiation in mice by REC-2001: a semi-purified fraction of *Podophyllum hexandrum*. *Phytomedicine*, 16, 47-55.
- LEE, B. Y., HAN, J. A., IM, J. S., MORRONE, A., JOHUNG, K., GOODWIN, E. C., KLEIJER, W. J., DIMAIO, D. & HWANG, E. S. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5, 187-95.
- LI, S., WANG, X., HE, Y., ZHAO, M., CHEN, Y., XU, J., FENG, M., CHANG, J., NING, H. & QI, C. 2013. Design and synthesis of novel quinazoline nitrogen mustard derivatives as potential therapeutic agents for cancer. *Eur J Med Chem*, 67, 293-301.
- LIN, C. F., LEU, Y. L., AL-SUWAYEH, S. A., KU, M. C., HWANG, T. L. & FANG, J. Y. 2012. Anti-inflammatory activity and percutaneous absorption of quercetin and its polymethoxylated compound and glycosides: the relationships to chemical structures. *Eur J Pharm Sci*, 47, 857-64.
- LIU, D., HU, H., LIN, Z., CHEN, D., ZHU, Y., HOU, S. & SHI, X. 2013. Quercetin deformable liposome: preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. *J Photochem Photobiol B*, 127, 8-17.
- LIU, G., WANG, W., MASUOKA, N., ISOBE, T., YAMASHITA, K., MANABE, M. & KODAMA, H. 2005. Effect of three flavonoids isolated from Japanese *Polygonum* species on superoxide generation in human neutrophils. *Planta Med*, 71, 933-7.
- LOKE, W. M., HODGSON, J. M., PROUDFOOT, J. M., MCKINLEY, A. J., PUDDEY, I. B. & CROFT, K. D. 2008. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr*, 88, 1018-25.

- LONGO, D., KASPER, D., JAMESON, L., FAUCI, A., HAUSER, S. & LOSCALZO, J. 2013. *Principios de Medicina Interna.*, McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- LUCIEN, F., HARPER, K., PELLETIER, P. P., VOLKOV, L. & DUBOIS, C. M. 2014. Simultaneous pH measurement in endocytic and cytosolic compartments in living cells using confocal microscopy. *J Vis Exp*.
- LUK, H. Y., MCFARLIN, B. K. & VINGREN, J. L. 2017. Using image-based flow cytometry to monitor satellite cells proliferation and differentiation in vitro. *Methods*, 112, 175-181.
- MACRAE, H. S. & MEFFERD, K. M. 2006. Dietary antioxidant supplementation combined with quercetin improves cycling time trial performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 16, 405-19.
- MAHER, P. 2015. How fisetin reduces the impact of age and disease on CNS function. *Front Biosci (Schol Ed)*, 7, 58-82.
- MAHMOUDI, M., HEFAZI, M., RASTIN, M. & BALALI-MOOD, M. 2005. Long-term hematological and immunological complications of sulfur mustard poisoning in Iranian veterans. *Int Immunopharmacol*, 5, 1479-85.
- MALAVIYA, R., LASKIN, J. D. & LASKIN, D. L. 2020. Long-term Respiratory Effects of Mustard Vesicants. *Toxicol Lett*, 319, 168-174.
- MALAVIYA, R., SUNIL, V. R., VENOSA, A., VAYAS, K. N., HECK, D. E., LASKIN, J. D. & LASKIN, D. L. 2016. Inflammatory mechanisms of pulmonary injury induced by mustards. *Toxicol Lett*, 244, 2-7.
- MANACH, C., WILLIAMSON, G., MORAND, C., SCALBERT, A. & REMESY, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81, 230S-242S.
- MANJEET, K. R. & GHOSH, B. 1999. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine macrophages. *Int J Immunopharmacol*, 21, 435-43.
- MARTÍNEZ SALAZAR, M. 2009. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 152-166.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., CULEBRAS, J. M. & TUÑÓN, M. J. 2002. [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutr Hosp*, 17, 271-8.
- MCMANUS, J. & HUEBNER, K. 2005. Vesicants. *Crit Care Clin*, 21, 707-18, vi.
- MENACHER, G., STEINRITZ, D., SCHMIDT, A., POPP, T., WOREK, F., GUDERMANN, T., THIERMANN, H. & BALSZUWEIT, F. 2018. Effects of anti-inflammatory compounds on sulfur mustard injured cells: Recommendations and caveats suggested by in vitro cell culture models. *Toxicol Lett*, 293, 91-97.
- MENG, L. Q., YANG, F. Y., WANG, M. S., SHI, B. K., CHEN, D. X., CHEN, D., ZHOU, Q., HE, Q. B., MA, L. X., CHENG, W. L. & XING, N. Z. 2018. Quercetin protects against chronic prostatitis in rat model through NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *Prostate*, 78, 790-800.
- MIDDLETON, E., JR., DRZEWIECKI, G. & KRISHNARAO, D. 1981. Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *J Immunol*, 127, 546-50.
- MOTEGI, S., UCHIYAMA, A., YAMADA, K., OGINO, S., YOKOYAMA, Y., PERERA, B., TAKEUCHI, Y. & ISHIKAWA, O. 2016. Increased susceptibility to oxidative stress- and ultraviolet A-induced apoptosis in fibroblasts in atypical

- progeroid syndrome/atypical Werner syndrome with LMNA mutation. *Exp Dermatol*, 25 Suppl 3, 20-7.
- MUROYA, K., MITSUKUNI, Y., ICHIKAWA, M., TSUSHIDA, T., MIYAMOTO, S. & TERAOKA, 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, 1907-12.
- NAGHII, M. R. 2002. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Mil Med*, 167, 573-5.
- NAIR, M. P., KANDASWAMI, C., MAHAJAN, S., CHADHA, K. C., CHAWDA, R., NAIR, H., KUMAR, N., NAIR, R. E. & SCHWARTZ, S. A. 2002. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN $\gamma$ ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta*, 1593, 29-36.
- NAYA, M. J., PEREBOOM, D., ORTEGO, J., ALDA, J. O. & LANAS, A. 1997. Superoxide anions produced by inflammatory cells play an important part in the pathogenesis of acid and pepsin induced oesophagitis in rabbits. *Gut*, 40, 175-81.
- NEGRE-SALVAYRE, A. & SALVAYRE, R. 1992. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radic Biol Med*, 12, 101-6.
- NG, T. B., HUANG, B., FONG, W. P. & YEUNG, H. W. 1997. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci*, 61, 933-49.
- NOPPE, G., DEKKER, P., DE KONING-TREURNIET, C., BLOM, J., VAN HEEMST, D., DIRKS, R. W., TANKE, H. J., WESTENDORP, R. G. & MAIER, A. B. 2009. Rapid flow cytometric method for measuring senescence associated beta-galactosidase activity in human fibroblasts. *Cytometry A*, 75, 910-6.
- NOREN HOOTEN, N. & EVANS, M. K. 2017. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J Vis Exp*.
- O'CONNOR, J. E., CALLAGHAN, R. C., ESCUDERO, M., HERRERA, G., MARTINEZ, A., MONTEIRO, M. D. & MONTOLIU, H. 2001. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life*, 51, 231-9.
- OLSON, E. R., MELTON, T., DICKINSON, S. E., DONG, Z., ALBERTS, D. S. & 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.
- OLSON, E. R., MELTON, T., DONG, Z. & BOWDEN, G. T. 2008. Stabilization of quercetin paradoxically reduces its proapoptotic effect on UVB-irradiated human keratinocytes. *Cancer Prev Res (Phila)*, 1, 362-8.
- OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M., SPOELSTRA-DE MAN, A. M. & DE WAARD, M. C. 2014. Vitamin C revisited. *Crit Care*, 18, 460.
- OYAGBEMI, A. A., OMOBOWALE, T. O., SABA, A. B., OLOWU, E. R., DADA, R. O. & AKINRINDE, A. S. 2016. Gallic Acid Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Neurotoxicity in Wistar Rats Through Free Radical Scavenging Activity and Improvement in Antioxidant Defense System. *J Diet Suppl*, 13, 402-19.
- PANAHI, Y., ABDOLGHAFFARI, A. H. & SAHEBKAR, A. 2018. A review on symptoms, treatments protocols, and proteomic profile in sulfur mustard-exposed victims. *J Cell Biochem*, 119, 197-206.
- PANAHI, Y., RAJAEI, S. M. & SAHEBKAR, A. 2017. Ocular Effects of Sulfur Mustard and Therapeutic Approaches. *J Cell Biochem*, 118, 3549-3560.

- PANCHAL, S. K., POUDYAL, H. & BROWN, L. 2012. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr*, 142, 1026-32.
- PAREDES SALIDO, F. & ROCA FERNÁNDEZ, J. J. 2002. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm*, 21, 96-100.
- PATIL, S. L., MALLAIAH, S. H. & PATIL, R. K. 2013. Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. *J Med Phys*, 38, 87-92.
- PECIVOVA, J., MACICKOVA, T., SVITEKOVA, K. & NOSAL, R. 2012. Quercetin inhibits degranulation and superoxide generation in PMA stimulated neutrophils. *Interdiscip Toxicol*, 5, 81-3.
- PEREBOOM, D., GILABERTE, Y., SINUES, B., ESCANERO, J. & ALDA, J. O. 1999. Antioxidant intracellular activity of genistein and equol. *J Med Food*, 2, 253-6.
- PEREZ-VIZCAINO, F. & DUARTE, J. 2010. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med*, 31, 478-94.
- PIETKIEWICZ, S., SCHMIDT, J. H. & LAVRIK, I. N. 2015. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods*, 423, 99-103.
- PITA, R. 2008. *Armas químicas: La ciencia en manos del mal*, Madrid (España), Plaza y Valdes.
- PITA, R., MARCO-CONTELLES, J., RAMOS, E., DEL PINO, J. & ROMERO, A. 2013. Toxicity induced by chemical warfare agents: insights on the protective role of melatonin. *Chem Biol Interact*, 206, 134-42.
- PITA, R., MARCO-CONTELLES, J., RAMOS, E., PINO, J. D. & ROMERO, A. 2014. Melatonin as potential candidate to prevent the toxicity induced by chemical warfare agents. *Arch Toxicol*, 88, 3-4.
- PITA, R., S., I. & R, R. 2007. Actuación sanitaria en atentados terroristas con agentes químicos de guerra: más de diez años después de los atentados con sarín en Japón. *Emergencias*.
- PITA, R. & VIDAL-ASENSI, S. 2010. Toxicología cutánea y sistémica de los agentes vesicantes de guerra. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 101, 7-18.
- POHL, C., PAPRITZ, M., MOISCH, M., WUBBEKE, C., HERMANN, M. I., UBOLDI, C., DEI-ANANG, J., MAYER, E., KIRKPATRICK, C. J. & KEHE, K. 2009. Acute morphological and toxicological effects in a human bronchial coculture model after sulfur mustard exposure. *Toxicol Sci*, 112, 482-9.
- PUNITHAVATHI, V. R. & PRINCE, P. S. 2010. Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci*, 86, 178-84.
- QIU, X., KROEGER, A., HE, S., KOZAK, R., AUDET, J., MBIKAY, M. & CHRETIEN, M. 2016. Prophylactic Efficacy of Quercetin 3-beta-O-d-Glucoside against Ebola Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 60, 5182-8.
- RAFIQ, R. A., QUADRI, A., NAZIR, L. A., PEERZADA, K., GANAI, B. A. & TASDUQ, S. A. 2015. A Potent Inhibitor of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) and Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase Signalling, Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavone) Promotes Cell Death in Ultraviolet (UV)-B-Irradiated B16F10 Melanoma Cells. *PLoS One*, 10, e0131253.
- RAZAVI, S. M., ABDOLLAHI, M. & SALAMATI, P. 2016. Cancer Events After Acute or Chronic Exposure to Sulfur Mustard: A Review of the Literature. *Int J Prev Med*, 7, 76.

- REITER, R. J. 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain1. *The FASEB Journal*, 9, 526-533.
- REPETTO JIMÉNEZ M. & REPETTO KUHN G. 2009. *Toxicología fundamental*, Sevilla, España, Díaz de Santos.
- RIVAS, C. I., ZUNIGA, F. A., SALAS-BURGOS, A., MARDONES, L., ORMAZABAL, V. & VERA, J. C. 2008. Vitamin C transporters. *J Physiol Biochem*, 64, 357-75.
- RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, M. J. 2018. Antídotos en intoxicaciones por gases de guerra. *Butlletí d'Antidots de Catalunya*, 1.
- ROJAS, A., DEL CAMPO, J. A., CLEMENT, S., LEMASSON, M., GARCIA-VALDECASAS, M., GIL-GOMEZ, A., RANCHAL, I., BARTOSCH, B., BAUTISTA, J. D., ROSENBERG, A. R., NEGRO, F. & ROMERO-GOMEZ, M. 2016. Effect of Quercetin on Hepatitis C Virus Life Cycle: From Viral to Host Targets. *Sci Rep*, 6, 31777.
- ROTHMILLER, S., JÄGER, N., MEIER, N., MEYER, T., NEU, A., STEINRITZ, D., THIERMANN, H., SCHERER, M., RUMMEL, C., MANGERICH, A., BÜRKLE, A. & SCHMIDT, A. 2021. Chronic senescent human mesenchymal stem cells as possible contributor to the wound healing disorder after exposure to the alkylating agent sulfur mustard. *Arch Toxicol*, 95, 727-747.
- ROTHMILLER, S., SCHRODER, S., STROBELT, R., WOLF, M., WANG, J., JIANG, X., WOREK, F., STEINRITZ, D., THIERMANN, H. & SCHMIDT, A. 2018a. Sulfur mustard resistant keratinocytes obtained elevated glutathione levels and other changes in the antioxidative defense mechanism. *Toxicol Lett*, 293, 51-61.
- ROTHMILLER, S., WOLF, M., WOREK, F., STEINRITZ, D., THIERMANN, H. & SCHMIDT, A. 2018b. Alteration of miRNA expression in a sulfur mustard resistant cell line. *Toxicol Lett*, 293, 38-44.
- SAALBACH, A., ANEREGG, U., BRUNS, M., SCHNABEL, E., HERRMANN, K. & HAUSTEIN, U. F. 1996. Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities. *J Invest Dermatol*, 106, 1314-9.
- SABOGAL-GUAQUETA, A. M., MUNOZ-MANCO, J. I., RAMIREZ-PINEDA, J. R., LAMPREA-RODRIGUEZ, M., OSORIO, E. & CARDONA-GOMEZ, G. P. 2015. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, 93, 134-45.
- SAHU, B. D., KALVALA, A. K., KONERU, M., MAHESH KUMAR, J., KUNCHU, M., RACHAMALLA, S. S. & SISTLA, R. 2014. Ameliorative effect of fisetin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats via modulation of NF-kappaB activation and antioxidant defence. *PLoS One*, 9, e105070.
- SAITOH, Y., NAKAWA, A., TANABE, T. & AKIYAMA, T. 2018. The influence of cellular senescence on intracellular vitamin C transport, accumulation, and function. *Mol Cell Biochem*, 446, 209-219.
- SAKAI-KASHIWABARA, M. & ASANO, K. 2013. Inhibitory action of quercetin on eosinophil activation in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 127105.
- SANCHEZ, M., GALISTEO, M., VERA, R., VILLAR, I. C., ZARZUELO, A., TAMARGO, J., PEREZ-VIZCAINO, F. & DUARTE, J. 2006. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 24, 75-84.

- SCHMIDT, A., STEINRITZ, D., ROTHMILLER, S., THIERMANN, H. & SCHERER, A. M. 2018a. Effects of sulfur mustard on mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett*, 293, 98-104.
- SCHMIDT, A., STEINRITZ, D., RUDOLF, K. D., THIERMANN, H. & STRIEPLING, E. 2018b. Accidental sulfur mustard exposure: A case report. *Toxicol Lett*, 293, 62-66.
- SCHMIDT, A., WOLF, M., ROTHMILLER, S., WOREK, F., STEINRITZ, D. & THIERMANN, H. 2018c. Cytostatic resistance profile of the sulfur mustard resistant keratinocyte cell line HaCaT/SM. *Toxicol Lett*, 293, 16-20.
- SCHREIER, C., ROTHMILLER, S., SCHERER, M. A., RUMMEL, C., STEINRITZ, D., THIERMANN, H. & SCHMIDT, A. 2018. Mobilization of human mesenchymal stem cells through different cytokines and growth factors after their immobilization by sulfur mustard. *Toxicol Lett*, 293, 105-111.
- SEYED M. RAZAVI, P. S., ALI AMINI HARANDI, MOSTAFA GHANEI 2013. Prevención y tratamiento de las consecuencias respiratorias inducidas por la mostaza azufrada en las víctimas iraníes. *International Journal of Preventive Medicine*.
- SHAHIN, S., CULLINANE, C. & GRAY, P. J. 2001. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by sulphur mustard in keratinocytes. *Chem Biol Interact*, 138, 231-45.
- SHAKARJIAN, M. P., HECK, D. E., GRAY, J. P., SINKO, P. J., GORDON, M. K., CASILLAS, R. P., HEINDEL, N. D., GERECKE, D. R., LASKIN, D. L. & LASKIN, J. D. 2010. Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicol Sci*, 114, 5-19.
- SHARMA, M., PANT, S. C., PANT, J. C. & VIJAYARAGHAVAN, R. 2010. Nitrogen and sulphur mustard induced histopathological observations in mouse visceral organs. *J Environ Biol*, 31, 891-905.
- SHARMA, M., VIJAYARAGHAVAN, R. & GANESAN, K. 2008. Comparison of toxicity of selected mustard agents by percutaneous and subcutaneous routes. *Indian J Exp Biol*, 46, 822-30.
- SHI, H., REN, K., LV, B., ZHANG, W., ZHAO, Y., TAN, R. X. & LI, E. 2016. Baicalin from *Scutellaria baicalensis* blocks respiratory syncytial virus (RSV) infection and reduces inflammatory cell infiltration and lung injury in mice. *Sci Rep*, 6, 35851.
- SHOSKES, D. A., ZEITLIN, S. I., SHAHED, A. & RAJFER, J. 1999. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. *Urology*, 54, 960-3.
- SHUTO, T., KAMEI, S., NOHARA, H., FUJIKAWA, H., TASAKI, Y., SUGAHARA, T., ONO, T., MATSUMOTO, C., SAKAGUCHI, Y., MARUTA, K., NAKASHIMA, R., KAWAKAMI, T., SUICO, M. A., KONDO, Y., ISHIGAMI, A., TAKEO, T., TANAKA, K. I., WATANABE, H., NAKAGATA, N., UCHIMURA, K., KITAMURA, K., LI, J. D. & KAI, H. 2016. Pharmacological and genetic reappraisals of protease and oxidative stress pathways in a mouse model of obstructive lung diseases. *Sci Rep*, 6, 39305.
- SIMBULAN-ROSENTHAL, C. M., RAY, R., BENTON, B., SOEDA, E., DAHER, A., ANDERSON, D., SMITH, W. J. & ROSENTHAL, D. S. 2006. Calmodulin mediates sulfur mustard toxicity in human keratinocytes. *Toxicology*, 227, 21-35.
- SINGH, M. & PIEKORZ, R. P. 2013. Senescence-associated lysosomal alpha-L-fucosidase (SA-alpha-Fuc): a sensitive and more robust biomarker for cellular senescence beyond SA-beta-Gal. *Cell Cycle*, 12, 1996.



- SMITH, K. J., CASILLAS, R., GRAHAM, J., SKELTON, H. G., STEMLER, F. & HACKLEY, B. E., JR. 1997. Histopathologic features seen with different animal models following cutaneous sulfur mustard exposure. *J Dermatol Sci*, 14, 126-35.
- SRIRAKSA, N., WATTANATHORN, J., MUCHIMAPURA, S., TIAMKAO, S., BROWN, K. & CHAISIWAMONGKOL, K. 2012. Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 823206.
- SRIVASTAVA, S., SOMASAGARA, R. R., HEGDE, M., NISHANA, M., TADI, S. K., SRIVASTAVA, M., CHOUDHARY, B. & RAGHAVAN, S. C. 2016. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci Rep*, 6, 24049.
- STEFEEK, M. 2011. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdiscip Toxicol*, 4, 69-77.
- STEINRITZ, D., SCHMIDT, A., SIMONS, T., IBRAHIM, M., MORGUET, C., BALSZUWEIT, F., THIERMANN, H., KEHE, K., BLOCH, W. & BOLCK, B. 2014. Chlorambucil (nitrogen mustard) induced impairment of early vascular endothelial cell migration - effects of alpha-linolenic acid and N-acetylcysteine. *Chem Biol Interact*, 219, 143-50.
- STIPP, D. 2012. The transformative promise of aging science. *Cell Cycle*, 11, 3903-4.
- SULLIVAN, M., FOLLIS, R. H., JR. & HILGARTNER, M. 1951. Toxicology of podophyllin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 77, 269-72.
- SZINICZ, L. 2005. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*, 214, 167-81.
- TAHMASBPOUR MARZONY, E., NEJAD-MOGHADAM, A., GHANEI, M. & PANAHI, Y. 2016. Sulfur mustard causes oxidants/antioxidants imbalance through the overexpression of free radical producing-related genes in human mustard lungs. *Environ Toxicol Pharmacol*, 45, 187-92.
- TELANG, P. S. 2013. Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatol Online J*, 4, 143-6.
- TEWARI-SINGH, N., INTURI, S., JAIN, A. K., AGARWAL, C., ORLICKY, D. J., WHITE, C. W., AGARWAL, R. & DAY, B. J. 2014. Catalytic antioxidant AEOL 10150 treatment ameliorates sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-associated cutaneous toxic effects. *Free Radic Biol Med*, 72, 285-95.
- TORRES, M., MÁRQUEZ, M., SUTIL DE NARANJO, R., DE YÉPEZ, C., LEAL DE GARCÍA, M., MUÑOZ, M. & GÓMEZ, M. E. 2014. Aspectos Farmacológicos relevantes de las Vitaminas Antioxidantes (E, A y C).
- TSOUTSOULOPOULOS, A., BROCKMOLLER, S., THIERMANN, H. & STEINRITZ, D. 2020. Comparison of the toxicity of sulfur mustard and its oxidation products in vitro. *Toxicol Lett*, 321, 69-72.
- VALET, G., LEARY, J. F. & TÁRNOK, A. 2004. Cytomics—New technologies: Towards a human cytome project. *Cytometry Part A*, 59A, 167-171.
- VAN DEURSEN, J. M. 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509, 439-46.
- VÉLEZ GÓMEZ, D. 2018. *Formulación de quercetina en liposomas para su administración tópica*. Magister en Farmacia y Química de Productos Naturales, Universidad de Salamanca.
- VERWILST, P., HAN, J., LEE, J., MUN, S., KANG, H. G. & KIM, J. S. 2017. Reconsidering azobenzene as a component of small-molecule hypoxia-mediated cancer drugs: A theranostic case study. *Biomaterials*, 115, 104-114.
- VICENTE-VICENTE L., PRIETO M. & MORALES A.I. 2013. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista de Toxicología*. Pamplona, España.

- VICENTINI, F. T., FONSECA, Y. M., PITOL, D. L., IYOMASA, M. M., BENTLEY, M. V. & FONSECA, M. J. 2010. Evaluation of protective effect of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin against UVB-induced damage in hairless mice skin. *J Pharm Pharm Sci*, 13, 274-85.
- WANG, L., WALTEBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, E. M., BLUNDER, M., LIU, X., MALAINER, C., BLAZEVIC, T., SCHWAIGER, S., ROLLINGER, J. M., HEISS, E. H., SCHUSTER, D., KOPP, B., BAUER, R., STUPPNER, H., DIRSCH, V. M. & ATANASOV, A. G. 2014. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): a review. *Biochem Pharmacol*, 92, 73-89.
- WEI, W. & JI, S. 2018. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *J Cell Physiol*, 233, 9121-9135.
- WEINBERGER, B., MALAVIYA, R., SUNIL, V. R., VENOSA, A., HECK, D. E., LASKIN, J. D. & LASKIN, D. L. 2016. Mustard vesicant-induced lung injury: Advances in therapy. *Toxicol Appl Pharmacol*, 305, 1-11.
- WENG, Z., ZHANG, B., ASADI, S., SISMANOPOULOS, N., BUTCHER, A., FU, X., KATSAROU-KATSARI, A., ANTONIOU, C. & THEOHARIDES, T. C. 2012. Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PLoS One*, 7, e33805.
- WILEY, C. D. & CAMPISI, J. 2016. From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metab*, 23, 1013-1021.
- WONG, G., HE, S., SIRAGAM, V., BI, Y., MBIKAY, M., CHRETIEN, M. & QIU, X. 2017. Antiviral activity of quercetin-3-beta-O-D-glucoside against Zika virus infection. *Virol Sin*, 32, 545-547.
- YANG, C. S., LANDAU, J. M., HUANG, M. T. & NEWMARK, H. L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*, 21, 381-406.
- YANG, H., BAUR, J. A., CHEN, A., MILLER, C., ADAMS, J. K., KISIELEWSKI, A., HOWITZ, K. T., ZIPKIN, R. E. & SINCLAIR, D. A. 2007. Design and synthesis of compounds that extend yeast replicative lifespan. *Aging Cell*, 6, 35-43.
- YANG, N.-C. & HU, M.-L. 2004. A fluorimetric method using fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside for quantifying the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity in human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Analytical Biochemistry*, 325, 337-343.
- YAO, C., XI, C., HU, K., GAO, W., CAI, X., QIN, J., LV, S., DU, C. & WEI, Y. 2018. Inhibition of enterovirus 71 replication and viral 3C protease by quercetin. *Virol J*, 15, 116.
- YAO, Z., GU, Y., ZHANG, Q., LIU, L., MENG, G., WU, H., XIA, Y., BAO, X., SHI, H., SUN, S., WANG, X., ZHOU, M., JIA, Q., WU, Y., SONG, K., GAO, W., GUO, C. & NIU, K. 2019. Estimated daily quercetin intake and association with the prevalence of type 2 diabetes mellitus in Chinese adults. *Eur J Nutr*, 58, 819-830.
- YARAEI, R., GHAZANFARI, T., EBTEKAR, M., ARDESTANI, S. K., REZAEI, A., KARIMINIA, A., FAGHIHZADEH, S., MOSTAFAIE, A., VAEZ-MAHDAVI, M. R., MAHMOUDI, M., NAGHIZADEH, M. M., SOROUSH, M. R. & HASSAN, Z. M. 2009a. Alterations in serum levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-1alpha, IL-1beta and IL-1Ra) 20 years after sulfur mustard exposure: Sardasht-Iran cohort study. *Int Immunopharmacol*, 9, 1466-70.

- YARAEI, R., GHAZANFARI, T., FAGHIHZADEH, S., MOSTAFAIE, A., SOROUSH, M. R., INAI, K., FOROUTAN, A., SHAMS, J., NAGHIZADEH, M. M. & HASSAN, Z. M. 2009b. Alterations in the serum levels of soluble L, P and E-selectin 20 years after sulfur mustard exposure: Sardasht-Iran Cohort Study. *Int Immunopharmacol*, 9, 1477-81.
- YIN, B., TANG, S., SUN, J., ZHANG, X., XU, J., DI, L., LI, Z., HU, Y. & BAO, E. 2018. Vitamin C and sodium bicarbonate enhance the antioxidant ability of H9C2 cells and induce HSPs to relieve heat stress. *Cell Stress Chaperones*, 23, 735-748.
- YORAM SOLBERG, M. A., MICHAEL BELKIN 1997. Ocular Injury by Mustard Gas. *Survey of Ophthalmology*, 41.
- YOUSSEFZADEH, M. J., ZHU, Y., MCGOWAN, S. J., ANGELINI, L., FUHRMANN-STROISSNIGG, H., XU, M., LING, Y. Y., MELOS, K. I., PIRTSKHALAVA, T., INMAN, C. L., MCGUCKIAN, C., WADE, E. A., KATO, J. I., GRASSI, D., WENTWORTH, M., BURD, C. E., ARRIAGA, E. A., LADIGES, W. L., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J. L., ROBBINS, P. D. & NIEDERNHOFER, L. J. 2018. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, 36, 18-28.
- ZAFARGHANDI, M. R., SOROUSH, M. R., MAHMOODI, M., NAIENI, K. H., ARDALAN, A., DOLATYARI, A., FALAHATI, F., MIRMOHAMMADKHANI, M., MOUSAVI, B. & GHANEI, M. 2013. Incidence of cancer in Iranian sulfur mustard exposed veterans: a long-term follow-up cohort study. *Cancer Causes Control*, 24, 99-105.
- ZHAO, L. M., MA, F. Y., JIN, H. S., ZHENG, S., ZHONG, Q. & WANG, G. 2015. Design and synthesis of novel hydroxyanthraquinone nitrogen mustard derivatives as potential anticancer agents via a bioisostere approach. *Eur J Med Chem*, 102, 303-9.
- ZHU, X., LI, N., WANG, Y., DING, L., CHEN, H., YU, Y. & SHI, X. 2017. Protective effects of quercetin on UVB irradiation-induced cytotoxicity through ROS clearance in keratinocyte cells. *Oncol Rep*, 37, 209-218.