

# En Profundidad

## Proyecto MELVES: uso terapéutico de la melatonina frente a la toxicidad por vesicantes

**Autores:** Alejandro Romero Martínez, Juan José Torrado Durán, Universidad Complutense de Madrid; Antonio Juberías Sánchez, Centro Militar de Farmacia de la Defensa; René Pita Pita, Escuela de Guerra del Ejército de Tierra.

**Palabras clave:** melatonina, armas químicas, agentes vesicantes, ivermectina, mostazas azufradas, mostazas nitrogenadas

Líneas Tecnológicas ETID relacionadas: 10.2.6.

### Introducción

Los agentes vesicantes de guerra son un grupo de armas químicas que se

caracterizan por producir lesiones en piel y mucosas que provocan la pérdida de capacidad operativa del combatiente. Actualmente la descontaminación inmediata y completa tras la exposición a agentes vesicantes es muy difícil de conseguir y no se disponen de antídotos ni tratamientos completamente efectivos frente a este tipo de intoxicaciones.

La melatonina ha emergido como un excelente agente antioxidante de amplio espectro, cuyas características se ven reflejadas por su ubicuidad en el organismo, su versatilidad para atravesar fácilmente todas las barreras morfofisiológicas y dotada además de muy baja toxicidad. Las importantes vías de señalización celular en las que esta molécula actúa como reguladora, la eleva a una categoría de moduladora pleiotrópica implicada en la protección y supervivencia celular, con capacidad de hacer frente al daño causado por los agentes vesicantes.

En este contexto, la importancia fisiológica de la melatonina excede al control del ciclo de sueño/vigilia tradicionalmente atribuido a esta molécula a nivel de la glándula pineal y puede suponer una interesante medida de apoyo sanitario frente a las lesiones causadas por agentes vesicantes.

El objetivo del proyecto MELVES (Melatonina-Vesicantes) es avanzar en el conocimiento de la melatonina como opción terapéutica para formar parte del arsenal de medidas de apoyo sanitario, incluido el tratamiento y la profilaxis frente a intoxicaciones producidas por agentes vesicantes. Este proyecto está financiado por la DGAM / SDG PLATIN y forma parte del programa SYP41804 "Contramiedidas médicas" con la Universidad Complutense de Madrid. El abordaje de MELVES se hace a través de dos importantes consideraciones: (i) determinar la dosis de melatonina

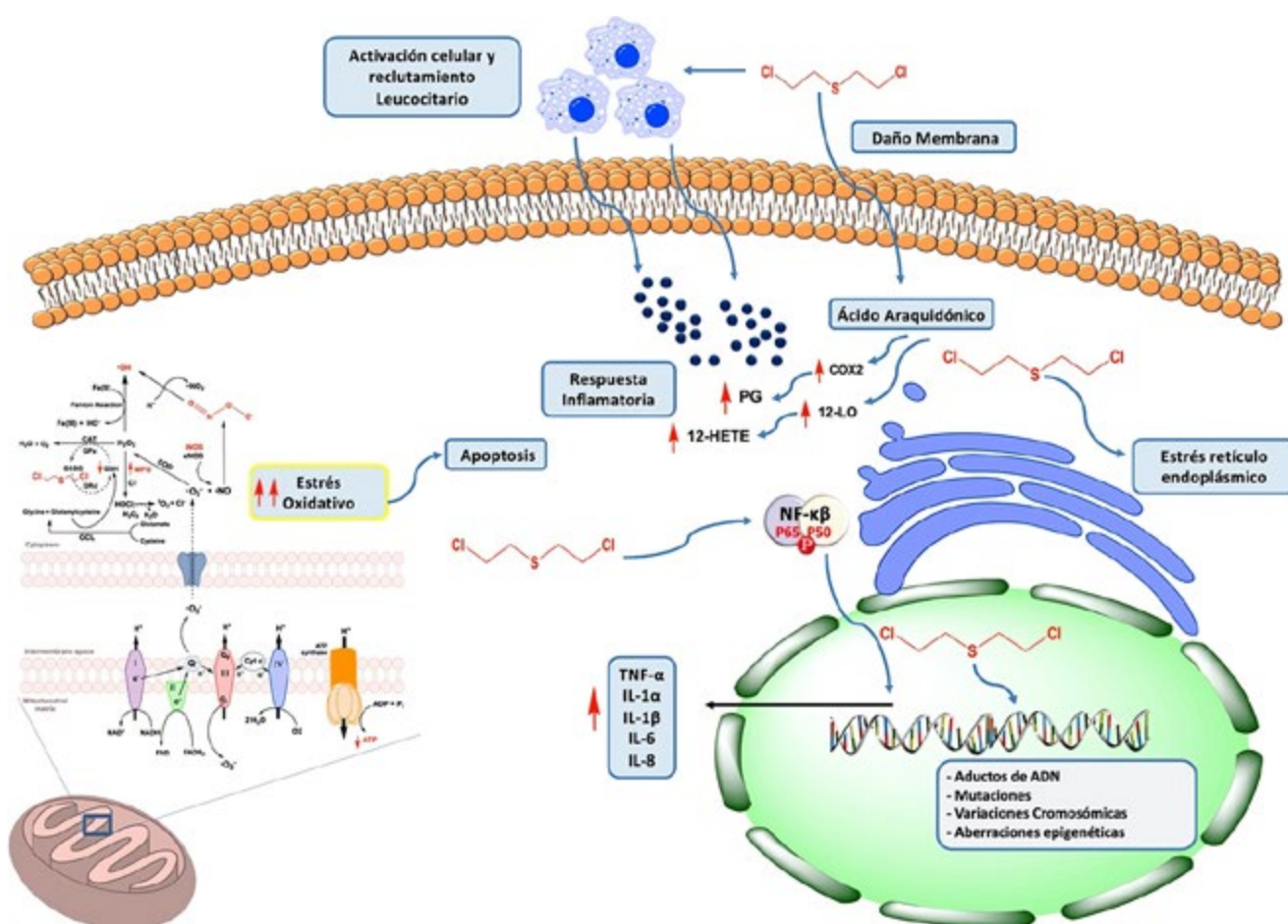


Figura 1. Mecanismos de acción de la ivermectina. (Fuente: propia).

requerida, evaluando su funcionalidad en ensayos celulares frente a agentes vesicantes y (ii) desarrollar nuevas formas farmacéuticas que permitan modificar sus características farmacocinéticas para su uso vía oral, tópica o inyectable frente a las lesiones causadas por agentes vesicantes.

**Los agentes vesicantes de guerra**

El nacimiento de la guerra química moderna se produjo durante la Primera Guerra Mundial cuando sustancias químicas que se utilizaban de forma habitual en la industria química, como el cloro o el fosgeno, fueron empleadas con fines tácticos. Los buenos resultados de estos ataques llevaron a que, tanto los alemanes como los países aliados, estableciesen programas de investigación y desarrollo de sustancias químicas cuyas propiedades físico-químicas y toxicológicas fuesen las más adecuadas para utilizar en combate. De esta manera surgieron los agentes vesicantes de guerra, denominados así por las llamativas lesiones que producen y que recuerdan a las quemaduras térmicas.

Los agentes vesicantes más importantes, por haber sido empleados en conflictos bélicos y por haber sido almacenados en cantidades importantes por países con programas de armamento químico, son las mostazas de azufre, especialmente la iperita, conocida coloquialmente como iperita o gas mostaza. Se empleó por primera vez en la tercera batalla de Ypres –de ahí su nombre–, la noche del 12 al 13 de julio de 1917. Tras la Primera Guerra Mundial, la iperita fue ampliamente utilizada en la Guerra Iraq-Irán en los años ochenta. Las mostazas nitrogenadas fueron desarrolladas como arma durante la Segunda Guerra Mundial, aunque actualmente se emplean en el tratamiento del cáncer.

A pesar de la entrada en vigor en 1997 de la Convención para la Prohibición de Armas Químicas, este tipo de armamento ha sido recientemente empleado en la guerra civil en Siria. Es más, distintas investigaciones de la Organización para la Prohibición de Armas Químicas en ese país han concluido que el DAESH utilizó iperita en varias ocasiones (1). Por lo tanto, a pesar de haber pasado más de cien años después de su primer

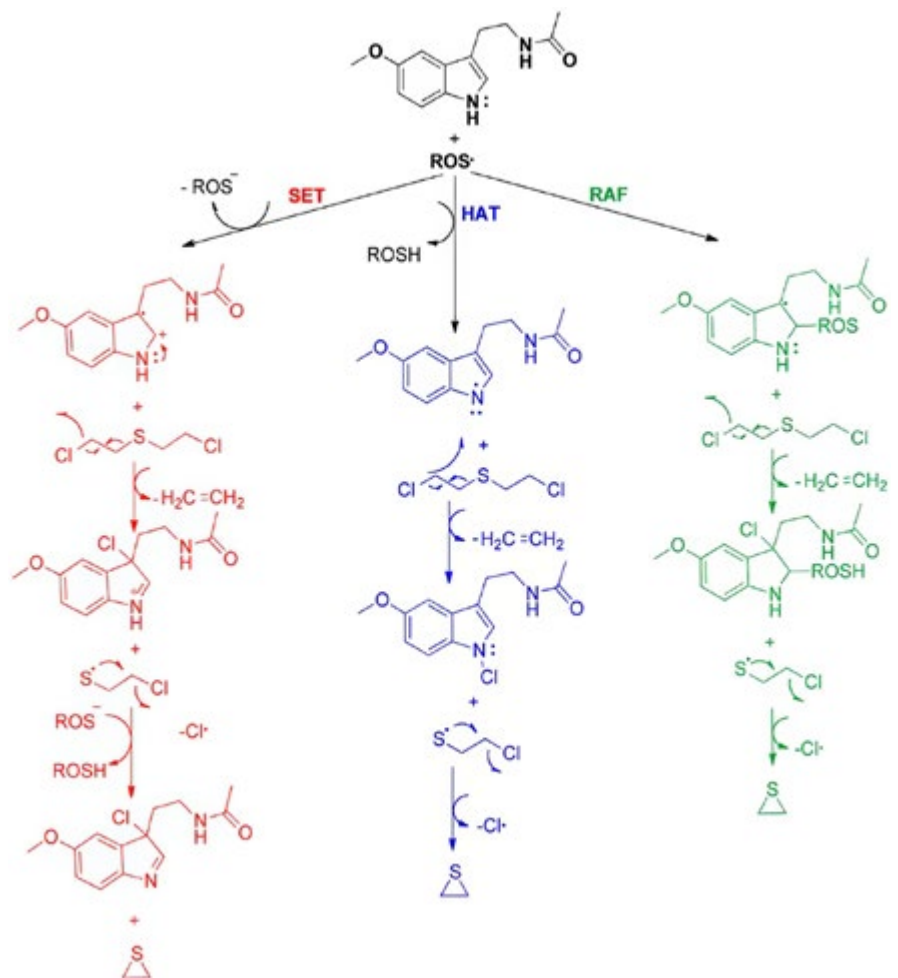


Figura 2. Tres mecanismos alternativos mediados por radicales libres a partir de los cuales la melatonina puede neutralizar la iperita. (Fuente: propia).

empleo como arma, los agentes vesicantes siguen siendo una amenaza actual.

**Efectos de los agentes vesicantes**

La información sobre los efectos clínicos de los agentes vesicantes proviene fundamentalmente de la experiencia obtenida del empleo de iperita en la Primera Guerra Mundial y en la Guerra Irán-Irak. Tras la exposición a la iperita se observa un periodo de latencia asintomático hasta que aparecen los primeros síntomas y signos de la intoxicación en piel y mucosas (2,3). Las zonas más sensibles del cuerpo son aquellas de menor espesor y mayor humedad, de ahí que las partes más afectadas sean el tracto respiratorio, ojos y, en la piel, axila, cuello, pliegue del codo, ingle, genitales y perineo. La iperita se absorbe a través de la piel, ojos, por inhalación e, incluso, a través del tracto gastrointestinal si es ingerida. Tanto en forma líquida como en forma de vapor, su

elevado carácter lipofílico hace que la piel sea una buena vía de absorción, por lo que se pueden producir efectos sistémicos que afectan sobre todo a la médula ósea, tracto gastrointestinal y sistema nervioso central.

La muerte en las primeras 24 horas tras la exposición a iperita suele deberse a la insuficiencia respiratoria aguda, consecuencia de la obstrucción del tracto respiratorio por pseudomembranas. La muerte a partir del tercer día suele ser consecuencia de una neumonía bacteriana favorecida por la depresión de la médula ósea directa inducida por la acción sistémica de la iperita.

**Mecanismos de acción de los agentes vesicantes**

Aunque la iperita se utilizó por primera vez en 1917, todavía no se conoce bien su mecanismo de acción, si bien hay distintas hipótesis. Las mostazas de azufre o de nitrógeno sufren una reacción de ciclación intramolecular

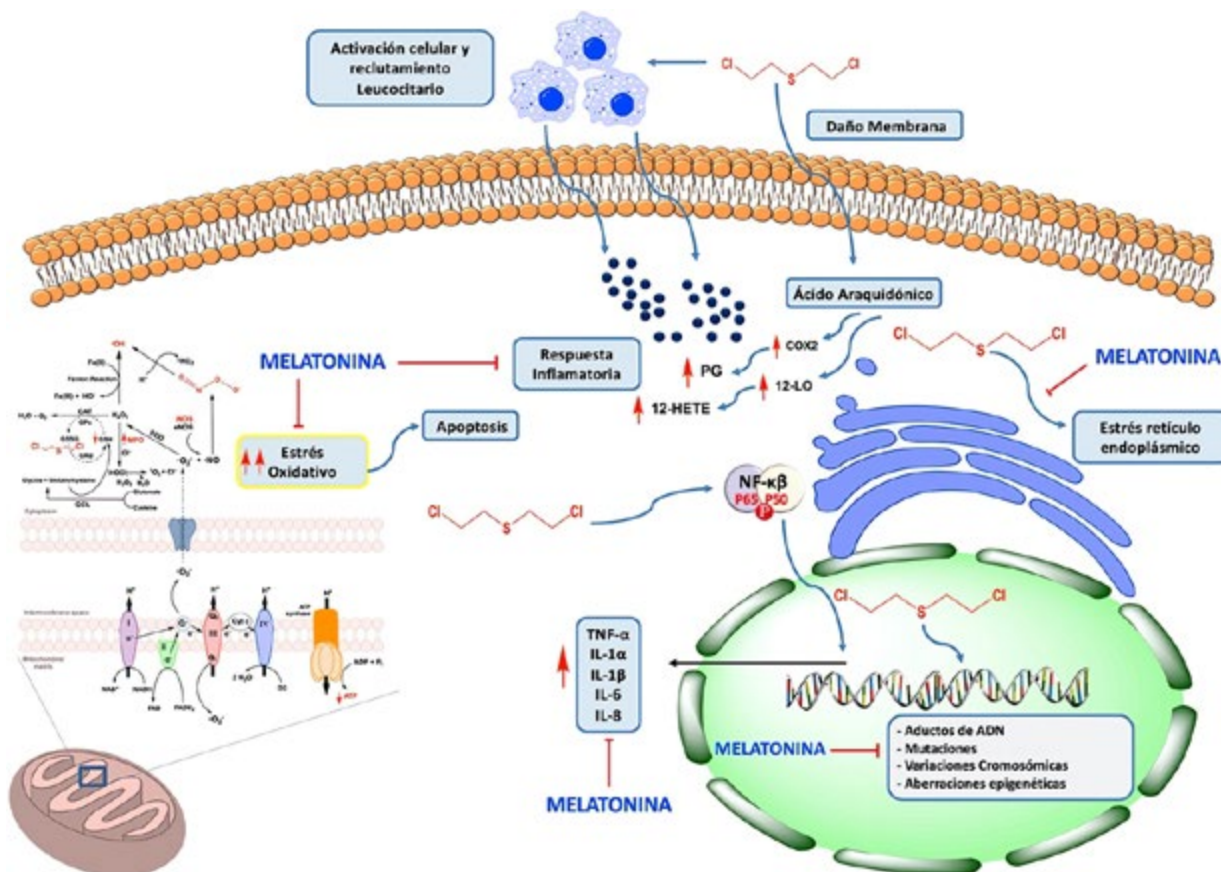


Figura 3. Mecanismos de acción de la melatonina a nivel celular. (Fuente: propia).

dando lugar a iones sulfonio o imonio, respectivamente (2,3). Esta reacción intramolecular se ha visto que está favorecida por la presencia de agua y por un aumento de la temperatura, de ahí que las zonas más húmedas del cuerpo sean las más susceptibles.

Los iones sulfonio e imonio son potentes agentes alquilantes del ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), glutatión y proteínas, entre otros (figura 1). La alquilación del ADN da lugar a entrecruzamientos y ruptura de las cadenas, activándose polimerasas como la poli(difosfato de adenosina[ADP]-ribosa) polimerasa (PARP), que produce una depleción de su sustrato, el dinucleótido de nicotinamida y de adenina (NAD<sup>+</sup>), y una inhibición de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP), provocando la muerte de la célula.

Los iones sulfonio e imonio también alquilan moléculas nucleofílicas como enzimas que contienen grupos sulfidrilo y que están encargadas de regular la homeostasis del calcio en la célula. Esto provoca un aumento en la concentración intracelular de calcio, alterando microtúbulos responsables de

la integridad de la célula y activando endonucleasas, proteasas y fosfolipasas, que finalmente causan apoptosis.

Además, las mostazas interactúan con el glutatión, aumentando los radicales libres que, por peroxidación de lípidos de membrana, alteran la integridad y funcionamiento de la membrana celular, y se produce estrés oxidativo a través de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Las mostazas estimulan también la producción de citocinas, induciendo reacciones inmunológicas y lesiones tisulares.

### Mecanismos de acción de la melatonina

La capacidad de eliminación de especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno de la melatonina neutralizaría la toxicidad inducida por vesicantes (4-7). En este contexto, la melatonina podría tener tres mecanismos para lograr esta acción (figura 2): (1) a través de la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT); (2) por la transferencia de electrones simples (SET); y (3) mediante la formación de aductos radicales (RAF). Estos mecanismos son alternativos y poseen

derivados intermedios reactivos de melatonina que neutralizan el azufre, obteniéndose un compuesto orgánico y volátil, tiorano, mucho menos tóxico que la iperita.

En la figura 3 se detallan los posibles mecanismos de acción de la melatonina para contrarrestar los efectos que produce la alquilación de biomoléculas por parte de la iperita.

El desequilibrio redox y las reacciones inmunes graves son eventos importantes involucrados en la patogénesis de la toxicidad de vesicantes. Durante la respuesta inmune inicial de los mastocitos, se produce una secreción de metaloproteína 9 (MMP-9), prostaglandinas, ciclooxigenasa (COX) y posterior infiltración de leucocitos, que contribuye a la vesicación. En este contexto, la capacidad de la melatonina para modular el eje inmune-inflamatorio podría mitigar las características patológicas inducidas por vesicantes.

Se ha evidenciado que la melatonina es capaz de reducir el estrés oxidativo, la inflamación y la toxicidad renal inducida por la mostaza



nitrogenada mecloretamina, así como de contrarrestar la producción de diferentes citocinas tales como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  y reducir marcadores de estrés oxidativo tras la exposición a iperita. Finalmente, la melatonina podría atrapar el catión sulfonio evitando la formación de aductos sobre el ADN.

Los detalles precisos de la fisiopatología celular tras la exposición a vesicantes todavía están a la espera de elucidarse a nivel molecular. En este contexto, cabe señalar la evidencia en el tejido pulmonar de individuos expuestos a iperita de más de 50 genes relacionados con el estrés oxidativo y con su expresión alterada, lo cual ha reforzado la suposición de la epigenotoxicidad en la patogenicidad respiratoria. Por esta razón, la búsqueda de una estrategia de intervención efectiva frente a los efectos secundarios de vesicantes se ha centrado en varios antioxidantes conocidos.

La melatonina tiene acceso a la edición epigenética y a la reprogramación de la expresión génica y, por lo tanto, al logro de adaptaciones altamente dinámicas que evitan la aparición de enfermedades a largo plazo. En este sentido, la participación epigenética cada vez más respaldada en los estudios de melatonina confiere una plausibilidad absoluta de que los regímenes de administración adecuados pueden prevenir la patología que los vesicantes establecen a lo largo de los años y que se sospecha que tiene un origen parcialmente epigenético. Sin embargo, la participación de la melatonina en la remediación de las perturbaciones epigenéticas producidas por los agentes vesicantes apenas se ha investigado y, por lo tanto, su aplicabilidad terapéutica en la actualidad es simplemente hipotética. Esto supone que el potencial epigenético de la melatonina para contrarrestar el efecto adverso de estos vesicantes precisa de investigación adicional.

### Conclusiones

Actualmente, el tratamiento de las intoxicaciones por agentes vesicantes de guerra está limitado por la falta de antidotos. En este complejo escenario, la melatonina se presenta como una molécula multipotente de amplio

espectro y con unos mecanismos de acción con capacidad potencial para mejorar y complementar las estrategias de tratamiento actualmente disponibles.

El proyecto MELVES realizará un estudio funcional de la melatonina como opción terapéutica frente a los agentes vesicantes, así como un posterior desarrollo y producción de formas farmacéuticas para su uso oral, inyectable o tópico, con el siguiente alcance:

- Estudio de la influencia de la molécula melatonina en la recuperación de daños celulares.
- Evaluación de la capacidad de la melatonina para mitigar, reducir y revertir la toxicidad de una mostaza nitrogenada sobre cultivos celulares.
- Evaluación y cálculo de una dosis adecuada que permita contrarrestar los daños generados por agentes vesicantes.
- Establecimiento de un modelo para la determinación de dosis efectivas.
- Diseño de forma(s) farmacéutica(s) fácilmente aceptable(s) por la población. Se considera como opciones iniciales comprimidos para administración oral, inyectables y una forma de uso tópico.
- Entrega y obtención de lotes piloto de la forma farmacéutica elegida, emitiendo el correspondiente certificado de análisis que determine la satisfacción de las especificaciones de la forma farmacéutica y medicamento.
- Diseño y desarrollo del escalado para producción industrial de formas farmacéuticas con definición de proceso, materiales y equipos necesarios, incluida la definición de lote.
- Escalado industrial de la producción de formas farmacéuticas (lotes teóricos).

En su conjunto, el proyecto MELVES supondrá un importante respaldo para aclarar el mapa de acciones desplegadas por la melatonina, y brindará nuevas oportunidades para el abordaje de la toxicidad de los agentes vesicantes, basadas en la administración de melatonina a través

del diseño de nuevas formas farmacéuticas.

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la DGAM / SDG PLATIN del Ministerio de Defensa la financiación del proyecto MELVES (expediente núm. 1003220008500, programa SYP41804 "Contra medidas médicas").

### Referencias

Pita, R., Anadón, A., Romero, A., Kuca, K. (2020). *Chemical weapons of mass destruction and terrorism: a threat analysis*. En: *Handbook of toxicology of chemical warfare agents (third edition)*, Gupta, R.C. (ed.), Londres: Academic Press, pp. 79-94.

Pita, R., Vidal-Asensi S. (2010). Toxicología cutánea y sistémica de los agentes vesicantes de guerra. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 101: 7-18.

Balali-Mood, M., Mathews, R., Pita, R., Rice, P., Romano, J., Thiermann, H., Willems, J. (2019). *Practical guide for medical management of chemical warfare casualties*, La Haya: Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons.

Romero, A., Gil Martín, E., de los Ríos, C., Egea, J., Ramos, E., López-Muñoz, F., Pita, R., Juberas, A. (2020). *Impact of melatonin effects on toxicology of vesicant chemical warfare agents: when science meets reality*. *Melatonin Research* 3: 101-119.

Pita, R., Ramos, E., Marco-Contelles, J.L., Romero, A. (2016). *Melatonin as a novel therapeutic agent against chemical warfare agents*. En: *Melatonin, neuroprotective agents and antidepressant therapy*, López-Muñoz, F., Srinivasan, V., de Beradis, D., Álamo, C., Kato, T.A. (eds.), Berlín: Springer, pp. 177-191.

Pita, R., Marco-Contelles, J., Ramos, E., del Pino, J., Romero, A. (2014). *Melatonin as potential candidate to prevent the toxicity induced by chemical warfare agents*. *Archives of Toxicology* 88: 3-4.

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*. *Chemico-Biological Interactions* 206: 134-142.