

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**EFEECTO DE LA VITAMINA C SOBRE LA  
LIBERACIÓN DE ROS INDUCIDA POR  
POLUTANTES AMBIENTALES EN UN  
MODELO 3D DE PIEL**

**CURSO ACADÉMICO 2017/2018**

**Autor:** David Blázquez Ruano

**Tutor:** Dña. Patricia Almudéver Folch

**Cotutor:** Dña. Sonia Contreras Martínez

**Valencia, Julio de 2018**

Todos los derechos reservados

## **EFFECTO DE LA VITAMINA C SOBRE LA LIBERACIÓN DE ROS INDUCIDA POR POLUTANTES AMBIENTALES EN UN MODELO 3D DE PIEL**

### **RESUMEN:**

Factores ambientales, como la radiación solar, polución y el tabaco, pueden acelerar el daño en la piel a través de la generación de un proceso llamado estrés oxidativo. La liberación de moléculas llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) puede dar lugar al envejecimiento celular y al paso de células epiteliales a células mesenquimales (transición epitelio-mesenquimal), la cual está asociada a enfermedades como la fibrosis cutánea. La vitamina C es uno de los antioxidantes naturales más potentes en la piel y ha sido ampliamente utilizado con objetivos farmacéuticos y cosméticos. Esta sustancia es capaz de neutralizar el estrés oxidativo a través de un proceso de transferencia/donación de un electrón y sumarse junto a los mecanismos que disponen las células de reducir el estrés oxidativo. El trabajo tiene como objetivo desarrollar un modelo de piel 3D de fibrosis cutánea, mediante el polutante ambiental, 1648a. Se estudian los efectos del polutante sobre la liberación de ROS y la transformación epitelio-mesenquimal (EMT) y se utiliza el ácido ascórbico como fármaco para su validación. Para ello, una vez obtenido el cultivo *in vitro* de piel en 3D se determinan marcadores antioxidantes (tioredoxina, catalasa, SOD), la citoquina inflamatoria (IL-8), proteínas fibróticas ( $\alpha$ -sma, CTGF, fibronectina, e-cadherina) y expresión de marcadores del balance redox (NOX-4 y Nrf2) para ver si se estaba desencadenando un proceso fibrótico. En todos los casos se utiliza la vitamina C para determinar sus efectos farmacológicos sobre el proceso inducido por el polutante. Los resultados confirman que el 1648a genera un fuerte desbalance del equilibrio redox y la sobreexpresión de proteínas antioxidantes y fibróticas, viéndose atenuados los efectos tras el tratamiento con vitamina C, compuesto que se presenta como un fuerte antioxidante. Por lo tanto, este modelo celular se podría presentar como una buena opción para futuros estudios farmacológicos *in vitro* de fibrosis cutánea.

**PALABRAS CLAVE:** vitamina C, polutante, ROS, fibrosis

**Autor:** David Blázquez Ruano

**Tutor académico:** Dña. Patricia Almudéver Folch

**Cotutor:** Dña. Sonia Contreras Martínez

**Localidad y fecha:** Valencia, Julio de 2018

## **EFFECTS OF VITAMIN C ON ROS RELEASE INDUCED BY ENVIRONMENTAL POLLUTANTS IN A 3D SKIN MODEL**

### **ABSTRACT:**

Ambiental factors, such as solar radiation, pollution and tobacco, can accelerate the damage on the skin through a process called oxidative stress. The release of molecules called reactive oxygen species (ROS) can result in the aging of the skin and in the conversion of epithelial cells to mesenchymal cells (epithelial-mesenchymal transition), which is linked with diseases like skin fibrosis. Vitamin C is one of the most powerful natural antioxidants in the skin and it has been used with pharmacological and cosmetics goals. That substance is capable of neutralize oxidative stress through a process of electron transference/donation and work together with the mechanisms that cells have to reduce oxidative stress. This project has as objective the development of 3D skin model of skin fibrosis using an environmental pollutant, 1648a. It is studied the effects of this pollutant on the release of ROS and the epithelial-mesenchymal transition, and ascorbic acid will be used to validate it. To get it, once the 3D *in vitro* model was obtained it was determined if there was occurring a fibrotic process, measuring antioxidant markers (thioredoxin, catalase and SOD-1), inflammatory cytokines (IL-8), proteins associated to fibrotic process ( $\alpha$ -sma, CTGF, fibronectin, e-cadherin) and the expression of markers of redox balance (NOX-4 and Nrf2). In all the experiments vitamin C was used to determine its pharmacological role against the process induced by the pollutant. Results obtained confirm that 1648a triggers an unbalance of the redox equilibrium and the overexpression of antioxidant and fibrotic proteins, effects that were attenuated after the treatment with vitamin C, presenting that compound like a good antioxidant. Therefore, the model developed is presented like a good option for future *in vitro* pharmacological studies of skin fibrosis.

**KEYWORDS:** vitamin C, pollutant, ROS, fibrosis

**Autor:** David Blázquez Ruano

**Academic Tutor:** Dña. Patricia Almudéver Folch

**Cotutor:** Dña. Sonia Contreras Martínez

**Date and place:** Valencia, July 2018

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Julio Cortijo por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio y a Patricia Almudéver por ayudarme como tutora y estar siempre pendiente de mi progreso.

Ya dentro del laboratorio, agradecer especialmente a Sonia Contreras por guiarme en todo momento, siempre atenta y dispuesta a ayudarme en todo momento. Aunque a veces algunos procedimientos eran un poco “tediosos” siempre me hacías verlo de otra forma, y sí, al final te he terminado cogiendo cariño por más veces que me lo preguntabas. Gracias por ayudarme tanto en el laboratorio como en la redacción y por darme siempre consejos.

Por otro lado, darle las gracias a Pilar y Bea, por ayudarme especialmente en mis inicios en el laboratorio junto a Sonia, gracias a vosotras aprendí todas las técnicas que necesitaba para realizar el trabajo, y siempre de forma divertida, no había forma de aburrirse con vosotras. También agradecer a Laia y Paula, que a pesar de estar ellas también con sus trabajos, siempre sacaban tiempo para ayudarme.

Ya los últimos meses y tras mucho lío de traslados, conocí al resto del laboratorio: Cristina, Inés, Fer, Marina, Martín, Mireya y Xavi. Especialmente a Cristina e Inés, las cuales siempre animaban el laboratorio (quizá a veces demasiado, tenéis loco a Xavi), y las cuales jamás se cansarán de recordarme aquel tormentoso día del “Buffer C”, el cuál sin Martín tampoco habría tenido gracia hacerlo. De todos modos, no siempre me salían mal las cosas a mí, espero que no se os vuelva a caer una placa justo antes de medirla.

Por último, agradecer a mi familia por ayudarme durante estos 4 años y que a pesar de no entender muy bien que es lo que estaba estudiando, siempre confiaron en mí.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. La Piel: Definición, estructura y funciones .....	1
1.2. Efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la piel. ....	2
1.2.1. Especies reactivas de oxígeno: Aspectos generales .....	2
1.2.2. Equilibrio redox .....	2
1.2.3. Estrés oxidativo en la piel .....	4
1.3. La fibrosis cutánea como enfermedad asociada a los ROS en la piel .....	5
1.3.1. La transición epitelio-mesenquimal (TEM) .....	6
1.4. La vitamina C como antioxidante y su posible papel en enfermedades cutáneas. ....	6
2. OBJETIVOS .....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Crecimiento de un modelo de piel 3D .....	9
3.2. Inmunofluorescencia para la validación de la formación del estrato córneo .....	9
3.3. Procedimiento experimental .....	9
3.4. Medida de la liberación de especies reactivas de oxígeno .....	10
3.5. Western Blot .....	10
3.6. ELISA para la detección de IL-8 .....	11
3.7. Retrotranscripción y PCR a tiempo real .....	11
3.8. Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS .....	13
4.1. Crecimiento del cultivo de piel 3D y validación de la formación del estrato córneo .	13
4.2. Medida de liberación de especies reactivas de oxígeno .....	14
4.3. Efecto de la Vitamina C sobre la liberación de IL-8.....	14
4.4. Efecto de la Vitamina C sobre la expresión de proteínas.....	14
4.5. Efecto de la Vitamina C sobre la expresión de transcritos.....	18
5. DISCUSIÓN .....	20
6. CONCLUSIONES .....	24
7. REFERENCIAS.....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de las distintas capas de la piel con sus distintas estructuras.....	1
Figura 2. Esquema general de la inducción de producción de enzimas antioxidantes por la ruta de señalización keap1-Nrf2-ARE.....	3
Figura 3. Asociación entre NOX4 y Nrf2 en la estabilización redox en las células.....	4
Figura 4. Mecanismo general de la fibrosis cutánea.....	5
Figura 5. Crecimiento del modelo de piel 3D.....	13
Figura 6. IF de modelo 3D con medio de diferenciación en placas de 6 pocillos, durante 21 días de formación.....	14
Figura 7. Efectos de la vitamina C sobre la inducción de ROS por 1648 a en modelo 3D.....	15
Figura 8. Efectos de la vitamina C sobre la liberación de IL8 inducida por 1648 a en modelo 3D.....	16
Figura 9. Efectos de la vitamina C sobre la expresión proteica de proteínas antioxidantes inducida por 1648a en modelo 3D.....	17
Figura 10. Efectos de la vitamina C sobre la expresión proteica de proteínas fibróticas inducida por 1648a en modelo 3D.....	17
Figura 11. Efectos de la vitamina C sobre la expresión genética de antioxidantes inducida por 1648 a en modelo 3D.....	18
Figura 12. Efectos de la vitamina C sobre la expresión genética de antioxidantes inducida por 1648 a en modelo 3D.....	19

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de los compuestos de estudio.....	10
--	----

## **ABREVIATURAS**

BSA: Seroalbúmina bovina.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo.

NOX4: NADPH oxidasa 4

PBS: Tampón salino fosfatado.

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SOD1: Superóxido dismutasa 1

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

TEM: Transición epitelio-mesenquimal.

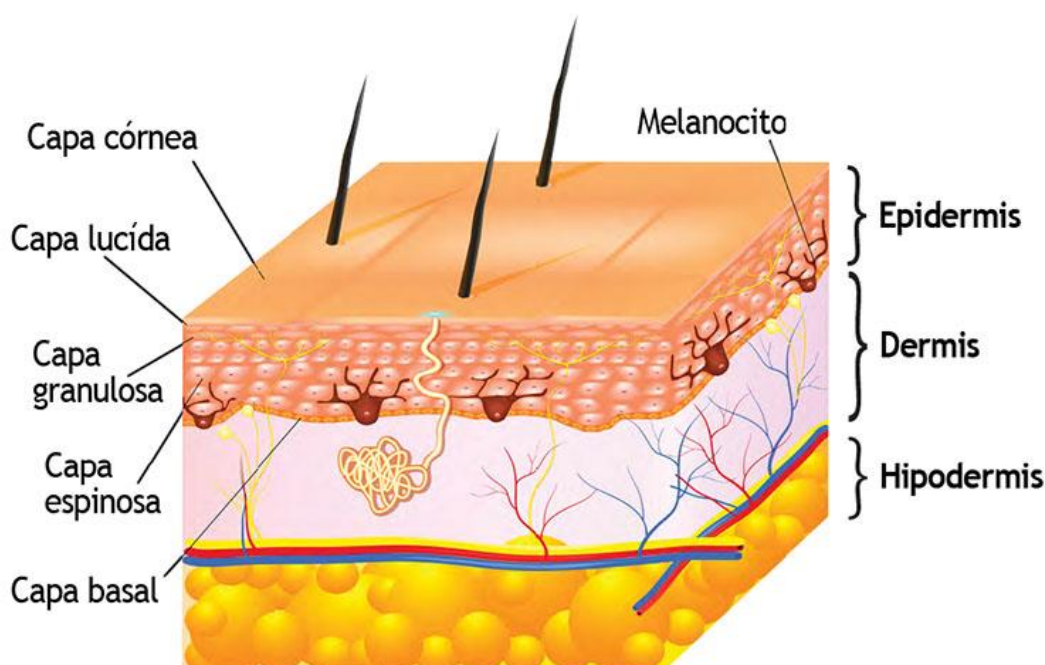
$\alpha$ -SMA:  $\alpha$  actina de músculo liso.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La Piel: Definición, estructura y funciones

La piel es un órgano del sistema integumentario que recubre todo el cuerpo de un animal, cuyas principales funciones son la protección frente a agentes físicos, químicos y biológicos, participar en el proceso de termorregulación del organismo (Kolarsick et al, 2011), proteger frente a las radiaciones ultravioleta (UV) gracias a la presencia de melanina en esta (Wilkin & Brainard, 2015) y la síntesis de Vitamina D por los queratinocitos o la excreción de urea mediante el sudor (Kolarsick et al, 2011).

En la piel se pueden distinguir 3 capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es la capa más externa de la piel y está formada por queratinocitos, que fabrican, melanocitos (que fabrican melanina), células de Langerhans (células inmunológicas presentadoras de antígenos), entre otros. La dermis es la segunda capa de protección de la piel y está unida a la epidermis mediante fibras de colágeno y separada de la epidermis mediante la membrana basal. En la Figura 1 se puede observar las distintas capas de la piel con sus diferentes estructuras) (Menon, 2017).



**Figura 1. Representación de las distintas capas de la piel con sus distintas estructuras.** La capa más externa es la epidermis, donde la capa córnea es el estrato más externo y la capa basal separa la epidermis de la dermis.



## **1.2. Efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la piel.**

### **1.2.1. Especies reactivas de oxígeno: Aspectos generales**

Las especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species o ROS) son moléculas de pequeño tamaño originadas de forma natural debido al metabolismo. Normalmente, la cantidad de estas especies está controlada y no supone un riesgo para el individuo, pero en algunas ocasiones estas aumentan a niveles dañinos debido a la presencia de factores que favorezcan la formación de estas especies, lo que se conoce como estrés oxidativo.

La mayoría de los ROS son generados durante el proceso de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y en muchas ocasiones son necesarios ya que participan directamente en los procesos metabólicos. (Held, 2015). Un ejemplo de ello es el gen NOX4, el cual está directamente implicado en la generación de especies reactivas de oxígeno.

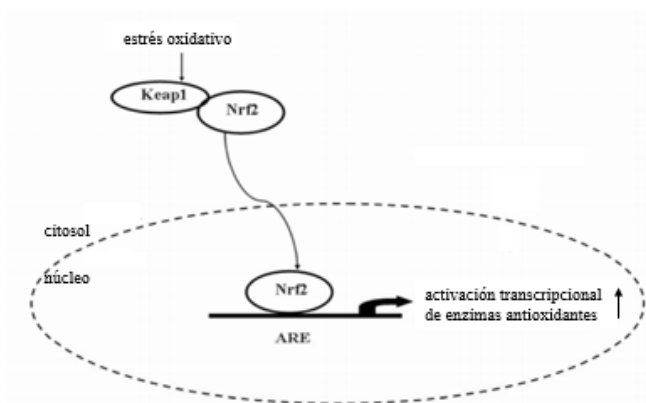
Las especies reactivas de oxígeno, tales como  $O_2^-$  o  $H_2O_2$ , comparten la característica de tener un oxígeno reducido o parcialmente reducido. El estrés oxidativo se dará cuando se acumulen grandes cantidades de estos compuestos, ya sea por un incremento directo de estas especies, o por fallos en los sistemas antioxidantes, como el de la tiorredoxina o la peroxirredoxina (Ray et al, 2012). La peligrosidad de los ROS llega cuando interaccionan con moléculas tales como DNA, proteínas o lípidos, alterando sus funciones debido a cambios estructurales.

### **1.2.2. Equilibrio redox**

Debido a la peligrosidad de acumulación de especies reactivas de oxígeno en las células, existen numerosos mecanismos que permiten establecer el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno que necesita un organismo para llevar a cabo su metabolismo. Sin embargo, si se produjeran errores en ellos, podrían producirse múltiples patologías como fibrosis o cáncer. Por un lado, están las enzimas antioxidantes, que son las encargadas de transformar estas moléculas en otras no reactivas. Ejemplos de esta función son la super óxido dismutasa (SOD), encargada de transformar los radicales superóxidos ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cuál posteriormente es transformado mediante la catalasa en agua y oxígeno molecular (Lü et al, 2009). Otra proteína importante en el proceso de anti-oxidación es la tiorredoxina. Este pequeño péptido de alrededor de 12 kDa no actúa directamente sobre los ROS, sino que actúa

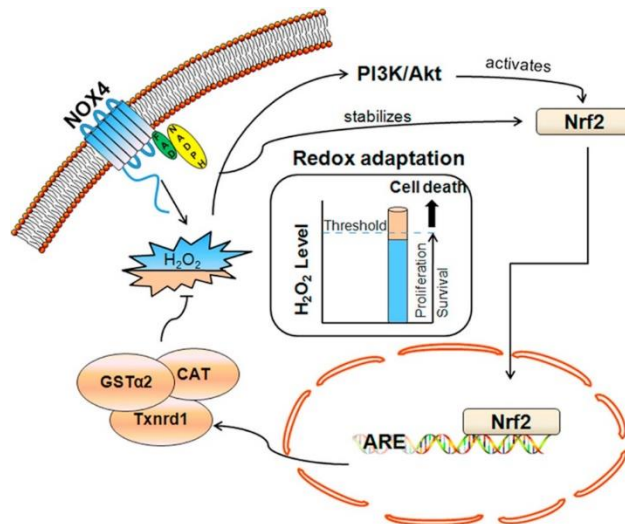
como cofactor en las peroxidetas, las cuales, si tienen actividad antioxidante, permitiendo regenerar los electrones perdidos gracias a la tiorredoxina. El NADPH será el encargado de volver a reducir a la tiorredoxina. (Lu & Holmgren, 2014).

Estas enzimas antioxidantes, están reguladas por Nrf2, un factor de transcripción que está implicado en la síntesis de los genes implicados en los procesos de antioxidación (Barahona, 2016). Este factor se une a una secuencia específica denominada ARE (Antioxidant Response Element). Dado que la célula necesita mantener una homeostasis redox, a pesar de que Nrf2 se expresa de forma constitutiva, éste se encontrará inhibido por la unión de otro factor, Keap1, el cual favorece su degradación. Nrf2 se activará cuando se entre en un estado de estrés oxidativo y se necesite una síntesis de moléculas antioxidantes (Königsberg, 2007), como se observa en la Figura 2.



**Figura 2. Esquema general de la inducción de producción de enzimas antioxidantes por la ruta de señalización keap1-Nrf2-ARE. (Recuperado y adaptado de Li et al, 2015)**

Puesto que las ROS también son necesarios en ciertas proporciones, se debe alcanzar un equilibrio de radicales libres. Una gran cantidad de las ROS que necesitan las células son aportados por NADPH oxidasas o NOXs, y en concreto NOX4 es la encargada de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Debido a la peligrosidad de una posible acumulación de este compuesto, se ha demostrado una asociación entre NOX4 y Nrf2, asociación que permite que se establezca el equilibrio electroquímico que necesitan las células, y que si falla podría dar origen a estrés oxidativo. En la Figura 3 se puede observar cómo se establece el equilibrio entre NOX4 y Nrf2 mediado por la vía de señalización PI3K/Akt (Wu et al, 2017).



**Figura 3. Asociación entre NOX4 y Nrf2 en la estabilización redox en las células.** NOX4 actúa sintetizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario para la célula, y este activa la ruta PI3K/Akt que activa a Nrf2, el cuál es un factor transcripcional que se une a la región ARE promoviendo la síntesis de enzimas antioxidantes como la catalasa o la tiorredoxina (Wu et al, 2017).

### 1.2.3. Estrés oxidativo en la piel

En la piel, se sabe que el estrés oxidativo está directamente relacionado con el envejecimiento (Kammeyer & Luiten, 2015). Al estar expuesta continuamente a diferentes mecanismos de estrés como puede ser la radiación ultravioleta o polutantes, la piel está sometida a un estrés oxidativo superior al de otros órganos (Wölfle et al, 2014).

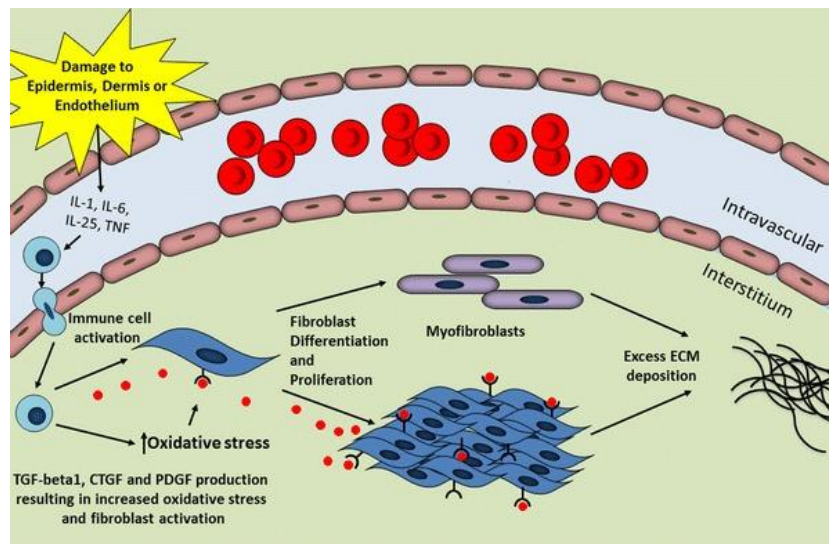
En cuanto a los polutantes, el medioambiente está lleno de ellos y es inevitable su contacto. Algunos de los polutantes presentes en el medio ambiente son el ozono, compuestos nitrogenados, polutantes gaseosos, compuestos sulfurados y metales pesados entre otros (Mancebo & Wang, 2015). Numerosos estudios han demostrado que la exposición a éstos es muy peligrosa ya que están asociados a gran cantidad de enfermedades y muerte en todo el mundo. Se conoce que los polutantes ambientales pueden causar efectos muy perjudiciales sobre la piel, pero todavía el conocimiento de los efectos de estos polutantes es limitado (Mancebo and Wang, 2015). Además, se ha visto que tienen un gran efecto sobre la piel, pero no todos tienen el mismo efecto sobre ella. Sin embargo, se ha descrito que todos los polutantes incrementan la formación de ROS y la liberación de algunas citocinas pro-inflamatorias como IL-8, TNF- $\alpha$  o IL-1 $\alpha$ . (Juliano and Magrini, 2018)

Las formas en las que se forman las especies reactivas de oxígeno en la piel son las comunes para el resto de órganos, como podría tratarse en problemas en la cadena de transporte mitocondrial o una producción peroxisomal debido a la gran cantidad de enzimas que contienen. En la Figura 2 se puede apreciar un resumen de los daños que se pueden originar asociados a la formación de ROS debido a estrés oxidativo en la piel.

### 1.3. La fibrosis cutánea como enfermedad asociada a los ROS en la piel

La fibrosis se define como la acumulación excesiva de tejido conectivo y componentes de la matriz extracelular tales como colágeno o fibronectina, desencadenando una cicatrización permanente. Es común en enfermedades crónicas inflamatorias como escleroderma o artritis (Wynn & Ramalingam, 2012).

Se ha comprobado que el estrés oxidativo está relacionado con la aparición de fibrosis. De esta manera, cuando hay estrés oxidativo, las células liberan una serie de citocinas y factores de crecimiento que favorecen la fibrosis, como el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) que activa rutas metabólicas que favorecen la producción de componentes de la matriz extracelular e impiden su degradación (Nakerakanti & Trojanowska, 2012). En la Figura 4 se puede observar la relación que se establece entre la presencia de especies reactivas de oxígeno y la aparición de fibrosis.



**Figura 4. Mecanismo general de la fibrosis cutánea.** Las células epiteliales responden a lesiones liberando citocinas implicadas en la activación de células inmunes inflamatorias, las cuales liberarán factores fibróticos como TGF- $\beta$ , CTGF y PDGF en caso de estrés oxidativo, los cuales favorecerán la deposición de elementos de la matriz extracelular (Shroff et al, 2014).

### **1.3.1. La transición epitelio-mesenquimal (TEM)**

Uno de los pasos que ocurren previos a la fibrosis es la transición epitelio-mesenquimal (TEM), caracterizada por la diferenciación de las células epiteliales a células mesenquimales. Tras la diferenciación celular tiene lugar una pérdida de marcadores epiteliales (como e-cadherina o ZO-1), ganancia de marcadores mesenquimales (como  $\alpha$ -sma o fibronectina), la pérdida de adherencia, cambios de polaridad, y la ganancia de capacidad migratoria e invasiva, entre otros (Troncoso et al, 2017). Además, el proceso TEM desencadena un proceso fibrótico que da lugar a la transcripción de factores post-transcripcionales implicados en la fibrosis (como CTGF) (Nikitorowicz-Buniak et al, 2015).

### **1.4. La vitamina C como antioxidante y su posible papel en enfermedades cutáneas.**

La vitamina C o ácido ascórbico es un fuerte antioxidante que no es producido por los primates, por lo que tiene que ser tomado mediante la dieta. Es soluble en agua y está considerada como el antioxidante más abundante y uno de los más efectivos debido a su capacidad de donar un electrón a los ROS y neutralizarlos. Además, se ha comprobado que el ácido ascórbico presenta resultados positivos en estudios donde se genera estrés con radiación UV en piel (Humbert et al, 2003).

En cuanto a sus propiedades, se encuentra su poder reductor, ya que posee la capacidad de ceder electrones a otros compuestos. Una vez cede un electrón, se forma un radical ascorbato, y cuando cede un segundo electrón, se forma el ácido dehidroascórbico (Padayatty, 2017). La vitamina C presenta varias características que le otorgan las propiedades antioxidantes, empezando por su potencial de reducción (282mV), el cual es muy bajo, lo que favorece a que en la mayoría de las reacciones de oxidorreducción actúe como oxidante. Otra característica es la baja reactividad del radical ascorbilo generado tras la oxidación del ascorbato, impidiendo que sucedieran eventos redox indeseados. (Barrita, 2013).

La piel contiene de forma normal grandes concentraciones de vitamina C, al igual que el resto de órganos, y numerosos estudios han demostrado que la piel dañada o envejecida contiene menos concentración de esta vitamina. Sin embargo, el rol de la vitamina C en la piel se ha visto sobre todo cuando hay deficiencia de esta, asociándose

a problemas de cicatrización debido a la poca formación de colágeno o al engrosamiento del estrato córneo. Además, la vitamina C se considera como una solución al envejecimiento de la piel, para el tratamiento de heridas y quemaduras o para reducir sequedad y la formación de arrugas (Pullar et al, 2017).

## 2. OBJETIVOS

Las hipótesis del presente trabajo son:

- El polutante 1648a es capaz de generar estrés oxidativo y desencadenar un proceso fibrótico en un modelo de piel 3D.
- La vitamina C es capaz de prevenir los efectos de los polutantes ambientales en términos de liberación de ROS y mecanismos *in vitro* implicados en la fibrosis cutánea en un modelo de piel 3D.

De esta manera, los objetivos de este trabajo se resumen en:

- Validar un modelo de piel 3D.
- Estudio del efecto de la vitamina C sobre la liberación de especies reactivas en un modelo de piel 3D estimulado con el polutante 1648a.
- Estudiar los efectos de la vitamina C sobre la remodelación celular en un proceso *in vitro* de fibrosis generado por la liberación de ROS en un modelo 3D de piel.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Crecimiento de un modelo de piel 3D**

Se colagenizaron inserts en placas de 6 pocillos y dejaron durante 2 horas. Se lavó con PBS para eliminar el exceso de colágeno. Una vez lavados, se sembraron queratinocitos primarios en la parte apical de los inserts (Ref. MCHT06H48, Millipore) a una confluencia de 500.000 células por insert (4cm<sup>2</sup>). Una vez sembrados, se añadió medio de cultivo KGM Gold (Ref. 192060, Lonza) en la parte apical y dorsal del insert y se dejó crecer en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cada dos días se renovó el medio hasta que se alcanzó una confluencia del 100%. Una vez alcanzada la confluencia, se dejó de añadir medio de cultivo en la zona apical para permitir que se formara una interfase aire-líquido que favoreciera la diferenciación de los queratinocitos en las capas de la piel, añadiendo medio de cultivo únicamente en la zona basal de los inserts durante 21 días. Una vez pasado este periodo de tiempo, se consideró que el modelo de piel 3D ya estaba formado y se procedió a realizar los distintos experimentos y protocolos correspondientes.

#### **3.2. Inmunofluorescencia para la validación de la formación del estrato córneo**

Se realizó un análisis de inmunofluorescencia para validar que se ha formado el estrato córneo en el modelo de piel 3D.

Una vez crecido los cultivos, se procedió a extraer los inserts cuidadosamente y se fijaron sobre un portaobjetos con paraformaldehído 4% durante 30 minutos. A continuación, se trató con una solución de bloqueo (PBS + 10% suero de cabra + 1% BSA) para evitar uniones inespecíficas al añadir el anticuerpo. Tras media hora, se añadió el anticuerpo primario, que en este caso fue la involucrina (Ref. I9018-100UL, Sigma) y se disolvió a 1/200 en PBS con 1% de BSA. Se dejó el anticuerpo overnight y se añadió el anticuerpo secundario luminiscente. Ya trabajando en oscuridad, se realizó una tinción DAPI y se analizó mediante microscopía confocal.

#### **3.3. Procedimiento experimental**

Una vez obtenidos los modelos de piel 3D, se dividieron las muestras entre controles, estímulos y muestras tratadas. El primer paso fue añadir diferentes concentraciones de Vitamina C en las “muestras tratadas”, por lo que se probaron cuatro distintas concentraciones del fármaco: 1000 ng/mL, 100ng/mL, 10ng/mL y 1ng/mL. Tras media hora, se añadió el factor ambiental sobre la muestra, que en este estudio será el polutante 1648a. En la Tabla 1 se observa un resumen de las distintas concentraciones utilizadas en el estudio.

Finalmente, se dejó reposar el polutante durante 16-48h para realizar los experimentos de ELISA, Western Blot y RT-PCR, y 30/60 minutos para el estudio de liberación de especies reactivas de oxígeno.



**Tabla 1. Concentraciones de los compuestos de estudio**

<b>Sustancias</b>	<b>Concentraciones</b>
Vitamina C (Ac. Ascórbico)	1-1000ng/ml*
1648a	2000ng/ml

\*Estas concentraciones fueron obtenidas a partir de referencias bibliográficas.

### **3.4. Medida de la liberación de especies reactivas de oxígeno**

Se partió de un cultivo 3D de piel ya tratado con el fármaco y los polutantes durante 30 o 60 minutos. Para ello, se utilizó la sonda CM-H<sub>2</sub>DCDA (Ref. C6827, Thermo Fisher), la cual se añadió a los inserts 1h antes de la adición del fármaco y de los polutantes, lavando posteriormente tres veces con PBS para limpiar los inserts y comenzar con la parte experimental. La sonda intercepta la generación de ROS emitiendo fluorescencia tras su detección. Se midió la fluorescencia emitida tanto en los experimentos de 30 minutos como los de 60 minutos, elaborando una curva de concentraciones de 1648a.

### **3.5. Western Blot**

La técnica del Western Blot se utilizó para la cuantificación de proteínas de los diferentes casos estudiados en el modelo 3D. Previo a la realización de esta técnica, se realizó la extracción de proteínas de las células, utilizando un choque térmico y con detergentes que permite la ruptura de la célula y la liberación de proteínas. Una vez extraída la proteína se procedió a la cuantificación de esta mediante el kit “Pierce™ BCA Protein Assay Kit” (Ref. 23225, Thermo Fisher), utilizando una curva estándar con diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) y una medida mediante espectrofotometría a 568nm. Mediante la curva estándar se realizó la interpolación de los datos numéricos obtenidos.

Una vez conocida la concentración de muestra, se procedió a la separación de las proteínas mediante un gel de poliacrilamida, realizando los cálculos oportunos para que en cada pocillo se añadieron 12µg de muestra. Además, se añadió a uno de los pocillos un marcador de peso molecular y en los pocillos vacíos se añadió LB para compensar el gel. Una vez finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia del gel a una membrana, utilizando el aparato TransTurbo™ (Bio-Rad). Posteriormente, se añadieron 8mL de una solución de 5% BSA en PBS Tween20 durante 2h para bloquear la membrana y así evitar interacciones inespecíficas. A continuación, se incubaron las membranas con los siguientes anticuerpos primarios toda la noche: cóctel ROS (Ref. ab179843, abcam), que se utilizó para la detección de tioredoxina, catalasa, SOD1 y  $\alpha$ -sma, Fibronectina (Ref. PA5-29578, Thermo Fisher), CTGF (Ref. orb10474, biorbit) y E-cadherina (Ref. 610181, BD Transduction Laboratories). Al día siguiente, se añadió el anticuerpo secundario correspondiente a la especie del que fuera el anticuerpo primario (rabbit y

mouse y poner referencias). Tras 2 horas, se procedió al revelado de las membranas. Para ello se utilizó un kit ECL Plus (Ref. RPN2232, GE Healthcare) que permitió una detección mediante quimioluminiscencia. Finalmente, se normalizó respecto a la detección de  $\beta$ -actina utilizando su anticuerpo correspondiente (Ref. A1978, Sigma-Aldrich).

### **3.6. ELISA para la detección de IL-8**

Para la medición de los niveles de IL-8 se realizó una técnica de ELISA utilizando el kit DuoSet Human CXCL/IL-8 (Ref. DY208, R&D Systems). El primer paso fue forrar una placa con un anticuerpo de captura de la IL-8 facilitado por el kit, dejándolo toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se eliminó el anticuerpo y se bloqueó con BSA 0,01% durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a cargar las muestras en la placa, elaborando previamente una recta patrón con un reactivo estándar y se dejó reposar 2h a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió 100 $\mu$ L de anticuerpo detector y se dejó de nuevo reposar 2h. El siguiente paso fue añadir 100 $\mu$ L por pocillo de estreptavidina diluida 1:40 y se incubó durante 20 minutos en oscuridad y añadir el sustrato (TMB) a cada pocillo para generar una reacción medible. Posteriormente, se incubó 20 minutos a oscuridad para permitir que ocurriese la reacción y se detuvo la reacción utilizando solución de STOP. Finalmente se midió la absorbancia a 450nm.

### **3.7. Retrotranscripción y PCR a tiempo real**

La PCR a tiempo real se utilizó para cuantificar la expresión de RNA para distintos genes en las distintas condiciones de estudio.

Se realizó una extracción de RNA mediante la técnica de trizol/cloroformo. A continuación, se cuantificó la muestra con un espectrofotómetro (NanoDrop2000). Una vez extraído el RNA, se realizó la transcripción reversa a partir de 300ng de muestra de cada condición utilizando los reactivos del kit TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EE. UU). El DNA complementario obtenido fue posteriormente amplificado mediante una PCR, amplificando con ensayos prediseñados los genes E-cadherina (Ref. Hs01023894\_m1, Applied Biosystems), CTGF (Ref. Hs00170014\_m1, Applied Biosystems), fibronectina (Ref. Hs00287359\_m1, Applied Biosystems), NOX4 (Ref. Hs01379108\_m1, Applied Biosystems), Nrf2 (Ref. Hs00975961\_g1, Applied Biosystems) y  $\alpha$ -sma (Ref. Hs05032285\_s1, Applied Biosystems). La cuantificación relativa de estos transcritos fue determinada con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  empleando  $\beta$ -actina como control interno (Ref. 4352341E, Applied Biosystems).

### **3.8. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El número de repeticiones independientes del experimento (n) es de 3, con cada condición por triplicado. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con la prueba “t de

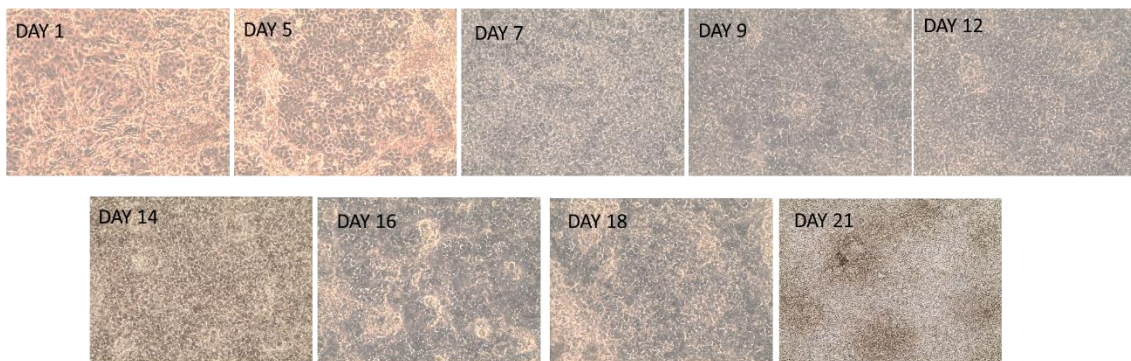
Student” mediante el software “GraphPad Prism” (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Los resultados se consideraron significativos cuando  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

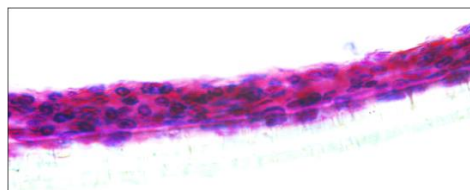
### 4.1. Crecimiento del cultivo de piel 3D y validación de la formación del estrato córneo

El primer paso para poder desarrollar todo el proceso experimental fue el de cultivar y validar un modelo de piel 3D. Para ello, una vez cultivados los queratinocitos primarios sobre los inserts y alcanzada la confluencia, se realizó un seguimiento del crecimiento de las células mediante microscopía, como se puede observar en la Figura 5A. En la Figura 5B se puede observar la tinción hematoxilina-eosina de un insert a los 21 días de desarrollo del cultivo, observando ya una estructura diferenciada.

**A**

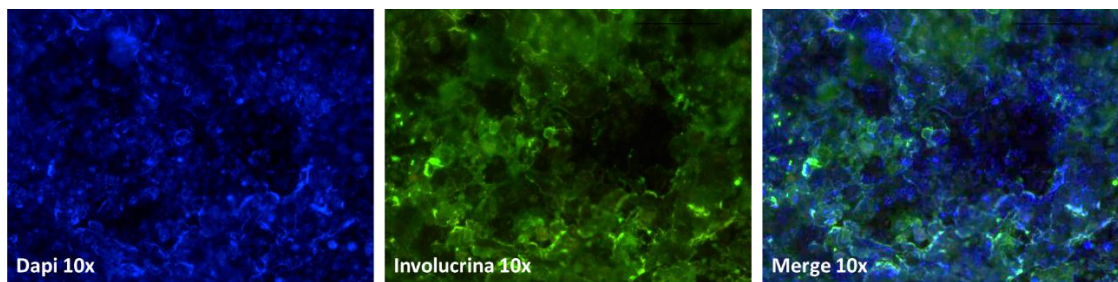


**B**



**Figura 5: Crecimiento del modelo de piel 3D.** A: Seguimiento del cultivo de piel 3D mediante microscopía de campo claro durante los 21 días de crecimiento. B: Tinción hematoxilina-eosina de un insert cultivado 21 días.

Tras el desarrollo *in vitro* del cultivo 3D, se procedió a validar si se había formado el estrato córneo mediante inmunofluorescencia como se observa en la Figura 6, donde se observa que hay expresión de la involucrina, marcador característico del estrato córneo.



**Figura 6.** IF de modelo 3D con medio de diferenciación en placas de 6 pocillos, durante 21 días de formación. Se ha teñido con un anticuerpo de involucrina, una proteína característica de estratocórneo. Fotos tomadas con un microscopio de fluorescencia.

#### **4.2. Medida de liberación de especies reactivas de oxígeno**

Se realizó un estudio comparativo entre dos tiempos de exposición con el polutante 1648a 2000µg/ml (30 y 60min) con el fin de evaluar la liberación de especies de oxígeno tras la exposición de este al modelo 3D de piel (Fig. 7). En ambos estudios se obtuvo que el polutante generaba un aumento significativo de las ROS *vs* control, aunque a 1h de exposición el polutante doblaba la producción de ROS (1500 *vs* 3000). A su vez, se administró la vitamina C al modelo 3D, donde se observó que la vitamina C no producía ningún efecto *per se*. Sin embargo, cuando se administró la vitamina C junto al polutante se observó que la vitamina C (100 y 1000ng/ml) disminuía significativamente la producción de ROS inducida por el polutante.

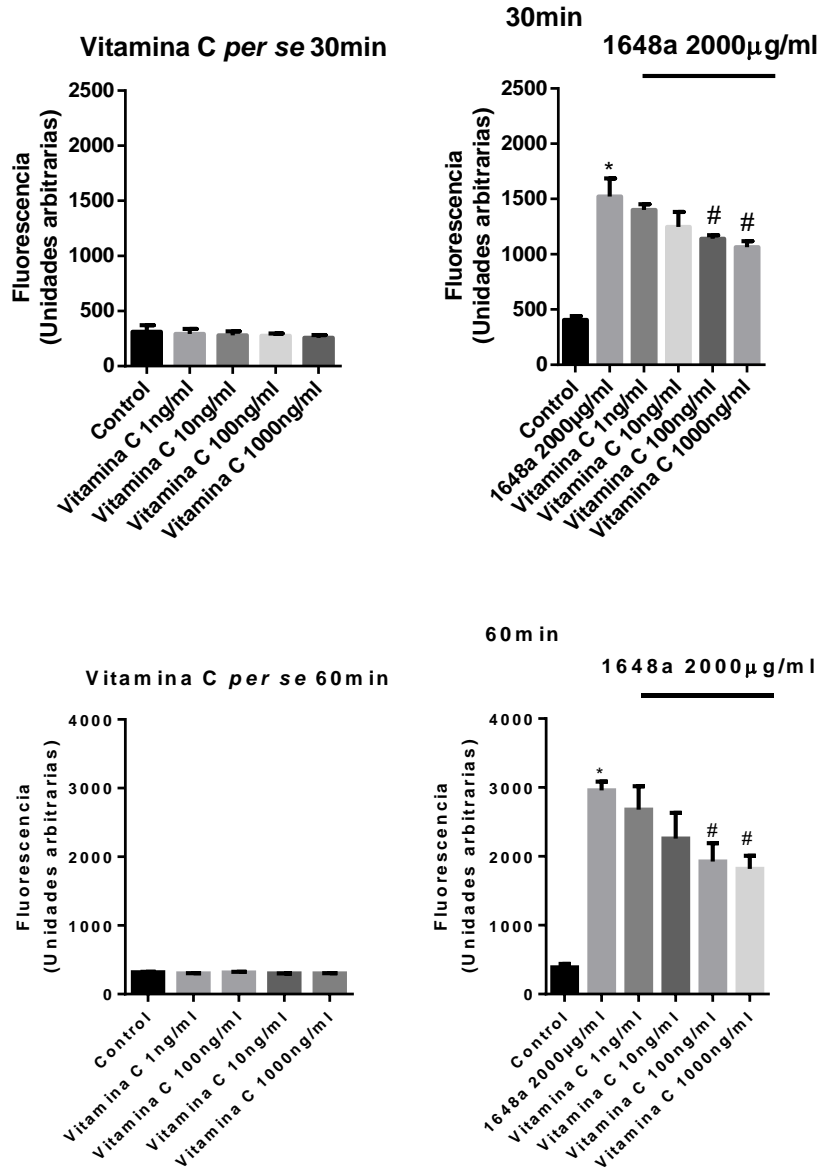
#### **4.3. Efecto de la Vitamina C sobre la liberación de IL-8**

Se realizó un estudio sobre la liberación de IL-8 inducida por el polutante 1648a (2000µg/ml) en un modelo 3D de piel (Fig. 8). Tras 16h de exposición con el polutante, se observó que se producía un aumento significativo de IL8 cuando el modelo era expuesto al polutante *vs* control. La vitamina C consiguió revertir significativamente los efectos del polutante a sus dosis 10-1000ng/ml.

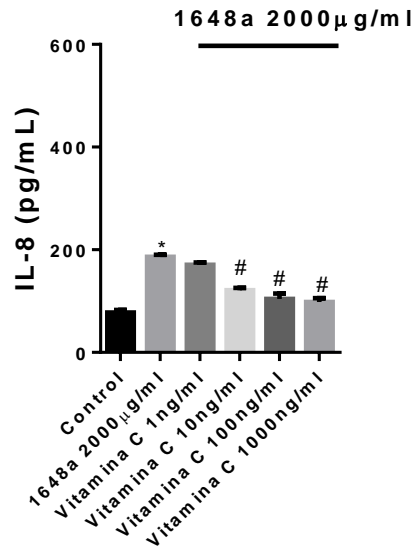
#### **4.4. Efecto de la Vitamina C sobre la expresión de proteínas**

Se realizó una técnica de western blot tras la 48h de exposición con el polutante 1648a (2000µg/ml) sobre el modelo 3D, con el fin de evaluar la expresión proteica de las proteínas antioxidantes (catalasa, SOD1 y tioredoxina), de los marcadores

mesenquimales ( $\alpha$ -SMA y fibronectina), del marcador epitelial (e-cadherina) y de un marcador fibrótico (CTGF).



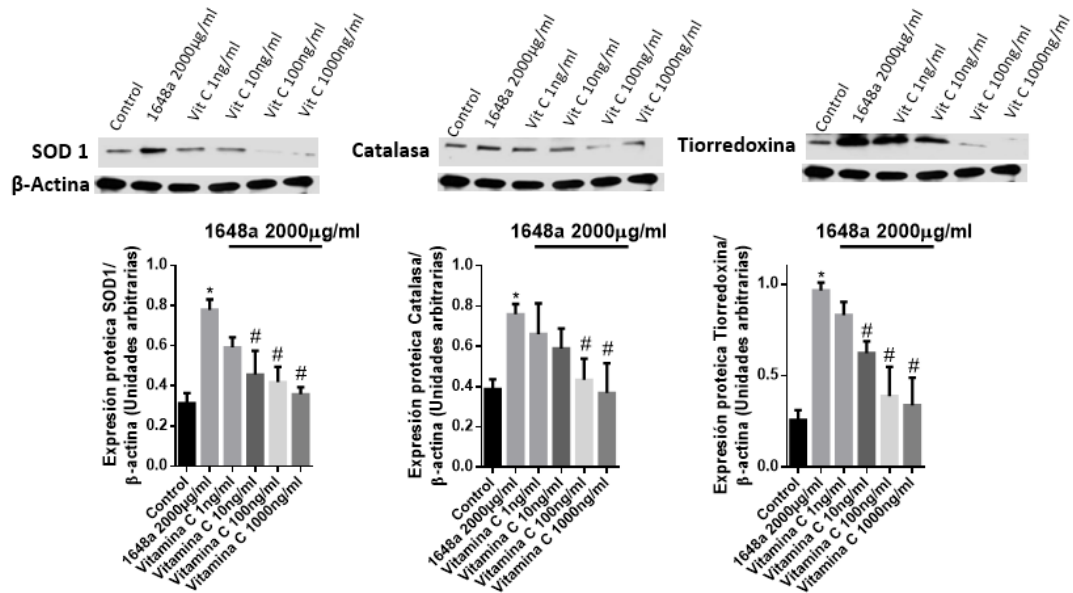
**Figura 7. Efectos de la vitamina C sobre la inducción de ROS por 1648 a en modelo 3D.** Se diferenció un modelo 3D y se realizó un estudio de las ROS liberadas tras ser estimuladas con el polutante durante 30min. Previamente, se administró una sonda CM-H2DCDA durante 1h. Se realizaron lavados y se administró la vitamina C durante 30min/60. Pasado ese tiempo se estimuló con 1648 a durante 60min. Se midió la fluorescencia.



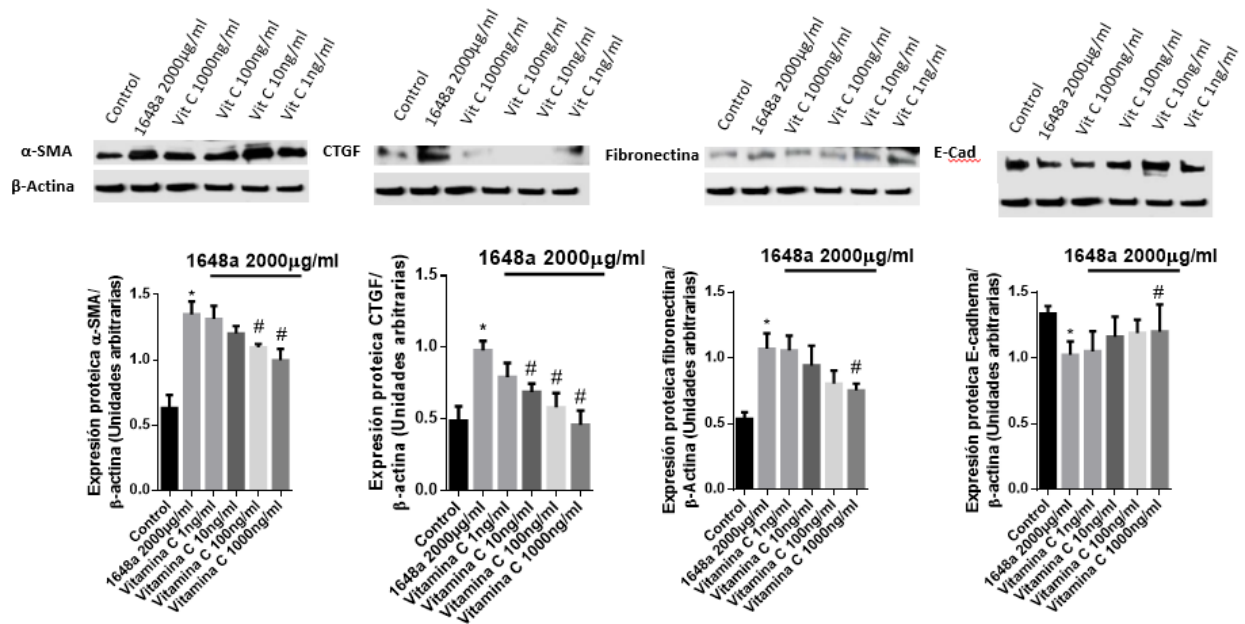
**Figura 8. Efectos de la vitamina C sobre la liberación de IL8 inducida por 1648 a en modelo 3D.** Se diferenció un modelo 3D y se realizó un estudio de las IL8 liberada tras ser estimuladas con el polutante durante 16h. Previamente, se pretrataron las células con vitamina C (1-1000ng/ml) durante 30min. Pasado ese tiempo se estimuló con 1648 a durante 16h. Finalmente, se realizó un ELISA de IL8.

Tras la exposición con el polutante se observó que las proteínas antioxidantes, SOD1, catalasa y tioredoxina, aumentaron significativamente su expresión *vs* control (Fig. 9). La expresión de SOD1 y tioredoxina disminuyó significativamente tras la adición de la vitamina C a las concentraciones de 10-1000ng/ml *vs* el polutante, mientras que, sobre la catalasa, la vitamina C consiguió disminuir significativamente su expresión a las dosis de 100 y 1000ng/ml *vs* el polutante.

En cuanto a las proteínas envueltas en el proceso TEM, se observó que, tras la exposición al polutante 1648a (2000µg/ml) los marcadores mesenquimales,  $\alpha$ -sma y fibronectina, aumentaron significativamente su expresión proteica, mientras que, el marcador epitelial, e-cadherina, disminuía significativamente su expresión *vs* control. El marcador de proceso fibrótico, CTGF, también aumentó significativamente su expresión tras la exposición con el polutante *vs* control (Fig. 10). Tras el tratamiento con la vitamina C, se observó que, los  $\alpha$ -sma (100-1000ng/ml), fibronectina (1000ng/ml) y CTGF (10-1000ng/ml) reducían significativamente su expresión al ser tratados con la vitamina C *vs* el polutante. E-cadherina aumentó significativamente su expresión tras la administración de vitamina C a 1000ng/ml.



**Figura 9. Efectos de la vitamina C sobre la expresión proteica de proteínas antioxidantes inducida por 1648a en modelo 3D.** Se diferenció un modelo 3D y se realizó un estudio de las IL8 liberada tras ser estimuladas con 1648a durante 48h. Previamente, se pretrataron las células con vitamina C (1-1000ng/ml) durante 30min. Pasado ese tiempo se estimuló con 1648 a durante 48h. Finalmente, se realizó la técnica western blot y se cuantificó con el programa Image j.



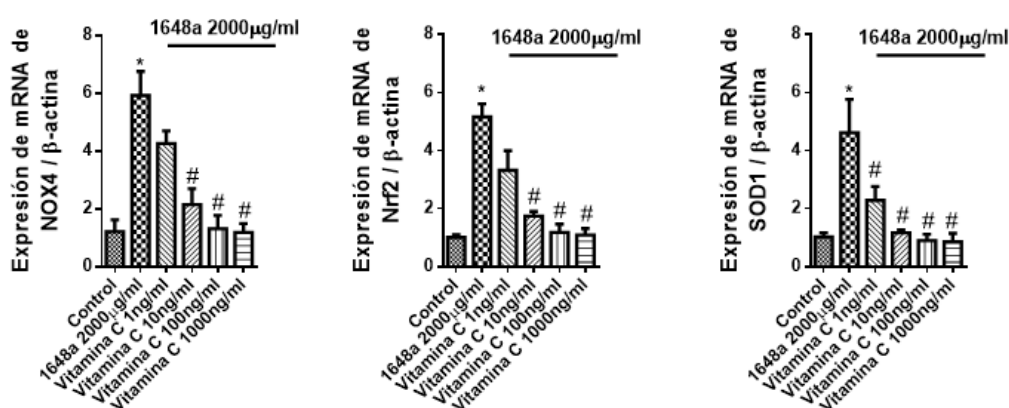
**Figura 10. Efectos de la vitamina C sobre la expresión proteica de proteínas fibróticas inducida por 1648a en modelo 3D.** Se diferenció un modelo 3D y se realizó un estudio de las IL8 liberada tras ser estimuladas con 1648a durante 48h. Previamente, se pretrataron las células con vitamina C (1-1000ng/ml) durante 30min. Pasado ese tiempo se estimuló con 1648 a durante 24h. Finalmente, se realizó la técnica western blot y se cuantificó con el programa Image j.



#### 4.5. Efecto de la Vitamina C sobre la expresión de transcritos

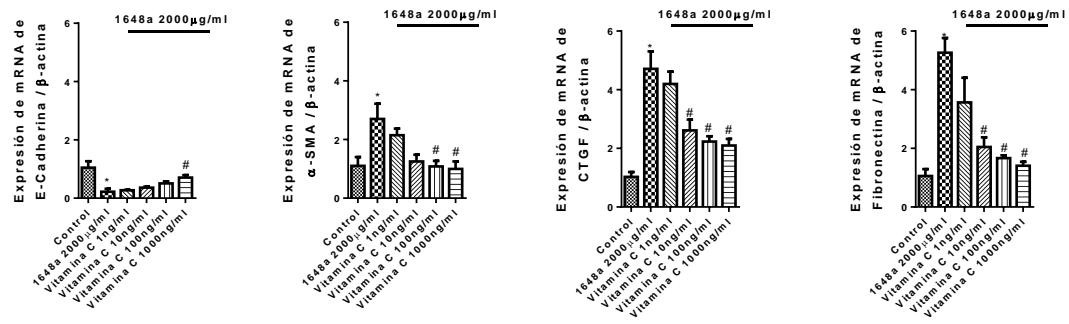
Se realizó un estudio sobre la expresión génica de los genes implicados en la respuesta redox (SOD1, Nrf2 y NOX4) y de genes implicados en el proceso fibrótico ( $\alpha$ -sma, fibronectina, e-cadherina y CTGF) tras la exposición del modelo 3D al polutante 1648a (2000 $\mu$ g/ml) durante 48h.

Tras la exposición con el polutante, se observó que SOD1, Nrf2 y NOX4 aumentaban significativamente su expresión vs control (Fig 11). Por su parte, la vitamina C redujo significativamente la expresión génica de Nrf2 y NOX4 a las concentraciones de 10-1000ng/ml, mientras que, SOD1 disminuyó significativamente su expresión tras la adición de la vitamina C con todas las concentraciones estudiadas vs el polutante.



**Figura 11. Efectos de la vitamina C sobre la expresión génica de antioxidantes inducida por 1648 a en modelo 3D.** Se diferenció un modelo 3D y se realizó un estudio de tras ser estimuladas con 1648 a durante 48h. Previamente, se pretrataron las células con vitamina C (1-1000ng/ml) durante 30min. Pasado ese tiempo se estimuló con CSE y 1648 a durante 24h. Finalmente, se realizó una RT-PCR y los resultados se cuantificaron por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Finalmente, en el estudio sobre marcadores génicos del proceso TEM y fibrosis se observó que, tras la exposición con el polutante 1648a,  $\alpha$ -sma, fibronectina y CTGF aumentaron significativamente su expresión génica vs control (Fig. 12). Por el contrario, e-cadherina se vio significativamente reducida tras la exposición con el polutante. La vitamina C disminuyó significativamente la expresión de fibronectina y CTGF a las concentraciones de 10-1000ng/ml, y la de  $\alpha$ -sma a 100-1000ng/ml. E-cadherina se vio incrementada significativamente tras el tratamiento con vitamina C a 1000ng/ml vs el polutante.



**Figura 12. Efectos de la vitamina C sobre la expresión genética de antioxidantes inducida por 1648 a en modelo 3D.** Se diferenció un modelo 3D y se realizó un estudio de tras ser estimuladas con 1648 a durante 48h. Previamente, se pretrataron las células con vitamina C (1-1000ng/ml) durante 30min. Pasado ese tiempo se estimuló con CSE y 1648 a durante 24h. Finalmente, se realizó una RT-PCR y los resultados se cuantificaron por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 5. DISCUSIÓN

El estrés oxidativo ha sido ampliamente asociado a numerosas enfermedades. La acumulación de ROS está directamente asociada con el envejecimiento de la piel y con el desarrollo de enfermedades como cáncer, enfermedades inflamatorias (Narendhirakannan & Hannah, 2013) y fibrosis (Richter & Kietzmann, 2016). Por ello, ha sido de especial interés el desarrollo de modelos de estudio en los cuales se genere estrés oxidativo para ver cómo afecta al metabolismo de las células y ver si se desarrollan enfermedades. Los estudios se han hecho con una amplia diversidad de polutantes y toxinas, como nanopartículas de molibdeno (Siddigui et al, 2015), nanopartículas de plata (Sun et al, 2017), y ozono (Cotovio et al, 2001), viendo en todos los casos como se producía un aumento de ROS. También se han hecho pruebas de cómo afecta la adición de iones líquidos a cultivos de queratinocitos 3D, viéndose también incrementados los niveles de ROS (Hwang et al, 2017). En el presente trabajo, se estudió el efecto del polutante 1648a (2000µg/mL) sobre la liberación de ROS durante 30 y 60 minutos, mediante la sonda CM-H2DCDA, donde se pudo comprobar que el polutante sí generaba significativamente la liberación de moléculas ROS en un modelo de piel 3D (Figura 7).

Como punto de partida del estrés oxidativo, está el daño que generan los polutantes en las células, provocando daños que se quieren reparar y produciendo que las células secreten citocinas y factores fibróticos, como los ROS, generándose un proceso de retroalimentación entre daño celular por el polutante, liberación de ROS, liberación de factores inflamatorios y liberación de factores fibróticos (Richter & Kietzmann, 2016). En este estudio se cuantificó la liberación de IL-8 mediante la técnica ELISA, observando aumentos de la liberación de IL-8 tras la estimulación con 1648a (Figura 8), evidenciando una liberación de citocinas pro-inflamatorias. Este resultado coincide con el observado por Gröne, 2002, dónde la producción de IL-8 aumenta en queratinocitos en respuesta de los estímulos externos como toxinas o polutantes

Existen mecanismos en la célula capaces de generar ROS en caso de estrés ante un polutante o toxina. Es el caso de la familia NADPH oxidasa (NOX), cuya función es catalizar oxígeno y transformarlo en ROS, siendo concretamente NOX4 una de las más estudiados en distintas patologías (Guo & Chen, 2015). En otros estudios en los que se ha generado estrés oxidativo mediante toxinas, se han visto incrementados la expresión de NOX4 (Sun et al, 2017). Además, la sobreexpresión de NOX4 ha sido relacionada con

los procesos fibróticos (Richter & Kietzmann, 2016). En este trabajo, NOX4 fue estudiada mediante qPCR, observándose un aumento en los niveles de NOX4 tras la estimulación con el polutante (Figura 11), evidenciando que NOX4 tiene aumentada su actividad tras la exposición a polutantes y, por lo tanto, está generando mayor cantidad de ROS que en condiciones sin estimulación.

Como principal respuesta a NOX4, se encuentra Nrf2, factor transcripcional que actúa ante el estrés oxidativo activando la transcripción de genes con función antioxidante como la catalasa con el fin de reducir ROS (Barahona, 2016). Además, se ha demostrado que en ratones deficientes de este gen se presentaban una mayor cantidad de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y que su activación mediante mecanismos genéticos o farmacológicos reduce la aparición de estas enfermedades y presenta efectos de prevención de enfermedades asociadas a estrés y de aparición de cáncer (Suzuki & Yamamoto, 2015). En este trabajo, mediante qPCR se estableció que Nrf2 también aumento sus niveles de transcripción ante el estrés oxidativo generado por el polutante, evidenciando que Nrf2 podría estar tratando de reestablecer el equilibrio redox.

De esta manera, dado un aumento de Nrf2 es lógico que se vea incrementada también la presencia de enzimas y complejos antioxidantes como son SOD-1 y la catalasa. Tanto la catalasa como SOD-1 son considerados como antioxidantes de “primera línea” que actúan rápidamente, efectivamente y conjuntamente, siendo SOD-1 el transformador de los radicales  $O_2^-$ , los cuales podrían considerarse la especie reactiva de oxígeno más tóxica, y siendo la catalasa junto al glutatión peroxidasa las que transforman el peróxido de hidrógeno generado en agua y oxígeno molecular (Ighodaro & Akinloye, 2017).

Otro mecanismo antioxidante del que disponen las células es el complejo tiorredoxina reductasa. Se ha demostrado que la tiorredoxina es de vital importancia para la supervivencia celular en cuanto a la neutralización de ROS, ya que en estudios se ha visto que al inducir estrés oxidativo en pulmones la tiorredoxina aumenta en grandes proporciones su nivel de expresión debido a la activación de Nrf2, y que su inhibición altera el balance redox y favorece el desarrollo de fibrosis (Zhu et al, 2013). En el presente trabajo se vio que, al igual que SOD-1 y catalasa, la tiorredoxina aumentó su expresión cuando se indujo estrés oxidativo por la presencia del polutante 1648a en las células de un modelo 3D de piel (Figura 9). El estudio de qPCR sobre la expresión de SOD1 también

demonstró que esta enzima aumentó significativamente su expresión génica tras la exposición al polutante 1648 (Figuras 11). Estas evidencias encontradas indican una clara respuesta antioxidante ante los ROS y que Nrf2 está promoviendo la fabricación de estos mecanismos para intentar reestablecer el equilibrio redox.

Otro punto importante en este estudio fue el de ver si este estrés oxidativo generado en las células del cultivo 3D de piel está asociado a un proceso fibrótico. Para ello, se han estudiado varios marcadores mesenquimales que se asocian con la TEM como las proteínas  $\alpha$ -sma y fibronectina, o un marcador epitelial como la e-cadherina, el cual está demostrado que se pierde durante la TEM debido a que las células mesenquimales pierden la estructura y las uniones existentes en las células epiteliales (Ranchoux et al, 2015). En el trabajo, se vieron claramente cambios en la expresión de tanto  $\alpha$ -sma, fibronectina y e-cadherina (Figuras 10 y 12), disminuyendo e-cadherina tras la adición del polutante, lo que implica que se ha perdido la estructura de las células epiteliales, y aumentando  $\alpha$ -sma y fibronectina, lo que significaría que ha ocurrido la transición epitelio-mesenquimal.

El inicio de la TEM ha sido estudiado en lesiones de piel como en la escleroderma cutánea, donde se ha visto que los queratinocitos comienzan a expresar un fenotipo de reparación de heridas, destacando la liberación de TGF- $\beta$ , factor que está bien documentado como inductor de la transición epitelio-mesenquimal en la fibrosis cutánea, siendo además el responsable de que se comiencen a expresar factores pro-fibróticos como CTGF (Nikitorowicz-Buniak et al, 2015). En un estudio con ratones transgénicos que sobreexpresaban CTGF se concluyó que CTGF juega un papel clave en la TEM y en el desarrollo de fibrosis cutánea (Sonnylal et al, 2013). En el presente trabajo, se vio claramente sobreexpresado CTGF debido a la presencia del polutante (Figuras 10 y 12) lo que demuestra más evidencias de que se ha producido la TEM y que ésta viene asociada a un proceso de fibrosis.

Este trabajo también ha tenido como objetivo ver el efecto farmacológico de un antioxidante como la vitamina C para neutralizar al daño del polutante 1648a. Las vitaminas son conocidas por sus diversas funciones, por lo que son de gran interés para el estudio de enfermedades como la fibrosis. En un estudio se testó un análogo de la vitamina D, el calcipotriol, para el tratamiento de escleroderma en ratones, donde concluyeron que el calcipotriol redujo los niveles de fibrosis cutánea (Usategui et al, 2014). Además, también se ha comprobado que la baja expresión del receptor de la

vitamina D y bajos niveles de vitamina D genera una proliferación aberrante de fibroblastos (Zerr et al, 2015). Otro estudio trató de utilizar una combinación de vitamina C y vitamina E para ver como afectaba al desarrollo de una fibrosis hepática inducida por etanol en ratas, concluyendo que la combinación de estas vitaminas reducía el desarrollo de esta enfermedad (Prathibha et al, 2013).

A lo largo del presente trabajo se ha estudiado la vitamina C como antioxidante con el fin de ver cómo afecta sobre la liberación de ROS por 1648a y sobre la expresión de proteínas asociadas a procesos fibróticos. Primero, se estudió como afectaba la vitamina C a la liberación de especies reactivas de oxígeno (Figura 7), donde se vio claramente como la vitamina C no generó ningún cambio sobre la liberación de ROS si no se estimulaba con 1648<sup>a</sup>. Se observó que se redujeron las especies reactivas de oxígeno con la adición del polutante, siendo significativa la respuesta a mayores dosis de vitamina C. Los resultados no muestran que se volviera a las condiciones control, pero si demuestran que la vitamina C tiene un efecto antioxidante relevante ante el estrés oxidativo generado por un polutante. Esto también se observó en el caso de NOX4 y Nrf2, los cuales recuperaron sus niveles de transcripción normales al añadir 10-1000ng/mL de vitamina C (Figura 11), lo que implica que se reestableció el equilibrio redox celular tras el tratamiento con vitamina C.

Los efectos de la vitamina C también fueron de gran importancia a la hora de estudiar mecanismos antioxidantes y proteínas fibróticas. Dado que la cantidad de ROS disminuye al añadir vitamina C, se observó también una reducción de expresión de proteínas antioxidantes como catalasa, tiorredoxina o SOD-1 (Figuras 9 y 11). Lo mismo se observó con las proteínas fibróticas como  $\alpha$ -sma, fibronectina o CTGF, las cuales vieron reducida su expresión y sus niveles transcripcionales al añadir vitamina C, recuperándose por otra parte los niveles de expresión del marcador epitelial e-cadherina (Figuras 10 y 12).

## 6. CONCLUSIONES

- El modelo de queratinocitos 3D establecido es válido para estudios farmacológicos.
- El polutante 1648a es capaz de generar estrés oxidativo en un modelo 3D de piel.
- El polutante 1648a es capaz de inducir la transición epitelio-mesenquimal en las células de un modelo 3D de piel, y con ello iniciar un proceso fibrótico.
- La vitamina C revierte el estrés oxidativo generado por polutantes, reestableciendo el equilibrio redox celular y evitando la desencadenación de un proceso fibrótico.

## 7. REFERENCIAS

- Barahona, S. (2016). Activar la producción de NRF2 previene las principales patologías degenerativas. *Dsalud*. Número 194-Junio 2016.
- Cotovio, J., Onno, L., Justine, P., Catroux, P. (2001). Generation of oxidative stress in human cutaneous models following in vitro ozone exposure. *Toxicol In Vitro*. 2001 Aug-Oct,15(4-5):357-62.
- Gröne, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002 Sep 6,88(1-2):1-12.
- Held, P. (2015). An introduction to Reactive Oxygen Species. Measurement of ROS in cells. BioTek Instruments. Recuperado de [https://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/ROS%20White%20Paper.pdf](https://www.biotek.com/assets/tech_resources/ROS%20White%20Paper.pdf)
- Humbert, P.G., Haftek, M., Creidi, P., Lapiere, C., Nusgens, B., Richard, A., Schmitt, D., Rougier, A., Zahouani, H. (2003). Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: Double-blind study vs. Placebo. *Exp. Dermatol*. 2003, 12, 237–244.
- Hwang, J., Park, H., Choi, D., Nam, K., & Lim, K. (2017). Investigation of dermal toxicity of ionic liquids in monolayer-cultured skin cells and 3D reconstructed human skin models. *Toxicology In Vitro*, 46, 194-202.
- Ighodaro, O., & Akinloye, O. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal Of Medicine*.
- Kammeyer, A., & Luiten, R. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*. Volume 21, May 2015, Pages 16-29
- Kolarsick, P., Kolarsick, M., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal Of The Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.
- Königsberg, M. (2007). Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de educación bioquímica (REB)* 26(1): 18-25, 2007.
- Lu, J., Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014 Jan,66:75-87.
- Lü, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. (2009) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010 Apr,14(4):840-60.
- Mancebo, S., & Wang, S. (2015). Recognizing the impact of ambient air pollution on skin health. *Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology*, 29(12), 2326-2332.
- Menon, G. (2014). Skin Basics, Structure and Function. *Lipids And Skin Health*, 9-23.



- Nakerakanti, S. (2012). The Role of TGF- $\beta$  Receptors in Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal*, 6(1), 156-162.
- Narendhirakannan, R., & Hannah, M. (2012). Oxidative Stress and Skin Cancer: An Overview. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry*, 28(2), 110-115.
- Nikitorowicz-Buniak, J., Denton, C., Abraham, D., & Stratton, R. (2015). Partially Evoked Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Is Associated with Increased TGF $\beta$  Signaling within Lesional Scleroderma Skin. *PLOS ONE*, 10(7), e0134092.
- Prathibha, P., Rejitha, S., Harikrishnan, R., Das, S., Abhilash, P., & Indira, M. (2013). Additive effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid in combating ethanol-induced hepatic fibrosis. *Redox Report*, 18(1), 36-46.
- Pullar, J.M., Carr, A.C., Vissers, M.C.M. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, 9(8), 866.
- Ranchoux, B., Antigny, F., Rucker-Martin, C., Hautefort, A., Pechoux, C., & Bogaard, H. et al. (2015). Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation*, 131(11), 1006-1018.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 May, 24(5): 981–990.
- Rockey, D., Weymouth, N., & Shi, Z. (2013). Smooth Muscle  $\alpha$  Actin (Acta2) and Myofibroblast Function during Hepatic Wound Healing. *Plos ONE*, 8(10), e77166.
- Shroff, A., Mamalis, A., & Jagdeo, J. (2014). Oxidative Stress and Skin Fibrosis. *Current Pathobiology Reports*, 2(4), 257-267.
- Sonnylal, S., Xu, S., Jones, H., Tam, A., Sreeram, V., & Ponticos, M. et al. (2013). Connective tissue growth factor causes EMT-like cell fate changes in vivo and in vitro. *Journal Of Cell Science*, 126(10), 2164-2175.
- Sun, X., Yang, Y., Shi, J., Wang, C., Yu, Z., & Zhang, H. (2017). NOX4- and Nrf2-mediated oxidative stress induced by silver nanoparticles in vascular endothelial cells. *Journal Of Applied Toxicology*, 37(12), 1428-1437.
- Suzuki, T., & Yamamoto, M. (2015). Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 88, Part B, November 2015, Pages 93-100
- Troncoso, D., Madarriaga, I., Aldana, S., Herreño, A., Chaparro, V, Molina, M., Rey, L., Ramírez, A., Montoya, C., Valderrama, A., Cañas, A., Rojas, A. (2017). Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ Med*. 2017,58(4):xx-xx.
- Usategui, A., Criado, G., Del Rey, M., Faré, R., & Pablos, J. (2014). Topical vitamin D analogue calcipotriol reduces skin fibrosis in experimental scleroderma. *Archives Of Dermatological Research*, 306(8), 757-761.
- Wilkin, D., Brainard, J. (2015). *Human Biology*. Recuperado de <https://textbookequity.org/Textbooks/HumanBiologyCK12.pdf>

Wu, Q., Yao, B., Li, N., Ma, L., Deng, Y., & Yang, Y. et al. (2017). Nrf2 mediates redox adaptation in NOX4-overexpressed non-small cell lung cancer cells. *Experimental Cell Research*, 352(2), 245-254.

Wynn, T. & Ramalingam, T. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, 18(7), 1028-1040.

Zhu, X., Zhong, J., Zhao, Z., Sheng, J., Wang, J., & Liu, J. et al. (2015). Epithelial derived CTGF promotes breast tumor progression via inducing EMT and collagen I fibers deposition. *Oncotarget*, 6(28).