



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Efecto paradójico radiosensibilizante del ácido carnósico en células de melanoma metastásico B16F10: una nueva estrategia terapéutica.

**D.<sup>a</sup> Marina Andreu Gálvez**

**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Efecto paradójico radiosensibilizante del ácido carnósico en células de melanoma metastásico B16F10: una nueva estrategia terapéutica.

Autor: D.<sup>a</sup> Marina Andreu Gálvez

Director/es: D. Miguel Alcaraz Baños

D.<sup>a</sup> Amparo Olivares Rueda





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Marina Andreu Gálvez

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias de la salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Efecto paradójico radiosensibilizante del ácido carnósico en células de melanoma metastásico B16F10: una nueva estrategia terapéutica.

y dirigida por,

D./Dña. Miguel Alcaraz Baños

D./Dña. Amparo Olivares Rueda

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 28 de junio de 2023

Fdo.:

Marina Andreu Gálvez

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D. Miguel Alcaraz Baños, Profesor Titular de Universidad del Área de Radiología y Medicina Física en el Departamento de Dermatología, Estomatología y Radiología y Medicina Física , AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Efecto paradójico radiosensibilizante del ácido carnósico en células de melanoma metastásico B16F10: la posibilidad de una nueva estrategia terapéutica", realizada por D<sup>a</sup>. Marina Andreu Gálvez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 05 de Mayo de 2023

Firmado digitalmente por Miguel Alcaraz Baños, Profesor Titular de Radiología y Medicina Física. Universidad de Murcia.

**Mod:T-20**



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D<sup>a</sup>. AMPARO OLIVARES RUEDA, Doctora de Universidad del Área de RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA en el Departamento de DERMATOLOGIA, ESTOMATOLOGIA, RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Efecto paradójico radiosensibilizante del ácido carnósico en células de melanoma metastásico B16F10: una nueva estrategia terapéutica.", realizada por D. Marina Andreu Gálvez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de JUNIO de 2023

Firmante: AMPARO OLIVARES RUEDA; Fecha hora: 28/06/2023 08:32:53; Emisor del certificado: CN=AC FNMT Usuarios, OU=Cens.OU=FNMT-FCM-ES;



Código seguro de verificación: RUXFMkvs-5oIHLbWV-dRtiD21L-jnpfk5/V

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>





## *Agradecimientos.*

A mis directores de tesis, el doctor don Miguel Alcaraz baños y la doctora doña Amparo Olivares Rueda, por la dedicación y el apoyo brindados, por proporcionarme orientación continua y ánimo para conseguir culminar este proyecto y superar las adversidades en el camino, incluyendo la pandemia que paralizó el mundo.

Al doctor Manuel Canteras Jordana, catedrático de bioestadística de la Universidad de Murcia, por prestar su conocimiento para ayudar a la elaboración del análisis estadístico de esta tesis.

Al departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física de la Universidad de Murcia y al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) por la colaboración tanto técnica como instrumental, por proporcionar sus instalaciones y por la dedicación de todos los profesionales que han colaborado en cada una de las etapas de este trabajo.

Gracias a mis padres, por confiar en mí y enseñarme que no importa las veces que uno caiga sino las veces que uno se levante.

Gracias a José Manuel, por estar ahí, por caminar juntos en esta experiencia, por compartir consejos y opiniones, por el apoyo y la confianza desde el principio hasta al final.

**A mi compañero de viaje, José Manuel,**

*por ser paz cuando todo es caos.*

*“Ahogar la locura es como intentar tapar y ocultar con un dedo el sol”. (MDO).*

# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1. La radiación ionizante.....	4
	1.2. Revisión de la literatura.....	6
	1.3. Melanoma.....	27
II.	OBJETIVOS.....	35
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
	3.1. Material.....	41
	3.1.1. Muestras de sangre.....	41
	3.1.2. Animales de experimentación.....	41
	3.1.3. Líneas celulares.....	42
	3.1.4. Equipos utilizados.....	44
	3.2. Método.....	55
	3.2.1. Actividad genoprotectora.....	55
	3.2.2. Estudios de citotoxicidad.....	71
IV.	RESULTADOS.....	91
	4.1. Resultados de efecto genotóxico mediante ensayo de micronúcleos.....	93
	4.2. Resultados del ensayo de citotoxicidad.....	99
	4.3. Resultados de supervivencia celular mediante ensayo clonogénico.....	111
	4.4. Resultados del ensayo de apoptosis con Anexina V.....	115
	4.5. Resultados de supervivencia celular mediante ensayo del glutatión.....	117

V.	DISCUSIÓN.....	125
VI.	CONCLUSIONES.....	141
VII.	RESUMEN.....	145
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	149
IX.	ANEXOS.....	181

# **I. INTRODUCCIÓN.**



# **I. Introducción.**

Desde el descubrimiento de la radiación ionizante en 1895 por Wilhelm Conrad Röntgen se han encontrado numerosas aplicaciones y utilidades en su utilización dentro del ámbito de la medicina. Su papel en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de múltiples patologías es fundamental y ha brindado una mejora sustancial en el abordaje de múltiples patologías y en la mejora del pronóstico de pacientes con distintos tipos de patología benigna o neoplásica. En los últimos años la radioterapia se ha convertido en uno de los pilares fundamentales en el tratamiento de diversas enfermedades, fundamentalmente oncológicas. No obstante, como cualquier intervención médica, su empleo no queda exenta de riesgos y sus consecuencias a largo plazo continúan siendo objeto de estudio.

Tradicionalmente los avances en el mundo de la radiobiología se han basado en la teoría del objetivo “diana”, en la que se asume que todos los efectos biológicos en las células irradiadas son resultado del daño directo de la radiación ionizante sobre el ADN (mecanismo de acción directo) o por la inducción de radicales libres generados por la radiólisis del agua u otros componentes celulares (mecanismo de acción indirecto). Los primeros estudios radiobiológicos describieron que los principales mecanismos de acción de las radiaciones ionizantes estaban relacionados con el daño al ADN [1]. Sin embargo, esta consideración ha sido cuestionada como única teoría del daño celular radioinducido por numerosas observaciones, produciéndose un crecimiento exponencial de los estudios que abogan por la existencia de mecanismos de daño celular en áreas tanto adyacentes como alejadas del lugar de exposición directa a la radiación y que pueden dar lugar a la misma respuesta que presentan las células irradiadas directamente [2–5]. Posteriormente, se ha descrito que las células cancerosas sometidas a radiación ionizante pueden liberar señales capaces de cambiar el microambiente tumoral y de influir en aquellas células que no han sido objeto de una radiación directa [6].

Ya en 1905 se empezó a contemplar la posibilidad de que se produjeran efectos biológicos de la radiación ionizante en tejidos que no habían sido expuestos directamente a la misma. Sólo a finales del siglo XX se comenzó a investigar sobre este fenómeno al que se denominó “efecto bystander” o efecto espectador inducido por la radiación (RIBE, de las



siglas en inglés de Radiation Induced Bystander Effect) [7,8]. La incorporación de nuevos métodos de investigación ha hecho que se vaya incrementando la información sobre los posibles mecanismos que subyacen en la producción del RIBE; sin embargo, todavía quedan muchas preguntas por resolver. El daño celular producido por el efecto bystander se produce tanto a nivel morfológico y estructural como a nivel del material genético [7]. Hoy día se conocen diversos factores que influyen en el daño celular producido a distancia como los producidos por el sistema inmunológico, el estrés oxidativo, los trastornos citogenéticos, variaciones en la expresión génica, efecto rescate y efecto abscopal, entre otros.

A pesar de los datos recopilados hasta la actualidad quedan todavía muchos interrogantes para poder determinar la relevancia de este efecto RIBE en el incremento del riesgo para la salud. Sin embargo, algunos autores han descrito que las actuales hipótesis así como los mecanismos subyacentes que se conocen hasta el momento podrían llegar a poner en jaque el paradigma actual que rige la actuación médica en el ámbito de la radioterapia así como en la protección radiológica de pacientes y personal profesionalmente expuesto a radiación ionizante [9].

## **1.1. La radiación ionizante.**

La radiación ionizante (RI) ha supuesto una herramienta de suma utilidad con un amplio abanico de aplicaciones que ha ido en aumento en las últimas décadas. En el ámbito de la medicina, la RI es utilizada tanto en el ámbito de la investigación como en el ámbito del diagnóstico por la imagen y en la radioterapia, constituyendo ésta última una opción de tratamiento primario y adyuvante en una gran variedad de patología tumoral, que mejora en muchos casos las expectativas vitales de los pacientes. Sin embargo, no está exenta de riesgos. A lo largo de los años se han descrito estudios que parecen apuntar a una relación entre la exposición a RI por tratamiento radioterápico y el aumento de la incidencia de cánceres secundarios posiblemente radioinducidos. La radioterapia aprovecha los efectos lesivos de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS) para dañar las células tumorales e inducir su muerte, consiguiendo la reducción de la masa tumoral y, en ocasiones, la curación de la enfermedad. Tradicionalmente la investigación se ha centrado en la interacción de la radiación con el agua, que es el principal constituyente de los seres vivos,

y con el ADN nuclear, que contiene la información genética. Esto condujo a la llamada “teoría diana”, según la cual las células tienen que ser alcanzadas por las partículas ionizantes para provocar una respuesta biológica importante, incluida la muerte celular [10].

La RI desarrolla efectos en el sujeto irradiado tanto a nivel local como a distancia. Son bien conocidos los efectos biológicos de la RI a nivel local: destrucción celular directa de las células diana, alteraciones de la molécula de ADN, cambios en la expresión génica, alteración de los procesos mitocondriales, detención del ciclo celular, muerte celular apoptótica, liberación de factores de inflamación local, alteración del endotelio vascular, alteración de barreras, etc. La capacidad de la RI para dañar el ADN induciendo una amplia gama de lesiones es probablemente una de sus características más importantes que afecta a los procesos biológicos en las células de mamíferos [11]. Las lesiones inducidas por la RI incluyen roturas de cadena simple y dobles (SSB de single strand binding protein y DSB de double strand binding protein, respectivamente), así como una complejidad variable de enlaces cruzados de ADN y daños en las bases nitrogenadas. Históricamente se ha aceptado que las DSBs incorrectamente reparadas son la principal lesión en cuanto a la mutagénesis y los efectos biológicos a largo plazo asociados a la RI [12]. Como consecuencia de este daño no reparado correctamente, se pueden adquirir cambios genéticos deletéreos como mutaciones y aberraciones cromosómicas en los momentos iniciales del daño celular [13]. La acumulación del daño e inestabilidad en el ADN causados por la RI junto con la alteración de los procesos de regulación celular puede conducir a la carcinogénesis celular [14,15]. Hasta la fecha, muchos estudios han evaluado el impacto adverso de la exposición a la RI en la salud humana en términos de inducción de mutaciones en células somáticas, utilizando sistemas *in vitro* e *in vivo* [16]. Como resultado de estos y otros hallazgos, ahora se reconoce que los efectos celulares adversos y el potencial carcinogénico de la radiación no se limitan solo a lo que históricamente se ha aceptado. Los efectos biológicos asociados a la exposición a las RI pueden manifestarse en las células en momentos posteriores al momento de la exposición, así como en las células que no recibieron una exposición directa a la RI [17,18].

En los últimos 20 años, son múltiples los estudios que han demostrado que la RI genera señales de "peligro" que se propagan de las células irradiadas hasta las células no irradiadas, dando lugar a efectos secundarios y otros efectos fuera del objetivo diana, constituyendo el denominado efecto Bystander (EB). Este efecto es provocado por factores

liberados por las propias células expuestas directamente a la RI. Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en la producción de este efecto son múltiples y dependen de características biológicas (como el tipo de célula expuesta a radiación, tipo de célula espectadora o receptora, características del medio intercelular) y físicas (dosis, tasa y tipo de RI administrada, y tiempo tras la exposición) [19]. Al igual que en el caso de los efectos dirigidos, los mecanismos redox también desempeñan un papel importante en los efectos fuera del objetivo diana a través de la transmisión de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), y también de citoquinas, ATP y ADN extracelular. En particular, el factor nuclear kappa B se considera esencial para desencadenar la producción autosostenida de ROS y RNS, lo que hace que la respuesta secundaria sea similar a la inflamación. En algunos casos, este fenómeno se asocia con el reclutamiento de células inmunitarias que participan en los efectos de la irradiación a distancia (denominados efectos "away-from-target", conocidos como efectos abscópicos).

## **1.2. Revisión de la literatura.**

La radiobiología es una ciencia que ha sufrido una evolución considerable en los últimos años. En el siglo XX se pensaba en ella como una disciplina sencilla en la que un haz de rayos producía un efecto sobre la célula debido a la propia energía de la radiación. En 1938 Karl Sax propuso por vez primera el concepto de daño cromosómico de 1 o 2 impactos por rayos X utilizando un modelo citogenético vegetal. En este estudio se relacionó la dosis de radiación recibida con el aumento de frecuencia de aberraciones cromosómicas [20]. Posteriormente, el desarrollo de las técnicas de cultivo celular permitió reproducir estos experimentos aplicados a células de mamíferos *in vitro*, obteniendo datos cuantitativos de dosis-respuesta más cercanos a los que se podrían obtener en células humanas. Las dosis de radiación utilizadas eran todavía relativamente elevadas y se extrajeron conclusiones respecto a las curvas de supervivencia celular que relacionaban la dosis con la muerte celular, siendo la curva exponencial con dosis elevadas, mientras que a dosis bajas la morfología de la curva indicaba muerte celular menor con mayor tasa de lesiones subletales [21].

En los años posteriores se observó que no sólo las células expuestas a RI podían sufrir daños cromosómicos. Se comenzó a detectar la existencia de daño biológico en células que no habían sido afectadas directamente por la radiación o por los radicales libres producidos durante la ionización. A estas células no directamente irradiadas pero que eran dañadas se les llamó células *bystander* y al conjunto de efectos biológicos descritos se denominó como efecto *bystander* inducido por radiación (RIBE) [8]. A pesar de que los RIBE han sido demostrados experimentalmente, se desconocen los mecanismos fisiopatológicos exactos ya que, existe gran controversia en los resultados obtenidos *in vitro*.

Mothersill et al. (2018)[22] concluyeron, en la investigación dedicada a la historia del descubrimiento del RIBE, que este fenómeno había sido previamente descrito bajo la denominación de otros diferentes nombres desde 1905 cuando Heineke et al. (1905) [23] plantearon por primera vez la hipótesis de que la irradiación de tumores en ratones estimulaba elementos linfoides en el cuerpo, y J. B. Murphy y J. J. Morton (1915) [24], por su parte, incidieron sobre las consecuencias causadas por la introducción de células irradiadas en animales no irradiados [10,25–28]. En 1954 Parsons et al. (1954) [29] objetivaron daño secundario de la médula ósea no irradiada en niños que habían sido expuestos a la radiación del bazo para el tratamiento de la leucemia [22]. Sin embargo, las causas y los mecanismos del desarrollo de estos fenómenos en aquellos días seguían sin esclarecerse. Seymour et al. (1986) [30] describieron, durante varias divisiones mitóticas, la aparición de mutaciones letales en células somáticas de mamíferos no expuestas a radiaciones ionizantes [25]. Se demostró que, tras la exposición a la radiación, el efecto de la dosis inicial se mantenía durante toda la vida de la célula y se transmitía incluso a generaciones sucesivas. No obstante, la comunidad científica ha mantenido que el fenómeno del efecto secundario inducido por la radiación fue descrito por primera vez por Nagasawa y Little (1992) [31] como un aumento inesperado de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en células de ovario de hámster tras la irradiación con dosis que no superaban los 0,31 mGy [30]. En estos estudios, sólo el 1% de los núcleos celulares fueron dañados por las partículas alfa, mientras que la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas alcanzó hasta el 30% de las células estudiadas. Por tanto, los autores señalaron que para el mismo aumento de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas debido a la irradiación con rayos X, debería ser necesaria una dosis de 2 Gy. Deshpande et al. (1996)

[32] obtuvieron resultados similares mediante la irradiación con partículas alfa de fibroblastos de pulmón humano con dosis inferiores a 50 mGy cuando el número medio de huellas de partículas alfa por núcleo era inferior a 1 (0,05-0,3) [31]. Nagasawa y Little (1992) [31] describieron que la frecuencia de las mutaciones en las células bystander (no irradiadas), causadas por el paso de la partícula alfa a través del núcleo de las células diana, era 5 veces superior a los datos esperados [32]. Hasta la fecha, se ha comprobado la existencia del RIBE por la acción de las radiaciones alfa ionizantes, los rayos X y la radiación gamma en dosis que van de 5 mGy a 10 Gy, la radiación ultravioleta y la exposición a neutrones [27,28]. Este efecto se considera "una de las manifestaciones del fenómeno universal causado por la respuesta celular al estrés genotóxico inducido" [27].

Varios enfoques experimentales fueron los que permitieron obtener los resultados más importantes sobre el RIBE [31,33,34]: influencia de la radiación alfa a bajas dosis, cuando una pequeña cantidad de células fueron dañadas directamente por la radiación y el resto permanecieron sin ser irradiadas por los microhaces cuya área es más pequeña que el tamaño del núcleo celular. Como resultado se afectaron sólo algunas partes de la célula, sin dañar otras; bajo la aplicación de microfracturas protectoras para proteger la parte de las células en el momento de la exposición a la RI; y mediante la incubación de células intactas en el medio de cultivo obtenido tras la incubación previa en él de células irradiadas en un tiempo determinado (6-8 horas).

El estudio del EB se llevó a cabo principalmente en cultivos celulares mixtos entre especies de mamíferos (incluidas las células somáticas humanas) y tuvo como objetivo la investigación de la apoptosis, la diferenciación celular, la inhibición del desarrollo celular, la transformación celular, los cambios mutacionales y los cambios en la expresión génica en las células no irradiadas que eran limítrofes con las células diana irradiadas [10,27,33–35]. En estos estudios se ha demostrado que el EB se produce debido al aumento de la formación de radicales libres, cambios en la expresión de ciertos genes y en la síntesis de proteínas, la muerte celular (apoptosis o necrosis), la proliferación/ diferenciación/ y transformación celular, en la respuesta adaptativa, el envejecimiento celular, y en la inducción de mutaciones genéticas, de aberraciones cromosómicas, y en el aumento de intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos [34,36,37].

Se ha establecido que las células no irradiadas limítrofes con las células diana irradiadas pueden adquirir inestabilidad genómica inducida por la radiación en todos los niveles de su organización, pudiendo objetivarse los marcadores biológicos apropiados, incluyendo los citogenéticos [38–41]. El estudio del RIBE a nivel citogenético ha sido bastante limitado hasta el momento, especialmente en los ensayos de linfocitos de sangre humana, preferentemente bajo irradiación *in vivo*. Esto se debe a las dificultades metodológicas que plantea la necesidad de exponer a la radiación sólo una parte determinada de las células y la posterior diferenciación de las poblaciones de linfocitos irradiados y no irradiados en el análisis citogenético. Por lo general, a los linfocitos no irradiados se añade el plasma sanguíneo de personas expuestas a la RI. Así, Pant y Kamada (1977) [42] establecieron la actividad clastogénica del plasma sanguíneo de las víctimas del bombardeo atómico en Japón [42]. Por su parte, Emerit et al. (1997) [43,44] registraron la actividad clastogénica del plasma del personal de la central nuclear de Chernobyl y de los niños expuestos a la radiación ionizante debido al accidente de Chernobyl. En dichos estudios ya se vio que la actividad clastogénica era inhibida por la enzima superóxido dismutasa, lo que indica que los efectos cromosómicos dañinos de los factores clastogénicos inducidos por la radiación se ejercen a través de la intermediación de los radicales superóxidos, como se sabe para los factores clastogénicos de distinto origen. Otros autores como Ermakov et al. (2008) [45] observaron la transposición de loci cromosómicos de la membrana al interior del núcleo debido a la inducción del efecto bystander en células no irradiadas tras someter a RI a linfocitos sanguíneos humanos *in vitro* con una dosis de 100 mGy [46]. Vorobtsova et al. (2007) [47] estudiaron el efecto citogenético secundario inducido por la radiación en linfocitos humanos y observaron que tanto los linfocitos previamente irradiados como los no irradiados se volvieron más resistentes a la exposición a la RI en una dosis de 1,0 Gy en la etapa G1 del ciclo celular [47]. Otros grupos de investigación han utilizado linfocitos de sangre humana como células inductoras y como células receptoras bajo cocultivos con levaduras irradiadas y no irradiadas con rayos X para estudiar los EB [48].

La dificultad metodológica acusada por el uso del cultivo de linfocitos de sangre humana para el estudio del EB hizo que no se llevara a cabo un estudio detallado de efectos citogenéticos en células somáticas por el RIBE. Los linfocitos humanos presentan una

distribución uniforme en el cuerpo. La simplicidad para disponer del material receptor, la existencia de unificación en criterios de investigación, el nivel estable de aberraciones cromosómicas espontáneas, la posibilidad de encontrar lesiones cromosómicas tardías tras la irradiación, hacen que el cultivo de linfocitos de sangre humana sea un método fiable y reproducible, avalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) para evaluar los efectos de la radiación ionizante en cromosomas humanos *in vivo* e *in vitro* [49,50].

Posteriormente, entre los años 2006 y 2010 se llevó a cabo el proyecto “NOTA” (Nontargeted Effects of Ionizing Radiation), un proyecto internacional para potenciar la investigación del fenómeno RIBE. E. Wright (2010) [51] propuso una clasificación de los RIBE con base en los mecanismos conocidos en ese momento para su desarrollo. Clasificó los RIBE en dos grupos: por un lado, los efectos *in vitro* (efecto Bystander) y por otro *in vivo* (efectos tipo Bystander).

El EB *in vitro* se caracterizaría por la interacción directa entre las células irradiadas y las no irradiadas. El EB *in vivo* se caracterizaría por la generación secundaria de moléculas de señalización como consecuencia de respuesta del tejido al daño inicial, incluyendo los efectos de los factores clastogénicos (productos de la peroxidación de los lípidos, citoquinas y otros oxidantes en el plasma sanguíneo después de la radiación) y los efectos abscópicos (efectos secundarios en la distancia sobre tejido no irradiado mediados por factores inmunológicos, macrófagos o linfocitos que surgen como resultado de la irradiación de otro tejido del cuerpo).

Wright (2010) [51] concluía que los mecanismos no dirigidos tienen implicaciones significativas para la comprensión de los mecanismos de acción de la RI, pero hasta el momento, el conocimiento contemporáneo no permite hacer afirmaciones firmes sobre si estos fenómenos tienen implicaciones para la evaluación del riesgo de la radiación [51].

### **1.2.1. Mecanismos involucrados en el desarrollo del EB.**

La existencia del EB inducido por la RI está bien documentada en la literatura, sin embargo, los mecanismos subyacentes todavía suponen una incógnita ya que muchos de los factores que intervienen en su desarrollo están todavía por determinar. Al inicio se asumió que la inducción de este efecto era producido directamente por las células irradiadas y transmitido a las no irradiadas causándoles ciertos cambios biológicos [52]. En el estudio de Vines et al. (2008) [53] comprobaron cómo la irradiación de medios de cultivo acelulares no producía EB, sino que el desarrollo de este dependía de la presencia de células en el mismo. También se vio que la irradiación del medio de cultivo sin que se hallaran células en el mismo no inducía el EB. El desarrollo del EB dependía de la cantidad de células irradiadas, confirmándose así la necesidad de la participación del factor celular en la transmisión de la señal de daño radioinducido [53]. Por el momento, se sabe que la inducción del EB se produce en dos etapas separadas, pero interconectadas entre sí. La primera etapa consiste en la transmisión de una señal bystander desde la célula objetivo irradiada hasta la célula bystander o receptora; la segunda etapa la constituye la reacción que se produce dentro de las células receptoras no irradiadas al recibir la señal de las células irradiadas vecinas [54].

#### **Papel de las uniones gap.**

La distribución espacial de la señal de daño alrededor de la célula irradiada está parcialmente limitada por la difusión de esta señal. Por lo tanto, se cree que el EB puede ser el resultado de dos formas distintas de transferencia de esta señal desde las células irradiadas a las no irradiadas. La primera se produce en tejidos con un alto grado de interacción entre células, utilizándose las uniones gap de comunicación intercelular (gap junctions, GJ), que son canales proteínicos multirresistentes que permiten la transmisión de moléculas de señales entre células [55]. En dicha unión, las conexinas (proteínas de unión) forman hemicanales en las membranas celulares adyacentes que interactúan entre sí, fusionándose para formar estos huecos. A través de estos poros pueden pasar moléculas con un tamaño que puede oscilar entre los 1.000 a 1.500 Da, generalmente. Los principales iones y metabolitos que se transmiten a través de las GJ son el ion calcio, nucleótidos y péptidos. Muchos de los estudios sobre el papel de las GJ en relación con el EB se han realizado



utilizando fibroblastos humanos que comparten la capacidad de formar monosomas. En el ensayo llevado a cabo por Azzam et al. (2001) [56] expusieron cultivos de fibroblastos a dosis bajas de radiación alfa, evaluando el papel que desempeñan las GJ en el desarrollo del EB. Demostraron un aumento en la expresión de la proteína CDKN1A (p21waf1), al igual que sucede en situaciones de estrés. Dicha proteína está directamente relacionada con el aumento de micronúcleos (MN) y el aumento de fosforilación de p53. Con un daño del 5% de las células por las partículas alfa se observó un aumento de 3 a 4 veces de los niveles de p53 y de su diana intracelular CDKN1A. El aumento del nivel en dichas proteínas disminuía cuando se sometía a las células a las mismas condiciones de irradiación pero tratadas con inhibidores de la comunicación intercelular (octanol)[56]. Aplicando este enfoque consiguieron demostrar una reducción en el EB al dañar el 10% de fibroblastos con partículas alfa, confirmando el papel que desempeñan las uniones intercelulares en el desarrollo del EB [57].

Por otro lado, Toledo et al. (2017) [58] estudiaron la influencia del tipo de GJ en la inestabilidad genómica de la descendencia lejana de las células bystander [58]. Observaron que la expresión de conexina 26 y conexina 43 fue mediada por el EB en un cocultivo de células irradiadas (con rayos  $\gamma$ , partículas  $\alpha$ , iones de hierro y silicio) y no irradiadas durante 5 horas. Se observaron cambios oxidativos y un aumento en la frecuencia de MN en las células bystander. Las uniones gap compuestas por la conexina 32 mediaron los efectos protectores. La descendencia lejana (20-25 divisiones) de las células bystander presentó un nivel elevado de MN que guardaba relación con el tipo de canales de conexión entre las células diana y las células bystander receptoras. En la descendencia de células bystander que expresaban conexina 26 o conexina 43 no se detectó daño en el ADN, mientras que en las células bystander que expresaban conexina 32, el daño del ADN estaba aumentado. La conclusión que extrajeron los autores fue que las células bystander dañadas por el cultivo inicial (con conexinas 26 y 43) murieron o detuvieron su proliferación, mientras que en las células bystander, que originariamente estaban protegidas (conexina 32) del daño en el ADN, aumentó.

### **Factores clastogénicos.**

La segunda forma de transmisión del daño de las células objetivo a las no irradiadas es inherente a los tejidos en los que no hay interacciones celulares directas, así como para la transmisión de la señal mediante un efecto abscopal (afectación de las células que están lejos de un objetivo irradiado cuando se induce el EB en la distancia). En estos casos, desde las células irradiadas se generan mediadores solubles (factores clastogénicos) que aumentan el nivel de oxígeno activo en las células no irradiadas [59,60].

En los estudios de Mothershill y Seymour (1998) [61] se estableció que los factores clastogénicos inducidos por las células irradiadas pueden pasar de 600 a 700 micras en el medio de cultivo, que se termolabilizan a 70° C y que pueden soportar la congelación y descongelación [61]. Lehnert (1997) [62] por su parte demostró la inducción del EB a través de factores secretados en el cultivo, objetivando el aumento en la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas en fibroblastos de pulmón humano no irradiados que se mantuvieron en el medio obtenido tras la irradiación alfa de las células a dosis bajas. El EB se observó en las 24 horas siguientes a la irradiación [62].

Los factores que se han descrito como inductores del EB incluyen citoquinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) ARN, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL8 y IL6 producidos por las células irradiadas [63–65]. Por otro lado, Mitra et al. (2017) [66] demostraron en sus estudios la importancia de la cromatina libre generada tanto por las células sanas como por las células dañadas (cancerosas o irradiadas) como otro mediador inductor de daño genotóxico e inflamación [66,67]. Kirolikar et al. (2018) [68] descubrieron que dichas partículas de cromatina no celular (cfCh) liberadas por la apoptosis de células Jurkat (leucemia linfoblástica humana) irradiadas se integraban en los genomas de los fibroblastos de ratón intactos circundantes (células NIH3T3), induciendo en ellos el EB (mediante la actuación de H2AX, caspasa3, NF $\kappa$ B e IL6) al incubarse conjuntamente durante 24 horas [68].

Ermakov et al. (2011) [69] propusieron los fragmentos de ADN extracelular liberados por apoptosis de células diana radiosensibles como el mediador del efecto

secundario de la RI. En dichos estudios se postula que los fragmentos de ADN de las células apoptóticas son segregados al medio intercelular e interactúan con el receptor de unión de ADN de las células circundantes. Dicha interacción conduce a una activación de los linfocitos bystander receptores actuando como una señal de síntesis de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, desencadenando el estrés oxidativo secundario que puede inducir el EB en células no irradiadas y producir nuevamente apoptosis en parte de esas células receptoras.

### **Efecto abscopal.**

El efecto abscopal es similar al EB, pero cuando se induce a gran distancia del lugar de exposición a la RI. El efecto abscopal puede provocar la muerte, la transformación o la disminución de la supervivencia celular. Koturbash et al. (2008) [70] demostraron, *in vivo* que se producían daños en el ADN en células situadas más allá de 1 centímetro del lugar de la irradiación. También demostraron cambios epigenéticos en tejidos no irradiados del hemicuerpo contralateral no irradiado, con aumento de metiltransferasa (ADN DNMT1) y aumento de proteínas de unión a metilo implicadas en el silencio transcripcional (MeCP2 y MBD2) [4]. Posteriormente Tamminga et al. (2008) [70] describieron la inducción de un efecto abscopal en espermatozoides de ejemplares con irradiación craneal, hallando en estas líneas celulares daños cromosómicos así como disminución del nivel de metilación del ADN en los loci CCGG de testículos y esperma [70].

Por su parte, Brooks (2004) [71] demostró diferentes efectos en función de la dosis de radiación. A pequeñas dosis de radiación ionizante se inducía un efecto secundario sólo dentro de los límites del órgano irradiado. Sin embargo, cuando los tejidos eran expuestos a mayores dosis de RI se producían factores clastogénicos que llegaban al torrente sanguíneo causando daño en órganos distantes no expuestos. Con dichas premisas apuntaba la necesidad de tener en cuenta la dosis en el cálculo de los riesgos derivados de la radiación [71]. Ventura et al. (2017) [72] mostraron el desarrollo del efecto abscopal (daños en el ADN agrupados, roturas dobles del ADN, apoptosis, cambios en las concentraciones de citoquinas IL10, TIMP1, VEGF, TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en el plasma sanguíneo), así como respuestas inmunitarias sistémicas (cambios en el número de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T) en la parte no irradiada del cuerpo de los ratones C57BL/6 expuestos localmente a los rayos X

mediante un sincrotrón. Stephan et al. (2005) [73] registraron el elevado nivel de roturas de cromátidas en los linfocitos de la sangre periférica de pacientes tratados de espondilitis anquilosante por exposición a  $^{224}\text{Ra}$ , lo que puede ser el resultado del efecto secundario ya que, estas células se encuentran en fase G0 del ciclo celular [74] .

### **Papel del sistema inmunitario.**

El sistema inmunitario está formado por varios tipos de elementos que protegen al organismo contra las infecciones y los daños celulares. Las citoquinas son las moléculas mediadoras encargadas de llevar a cabo gran parte de estos efectos. Las citoquinas pueden cambiar la secreción de algunas moléculas, así como la proliferación celular, afectando a la expresión o a la inhibición de las proteínas de membrana. Por lo tanto, tienen efecto en la regulación de la respuesta inmunitaria, la inflamación y la proliferación de las células sanguíneas. Los factores más importantes del sistema inmunitario que participan en el efecto secundario inducido por la radiación son los linfocitos y los macrófagos. La RI, al estimular estas células, eleva el nivel de la mayoría de las citoquinas como la IL-1, IL-2, IL-6, IL-8,  $\text{TNF}\alpha$  y  $\text{TGF}\beta$  en las células no irradiadas. La irradiación parcial del pulmón demostró el aumento de estas citoquinas en la zona pulmonar protegida [75]. La elevación de estas citoquinas juega un papel clave en la aparición de una segunda neoplasia tras la radioterapia [76]. La mayoría de estas citoquinas están implicadas en la proliferación y diferenciación de las células madre. El  $\text{TNF}\alpha$ , que se incrementa de forma evidente tras la exposición aguda [77], induce la necrosis y la muerte celular en las células tumorales, aunque no ocurre lo mismo con las células normales. El  $\text{TNF}\alpha$  junto con otras citoquinas anteriores se sitúan en la vía de la inflamación y estimulan la producción de óxido nítrico. La activación de los macrófagos mediante el aumento de la producción de citoquinas conduce a un aumento de los daños cromosómicos, al cambio de las bases del ADN, la mutagénesis y la apoptosis en las células receptoras no irradiadas. El aumento del nivel de producción de citoquinas a través de los macrófagos estimula la producción de NO, lo que conduce también al estrés oxidativo.

Las respuestas inmunitarias intactas (vigilancia inmunitaria o la inmunomodulación) son necesarias para prevenir e inhibir el desarrollo de tumores. Sin embargo, las respuestas

inmunitarias que se asocian a la inflamación crónica pueden promover el crecimiento y la progresión del cáncer. Dentro del sistema inmunitario, los linfocitos T citotóxicos CD8 y CD4, junto con su citoquina característica IFN- $\gamma$ , actúan como las principales células efectoras inmunitarias antitumorales; mientras que los macrófagos asociados a tumores (MAT) o las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC) y sus citoquinas derivadas IL-6, TNF, IL-1 $\beta$  e IL-23 se consideran generalmente como fuerzas promotoras de tumores. Sin embargo, las funciones que desempeñan las células Th17, los linfocitos T reguladores CD4, CD25, Foxp3 y las citocinas inmunorreguladoras, como el TGF- $\beta$ , en el desarrollo y la supervivencia de los tumores siguen siendo difíciles de determinar. Estas células inmunitarias y los factores celulares producidos a partir de ellas desempeñan un doble papel en la promoción o el rechazo del desarrollo del cáncer, y su función final puede depender en gran medida del microambiente tumoral [78] .

Numerosos estudios experimentales han establecido que en el mecanismo de desarrollo del EB inducido por la radiación puede estar implicada la respuesta del sistema inmunitario a la exposición a la radiación [79]. Los factores más importantes del sistema inmunitario que participan en la inducción del efecto secundario son los linfocitos y los macrófagos [80]. La RI actúa estimulando estas células y aumentando la producción de citoquinas (IL1, IL2, IL6, IL8, TNF $\alpha$  y TGF $\beta$  que intervienen en la proliferación y diferenciación de las células madre y en el desarrollo de tumores secundarios radioinducidos tras la radioterapia) que, a su vez, afectan a las células receptoras no irradiadas [78,81]. En los trabajos de Calveley et al. (2005) [75] en los que se produjo la irradiación parcial de pulmones de rata se ha descrito un aumento de estas citoquinas sólo en la zona pulmonar que estaba protegida de la RI [75]. El aumento de la producción de citoquinas estimula la producción de óxido nítrico, lo que conduce al desarrollo de estrés oxidativo y, consecuentemente, a cambios mutagénicos en el material genético de las células no irradiadas y su apoptosis [82].

En relación con la participación de las citoquinas, las formas activas de oxígeno y nitrógeno en la transmisión de una señal dañina de las células directamente irradiadas a las células receptoras, el desarrollo del efecto secundario inducido por la RI se compara con el desarrollo de las reacciones inflamatorias [83,84]. En el estudio de Rastogi et al. (2013) [84] se pone de manifiesto la influencia del fenotipo macrofágico en el tipo de respuesta

(proinflamatoria o antiinflamatoria) generada al fagocitar células apoptóticas [84]. En sus conclusiones sugerían que la modulación del fenotipo de los macrófagos podría representar un posible enfoque para la disminución de efectos indeseados de la RI.

Se sabe que los RIBE pueden estar causados por varios tipos de partículas: partículas  $\alpha$  de transferencia de alta energía lineal (LET), radiación- $\gamma$ , LET de baja energía y también radiación UV. Este efecto es provocado por factores liberados por las células afectadas directamente por la RI. Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a este efecto son múltiples y dependen de características biológicas (tipo de célula expuesta a radiación, tipo de célula espectadora, medio intercelular) y físicas (dosis, tasa y tipo de radiación ionizante administrada, y tiempo tras la exposición) que no están todavía claramente establecidos [19].

### **Mitocondrias.**

La producción de radicales libres y superóxidos en las células depende en gran medida de la actividad mitocondrial [64,85–87]. Se descubrió que la supresión de la respiración celular mitocondrial, la absorción de calcio por parte de las mitocondrias y el agotamiento del ADNmt reducían significativamente el nivel de daño cromosómico inducidos por el EB [86]. En el estudio de Zhou et al. (2000) [88] con fibroblastos humanos, las células empobrecidas en ADN mitocondrial mostraban una mayor respuesta mutagénica bystander en monocapas confluentes cuando una fracción de la misma población era irradiada con dosis letales, en comparación con sus células parentales mitocondriales-funcionales. Sin embargo, utilizando cultivos mixtos de células funcionales y no funcionales y dirigiéndose a una sola población de células con una dosis letal de partículas alfa, se encontró uniformemente una disminución de la mutagénesis en las células bystander receptoras de ambos tipos celulares, lo que indica que las señales de un tipo celular pueden modular la expresión de la respuesta bystander en otro tipo celular. Además, se vio que la actividad de NF-kappaB y sus proteínas dependientes, la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la NO sintasa inducible (iNOS), eran menores en las células suprimidas bystander en comparación con sus homólogas funcionales [87].

### **Vesículas extracelulares.**

Las vesículas extracelulares se comportan como vehículos de señales bystander al contener en su interior marcadores relacionados con el daño celular y la apoptosis. Estos contienen material de carga procedente de endosomas, citosol, membrana plasmática y moléculas de microARN, y son liberados por una serie de células cancerosas y no cancerosas tanto en el microambiente extracelular, así como en fluidos corporales. Albanese y Dainiak (2000) [89] describieron por primera vez que la RI aumenta los niveles del ligando Fas (FasL), también llamado "ligando de la muerte", exfoliado en vesículas extracelulares. Desde entonces, numerosos estudios sugieren que las vesículas están implicadas en la mediación del RIBE *in vivo* y también en células cultivadas.

En el estudio de Ariyoshi et al. (2019) [90] observaron que la secreción de ADNmt a través de los exosomas está implicada en la mediación de las señales RIBE [90]. Shuai et al. (2015)[91] también describieron que otro microARN, el miR-21 (respuesta al daño del ADN) puede ser transferido de las células irradiadas al medio extracelular y, posteriormente, acceder a las células bystander receptoras para producir dichos efectos a través de exosomas.

### **Epigenética.**

La RI es una modalidad de diagnóstico y tratamiento fundamental, pero también es un potente agente genotóxico que causa inestabilidad del genoma y carcinogénesis. El riesgo de complicaciones relacionadas con el tratamiento con radiación se está convirtiendo en un problema creciente. En los últimos años se ha propuesto la epigenética como otra vía de daño celular en el RIBE. La epigenética podría definirse a grandes rasgos como la suma de todos los mecanismos necesarios para el despliegue del programa genético. Se han propuesto varios mecanismos que regularían la expresión de las secuencias de ADN. Se sabe que la 5-metil citosina tiene un papel fundamental en el control de la expresión génica, y también que el patrón de metilación es heredable. La metilación está fuertemente asociada al silenciamiento de los genes en diversos contextos biológicos. También hay muchos ejemplos

de herencia epigenética a través de la línea germinal. Otros mecanismos epigenéticos importantes son aquellos en los que intervienen la cromatina y las modificaciones de las histonas, así como el campo en expansión de los ARN reguladores [92]. Así, los tres principales fenómenos epigenéticos: la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y el silenciamiento mediado por pequeños fragmentos de ARN podrían intervenir en el RIBE.

El papel más importante parece pertenecer al grupo metilo. La reducción de los grupos metilo en la región promotora de los genes aumenta su expresión [92]. La pérdida de metilación es un signo de las células cancerosas que aumenta la frecuencia de lesiones del ADN, promueve la inducción de mutaciones y el desarrollo de la inestabilidad genómica [93]. Efectos similares también han sido inducidos por la exposición aguda a los rayos X y gamma debido a la hipometilación del ADN mediante la alteración de la expresión de las metiltransferasas del ADN (DNMT3a y DNMT3b) en los tejidos directamente irradiados [93]. En las células bystander no irradiadas y cercanas a los objetivos irradiados, también se ha descrito una reducción de la metilación del ADN, roturas cromáticas y cromosómicas, aumento de la inestabilidad genómica, apoptosis y muerte celular [94].

Por otro lado, los microARN (miARN) han emergido como un mecanismo epigenético participando, por tanto, en la regulación génica y en los procesos de comunicación intercelular. Estos miARN son una clase de ARN no codificante de pequeño tamaño (de 20 a 25 nucleótidos) relativamente estables y capaces de atravesar las células que se encuentran a gran distancia [95]. Con respecto al papel del ARN no codificante se ha descrito que éste controla la expresión de los genes a través de interacciones específicas de la secuencia con las regiones reguladoras. La acción directa de las RI cambia la expresión de los miARNs, pueden provenir del tejido irradiado y afectar a la expresión de genes en tejidos distantes, lo que les permite participar en la inducción del EB a distancia. Xu et al. (2015) [91] demostraron que el miARN (miR21) puede ser transferido desde las células irradiadas en el medio extracelular y luego a las células receptoras no irradiadas a través de los exosomas [91].



El ADN extracelular oxidado, incluido el liberado por las células apoptóticas, también se ha sugerido como una señal no dirigida de daño celular [96]. Además, se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y la expresión de miARN, están regulados de forma significativa por la radiación directa e indirecta en modelos de roedores y humanos [97–99]. La señalización de miARN no parece propagar la comunicación del estrés a las células y tejidos vecinos directamente, pero se ha observado que desempeña un papel importante en la respuesta celular posterior al daño inducido por la radiación [100–102]. Dickey et al. (2012) [97] abordaron esta cuestión probando factores de estrés que incluían la radiación UV-A en células sensibilizadas con BrdU, la UV-C y la presencia en el cultivo de células tumorales y células senescentes. En sus conclusiones sugieren que la vulnerabilidad de las células a los daños por roturas de la doble cadena de ADN secundarios puede deberse tanto a la transcripción como a la replicación. Estos hallazgos ofrecen información sobre los tejidos que pueden ser vulnerables a la desestabilización genómica por EB *in vivo*.

Además, en el estudio de Ilnytsky et al. (2009) [103] pusieron de manifiesto que para una misma dosis de radiación (en dosis única o fraccionada) se producen cambios en la metilación del ADN y alteraciones del microARN en células cutáneas y en bazo. Sin embargo, la hipometilación en las células del bazo permanecieron en el tiempo mucho más que los cambios en las células cutáneas (14 días frente a 6 horas). Por tanto, concluyeron que los efectos epigenéticos secundarios a RI son desencadenados tanto por la exposición aguda como por la fraccionada y pueden ser muy distintos en los diferentes órganos secundarios [103].

### **Efectos no dirigidos causados por otras fuentes de estrés.**

En la actualidad ha quedado demostrada la variedad de efectos causados por la RI en las células receptoras. Sin embargo, dicho estímulo no es el único capaz de causar la cascada de efectos descrita, sino que existen otras fuentes de estrés capaces de causar el mismo tipo de efectos [102]. Dickey et al. (2012) [97] abordaron esta cuestión probando distintos factores de estrés que incluían la radiación UV-A en células sensibilizadas, la UV-C y la presencia en el cultivo de células tumorales y células senescentes. A partir de los

experimentos realizados mediante la transferencia de medios, descubrieron que todas estas condiciones provocaban daños en el ADN de las células bystander receptoras. También varios reactivos químicos han inducido efectos no selectivos, como la mitomicina C [104,105], la fleomicina [105], la cloroetilnitrosurea [106] y la actinomicina D [107].

La senescencia celular suprime el cáncer al detener de forma estable la proliferación de las células dañadas. Paradójicamente, las células senescentes también secretan factores que alteran los microambientes tisulares. Se ha descrito que la persistencia del daño en el ADN de las células senescentes inicia el aumento de la secreción de citoquinas inflamatorias, como la IL-6 [108]. Esta respuesta a las citoquinas requeriría las proteínas de respuesta al daño de ADN ATM, NBS1 y CHK2 en lugar de los ejecutores de la detención del ciclo celular, p53 y pRb. Se demostró que la ATM es esencial para la secreción de IL-6, resultante de la senescencia inducida por oncogenes y por las células dañadas que eluden la senescencia [108]. Por lo tanto, las células senescentes también son capaces de inducir inestabilidad genómica en su vecindad estableciendo un entorno inflamatorio crónico mediante la secreción de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) [108,109]. El medio de las células senescentes contiene altos niveles de IL1, IL6 y TGFβ1, capaces de inducir una respuesta de daño al ADN mediada por ROS, que a su vez causan senescencia en las células normales bystander receptoras a través de la activación de múltiples vías de señalización como JAK/STAT, TGFβ/SMAD e IL1/NFκB, provocando la expresión de NADPH oxidasa [110].

Por otro lado, es conocido que los tumores interactúan con el microambiente tumoral. Los tumores son capaces de enviar señales al tejido local y también reciben señales en un proceso necesario para la supervivencia del tumor. La inflamación crónica podría desempeñar un papel importante en la determinación de la propagación de las metástasis al crear un entorno más susceptible. Esto podría conseguirse mediante la estimulación de los fibroblastos normales en los lugares potencialmente metastásicos para que produzcan proteínas que unan las células al medio extracelular, seguida de la posterior activación de los fibroblastos y macrófagos residentes [111,112]. Los tumores segregan ROS, incluyendo peróxido de hidrógeno de larga duración [113], varios factores de crecimiento y citoquinas [114], que a su vez promueven la activación de las células mesenquimales, lo que conduce

a la inflamación y al posible daño del ADN a través de los radicales reactivos [115]. Se ha observado que el daño al ADN y a las proteínas aumenta en los tejidos normales y en las células que bordean los tumores [116,117], como los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) [118,119]. La producción de ROS en los CAF induce un efecto de retroalimentación en las células cancerosas adyacentes, que conduce a un mayor daño en el ADN, inestabilidad genómica y aneuploidía, lo que sugiere que los tumores y el estroma están metabólicamente acoplados y que el estrés oxidativo puede constituir una “fertilización metabólica” de la progresión tumoral [118,120].

### **1.2.2. Sustancias modificadoras del RIBE.**

Como ya se ha expuesto anteriormente, el estrés oxidativo parece tener un papel decisivo en el mecanismo de desarrollo de daño del ADN en las células bystander o receptoras, ya que aumenta la producción de radicales libres e inactiva la defensa antioxidante de las células. Una forma de descubrir los mecanismos del efecto secundario inducido por las RI es el estudio del impacto de varios modificadores en su manifestación [121].

Para el funcionamiento normal del organismo es necesario un bajo nivel de iniciadores de radicales libres y un balance antioxidante equilibrado. Como resultado de la exposición a la RI este equilibrio se ve comprometido, la eficacia de la iniciación de las reacciones de los radicales libres aumenta debido a la elevación de la producción de formas activas de oxígeno [79,121]. Los radicales libres tienen un tiempo de vida extremadamente corto tras su formación en las células irradiadas, lo que hace que no puedan llegar a las células bystander receptoras y, por lo tanto, no pueden ser considerados como un factor de daño de las células no directamente irradiadas [122]. Sin embargo, los radicales libres en presencia de oxígeno pueden convertirse en peróxidos de larga duración, que pueden presentar más de veinte horas de vida media, permitiéndoles alcanzar mayores distancias, salir de las células directamente irradiadas y causar daños en las células lejanas receptoras no irradiadas. Konopacka et al. (2006) [121] en sus experimentos *in vitro* describieron que las sustancias “eliminadoras” de radicales libres y lipoperóxidos (por ejemplo, DMSO,

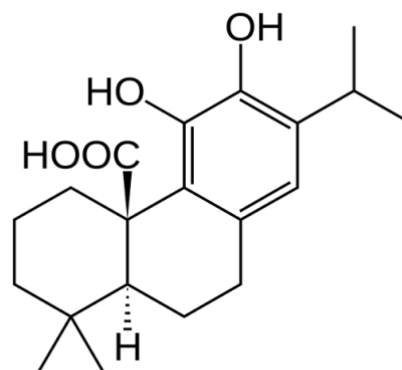
vitamina C), reducen la frecuencia de roturas cromosómicas, apoptosis y micronúcleos en las células bystander receptoras.

Mosse et al. (2006) [123] llevaron a cabo una modificación de los efectos RIBE utilizando la melanina y la melatonina, que tienen también una gran actividad antirradical [123]. El uso de estas sustancias antioxidantes disminuyó la manifestación del fenómeno RIBE y mejoró la supervivencia de los queratinocitos humanos HPVG tratados con el medio en el que se cultivaron las células irradiadas a dosis de 0,5 y 1,0 Gy.

Zhou et al. (2006) [87] observaron que el Bay 11-7082, inhibidor farmacológico de la activación del factor nuclear kappaB, y el 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido-3-óxido, un eliminador de óxido nítrico disminuían significativamente la frecuencia de mutaciones tanto en las células bystander con actividad mitocondrial como en células bystander con supresión de dicha actividad. Con ello, incidían en la importancia de las vías de señalización NF-kappaB/iNOS/NO y NF-kappaB/COX-2/prostaglandina E2 dependientes de las mitocondrias en la regulación del EB [87].

### **Ácido carnósico.**

El ácido carnósico (AC) fue descubierto por Linde en *Salvia officinalis* y, posteriormente por Wenkert et al. (1965) [124] en las hojas de *Rosmarinus officinalis*. A pesar de que las propiedades de la salvia y el romero eran conocidas tradicionalmente no fue hasta la década de los 2000 cuando las investigaciones comenzaron a profundizar en los mecanismos de acción del AC [125]. El AC (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>), es un diterpeno fenólico que se encuentra en abundancia en las hojas de romero, más concretamente en los cloroplastos de las células de los tricomas. Su estabilidad es discutida debido a varios derivados de deshidrogenación como el carnosol, rosmanol e isorosmanol, que pueden aparecer incluso en la planta. Se sabe que, en las plantas sometidas a una alta radiación solar y a una elevada sequía, el AC puede transformarse en derivados metílicos. Por tanto, esta molécula ejerce una doble función protectora en la planta, capturando los radicales libres en los cloroplastos y preservando la estabilidad de las membranas celulares [126].



ÁCIDO CARNÓSICO

**Figura 1.** Estructura química del ácido carnósico.

En la última década, varios autores han estudiado las propiedades farmacológicas del AC, describiendo que puede tener aplicaciones clínicas para diversas enfermedades humanas. Sus propiedades están estrechamente relacionadas con sus componentes fenólicos. Entre los mecanismos de utilidad en su aplicación clínica se incluyen su capacidad antioxidante que consigue la inhibición del estrés oxidativo, la atenuación de la inflamación, efecto antiviral y efecto sobre diversos tipos de células cancerígenas [127–129].

Es importante señalar que no existe una vía de señalización particular o universal adoptada por el AC para la eliminación de diferentes tipos de células cancerosas. De hecho, el AC puede inducir sobre varios tipos de carcinomas apoptosis, detención del ciclo celular, autofagia e inhibición de la proliferación celular, estando implicadas en cada caso diferentes vías de señalización [125]. Algunos estudios han demostrado inhibición en la proliferación y la migración de las células cancerosas por el AC [128,130–132], y también reducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular [133]. Diferentes estudios han descrito que el AC induce la apoptosis en células de neuroblastoma humano y de carcinoma de próstata humano [130,134], e inhibe la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y la migración de las células B16F10 de forma dependiente de la dosis [132]. Otros estudios apuntan que el tratamiento combinado de AC y curcumina induce la apoptosis en células de leucemia mieloide aguda a través de una vía mediada por la caspasa 8 [135]. Además, el AC potencia la apoptosis mediada por TRAIL en células de carcinoma humano caki [136]. Por lo tanto, todas estas evidencias sugieren que el tratamiento combinado con AC y otros

fármacos quimioterápicos podría ser una estrategia útil en la terapia de algunos tipos de cáncer.

Además, se ha visto implicación del AC en la reducción del crecimiento de líneas celulares de cáncer mediante interferencia en la angiogénesis tumoral (importante proceso en crecimiento tumoral y de las metástasis). En el estudio de López-Jiménez et al. (2011) [137] se describe la actividad antiangiogénica del AC a 10 mM y 100mM mediante la inhibición de la diferenciación, la proliferación, la migración y la capacidad proteolítica de las células endoteliales. Asimismo, describen un efecto antiproliferativo en las propias células tumorales mediante la inducción, al menos parcialmente, de la apoptosis. Esta actividad puede contribuir a la prevención de trastornos relacionados con la angiogénesis, como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas.

En cuanto a efectos descritos sobre las células de melanoma, en el estudio de Park et al. (2014) [132] observaron que el AC previene la adhesión y la migración de las células de melanoma B16F10 en concentraciones que van de 2,5 a 10 mM mediante la supresión de la expresión de marcadores mesenquimales y mediante la inducción de marcadores epiteliales que conducen a la inhibición de la transición epitelial-mesenquimal (EMT). El AC inhibió la fosforilación de AKT, la secreción de la metaloproteinasa de la matriz (MMP)-9, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMP)-1, el activador del plasminógeno de la uroquinasa (uPA) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1. Curiosamente, la secreción de TIMP-2 aumentó significativamente en las células B16F10 tratadas con 10  $\mu$ mol/L de AC [132].

Por otro lado, Lin et al. (2018) [138] mostraron la capacidad del AC como un inhibidor de crecimiento y detención del ciclo celular en las células de melanoma B16F10. Observaron que el AC desencadena la detención del ciclo celular en la fase G0/G1, y aumenta la expresión de p21, además de potenciar la citotoxicidad mediada por carmustina y lomustina. Todo ello supone la disminución del crecimiento del tumor, por lo que también concluyeron que el AC podría ser útil como nuevo agente quimioterapéutico en diferentes tipos de neoplasias.

En otros estudios se ha observado un efecto radiosensibilizante de sustancias con estructura química muy próxima al AC como el carnosol [139]. En el estudio llevado a cabo

por Alcaraz et al. (2013) [140] se describe como el carnosol actuaba inesperadamente como radiosensibilizante en células murinas B16F10. El posible mecanismo subyacente a este efecto podría estar relacionado con la estimulación de la melanogénesis como ya sucede con otros extractos vegetales.

En el estudio llevado a cabo por Alcaraz et al. (2022) [141] se sugería que los compuestos radioprotectores actuaban mediante mecanismos distintos en función de su aplicación antes o después de la RI. Cuando los compuestos fenólicos se añaden antes de la irradiación gamma, su actividad antimutagénica protectora se basa en su capacidad de eliminación del anión superóxido y, especialmente, contra el radical hidroxilo, independientemente de que sean compuestos hidrosolubles o liposolubles. Sin embargo, cuando estos compuestos fenólicos se añaden después de la irradiación gamma, el efecto protector se basa en la actividad contra las especies reactivas del oxígeno presentes en las células, es decir, los radicales lipoperóxidos, que son los principales responsables del daño oxidativo cromosómico continuo. Sólo los compuestos liposolubles, como el ácido carnósico, el carnosol y el delta-tocoferol, proporcionaron una actividad antimutagénica protectora significativa [141].

En cuanto a la biodisponibilidad del AC sólo hemos encontrado dos estudios en animales. Se ha visto que 6 horas después de la administración oral en ratas (64,3-5,8 mg/kg), la biodisponibilidad del AC en su forma libre es del 40,1%, y su excreción en las heces después de 24 horas es del 15,6-8,2% [142]. Tras su administración oral el AC se absorbe hacia el torrente sanguíneo, quedando rastros en intestino, hígado y tejido muscular del abdomen y patas de las ratas. En el estudio de Romo Vaquero et al. (2013) [143] también estudiaron la biodisponibilidad del AC junto con otros diterpenos del extracto de romero, y detectaron los metabolitos 25 minutos después de la administración oral en ratas. El AC estaba presente de forma importante en el intestino, el hígado y el plasma, y de forma más moderada en el cerebro.

Por otro lado, es importante tener en cuenta el perfil de biotoxicidad del AC. En el estudio de Wang et al. (2012) [144] se evaluó la toxicidad oral aguda y a 30 días del AC en ratas Wistar y obtuvieron la dosis letal oral aguda (LD50) en el rango de 7100 mg/kg de peso corporal. En las ratas que se trataron crónicamente con una dosis alta de AC, observaron

como efectos asociados una ligera reducción en el aumento de peso corporal en comparación con el grupo de control y débiles cambios patológicos en el corazón, el hígado y el riñón. Con todos estos resultados la molécula de AC puede ser considerada con un bajo perfil de toxicidad.

### **1.3. Melanoma.**

Los melanomas son un tipo de neoplasia maligna derivada de los melanocitos (células dendríticas del neuroectodermo con capacidad de producción de melanina) que se encuentran en la piel, los folículos pilosos, los ojos, el oído interno, los huesos, el corazón y el cerebro de los seres humanos [145]. Los melanoblastos son las células precursoras de los melanocitos y son células no pigmentadas que se originan en las células de la cresta neural embrionarias [146]. Tras el cierre del tubo neural, los melanoblastos migran a varias regiones del cuerpo y se convierten en melanocitos, así como en células del sistema nervioso periférico, del hueso y del cartílago de la cabeza, y de la coroides del ojo. Los melanoblastos que se convierten en melanocitos se encuentran predominantemente en la capa basal de la epidermis de la piel y en los folículos pilosos, y pueden identificarse por la expresión de marcadores específicos de los melanocitos, como la tirosinasa (TYR), la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TYRP1), DOPAcromo tautomerasa o proteína relacionada con la tirosinasa-2 (TYRP2), proteína premelanosoma 17 (Pmel17/gp1000), melan-A o antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MART-1) y factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF) [147]. La mayoría de los melanomas se originan en las células de la piel, surgiendo como un nevus, pero pueden aparecer en otras localizaciones donde se encuentra este tipo celular, es decir, en otros tejidos pigmentados, como el ojo o el intestino.

Las melaninas son moléculas pigmentarias sintetizadas de forma endógena por los melanocitos en los melanosomas. Son potentes quelantes de cationes y pueden actuar como reguladores de radicales libres por su capacidad antioxidante. La melanogénesis consiste en una serie de complejas reacciones bioquímicas y enzimáticas catalizadas por la tirosinasa (TIR) y otras proteínas relacionadas con la TIR, que conducen a la formación de dos tipos de melanina, la eumelanina y la feomelanina. El proceso comienza con la conversión de L-



tirosina en DOPAquinona. La adición de cisteína o glutatión a la DOPAquinona conduce a la formación de metabolitos intermedios, seguidos de posteriores transformaciones y polimerización hasta el producto final, la feomelanina. En ausencia de compuestos tiólicos, la DOPAquinona se somete a una ciclación y oxidación intramolecular para formar DOPAcromo, que luego se convierte en 5,6-dihidroindol (DHI) o ácido 5,6-dihidroindol-2-carboxílico (DHICA). La eumelanina se forma por polimerización del DHI y el DHICA y sus quinonas [148]. Los tipos y las cantidades de melanina que producen los melanocitos están determinados genéticamente y se ven influidos por una serie de factores físicos y bioquímicos como los cambios hormonales, la radiación ultravioleta (RUV), moléculas secretadas por los queratinocitos, fibroblastos, células inflamatorias, neuronales o endocrinas circundantes que pueden verse afectadas por situaciones como el embarazo o la diabetes. Estos estímulos afectan a las diferentes vías de la melanogénesis. Las vías de señalización intracelular están compuestas por varias cascadas: cascada de monofosfato de adenosina (cAMP)/proteína kinasa (PKA)/CREB/MITF, cascada de MAP quinasas, cascada PLC/DAG/PKC $\beta$  y cascada NO/cGMP/PKG, que intervienen en la regulación de la expresión y la actividad de las proteínas relacionadas con la melanogénesis por la RUV y los agentes endógenos (citoquinas y hormonas). La actividad de la enzima melanogénica clave, la tirosinasa (TIR), también se ve afectada por el pH y la temperatura. La RUV es el principal factor extrínseco en la regulación de la melanogénesis, a través de la generación de ROS. Además, muchas sustancias farmacológicamente activas poseen la capacidad de inhibir o estimular la biosíntesis de la melanina. Los antioxidantes con la capacidad de eliminar los ROS pueden disminuir la melanogénesis. Los dos principales sistemas antioxidantes celulares son los sistemas de tiorredoxina (Trx) y del glutatión (GSH). En concreto, el sistema GSH está relacionado con la regulación de la formación de feomelanina. Se ha demostrado que la adición exógena de GSH actúa como agente despigmentante, lo que sugiere que otros antioxidantes también pueden tener el potencial de actuar como agentes despigmentantes [149].

Una importante característica de los melanocitos es la resistencia a la apoptosis ya que están dotados de mecanismos antiapoptóticos ejemplificados por la expresión del proto-oncogen Bcl2 que les permiten sobrevivir [150]. A diferencia de los queratinocitos, los melanocitos tienen una vida muy larga sobreviviendo durante décadas en la epidermis. Sin

embargo, la longevidad de los melanocitos y su resistencia a la apoptosis hacen de los melanocitos células vulnerables a las mutaciones que surgen a lo largo de los años

El melanoma es considerado el tipo de neoplasia maligna de piel más letal debido a su carácter invasivo y a la limitada eficacia de su tratamiento. La principal terapia para el melanoma primario y las metástasis en órganos solitarios es la escisión quirúrgica amplia. La terapia adyuvante, como la quimioterapia y las terapias dirigidas, se utilizan principalmente para la enfermedad diseminada [151]. La RT es una poderosa opción de tratamiento que se utiliza en más del 50% de la población de pacientes con cáncer en general [152], sin embargo, en el caso del melanoma la RT convencional por sí sola es incapaz de erradicarlo.

Para el abordaje general de diversos tipos de neoplasia el régimen de tratamiento radioterápico más extendido es el de irradiación fraccionada estándar administrando de 1,8 a 2 Gy por día, 5 días a la semana. En algunos casos como el cáncer de próstata se está apostando por el hipofraccionamiento con dosis que ascienden de 2,4 a 3,4 Gy, e incluso ultrahipofraccionamiento con dosis que pueden alcanzar los 5 Gy por fracción [153]. A pesar de las aportaciones ofrecidas por la RT en distintos tipos de tumores, la principal limitación que presenta es la posibilidad de que algunas células desarrollen mecanismos de resistencia durante las exposiciones consecutivas [154,155]. La radiosensibilidad constituiría la 5ª R de la radioterapia según Steel (1989) [156], además de las cuatro R propuestas por Withers (reparación, reordenación, repoblación y reoxigenación), que representan los mecanismos más importantes para determinar la respuesta de un tejido biológico a múltiples dosis de radiación [157]. A pesar de que algunos estudios apuntan a que la RT de microhaz (mayor administración de dosis) asociada a inmunoterapia podría superar en cierta medida estas limitaciones [151], el melanoma, en especial el localmente avanzado, sigue constituyendo un reto clínico debido a la radiorresistencia inherente a este tumor, con cierta variabilidad entre las distintas estirpes [158–160].

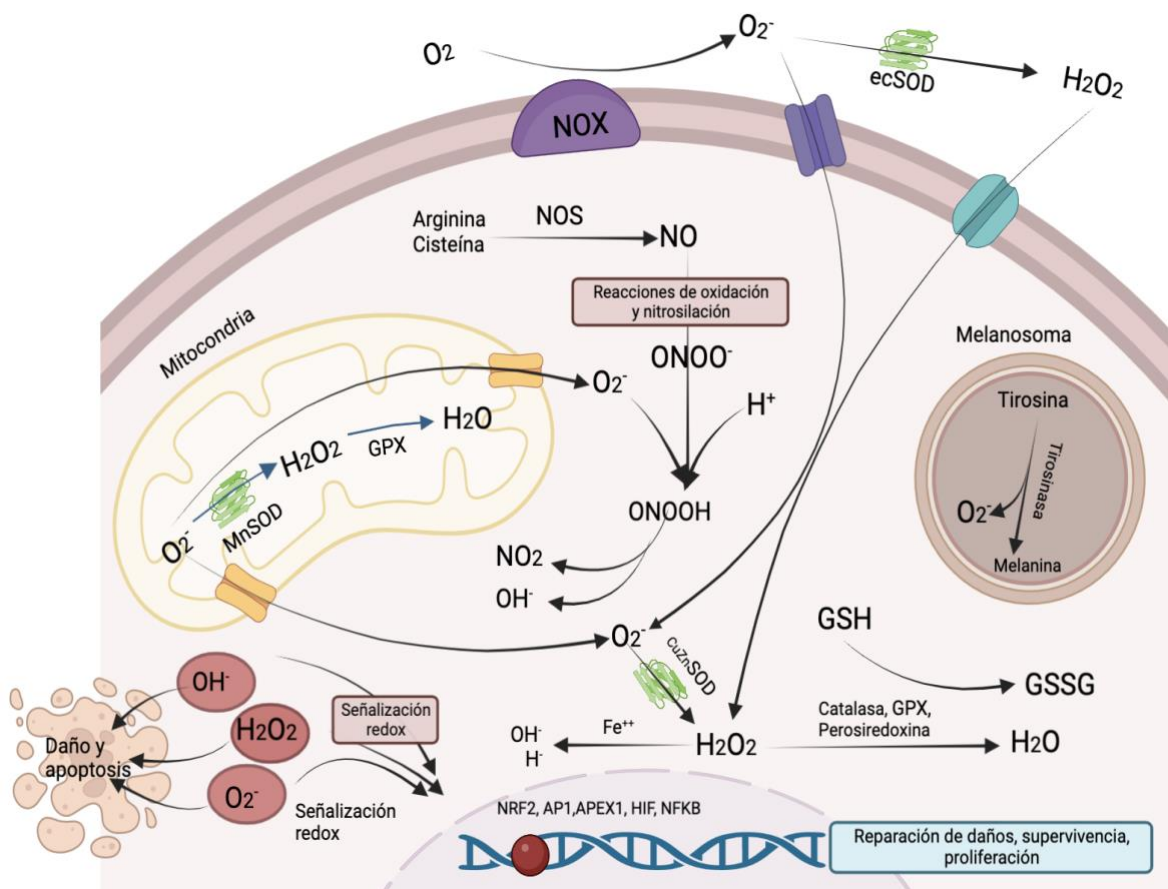
Dependiendo de si la resistencia de un tejido tumoral a la RI es inherente al mismo (mecanismos ya activos en las células cancerosas) o se desarrolla como respuesta a la irradiación (inducidos tras la irradiación) se distinguen dos categorías de radiorresistencia: intrínseca y adquirida. La radiorresistencia intrínseca está presente en las células cancerosas

incluso antes del inicio del tratamiento, y se basa en algunas características inherentes al tumor [161] y, en particular, a la presencia de las células madre cancerosas (cancer stem cell, CSC) en el grueso de la masa tumoral [162–164], que componen un reservorio de células autosuficientes con potencial autorrenovador y de mantenimiento del tumor. Estas células poseen unos rasgos característicos: el aumento de la actividad de reparación del ADN (mayor señalización de ATM), inhibición de la apoptosis (aumento de las proteínas antiapoptóticas), reducción de la progresión del ciclo celular (CSC latentes), y disminución de la producción de ROS (aumento de los eliminadores). Por lo tanto, si la dosis de radiación no es eficiente para reducir la población de CSCs lo suficiente, el número de estas células podría aumentar incluso si el tamaño del tumor ha disminuido [165]. En el caso del melanoma la radiorresistencia general se atribuye a las CSCs y a la sobreexpresión de genes reparadores en combinación con cascadas de mecanismos bioquímicos de reparación.

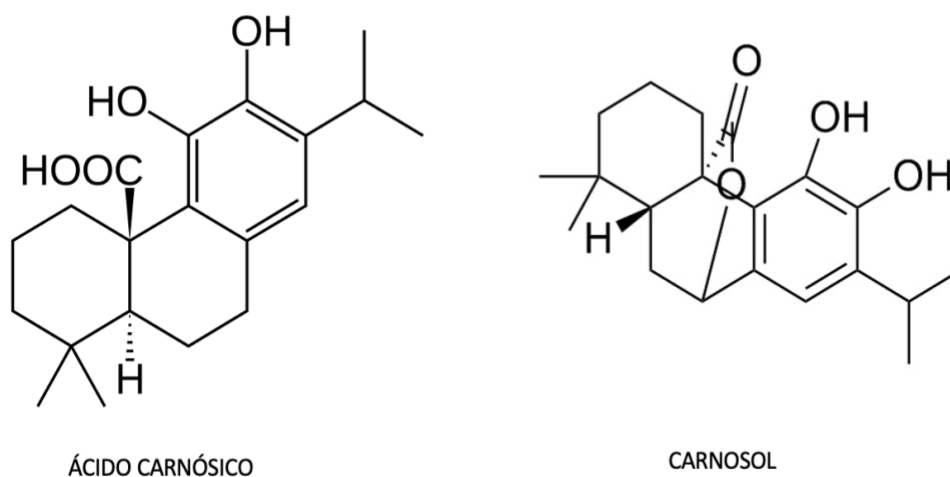
La radiorresistencia adquirida es un proceso de adaptación de las células cancerosas a los cambios inducidos por la propia irradiación, que finalmente resulta en una resistencia al tratamiento [166]. La activación de algunos factores de transcripción (FT) por la RI permite a las células cancerosas escapar a sus efectos. En la revisión llevada a cabo por Galeaz et al. (2021) [167] se desarrollan cuatro sistemas de FT que están implicados en el desarrollo de radiorresistencia tumoral. Destacan la familia de proteínas STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción). Actualmente, la familia STAT3 es un conocido activador de la transcripción codificado en el cromosoma 17q21.2. La proteína está compuesta por un dominio en espiral en el N-terminal, seguido de un dominio de unión al ADN, una secuencia enlazadora, que conecta este último con el dominio SH2 y, finalmente, el dominio de transactivación en el C-terminal [168]. En esta parte terminal, hay dos aminoácidos específicos, una tirosina y una serina, en posición 705 y 727, respectivamente, que son extremadamente importantes para la activación de la proteína. La fosforilación de estos dos residuos es necesaria para la activación de STAT3, que posteriormente puede homo o hetero-dimerizar y translocarse al núcleo, donde desempeña su papel de activador de la transcripción. La estimulación de STAT3 por parte de las citoquinas evidencia un vínculo entre las vías inflamatorias y la radiorresistencia. Esta observación puede verse reforzada por la implicación de otro FT relacionado con la inflamación en la radiorresistencia tumoral: el potenciador de la cadena ligera del factor nuclear kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) [167].

Existen nuevos enfoques de tratamiento del melanoma basados en terapias dirigidas e inmunológicas. La biología redox, incluidas las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), desempeña un papel fundamental en todos los aspectos de la fisiopatología del melanoma, desde el inicio hasta la progresión y las metástasis. La producción de melanina y la radiación UV están directamente implicados en la generación de ROS/RNS. En general, se ha asociado un estado oxidativo elevado con el melanoma, por lo que se han realizado muchos estudios para prevenir o tratar el melanoma utilizando antioxidantes esperando que contrarresten el estrés oxidativo [169]. Los melanomas sufren cambios funcionales y cambios metabólicos durante la metástasis que aumentan su capacidad de soportar el estrés oxidativo, lo que implica que equilibran los niveles intracelulares de ROS para favorecer su propia supervivencia. Este proceso adaptativo parece conducir a la generación de subclones celulares más resistentes. En la revisión llevada a cabo por Obrador E. et al (2019) [169] concluyen que existen resultados controvertidos (incluso opuestos) sobre el uso de posibles moléculas antioxidantes en la terapia del cáncer. No obstante, los efectos tanto anticancerígenos como procancerígenos parecen depender de la estructura química, de la dosis y de la concentración alcanzable.

En el estudio de Alcaraz et al. (2013) [140] se estudió el carnosol como agente radioprotector en células tumorales y no tumorales. Al ensayarlo en células de melanoma B10F16 observaron que la melanogénesis podría ser activada por el carnosol, alterando los equilibrios enzimáticos de la producción de glutatión y cisteína-liasa, comprometiendo el sistema de defensa redox intracelular y produciendo un aumento de la capacidad de daño celular inducido por la RI en las células neoplásicas [140]. A este efecto no esperado en las células de melanoma le llamaron efecto radiosensibilizante paradójico, ya que proporciona un efecto protector en células normales mientras que en las células de melanoma induce disminución de la supervivencia celular. Teniendo en cuenta estos resultados es posible que pudiera observarse también con otras sustancias antioxidantes que actuaran al mismo nivel que el carnosol. En la figura 3 se observa la estructura química de ambas moléculas, carnosol y AC.



**Figura 2.** Esquema simplificado de la generación y gestión de ROS y RNS en melanocitos y melanoma, adaptado de Obrador et al., (2019) [169]. En los melanocitos y células de melanoma la principal fuente conocida de ROS incluye las mitocondrias, los melanosomas, las enzimas NADPH-oxidasa (NOX) y las enzimas óxido nítrico-sintasa (NOS). El anión superóxido se transforma en peróxido de hidrógeno mediante las superóxidodismutasas (SOD) a nivel extracelular (ecSOD), citoplasmático (CuZnSOD) y a nivel mitocondrial (MnSOD). En este esquema, la NOX aparece en la membrana plasmática; sin embargo, se sabe que puede localizarse en otros compartimentos subcelulares. El superóxido atraviesa la membrana celular a través de poros de membrana, mientras que el peróxido de hidrógeno puede difundir libremente o atravesar membranas a través de acuaporinas. El peróxido de hidrógeno es metabolizado por la catalasa, GPX (glutatión peroxidadas) y peroxiredoxinas. En presencia de hierro ferroso, el peróxido de hidrógeno puede generar radicales hidroxilos mediante la reacción de Fenton. En presencia de NO, el superóxido forma peroxinitrito que oxida/nitrosila las proteínas. El peroxinitrito puede protonarse y el ácido peroxinitroso resultante puede descomponerse de nuevo en radical hidroxilo que también oxida proteínas. Un exceso de ROS daña las células e induce la apoptosis. Sin embargo, tanto el peróxido de hidrógeno como el superóxido pueden servir como moléculas de señalización para desencadenar una cascada de señalización redox en la que intervienen factores transcripcionales NRF2, AP1, APEX1, HIF y NFκB para la reparación de daños, la supervivencia y la proliferación.



**Figura 3.** Estructura química de ácido carnósico y carnosol. Similitudes y diferencias estructurales.

Por su parte Olivares A. et al, (2020) [170] en su estudio sobre el efecto del ácido rosmarínico en células de melanoma B16F10 también observaron un efecto aditivo entre la adición de ácido rosmarínico y exposición a RI, consiguiendo la modulación selectiva de la síntesis de GSH, obteniendo un efecto radioprotector en células no tumorales (por aumento del GSH o la capacidad de su síntesis) y consiguiendo un efecto lesivo en las células tumorales de melanoma estudiadas [170].



## **II. OBJETIVOS.**





## II. Objetivos.

Los objetivos que se pretenden alcanzar en este estudio son los siguientes:

### 2.1. Objetivo general.

1°. Evaluar el efecto radioprotector del ácido carnósico frente al daño biológico inducido por la radiación ionizante en las células directamente expuestas a la radiación ionizante y en las células receptoras del efecto bystander inducido por la radiación ionizante.

### 2.2. Objetivos específicos.

2°. Determinar la existencia de un posible efecto protector antígenotóxico del ácido carnósico frente al daño cromosómico inducido por los rayos X mediante técnicas citogenéticas: el ensayo de micronúcleos “*in vitro*” sobre linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético y los ensayos de micronúcleos “*in vivo*” sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea y en reticulocitos de roedor.

3°. Evaluar la existencia de un posible efecto radioprotector del ácido carnósico frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante mediante la determinación de la supervivencia celular con el ensayo del MTT y el ensayo clonogénico *in vitro* en células normales de próstata y en células de melanoma metastásico.

4°. Analizar el posible efecto radioprotector del ácido carnósico frente al daño citotóxico de la radiación ionizante mediante la determinación de la apoptosis celular radioinducida con el ensayo de la anexina-V y su relación con la concentración del Glutatión intracelular en células normales y en células de melanoma metastásico.

5°. Demostrar un efecto paradójico radiosensibilizante del ácido carnósico sobre las células de melanoma metastásico y sugerir un posible mecanismo de acción que podría constituir una nueva vía de desarrollo de estrategias de tratamiento en el melanoma; lo que supondría una nueva forma de abordaje de algunos tipos de cáncer tradicionalmente considerados resistentes a la radioterapia.



### **III. MATERIAL Y MÉTODO.**



## **III. Material y método.**

### **3.1. Material.**

#### **3.1.1. Muestras de sangre.**

Las muestras de sangre se han obtenido de voluntarios sin enfermedad conocida y, por ello, considerados supuestamente sanos. Las muestras de sangre se recogieron en tubos cónicos estériles VENOSAFE™ (Terumo Europe NV, Leuven®, Bélgica) preparados al vacío que contenían heparina (Heparin sodium 5%; Laboratorios Rovi®, Madrid). Los donantes eran no fumadores, no padecían enfermedades conocidas y no presentaban antecedentes de exposición a agentes clastogénicos. Todo voluntario expresó su consentimiento informado para el uso de su muestra sanguínea en esta investigación. Los donantes comprometidos se corresponden con dos mujeres de 18 y 20 años. Las muestras de sangre fueron extraídas por la mañana del día de la experimentación y utilizada inmediatamente para el ensayo de micronúcleos (MN) siguiendo el protocolo propuesto. Todos los procedimientos utilizados en este estudio respecto al manejo de muestras y tejidos humanos han sido previamente aprobados por el Comité de Bioseguridad Experimental de la Universidad de Murcia (ID: 472/2021) (Anexo I).



**Figura 4.** Extracción de muestras de sangre.

#### **3.1.2. Animales de experimentación.**

En este estudio se han utilizado ratones Swiss machos entre 9 y 11 semanas de edad y aproximadamente 20-25 gr de peso al inicio del estudio. Los animales se mantuvieron bajo

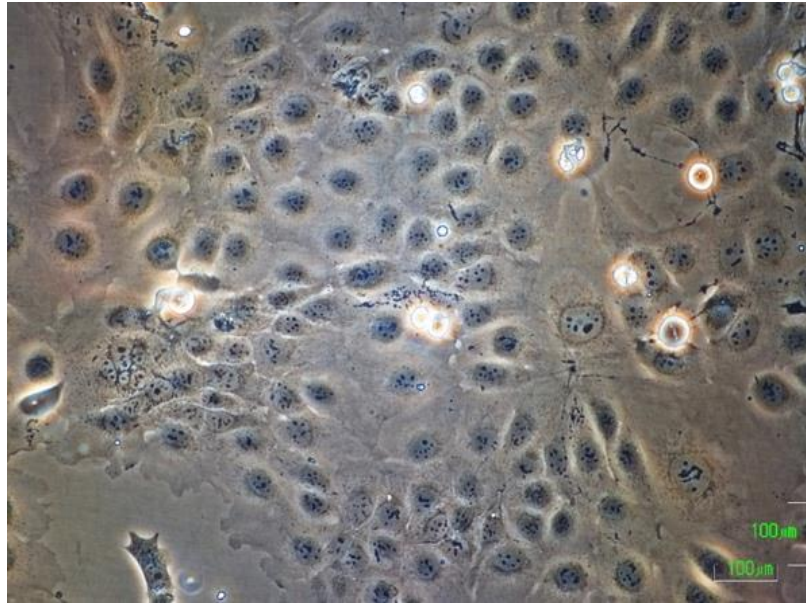
idénticas condiciones ambientales de temperatura, luz y humedad en todo momento. Se les proporcionó alimento y agua “*ad libitum*”. Todos los animales se obtuvieron y cuidaron durante el estudio en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia (Licencia REGAES300305440012). En todo momento se han seguido las recomendaciones éticas internacionales sobre el uso y manipulación de animales de laboratorio para la investigación biomédica (*Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations*). Todos los procedimientos utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Murcia (CECA: 510/2018) y por el Gobierno de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (nº A13211208) (Anexo I).

### **3.1.3. Líneas celulares.**

En los estudios *in vitro* se han utilizado las siguientes líneas celulares:

#### **a. Línea de células epiteliales normales de próstata humana PNT2.**

Línea celular epitelial de próstata humana de células no tumorales establecida a partir del tejido de próstata de un varón de 33 años, e inmortalizada mediante la transfección de un plásmido con el genoma del virus vacuolado de simio (SV40) con un origen de replicación defectivo. La firma comercial suministradora es HPACC (Salisbury, Reino Unido). Para el cultivo de esta línea celular se ha utilizado el medio RPMI 1640, tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con suero bovino fetal (SBF) Sigma-Aldrich (St. Louis: E.E.U.U) al 10%, glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub>.

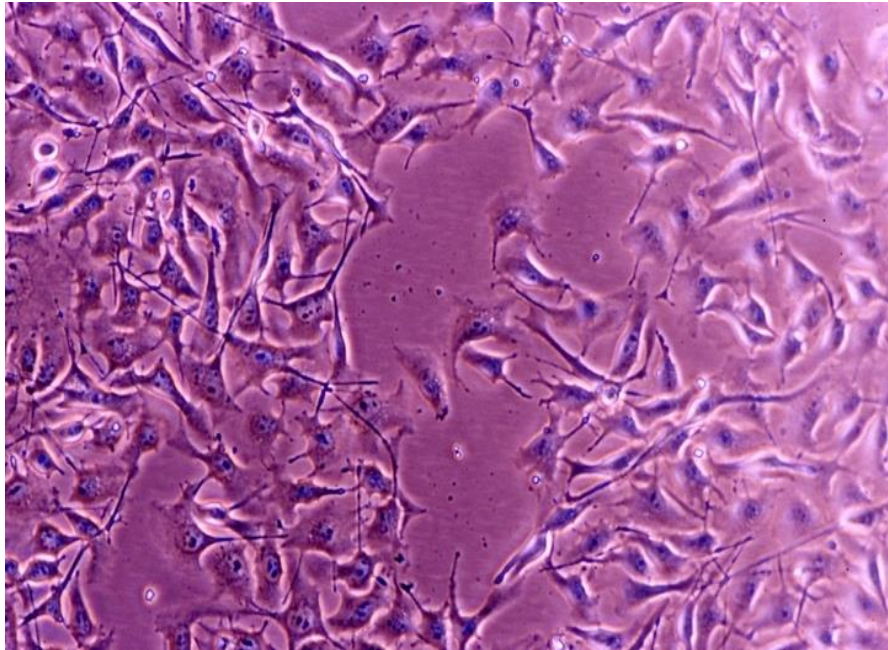


**Figura 5.** Células de la línea PNT2 en cultivo (Contraste de fases, 100X).

#### **b. Línea celular de melanoma metastásico murino B16F10.**

Es una variante metastásica de la línea original B16, establecida a partir del melanoma que surgió de forma espontánea en 1954 en la piel de la oreja de un ratón de la cepa no híbrida C57BL/6 en los laboratorios del National Institute of Health (NIH) de E.E.U.U. y proporcionada por el Dr. V. Hearning (NIH, Bethesda MD). Actualmente, la firma depositaria de esta línea celular es Naval Biosciences Laboratory, School of Public Health, University of California (Berkeley, California, E.E.U.U.). Se ha cultivado con medio DMEM de Sigma-Aldrich (St. Louis: E.E.U.U.), con L-glutamina y 4,5 g/l de glucosa, sin bicarbonato sódico, tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con un 10% de SBF Sigma-Aldrich (St. Louis: E.E.U.U.), 4 mM de L-glutamina, penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 μg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y una atmósfera con el 7,5% de CO<sub>2</sub>. Este cultivo adopta una morfología fusocelular con frecuentes prolongaciones dendríticas, que va cambiando a poligonal conforme va aumentando la densidad del cultivo. Los medios de cultivo para el mantenimiento celular, se usaron con el marcador colorimétrico de pH (rojo fenol) y se han conservado en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, dentro de estufas, con las condiciones de temperatura, humedad y concentración de CO<sub>2</sub> adecuados.





**Figura 6.** Aspecto morfológico de las células de la línea B16F10 (200X).

### **3.1.4. Equipos utilizados.**

- **Cabina de flujo laminar de presión positiva.**

Se ha utilizado una cabina de bioseguridad de flujo laminar Telstar Bio-II-A para conseguir un puesto de trabajo estéril. Esta cabina de flujo laminar elimina las partículas del aire para asegurar uniformidad y flujo libre de contaminación del aire utilizado.



**Figura 7.** Cabina de flujo laminar usada para la manipulación de cultivos y muestras biológicas.

- **Equipo Irradiador de Rayos X.**

Se ha utilizado un equipo productor de rayos X Irradiador Smart Laboratory-ray, Model 583 E, equipado con un tubo 200 E, (200 kV y 4,5 mA) (YXLON International AS Copenhagen, Dinamarca), ubicado en el Servicio de Protección Radiológica y de Gestión de Residuos del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia.



**Figura 8.** Equipo de rayos X utilizado: Smart Laboratory-ray, Model 583 E.

- **Electrómetro.**

Para conseguir determinar y monitorizar la dosis de radiación en tiempo real dentro de la cabina de irradiación se ha utilizado un equipo UNIDOS E equipado con una cámara sonda/ionización TW 30010-1 (PTW Freiburg, Alemania). Esta sonda ultrasensible posibilita la medición de dosis administrada en nuestras muestras dentro del irradiador de rayos X que fueron confirmadas posteriormente con dosimetría de termoluminiscencia.



**Figura 9.** Electrómetro con sonda utilizado en este estudio.

- **Equipo de HPLC.**

Para el análisis cromatográfico de las sustancias ensayadas se ha utilizado un equipo Hewlett-Packard (HP), HPLC 1100 System (Agilent technologies, Sta. Clara, USA) equipado con detector de diodos; como fase estacionaria se utilizó una columna A C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm id) con un tamaño promedio de partículas de 5 micras. La temperatura utilizada fue de 30 °C, el flujo de 1ml/min y la longitud de onda empleada de 280 nm.



**Figura 10.** Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

- **Espectrofotómetro.**

Para la cuantificación de absorbancia se ha utilizado el lector de placas FLUOstar Galaxy (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia). Este lector de placas tiene 4 modos de detección:

- Absorbancia UV/Vis (mediante filtros).
- Fluorescencia (intensidad, FRET).
- Fluorescencia Time-resolved (incluye TR-FRET).
- Luminiscencia.



**Ilustración 11.** Espectrofotómetro FLUOstar Galaxy.

- **Microscopio óptico.**

Para cuantificar la frecuencia de aparición de micronúcleos se usaron tres microscopios ópticos diferentes: Laborlux 12 (Leitz, Alemania), Hund V200 (Wetzlar, Alemania) y Olympus BX40 (Barcelona, España).



**Figura 12.** Microscopio OLYMPUS BX40 (vista lateral) y estación de análisis morfológico utilizando análisis de imágenes para la identificación de células binucleadas (BN) y binucleadas con micronúcleos (MNBN).

Además, las imágenes se escanearon para conservar una calidad de imagen de alta resolución en un equipo Leica SCN400 F. Esta técnica ha permitido un estudio doble ciego digital para evaluar el efecto biológico (frecuencia de micronúcleos) a través de la utilización de la imagen mediante el programa Digital Hub Management Web Service System de la Universidad de Murcia.

Link	Nombre	Tipo	Tamaño
	ImageCollection_000000901_2012-05-30 13_05_04.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000902_2012-05-30 12_59_45.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000903_2012-05-30 12_36_58.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000904_2012-05-30 12_38_25.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000905_2012-05-30 14_09_04.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000906_2012-05-30 14_08_49.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000907_2012-05-30 13_34_40.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000908_2012-05-30 13_24_47.acr	LeicaSCN	1
	ImageCollection_000000910_2012-05-30 14_31_24.acr	LeicaSCN	1

**Figura 13.** Preparaciones de genotoxicidad para microscopio virtual - digital con base de datos on line.



**Figura 14.** Vista aumentada de un campo en el microscopio virtual digital para su estudio genotóxico.

- **Dosímetros de Termoluminiscencia (TLDs).**

La determinación de la dosis de radiación ionizante administrada a las muestras de sangre estudiadas es un paso fundamental para establecer el efecto biológico buscado en el estudio de micronúcleos y, además, permite la realización de la curva dosis-respuesta (curva de luz, es la representación gráfica de la luz emitida por el TLD en función de la temperatura de calentamiento del material). Los dosímetros de termoluminiscencia son dispositivos que emiten luz cuando un material que ha sido expuesto a RI es calentado. En este estudio se usaron para comprobar las dosis absorbidas administradas a las muestras estudiadas. Los TLDs han sido utilizados extensamente durante varias décadas y están aceptados como la técnica más apropiada para realizar mediciones de dosis de RI. Los TLDs son cristales de fluoruro de litio sensibles a la radiación tratados con magnesio (Mg), cobre (Cu) y fósforo

(P) (GR-200r, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China). Estos dispositivos fueron colocados por pares en bolsas de plástico transparentes de 8x16 mm selladas y protegidas térmicamente del exterior. Las bolsas fueron codificadas y etiquetadas con tinta indeleble (figura 13). El pequeño tamaño de los dosímetros facilita su proximidad a las muestras de sangre en el equipo de irradiación. Los TLDs tienen forma redondeada (pastilla) de unos 4-5 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Un total de 50 dosímetros se colocaron por pares en 24 bolsas individuales. Una de estas bolsas contenía dosímetros que no fueron expuestos a radiación ionizante y fueron utilizados como controles.



**Figura 15.** Dosímetros de termoluminiscencia.

Tras la exposición de las muestras los dosímetros se procesaron en un lector automático Harshaw 5500 TLD con un sistema programable de calefacción mediante inyección de nitrógeno caliente, a través de una programación tiempo-temperatura adaptada al perfil de los diferentes materiales termoluminiscentes. Basado en la experiencia del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), para los cristales utilizados (LiF: Mg, Cu, P), fue definida una lectura cíclica a una velocidad lineal de calefacción de 15 °C/s desde 50 °C hasta 275 °C. La temperatura fue mantenida durante 12,7 segundos para un total de periodo de lectura de 26,7 segundos. Este ciclo asegura la completa lectura del detector hasta dosis altas como 1 Gy asegurando su reutilización posterior. Los TLDs fueron proporcionados por el CIEMAT del Ministerio de Industria y Energía, quien también monitorizó las lecturas de los TLDs para determinar la dosis de radiación en este trabajo. La evaluación de las dosis está basada en los análisis simples de curvas emitidas en los programas de ordenador desarrolladas por el CIEMAT. Unas dosis

de 50 Gy y 2 Gy se establecieron como las apropiadas para los procedimientos experimentales ensayados.

- **Citómetro de flujo.**

Las mediciones mediante citometría de flujo para la determinación de reticulocitos se llevaron a cabo con un equipo Becton Dickinson LSR Fortessa™ (figura 14) con opción de muestreo de alto rendimiento, capaz de manejar placas de pocillos múltiples (placas de 96 pocillos) y dotado de 5 líneas de láser que permite detectar 20 parámetros simultáneamente. Líneas de láser: Blue 488 nm 50 mW; Yellow-green 561 50 mW, Red 640 nm 40mW; Violet 405 nm 50 mW; UV 355 nm 20 mW. (BD Bio-sciences, San Jose, CA, USA).



**Figura 16.** Citómetro BD LSRFortessa™ X-20.

Las mediciones mediante citometría de flujo para la determinación de la apoptosis se llevaron a cabo con un equipo Citómetro BD FACSCalibur™ (figura 15) analizador de 6 parámetros (FSC, SSC y 4 fluorescencias) con óptica de excitación: láser azul: Argón 488 nm (15mw) y láser rojo: Helio-Neón 633 nm. Con sistema de adquisición en tubo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).



**Figura 17.** Citómetro BD FACSCalibur™.

- **Espectómetro.**

Para medir la absorbancia se utilizó un equipo FLUOstar® Omega de BMG Labtech (Ortenberg, Alemania). Es un lector de placas multimodo que permite la medición de la absorbancia de las muestras procesadas mediante distintos filtros UV/vis. Permite medidas de absorbancia de un espectro de 220 a 1000 nm y resoluciones de 1 a 10 nm (figura 16). Los resultados obtenidos tras el procesamiento de muestra son almacenados digitalmente mediante el software Reader control and MARS data análisis, que permite la realización de tablas de absorbancia y análisis de datos.



**Figura 18.** Espectómetro FLUOstar® Omega para medida de la absorbancia.



### **3.1.5. Reactivos químicos y extractos utilizados en este estudio.**

Los medios RPMI 1640 y Ham's F10, así como la Phytohemagglutina A (PHA), cytochalasina B, estreptomina, penicilina, solución salina fosfato-buffer (PBS), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide (MTT), suero de albúmina bovina (BSA fraction V) y 6-n-propyl-2-thiouracilo (PTU) se obtuvieron de Sigma-Aldrich® chemicals SA (Madrid, Spain). El suero bovino fetal (FBS) se obtuvo de Gibco™ (USA); el ácido acético glacial y el etanol de Scharlab® SL (Madrid, Spain). El metanol y el cloruro potásico se obtuvieron de Panreac® química SL (Madrid, Spain); la heparina sódica al 5 % de Rovi® Pharmaceutical Laboratories (Madrid, Spain). La rutina y la quercetina se han obtenido de Extrasynthese (Extrasynthèse S.A., Genay, France). El dimethyl sulfoxido (DMSO) de Laboratorios Merck (Merck, Darmstadt, Germany). La amifostina (WR-2721) o Ethyol® de Schering (Schering-Plough S.A., Madrid). El ácido carnósico (AC) se ha obtenido de Furfural Español S.A. (Nutrafur®, Alcantarilla, Murcia).

La RNasa A de páncreas bovino y la solución de yoduro de propidio (PI) de 1,0 mg/mL se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals S.A. (Madrid, España). El anticuerpo contra el receptor de transferrina CD71 de rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de Southern Biotech (Birmingham, EEUU).

Para la cuantificación de apoptosis se utilizó el kit Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog nos. V13241) obtenida de Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, España, Madrid.

La N-etilmaleimida (NEM), el tampón de lisis pasiva, el DTT (DL-dithiothreitol) acuoso con pureza del 99%, luciferina-NT, el reactivo de detección de luciferina, el glutatión y glutatión S-transferasa son de Promega Biotech Ibérica S.L. (Madrid, España).

## **Almacenamiento y preparación de los reactivos para su utilización en los ensayos.**

### **MTT.**

El 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide (MTT) se mantuvo almacenado a 0-5° C en una solución de 8 mg/ml preparado en PBS y almacenada a 4°C en ambiente sin luz. El periodo máximo de almacenamiento fue de 1 mes.

### **Dimetilsulfóxido (DMSO).**

DMSO (MW 78, 99.5% pureza) se mantuvo a temperatura ambiente. El dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, USA) es una sustancia de amplio uso en cultivos celulares y que se ha utilizado como disolvente de numerosos flavonoides. Por haberse utilizado como disolvente y por sus características estructurales y antioxidantes, el grupo al que se le ha administrado DMSO se le ha considerado como un grupo de animales independiente. Su estructura química es la siguiente: C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS.

El DMSO se ha utilizado al 5 %: 50 g de DMSO se han disuelto en 1000 ml de agua destilada y ha sido almacenado a 4 °C hasta su utilización. Su inclusión dentro de los grupos estudiados es doble: por un lado, es necesario conocer los posibles efectos sobre el procedimiento utilizado ya que se ha incorporado como agente indispensable para la solubilización de algunos flavonoides; por otro lado, su estructura presenta puentes disulfuro que clásicamente se aceptan como protectores frente a la radiación ionizante. Además, es un agente antioxidante que obliga a la discriminación de sus posibles efectos, ya que pueden solaparse con el de los flavonoides que vehiculiza.

### **Albúmina Bovina.**

Liofilizados de suero de albúmina bovina (fracción V) con una pureza mínima del 96% se almacenó en tubos de 20 mgr/l en PBS esterilizadas mediante filtros a 0-5 °C.

### **Solución de CD-71/RNasa.**

La solución de CD71/RNasa se utiliza para digerir el ARN en la prueba de micronúcleos en reticulocitos de ratón y cuantificación mediante citometría de flujo. Esta solución debe estar recién preparada para su utilización en el ensayo. Se ha de trabajar con

luz tenue para evitar su desnaturalización y consecuente pérdida de actividad. Se requiere una actividad suficiente de la RNasa A para digerir el ARN presente en las RET, ya que el PI se une tanto a ARN y como a ADN, y podría dar lugar a resultados inexactos. Se preparó suficiente mezcla de tampón de bicarbonato/RNasa/CD71-FITC de anticuerpos para el número requerido de muestras más un 10% extra, correspondiente a volumen "muerto". A cada muestra, se añadió 0,2 µl de anti-CD71-FITC (0,5 mg/ml) y 7 µl de RNasa A al tampón de bicarbonato (72,8 µl) para hacer un volumen total de 80 µl.

### **Ácido carnósico.**

El ácido carnósico (AC) es un compuesto fenólico con capacidad antioxidante presente en el romero (*Rosmarinus officinalis*). Se ha disuelto en DMSO a razón de 1 mg/ml. El carnosol y el ácido carnósico son los principios activos más importantes del romero. Se ha sugerido que son responsables del 90% de las propiedades antioxidantes de los extractos de romero, actuando como potentes inhibidores de la peroxidación lipídica en los sistemas microsomales y liposomales, y siendo buenos captadores de radicales peróxido y aniones superóxido. Además de sus propiedades antioxidantes también presentan propiedades anticarcinogénicas.

El AC es un compuesto insoluble en agua, parcialmente soluble en alcoholes y soluble en disolventes orgánicos y aceites, por lo que se solubilizó en DMSO en una proporción de 1 mg/ ml DMSO.

### **Anexina V.**

Para la determinación de la apoptosis celular mediante citometría de flujo, se utilizó el Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog nos. V13241) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, España, Madrid), que permite medir la apoptosis temprana mediante la detección de la expresión de fosfatidilserina (PS) y la permeabilidad de la membrana. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células tratadas se lavaron una vez con solución salina fría tamponada con fosfato (PBS) y se cosecharon. Tras centrifugar y resuspender las células, se añadieron 5 µL de anexina V

Alexa Fluor® 488 (componente A) seguidos de la adición de 1 µL de 100 µg/mL de PI a cada 100 µL de suspensión celular. Tras 15 min de incubación, se añadieron 400 µL de tampón a las muestras en hielo. Las células teñidas se analizaron inmediatamente por citometría de flujo, midiendo la fluorescencia a 530 nm y 575 nm utilizando 488 nm de excitación en FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

## **3.2. Método.**

### **3.2.1. Actividad genoprotectora.**

#### **3.2.1.1. Ensayo “*in vitro*” de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados con bloqueo de citocinesis con citochalasin B (CBMN).**

##### **Sangre periférica, muestras de linfocitos.**

Las muestras de sangre se recogieron en tubos de vacío para recolección de sangre VENOSAFE™ (Terumo Europe NV, Lovaina, Bélgica) estériles que contenían heparina (heparina sódica al 5%, Rovi Lab, Madrid). La sangre se dividió en alícuotas en porciones de 2 ml en crioviales. Las alícuotas de sangre de los donantes se dividieron en dos cohortes para la construcción de una curva dosis-respuesta y para la evaluación de la actividad antimutagénica de algunas de las sustancias de prueba.

##### **Construcción de curvas de respuesta a la dosis.**

Las muestras de sangre se dividieron en 2 grupos:

- Grupo 1: catorce crioviales que contenían 2 ml de sangre del donante se usaron para la construcción de una curva dosis-respuesta. De estos, 2 viales que contenían sangre no se irradiaron y se consideraron muestras controles o como viales de control (frecuencia micronucleos basal) mientras que las 12 muestras de sangre restantes se expusieron a diferentes dosis de 2 Gy de rayos X.
- Grupo 2: actividad genoprotectora *in vitro* de las sustancias ensayadas. Este segundo grupo consistió en tubos con partes alícuotas de sangre de 2 ml en crioviales, que se usaron para evaluar el efecto antimutagénico del AC (pre y post irradiación).

Dos de estas muestras de sangre se usaron como controles experimentales: una como frecuencia de MN inicial o control no irradiado y otra como control irradiado. Se reservó una muestra de sangre para la sustancia de prueba utilizada, y esto sirvió como control de la sustancia de prueba. Estas muestras solo recibieron la sustancia de prueba, pero no estuvieron expuestas a la RI. Algunas muestras de sangre se trataron con la sustancia de prueba antes de la exposición a la irradiación y se denominó grupo de preirradiación, el resto se irradió antes de la adición de la sustancia de prueba y, en consecuencia, se denominó grupo de postradiación.

### **Técnica de determinación de frecuencia de micronúcleos.**

Este ensayo se basa en la utilización de la técnica de MN en cultivos de linfocitos obtenidos de sangre periférica humana y bloqueados citocinéticamente en su primera división mitótica, descrito por Fenech (1986, 1990, 2000) [171–173] y considerado como el procedimiento más adecuado para el análisis citogenético del daño genotóxico inducido por radiación ionizante de forma sistemática [49].

Para su realización, en primer lugar se obtuvieron muestras de sangre de tres donantes sanos, fueron heparinizadas, cultivadas en 4,5 ml de medio de cultivo celular y expuestas a los rayos X para posteriormente realizar el ensayo de MN bloqueados por citocalasina B (CBMN) descrito por Fenech y Morley y adaptado por el Organismo Internacional de Energía Atómica para reducir la cantidad de medio de cultivo utilizado [174]. En los grupos tratados con AC, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de una concentración de 25  $\mu\text{M}$  de solución de AC a 2 mL de sangre.

Todos los procedimientos utilizados para la manipulación de muestras humanas fueron aprobados por el Comité de Bioseguridad Experimental de la Universidad de Murcia (ID: 472/2021). Todos los experimentos se repitieron seis veces.

**I. Preparación del medio de cultivo.** En primer lugar se procedió a la preparación de las sustancias añadidas al medio de cultivo como se explica a continuación:

a) Preparación de la Fitohemaglutinina.

- b) Preparación de la Cytochalasina B.
- c) Preparación de la Solución Hipotónica de Cloruro Potásico.
- d) Preparación del Tampón Fosfato.
- e) Preparación de la Solución Fijadora.

- a) Preparación de la Fitohemaglutinina.

La Fitohemaglutinina o PHA (Sigma-Aldrich, Madrid) se obtuvo en presentaciones de 1 y de 5 mg guardada a 2-8 °C hasta su utilización. Para utilizarla, la PHA previamente debía estar disuelta en medio de cultivo Ham F10 en ambiente estéril a razón de 1 mg de PHA/ml de HAM F10 y almacenada a -20 °C para su conservación. Habitualmente se preparan 100 ml de medio de cultivo y como se precisan 16 µg PHA/ml se suministraron 1.600 µg PHA para 100 ml de medio de cultivo o, lo que es lo mismo, 1'6 mg de PHA. Como la concentración obtenida fue de 1 mg/ml de HAM F10, para administrar 1'6 mg de PHA se añadieron 1'6 ml de la disolución de PHA previamente preparada. Su función es el estímulo de la división o proliferación celular de los linfocitos que, en condiciones normales, no se dividen.

- b) Preparación de la Cytochalasina B.

La cytochalasina B o Cyt B (Sigma-Aldrich, Madrid) realiza el bloqueo de la citocinesis mediante bloqueo tras la primera división mitótica; esta sustancia se añadió a cada uno de los cultivos a las 44 horas del mismo en cabina estéril. La Cyt B se obtuvo en presentaciones de 1 y de 5 mg y se almacenó a una temperatura de -20 °C hasta su utilización. Para ser utilizada, la Cyt B debía ser disuelta previamente en DMSO al 100 % en ambiente estéril. Dicha disolución se realizaba a razón de 1 mg de Cyt B por cada 0,5 ml de DMSO. Posteriormente y en cabina estéril, esta disolución era alícuotada en tubos de 1 ml de capacidad a razón de 0,1 ml de disolución/tubo al que se añadían 0,9 ml de PBS quedando alícuotas que presentaban la siguiente proporción: 0,9 ml de PBS, 0,1 ml de DMSO y 200 µg de Cyt B. Finalmente, estas alícuotas eran almacenadas a -80°C y sólo se descongelaban en el momento de ser utilizadas, es decir, para su adición al cultivo. La concentración de Cyt B que se añadía al cultivo era de 3 µg/ml. Como cada cultivo presentaba un volumen de 10 ml, se añadieron 30 µg de Cyt B, para lo que se precisaba 150 µl del contenido de cada tubo previamente preparado.

c) Preparación de la Solución Hipotónica de Cloruro Potásico.

La disolución 0,075 M de cloruro potásico (ClK) se prepara con 5,59 g de ClK (Probos, Madrid) en 1 l de agua destilada. Esta disolución hipotónica tiene como objetivo aumentar el tamaño de las células binucleadas permitiendo una mejor visualización de las mismas al microscopio óptico.

d) Preparación del Tampón Fosfato.

La disolución de tampón fosfato 10 mM con un pH de 6,2 se obtuvo diluyendo en 1 l de agua bidestilada:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O -----1,560 g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O -----2,340 g/l

e) Preparación de la solución fijadora.

La solución fijadora utilizada se preparó mezclando 3 partes de alcohol metílico con 1 parte de ácido acético glacial. Esta disolución debe ser preparada en el momento de ser utilizada.

**II. Descripción de la técnica de MN. A continuación se exponen los pasos seguidos hasta la obtención de las preparaciones para su lectura:**

1. Preparación del medio de cultivo con los siguientes componentes: medio HAM F10 85%, SBF (Sigma-Aldrich, Madrid), 15%, fitohemaglutinina (PHA)(Sigma-Aldrich, Madrid) 16 µg/ml, glutamina 1 µg/ml, antibióticos (Sigma-Aldrich, Madrid): penicilina sódica 100 UI/ml y estreptomina 100 µg/ml.

2. Cultivar 1 ml de cada muestra de sangre heparinizada (irradiada o no y/o tratada o no) en frascos de cultivo de 25 ml en una estufa a 37 °C y ambiente enriquecido con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72-76 horas junto con 9 ml de medio de cultivo preparado como se ha comentado anteriormente.

3. Transcurridas 44 horas de cultivo añadir 150 µl de la disolución de cytochalasina B (Cyt B) a cada cultivo. Estos 150 µl de disolución, contienen 30 µgr de Cyt B (3 µg/ml).

4. Posteriormente, continuar el cultivo durante otras 28-32 horas, siendo el tiempo total de cultivo de hasta 72-76 horas.

5. Transcurrido este tiempo trasvasar el contenido de los frascos de cultivo a tubos cónicos de 15 ml y lo centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm (Heraeus, Minifuge T, Madrid).

6. Extracción del sobrenadante y agregar 8 ml de solución hipotónica de CIK. De esta forma se obtiene una mezcla que se incuba nuevamente en estufa durante 3 minutos, en las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

7. Centrifugar el cultivo a 800 rpm durante 8 minutos, decantar el sobrenadante y resuspender en 8 ml de fijador (Alcohol metílico: Ácido Acético Glacial, 3:1) que se vuelve a centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Este último paso es necesario (fijación y centrifugación) 3 ó 4 veces, hasta obtener un sobrenadante transparente. De este modo, se consigue aislar los linfocitos que se resuspenden en un volumen apropiado de fijador (0,5 ml).

8. Realizar las preparaciones microscópicas colocando la suspensión celular gota a gota sobre portaobjetos enfriados previamente y que, posteriormente, se van a secar en corriente de aire suave.

9. A las 24 horas, se puede proceder a la tinción de las preparaciones por inmersión:

a. En primer lugar se procede a la inmersión en una solución de May-Grünwald puro (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 3 minutos.

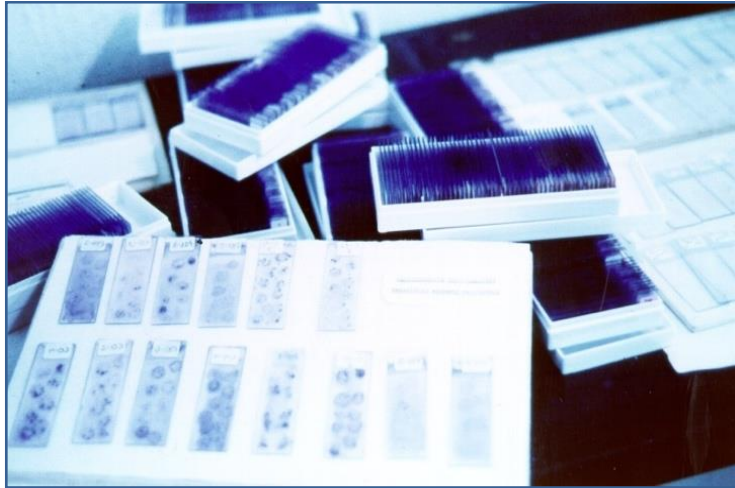
b. Seguidamente, se pasan durante 2 minutos por solución de May-Grünwald al 50 % (50 % May-Grünwald y 50 % agua destilada (Braun, Melsungen, Alemania)).

c. Posteriormente y sin lavarlas, se pasan a solución Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 2 minutos más.

10. Finalmente se lavan las preparaciones sumergiéndolas individualmente en tampón fosfato 100 mM pH 6,2 y se dejan secar al aire.

11. Para terminar, las preparaciones microscópicas (figura 19) se montan con portaobjetos quedando definitivamente preparadas para su estudio mediante microscopía óptica.





**Figura 19.** Preparaciones microscópicas tras la tinción con May-Grünwald y Giemsa para determinación de la frecuencia de MN.

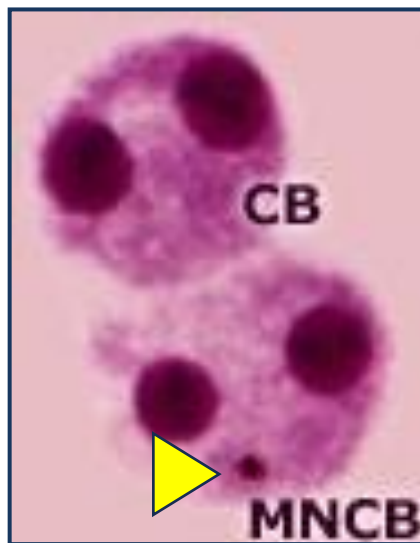
### **III. Criterios de recuento de micronúcleos.**

Los portaobjetos con las preparaciones microscópicas obtenidas de los cultivos de las muestras de sangre fueron digitalizadas con un escáner Leica SCN400F equipado con un Digital Image Hub (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, EE.UU.). Las preparaciones fueron estudiadas por tres especialistas (dos radiobiólogos con más de diez años de experiencia en estudios citogenéticos y un especialista en anatomía patológica (citopatología) con más de quince años de ejercicio profesional) para confirmar las imágenes dudosas de CBMN.

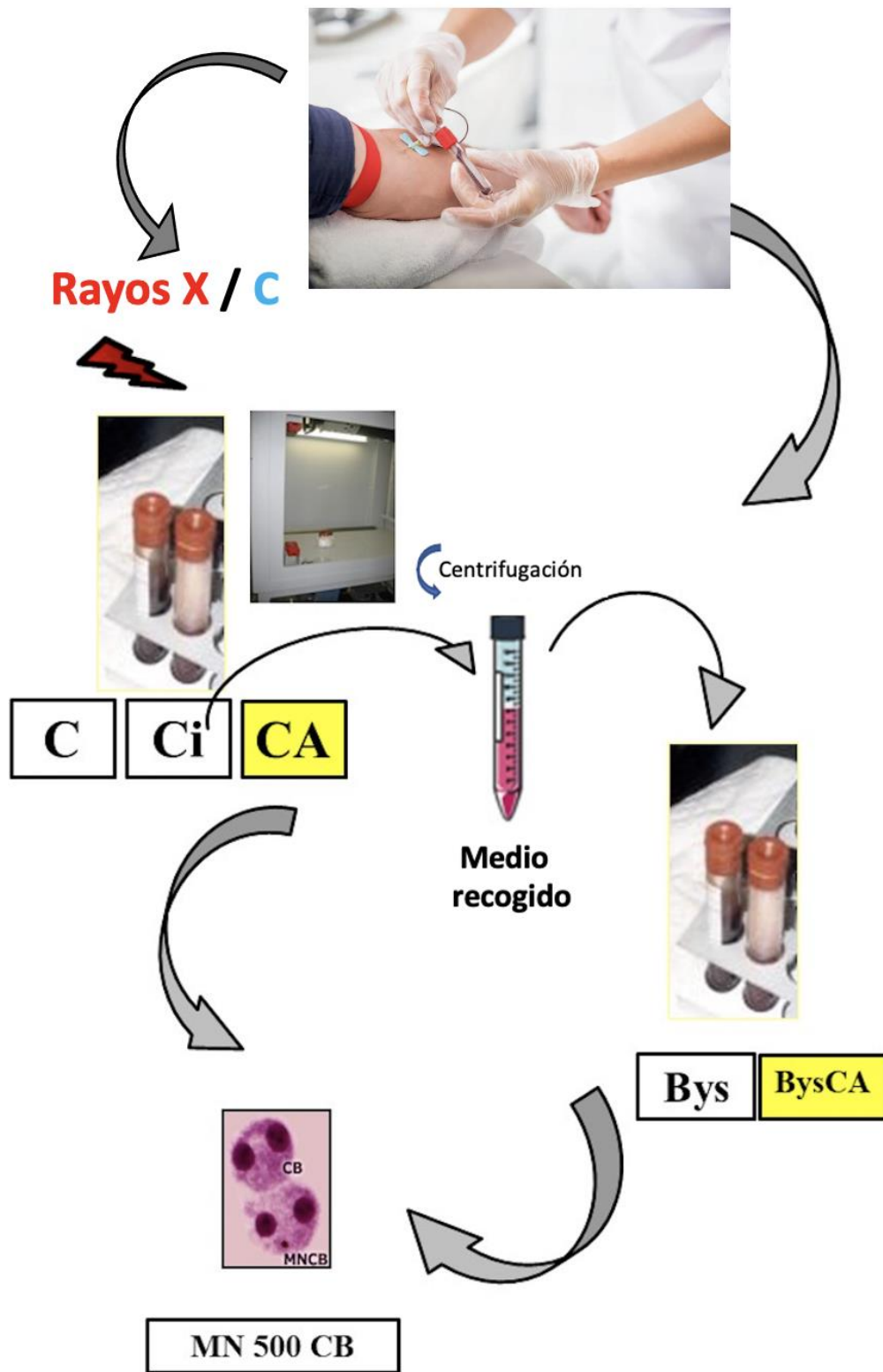
El recuento de MN en las preparaciones microscópicas de linfocitos humanos se realizó sobre 500 células binucleadas (CB) en cada una de las 6 preparaciones que se obtuvieron de los 2 cultivos realizados por cada muestra de sangre (1 muestra de sangre, 2 cultivos celulares y 6 preparaciones microscópicas). Por lo que, aunque las cifras de micronúcleos se han presentado por 500 células bloqueadas (MN/500 CB), el estudio corresponde al análisis de 3000 CB para cada uno de los valores mostrados, obtenidos por 3 observadores independientemente. Las muestras estudiadas se mezclaron y codificaron sin conocimiento previo de los resultados aportados por los otros especialistas durante el proceso de análisis.

El recuento fue realizado a triple ciego, desconociendo las características de la preparación observada, obteniéndose un único valor para cada punto que corresponde a la media de las 6 lecturas diferentes para cada una de las muestras. Se siguieron los criterios para el recuento de micronúcleos establecidos por Almassy en 1987 [175]:

- Los MN deben tener la misma estructura que el núcleo principal.
- Los MN deben ser más pequeños que el núcleo principal: no excediendo de la mitad del tamaño del núcleo principal o dos veces la longitud normal de un cromosoma.
- Los MN deben ser redondos o esféricos y estar separados visiblemente del núcleo principal.
- En contraste con las partículas no nucleares, los MN no deben mostrar refractibilidad a la luz.
- Los MN se cuentan sólo en células que tengan conservado el citoplasma.
- La frecuencia de aparición de MN ha de seguir la cinética de división celular.



**Figura 20.** Imagen microscópica de dos linfocitos o células binucleadas con el citoplasma conservado (CB) en dónde una de ellas presenta un micronúcleo en el citoplasma, señalado por flecha en amarillo (MN CB) (MG-G. 400x).



**Figura 21.** Esquema del protocolo experimental de ensayo de CBMN donde se observan los distintos pasos seguidos: recogida de muestras de sangre de donantes sanos, irradiación, recogida de medio de sangre irradiada para evaluación de efecto bystander, fijación y lectura para determinación del número de MN por cada 500 células con bloqueo de citocinesis en cada una de las condiciones del ensayo: control (C), control irradiado (Ci), células irradiadas tratadas con AC (CA), células tratadas con medio de sangre irradiada (Bys), células tratadas con medio de sangre irradiada y AC (BysCA).

### 3.2.1.2. Ensayo de micronúcleos “*in vivo*” sobre reticulocitos de ratón. cuantificación mediante citometría de flujo (MNRET).

El test de MN “*in vivo*” sobre médula ósea de ratón es un test ampliamente utilizado para la determinación “*in vivo*” del efecto genotóxico y mutagénico de diferentes agentes químicos y físicos y que fue descrito originalmente por Schmid en 1975 [176].

**Técnica:** Los animales utilizados en este experimento se han sacrificado por descerebración traumática para proceder a la exéresis de la médula ósea de ambos fémures, según la técnica descrita por Von Ledebur y Schmid [177] en 1973 y Schmid [176] en 1975 cuyos pasos se describen detalladamente a continuación:

1. Exposición de los animales de experimentación a 50 cGy de rayos X (figura 22).



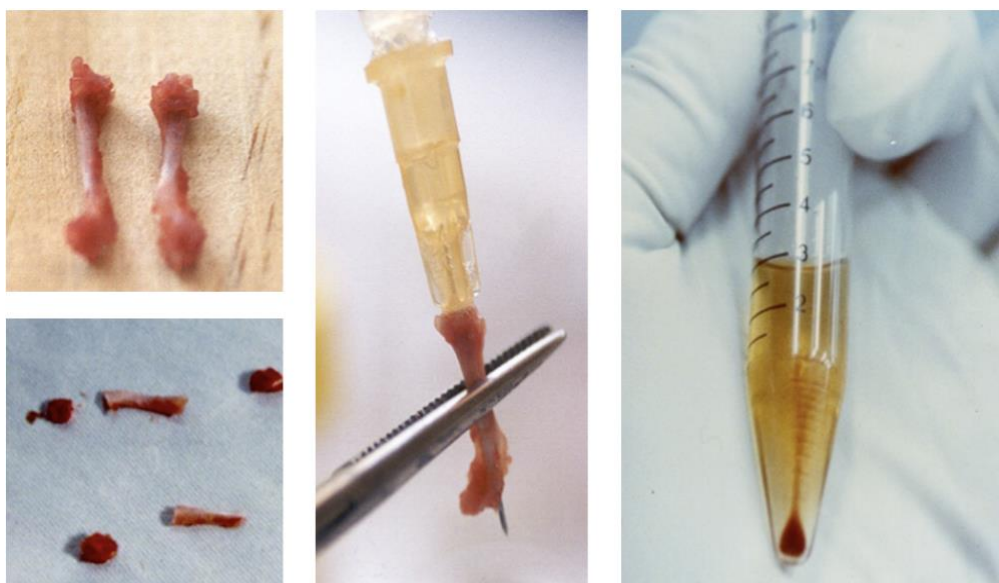
**Figura 22.** Detalle de la exposición de los animales de experimentación a la radiación ionizante *in vivo*.

2. Tras 24 horas de la exposición se procede al sacrificio de los animales por dislocación cervical e, inmediatamente, disección de los fémures, limpiándolos de todo resto de músculos y tendones (figura 23).
3. Se cortan las epífisis de los fémures y mediante una jeringa de insulina (24G), se hace fluir suero bovino fetal (Sigma, Madrid) por la diáfisis femoral de forma que arrastre la médula ósea que contiene, la cual se recoge en tubos cónicos de 15 ml de capacidad (figura 24).



**Figura 23.** Técnica de disección de ambos fémures para extracción de médula ósea.

4. Usando una pipeta Pasteur con bulbo de goma, se pipetea enérgicamente el contenido del tubo hasta obtener una suspensión celular sin grumos (figura 25).
5. Se deja reposar durante 5 minutos y se centrifuga, posteriormente, a 1000 rpm durante 5 minutos, en centrífuga Centromix 549 (Selecta, Madrid).
6. Según el volumen de sedimento obtenido, se extrae el sobrenadante con una pipeta Pasteur hasta dejar aproximadamente 0,2 ml; posteriormente, se agita bien hasta obtener una suspensión homogénea.
7. Se hace una extensión dejando caer a unos 2-3 cm una gota del líquido obtenido a modo de frotis sanguíneo.
8. Se dejan secar al aire durante 24 horas.
9. Se tiñen con May-Grünwald puro (Analema, Vorquímica S.L, Vigo) durante 3 minutos.
10. Se retira el 50% del colorante y se reemplaza por agua destilada, dejándolo en esta solución durante 2 minutos.
11. Sin lavar, se tiñen con una solución de Giemsa (Probus, Madrid) diluido 1:6 en tampón fosfato 100M, pH 6,2 y, se mantiene durante 2 minutos más.
12. Se lavan los preparados sumergiéndolos uno por uno en agua destilada.
13. Se limpia la parte inferior del portaobjetos con Xilol (Probus, Madrid) y las preparaciones se dejan secar al aire.
14. Se montan con cubreobjetos, quedando dispuestas para su estudio microscópico



**Figura 24.** Detalle de los fémures disecados y tras el proceso de extracción medular.

#### **Determinación de la frecuencia de micronúcleos mediante microscopía óptica.**

Las preparaciones de médula ósea obtenidas en todos los experimentos realizados se han analizado por dos observadores independientemente utilizando microscopía óptica. Para el recuento y análisis de MN se ha empleado sistemáticamente una magnificación de 400 aumentos y, en los casos de comprobación y/o discriminación, se han utilizado 1000 aumentos con aceite de inmersión.

En los experimentos se han obtenido dos preparaciones de cada uno de los animales utilizados. En cada una de esas preparaciones se ha procedido al recuento de 500 eritroblastos policromatófilos (PCEs) para determinar la frecuencia de aparición de MN en cada uno de los animales. Este valor se ha expresado como MN/1000 PCEs para cada uno de los animales estudiados.

El recuento se ha realizado desconociendo las características de la preparación observada, obteniéndose un único valor para cada punto que va a corresponder con la media de las lecturas para cada una de las muestras.

La ratio PCEs por NCEs (P/N) y la ratio PCEs por Eritrocitos (PCEs + NECs) (P/E) fueron determinados para evaluar el posible efecto citotóxico de los tratamientos físicos y químicos.



**Figura 25.** Detalle de la cabina en el interior del equipo de rayos X. Obsérvese la colocación de los animales inmovilizados y conscientes para una irradiación corporal total; y, la colocación de las muestras sanguíneas durante la exposición a rayos X.

### **Técnica de ensayo de MN en reticulocitos de médula ósea de ratón.**

El análisis de micronúcleos (MN) en reticulocitos (RET) basado en la citometría de flujo se realizó según la técnica descrita por Balmus et al. [178]. Se empleó un citómetro de flujo Becton Dickinson LSR Fortessa con opción de muestreo de alto rendimiento, capaz de manejar placas de pozos múltiples (96 pozos) y equipado con láseres azul de 488 nm y verde de 561 nm (BD Bio-sciencies, San Jose, CA, USA). La fluorescencia emitida por el anti-CD71 conjugado con FITC y el yoduro de propidio (PI) se recogió a través de un filtro de paso de banda de 530/30 nm y 610/20 nm, tras ser excitado por los láseres azul de 488 nm y verde de 561 nm, respectivamente. El ensayo detecta niveles bajos de inestabilidad del genoma que no pueden identificarse fácilmente mediante el fenotipado clásico, utilizando 25  $\mu$ l de sangre.

Los pasos seguidos para la preparación de las muestras para su lectura fueron los siguientes:

1. Recoger 50  $\mu$ l de sangre venosa de la cola del ratón y diluir en 300  $\mu$ l de solución de heparina en un tubo de 1,5 ml.
2. Extraer 150  $\mu$ l de la mezcla de heparina y sangre, y verter directamente sobre la alícuota de 2 ml de metanol frío (sacada directamente del congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) utilizando una pipeta y tapar el tubo de 15 ml. Repetir este paso para el tubo duplicado. La muestra de sangre debe permanecer de color rojo brillante en el fijador.
3. Invertir la muestra 4-5 veces para evitar la agregación, y guardar los tubos a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante al menos 12 h.
4. Trabajando en hielo, añadir 12 ml de tampón de bicarbonato frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ), y tapar e invertir los tubos de 15 ml para mezclar el contenido.
5. Centrifugar los tubos a 500 G durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. Verter el sobrenadante, añadir 200  $\mu$ l de tampón de bicarbonato frío y resuspender el pellet de células pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo.
7. Transferir 20  $\mu$ l de muestra a cada pocillo de la placa de 96 pocillos 96 con capacidad de 0,8 ml (ABgene, # AB-0859). Añadir 20  $\mu$ l de cualquier muestra a tres tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para la preparación del control sin tinción, el control sólo PI y el control sólo CD71-FITC, que son necesarios para la configuración de la citometría de flujo.
8. Añadir 80  $\mu$ l de solución de CD71-FITC/RNasa a las muestras de ensayo de la placa y al tubo de control de una sola tinción de CD71-FITC. Añadir 7  $\mu$ l de RNasa y 73  $\mu$ l de tampón a los tubos de control sin tinción y de control sólo PI.
9. Cubrir la placa con papel de aluminio e incubarla durante 45-60 min a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación suave (60 r.p.m) en un agitador.
10. Lavar las muestras (en pocillos y tubos Eppendorf) añadiendo 600  $\mu$ l de tampón de bicarbonato frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y centrifugarlas a 500 g durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
11. Eliminar con una pipeta el sobrenadante de los tubos de control.
12. Resuspender los pellets en 500  $\mu$ l de tampón de bicarbonato pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo.
13. Transferir 200  $\mu$ l de muestra a una placa de 96 pocillos de fondo plano y transparente.

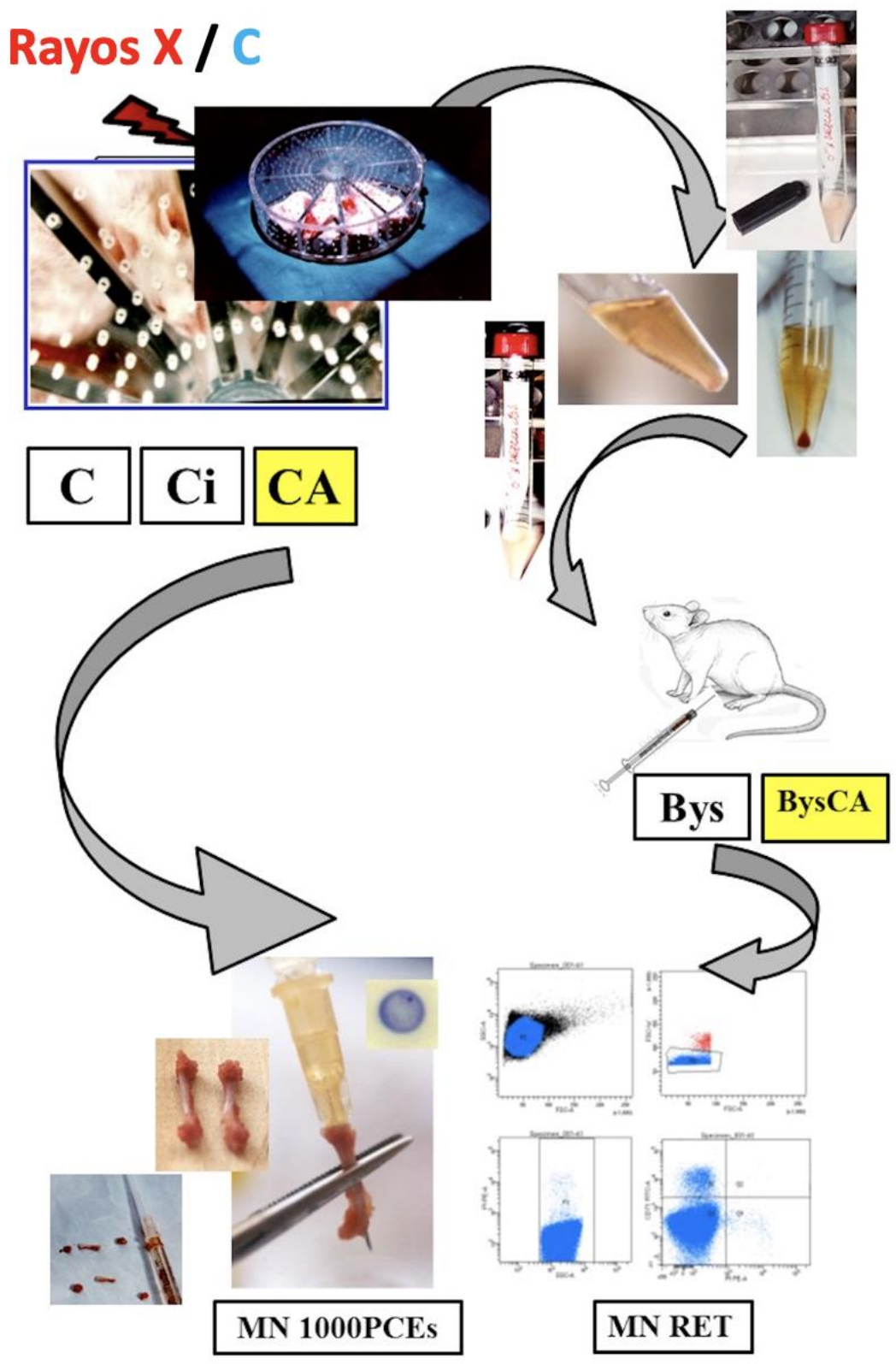


### **Análisis mediante citometría de flujo:**

1. Transferir 500  $\mu$ l de cada muestra de control a tubos de poliestireno de fondo redondo de 5 ml.
2. Utilizando el control no teñido, adquirir eventos con ejes de dispersión lateral logarítmica (SSC-A-log) frente a la dispersión frontal lineal (FSC-A-Lin). En el diagrama SSC-versus-FSC aparecerán 2-3 poblaciones de glóbulos rojos. Se centra la población principal (eritrocitos) se crea la primera puerta (R1) justo dentro de la población de eritrocitos.
3. Aislar los dobletes trazando FSC-W-Lin frente a FSC-A-Lin y establecer la puerta R2 alrededor de las células individuales.
4. Añadir 2,5  $\mu$ l de PI al tubo de control de sólo PI, dejar unos minutos y adquirir los eventos. Ajustar el voltaje y la ganancia para asegurar que todos los eventos quedan dentro de los ejes, y dibujar una puerta de cuadrante para separar las poblaciones positivas y negativas.
5. Se repite el paso anterior para el control de sólo CD71-FITC.
6. Utilizar el control de una sola mancha PI para identificar los eventos causados por la autofluorescencia eliminarlos estableciendo la puerta R3.
7. En los ejes biexponenciales CD71-FITC frente a PI, se establece la puerta de las cuatro poblaciones diferentes (RET, Q1; MN-RET, Q2; MN-NCE, Q3; NCE, Q4; Fig. 5d).
8. Cambiar el citómetro de flujo al modo de placa de pocillos múltiples.
9. Configurar el volumen a 70  $\mu$ l, las mezclas a 4 y la velocidad de flujo volumétrico a 0,5  $\mu$ l o 1  $\mu$ l/s (para lograr ~ 1000-2000 eventos por segundo).
10. Agregar 1  $\mu$ l de PI a cada pocillo de la placa utilizando un multipipeteador, cargando 24 pocillos a la vez.
11. Cargar el protocolo guardado y exportar y guardar los datos.
12. Repetir el análisis (crear la compuerta R1 alrededor de los eritrocitos, aislar los dobletes y establecer la compuerta R2, eliminar la autofluorescencia estableciendo la compuerta R3, compilar las cuatro poblaciones).
13. Para calcular el % de formación de micronúcleos (MN) se utilizaron los recuentos absolutos de eventos para cada uno de los cuadrantes indicados.

Se configuró un muestreador de alto rendimiento para mezclar cada muestra de 2 a 4 veces, con lo que se adquirieron 196.000 eventos por muestra a una velocidad de 1.000 a 2.000 eventos por segundo. La preparación de controles individuales con fluorocromo y tinción de la muestra sobrante se utilizó para establecer las puertas regionales para el análisis de la población de células eritrocitarias. Se puntuaron aproximadamente 196.000 eventos por animal para obtener la frecuencia de reticulocitos micronucleados en la sangre (MN-RET), que se calculó utilizando los eventos absolutos de los diferentes cuadrantes obtenidos del software mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MN-RET} = [\text{MN-RET}/(\text{RET} + \text{MN-RET})] \times 100.$$



**Figura 26.** Esquema del procedimiento en el análisis de micronúcleos en eritrocitos de ratón con microscopía óptica y mediante citometría de flujo.

### **3.2.2. Estudios de citotoxicidad:**

#### **3.2.2.1. Ensayo de viabilidad celular con MTT.**

##### **Mantenimiento y conservación de los cultivos.**

Las dos líneas utilizadas se mantuvieron por medio de cultivo masivo y fueron conservadas por criop congelación.

El cultivo masivo se realizó en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, con el medio adecuado para cada línea. Todas las operaciones fueron realizadas en cabinas de flujo laminar vertical, con el instrumental adecuadamente esterilizado. El crecimiento celular fue controlado por la observación directa de los frascos con un microscopio invertido de contraste de fases, cambiando el medio aproximadamente cada dos días, o cuando el indicador de pH señala agotamiento. Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia formando una monocapa. En esta fase se trataron los cultivos con 2 ml de tripsina (0,1 mg/ml) y EDTA (0.2 mg/ml) durante 5 minutos en estufa a 37°C y agitándolos hasta que las células se despegaran. Seguidamente, se añadieron 4 ml de medio caliente suplementado con SBF y se centrifugó a 214 g durante 10 minutos a 22°C para eliminar completamente la enzima. Posteriormente se resuspendió el sedimento en 2 ml de medio fresco y al recuento del número de células vivas en cámara hemocitométrica mediante un ensayo de exclusión de colorante (azul tripán) y se calculó el inóculo necesario para nuevos frascos donde propagar el cultivo. De los frascos de cultivo, se tomó regularmente muestras de las dos líneas con el fin de comprobar la ausencia de contaminación por *Mycoplasma spp*, mediante fluorescencia directa con el colorante específico para el ADN (H33233, Hoecht, Alemania).

La criop congelación se llevó a cabo cuando los cultivos estaban próximos a la confluencia. Para estas líneas celulares se procedió a la tripsinización y centrifugación. El sedimento se resuspendió en medio fresco suplementado con SBF hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se distribuían en ampollas de criop congelación con un 10% (v/v) de DMSO como agente crioprotector. En todos los casos, la criop congelación fue realizada primero en alcohol isopropílico que provoca una bajada de temperatura de

1°C/minuto, hasta alcanzar los -80°C y seguidamente, las ampollas eran colocadas en nitrógeno líquido para bajar la temperatura hasta -196°C para su almacenamiento.

Para restablecer los cultivos a partir de los viales congelados, los viales se introdujeron en un baño a 37°C para acelerar el proceso de descongelación. Seguidamente, en la cabina de flujo laminar, el contenido de cada vial se vertía en un tubo de centrifuga adicionando 10 ml de medio de cultivo para diluir el DMSO contenido en el medio de congelación. Tras una centrifugación de 10 minutos a 214 g, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1-2 ml de medio de cultivo para realizar el recuento celular en cámara hemocitométrica utilizando como colorante el azul tripán y estimular la viabilidad celular tras la congelación. Después de ajustar la concentración, se realizó la siembra en frascos de cultivo para reiniciar el cultivo celular, cambiando el medio de cultivo a las 24 horas y suplementándolo con mayor proporción de SBF para las células con peor recuperación.

#### **Optimización del número de células.**

La viabilidad celular y los ensayos proliferativos se realizaron a las 24 y 48 horas después del tratamiento con la sustancia problema con y sin exposición a la radiación X. Los cultivos celulares se realizaron en placas de fondo óptico de 96 pocillos Nunc® MicroWell de capacidad de 300 µl / pocillo. Se incluyeron controles positivos para cada tratamiento y línea celular y se sometieron a las mismas condiciones que las células experimentales. Las células en la fase de crecimiento exponencial se usaron para los ensayos y las condiciones de cultivo en los pocillos fueron las mismas que las de los matraces de cultivo tisular. Los tratamientos se incubaron durante 24 horas después de la siembra celular en ambos tipos de ensayos para obtener células adaptadas a las condiciones de cultivo y para adherirse al fondo de los pocillos. Para determinar la concentración óptima de siembra celular, se sembró el número apropiado de células en cada pocillo para evitar el sobrecrecimiento celular durante los tratamientos a partir de los cuales se construyeron las curvas de crecimiento. Después de analizar la curva de crecimiento de cada línea celular, resultó que el número más conveniente para sembrar por pocillo era 3.200 células para células PNT2 y 2.500 para células de melanoma BF16F10.

### **Cuantificación de la viabilidad celular. Test con MTT.**

Este ensayo es un test colorimétrico que utiliza la sal de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) porque en eucariotas la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa puede reducir el MTT soluble y amarillo, convirtiéndolo en un producto azul intenso e insoluble (MTT formazán) permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Utilizamos la técnica descrita por Carmichael *et al.* (1987)<sup>10</sup> y por Alley *et al.* (1998) [181], adaptada a nuestras condiciones de cultivo [182], para cuantificar la viabilidad celular.

El procedimiento que se siguió para realizar el ensayo con el MTT fue el siguiente:

1. Reemplazar con 200  $\mu$ l de medio fresco con SBF por pocillo sin rojo fenol.
2. Añadir 50  $\mu$ l de MTT (8mg/ml) a cada uno de los pocillos.
3. Incubar durante 4 horas en estufa a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.
4. Añadir 100 $\mu$ l de DMSO para solubilizar el MTT formazán producido por las células.
5. Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
6. Lectura en un espectrofotómetro FLUOstar Galaxy® utilizando un sistema de doble longitud de onda (560 y 690 nm).

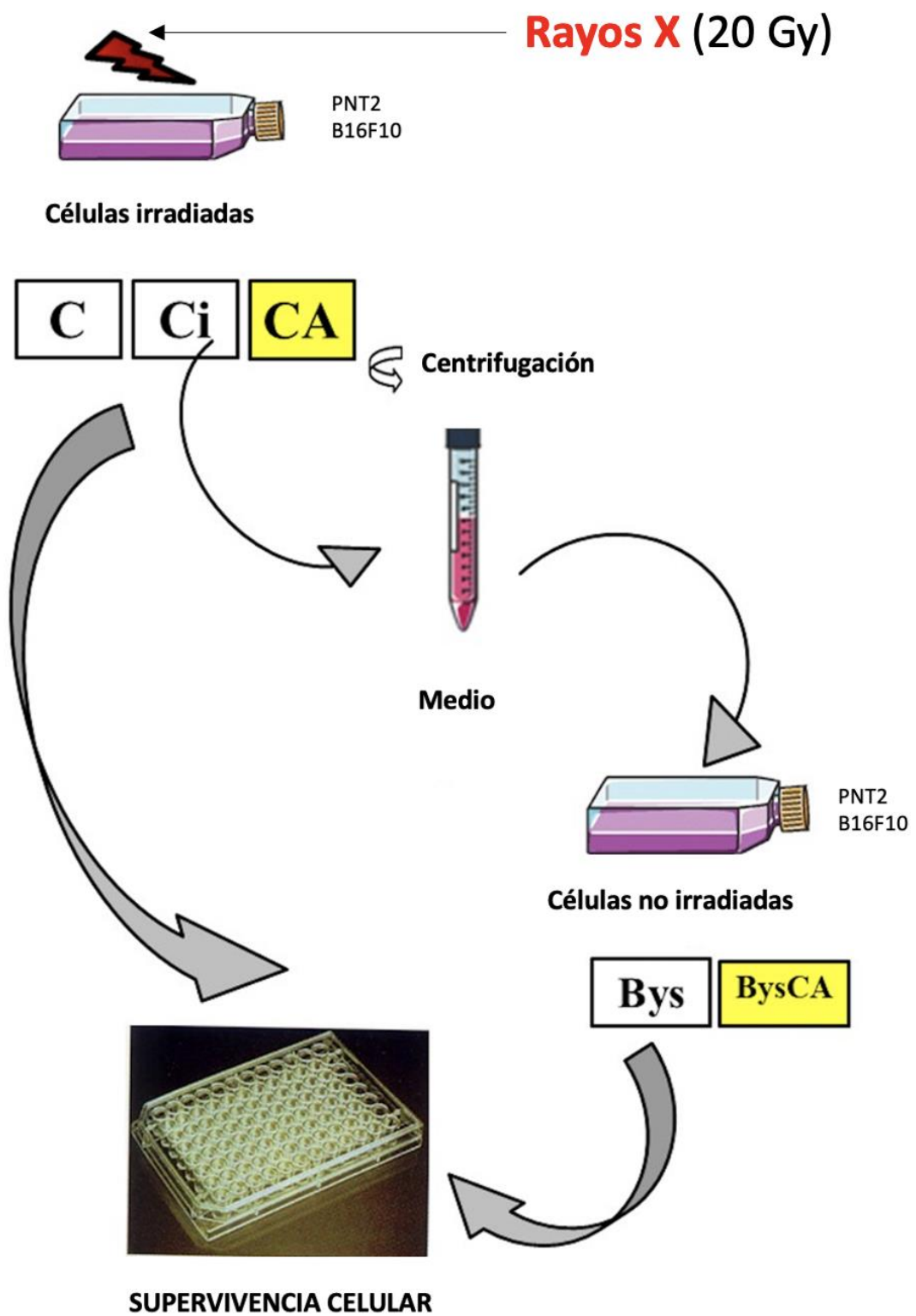
El efecto del AC para determinar la viabilidad o supervivencia celular de las células PNT2 y B10F16 se determinó usando el ensayo MTT (3-4, 5-dimetiltiazol-Z-il-2, 5-difeniltetrazolio bromuro). Las células PNT2 y B10F16 se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 3200 y 2500 células/ml, respectivamente. Veinticuatro horas después de comenzar la incubación, las células se trataron con dos concentraciones diferentes de AC. Se preparó AC disuelto en DMSO (1 mg por mL) a 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El AC se administró añadiendo 20  $\mu$ L a cada pocillo de una concentración de 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de AC de esta solución. La administración de AC al medio de cultivo se realizó inmediatamente antes de la exposición a rayos X durante 15 minutos.

Tras los 15 minutos de incubación del AC las placas se irradiaron con diferentes dosis de rayos X (0, 4, 6, 8 y 10 Gy). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 24 o 48 horas para finalmente evaluar sus capacidades radioprotectoras/citoprotectoras mediante el ensayo de viabilidad de MTT.

La viabilidad celular relativa se determinó mediante la cantidad de MTT convertida en sal de formazan insoluble. Las reducciones de la absorbancia de la viabilidad de las muestras se determinaron mediante reducciones de absorbancia de las muestras a diversas concentraciones cuando se compararon con el control no tratado. La viabilidad celular se definió con relación a los cultivos celulares de control no tratados de la siguiente manera:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{absorbancia del cultivo de células tratadas}}{\text{absorbancia}} \times 100.$$

Todos los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (SD) para al menos seis repeticiones para cada muestra preparada.



**Figura 27.** Esquema del protocolo del test de supervivencia celular con MTT.



### 3.2.2.2. Cuantificación de la viabilidad celular. ensayo clonogénico.

El ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonias es un ensayo de supervivencia celular *in vitro* basado en la capacidad de una sola célula para crecer en una colonia que se define por un número de células de al menos 50. Mediante este ensayo se puede comprobar la capacidad de cada célula de la población de someterse a una división "ilimitada". Se considera el método de elección para determinar la muerte reproductiva de las células tras el tratamiento con RI, pero también puede utilizarse para determinar la eficacia de otros agentes citotóxicos [183]. Sólo una fracción de las células sembradas conserva la capacidad de producir colonias. Antes o después del tratamiento, las células se siembran en diluciones adecuadas para formar colonias en 1-3 semanas. Las colonias se fijan con glutaraldehído (6,0% v/v), se tiñen con cristal violeta (0,5% p/v) y se cuentan con un estereomicroscopio.

Se seleccionó la modalidad de ensayo "*plating after treatment*" donde las células reciben tratamiento en placas y posteriormente son resembradas para evaluar la capacidad clonogénica. Este método es utilizado especialmente en la investigación radiobiológica para determinar la reparación de daños potencialmente letales y subletales.

El procedimiento para realizar el ensayo clonogénico (figura 18), siguiendo el protocolo de Nicolaas A. P. Franken (2006)[183] fue el siguiente:

1. Irradiación con 4 Gy de cultivo de células PNT2 y B16F10.
2. Extracción de medios de las células irradiadas y adición de estos a cultivo de células PNT2 y B16F10 no irradiados, respectivamente, para valoración del EB.
3. Recolección de células de los cultivos donantes PNT2 y B16F10 mediante tripsinización, previo lavado con PBS.
4. Dejar la solución de tripsina sobre las células hasta que se redondeen, controlando dicho evento inspeccionando bajo el microscopio.
5. Tras el desprendimiento celular de los platos de cultivo, resuspender las células en medio para inhibir la tripsinización.
6. Separar las células pipeteando hacia arriba y hacia abajo el medio con las células.

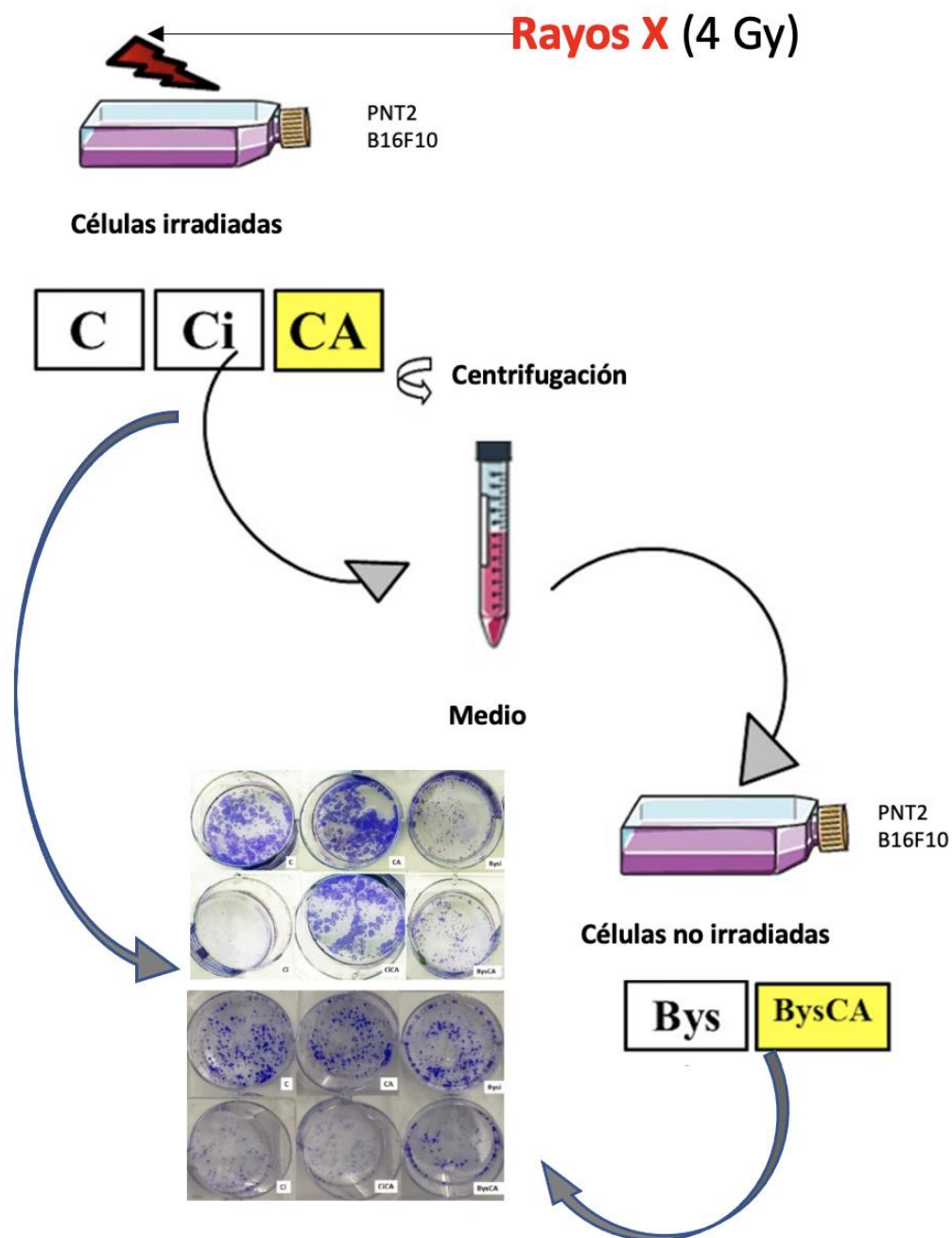
7. Contaje celular con contador Coulter. Se ha de determinar el número exacto de células sembradas para obtener los datos correctos de la eficiencia de sembrado para los controles no irradiados.
8. Diluir en tubos estériles para poder pipetear en los pocillos de ensayo 100 o hasta  $10^4$  células después del tratamiento para un cálculo adecuado de la supervivencia.
9. Siembra celular en placas para obtener los controles no irradiados.
10. Siembra celular en placas de células irradiadas.
11. Siembra celular en placas de células bystander.
12. Finalmente se habrán obtenido 2 placas, una para cada línea celular (PNT2 y B16F10), con 6 pocillos para comparar la supervivencia celular en cada una de las condiciones ensayadas:
13. Posteriormente proceder a la fijación y tinción de las colonias.
14. Retirar el medio por encima de las células.
15. Aclarar cuidadosamente con PBS.
16. Retirar el PBS y añadir 2-3 ml de una mezcla de glutaraldehído al 6,0% y cristal violeta al 0,5%.
17. Tiempo de fijación de 30 minutos.
18. Retirar la mezcla de glutaraldehído y cristal violeta. Enjuagar con agua.
19. Dejar las placas secar al aire. A una temperatura ambiente de 20-21°C.
20. Contaje de las colonias. Se procede tras la fijación y tinción a contar las colonias mediante un estereomicroscopio.
21. Determinar la eficiencia de siembra, PE (de Plating efficiency), de las células de control. Es la relación entre el número de colonias y el número de células sembradas. Pequeños cambios en las condiciones pueden influir en este factor.

$$PE = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias formadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células sembradas}} \times 100\%$$

22. Teniendo en cuenta la PE de las células control se procede al cálculo de la fracción de supervivencia (SF).

$$SF = \frac{\text{Nº de colonias formadas tras el tratamiento}}{\text{Nº de células sembradas} \times PE}$$

23. Posteriormente se lleva a cabo el análisis de las curvas de supervivencia ajustadas mediante una regresión lineal ponderada y estratificada según la fórmula lineal-cuadrática  $S(D)/S(0) = \exp(aD + bD^2)$  (8-11).



### ENSAYO CLONOGÉNICO

**Figura 28.** Esquema del protocolo del ensayo clonogénico donde se observan los distintos pasos seguidos hasta la tinción y conteo de colonias. Irradiación de los cultivos PNT2 y B16F10 con 4 Gy de rayos X. Extracción de medio de cultivos irradiados y adición de dicho medio a cultivos celulares PNT2 y B16F10 no irradiados para cuantificar el EB. Al final del esquema imágenes de los resultados tras la tinción donde se observan dos placas de seis pocillos que corresponden a las seis condiciones de estudio (controles no irradiados (C), controles irradiados (Ci), cultivos irradiados y tratados previamente con AC (CA), cultivos bystander tratados con medio de cultivos no irradiados (Bys), cultivos bystander tratados con medio de cultivos irradiados (Bysi) y cultivos bystander tratados con AC y medio de cultivos irradiados (BysCA)) de células PNT2 y B16F10.

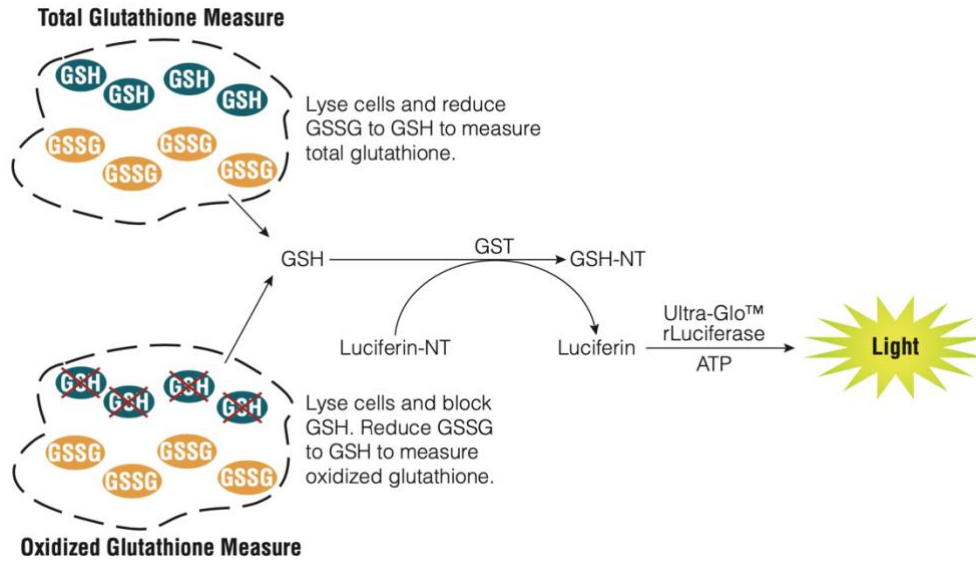
### 3.2.2.3. Test de determinación de glutatión intracelular (GSH y GSSG).

El glutatión (GSH) es un importante antioxidante tiol tripeptídico ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine) en las células que existe en dos formas: reducido como GSH y oxidado como glutatión disulfuro (GSSG) [184]. En condiciones fisiológicas el GSH está significativamente más elevado que el GSSG. Sin embargo, se ha descrito que condiciones patológicas que causan estrés oxidativo provocan una disminución de la relación GSH / GSSG [185]. Por lo tanto, la evaluación de los niveles de GSSG en condiciones de inducción de estrés puede proporcionar información valiosa sobre el estrés oxidativo que está experimentando un sistema biológico [186,187].

Los niveles totales de glutatión se determinaron utilizando el kit GSH / GSSG-Glo™ Assay (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España) (figura 30), un sistema basado en luminiscencia para la detección y cuantificación de glutatión total (GSH + GSSG) y de los ratios de GSSG y GSH/GSSG en células PNT2 y B16F10 sometidas a las diferentes condiciones experimentales tres horas después de la exposición a 20 Gy de rayos X. Las variaciones en los niveles de GSH son importante en la evaluación de las respuestas toxicológicas y es un indicador de estrés oxidativo que puede indicar la aparición de apoptosis o muerte celular. El ensayo proporciona de forma sencilla y rápida, señales luminiscentes estables que se correlacionan con el GSH total, o con la concentración de GSSG de una muestra en el cultivo. Tanto el glutatión total como las determinaciones de GSSG se basan en la reacción de conversión de GSH-dependiente de una sonda de GSH (luciferina-NT a luciferina) por una enzima glutatión-S-transferasa que se acopla a una reacción de luciferasa.

La luz de la luciferasa depende de la cantidad de luciferina formada, que es a su vez dependiente de la cantidad de GSH presente. Esto hace que la señal luminiscente sea proporcional a la cantidad de GSH. La determinación del glutatión total y GSSG se llevan a cabo en reacciones paralelas. En una primera reacción, los reactivos del ensayo miden glutatión total usando un agente reductor que convierte todo el glutatión (GSH y GSSG) en un lisado celular a la forma reducida, GSH. En una segunda reacción, los reactivos de ensayo se utilizan para medir solamente la forma oxidada (GSSG). En este caso, se añade un reactivo que bloquea todo el GSH, dejando intacto el GSSG. Esta etapa de bloqueo es

seguida por una etapa de reducción que convierte la GSSG a GSH para la cuantificación de la reacción luminiscente (figura 29). Debido a que los ensayos se realizan directamente sobre las células en los pocillos, la pérdida de GSH o GSSG se reduce al mínimo y con ello la variabilidad.



**Figura 29.** Esquema de reacciones para la determinación de glutatión total y glutatión oxidado (tomado del manual del kit GSH/GSSG-Glo assay).

Para la realización de la técnica los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Las células sembradas y adheridas durante 24h en una placa de 96 pocillos se tratan con los compuestos a ensayar o con el vehículo: unos pocillos para la medición del glutatión total y otros para la medición del GSSG.
2. Los tratamientos se retiran y se sustituyen con un reactivo de lisis: el reactivo de lisis de glutatión total para el conjunto de células de medición de glutatión total, o el reactivo de lisis de glutatión oxidado para el conjunto de células de medición de GSSG.
3. El reactivo de generación de luciferina se añade a todos los pocillos, se mezcla y se sigue con una incubación de 30 minutos.
4. El reactivo de detección de luciferina se añade a todos los pocillos, se mezclan y tras una incubación de 15 minutos, se mide la luminiscencia.

5. Los ratios de GSH / GSSG se calculan directamente a partir de mediciones de luminiscencia (en unidades relativas de luz, RLU) para la interpolación de las concentraciones de glutatión a partir de su comparación con su curva estándar.



**Figura 30.** Kit de glutatión de Promega® utilizado en el estudio donde se observan los distintos reactivos.

La técnica permite:

- Medir glutatión total y los niveles de GSSG en las células como un indicador de la viabilidad celular.
- Medir las relaciones de GSH / GSSG en las células como un indicador de estrés oxidativo.
- Establecer el perfil de medicamentos y de nuevas entidades químicas para la modulación del total de los niveles de GSH y GSSG en las células.

Parta realizar el cálculo de las fracciones de glutatión a partir de la curva estándar de GSH:

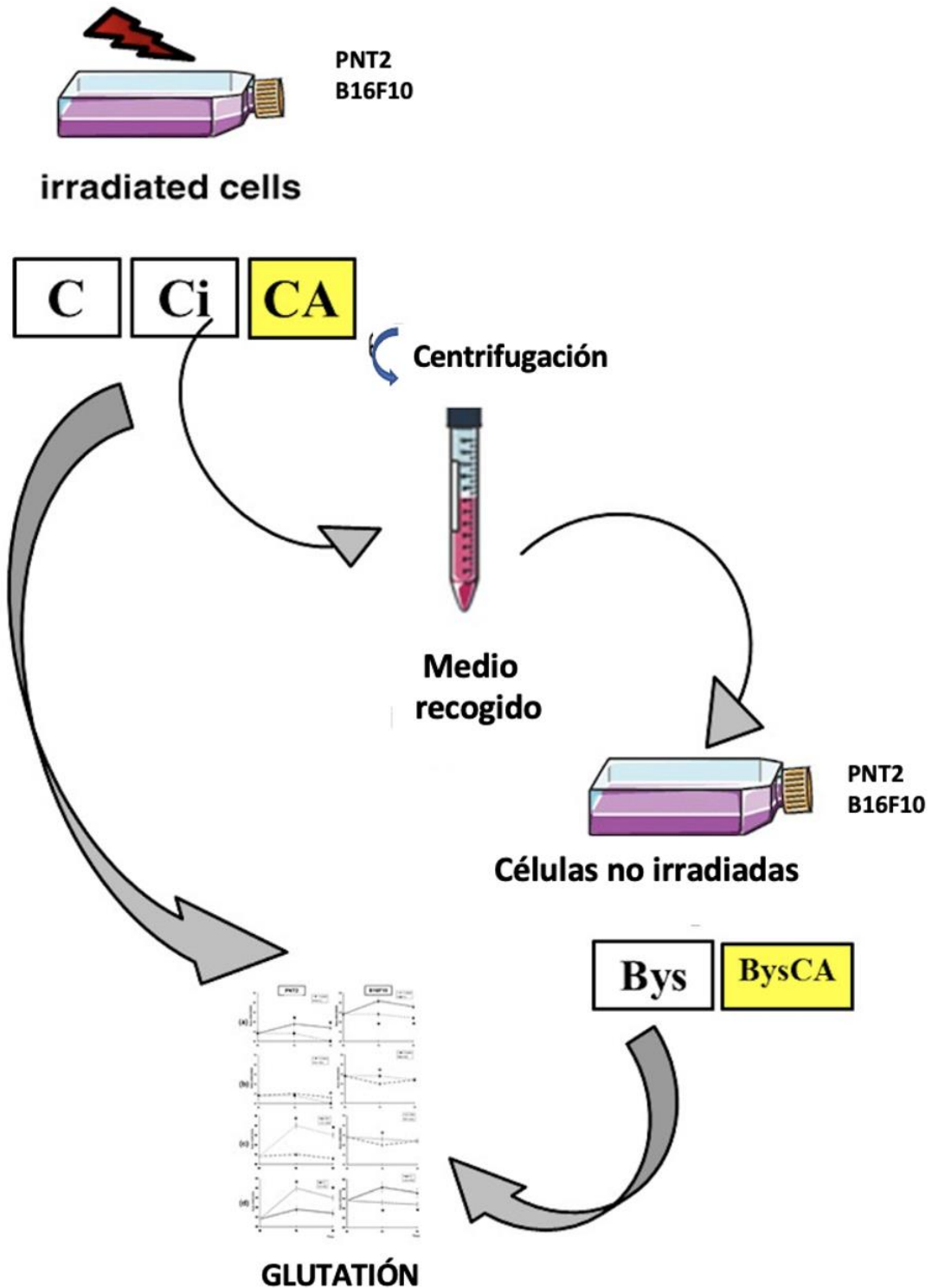
- Se trazó un primer gráfico RLU neto vs GSH  $\mu\text{M}$ . Se trazó un segundo gráfico con los valores del eje x divididos por dos para reflejar la concentración micromolar de GSSG. Teniendo en cuenta que se generan 2 moles de GSH por 1 mol de GSSG dividiendo las concentraciones de GSH por dos se obtiene la concentración de GSSG.
- Utilizando la pendiente (m) generada por la porción lineal de cada curva estándar y la fórmula  $y = mx + b$ , se ocnvierten los valores netos medios de RLU de las células tratadas y no tratadas en micromoles de GSSG y GSH.
- Sustraer la contribución de GSSG a la concentración total de glutatión multiplicando los valores de micromoles de GSSG por 2 y restando este valor de la cantidad total de glutatión para generar la concentración de GSH en las muestras.
- Cálculo de los ratios siguiendo las fórmulas que se muestran a continuación:

$$\text{Ratio GSH / GSSG control} = \frac{\mu\text{M glutatión total vehículo} - (\mu\text{M GSSG vehículo} \times 2)}{[\mu\text{M GSSG vehículo}]}$$

$$\text{Ratio GSH / GSSG tratado} = \frac{\mu\text{M glutatión total tratado} - (\mu\text{M GSSG tratado} \times 2)}{[\mu\text{M GSSG tratado}]}$$



## Rayos X / 20 Gy

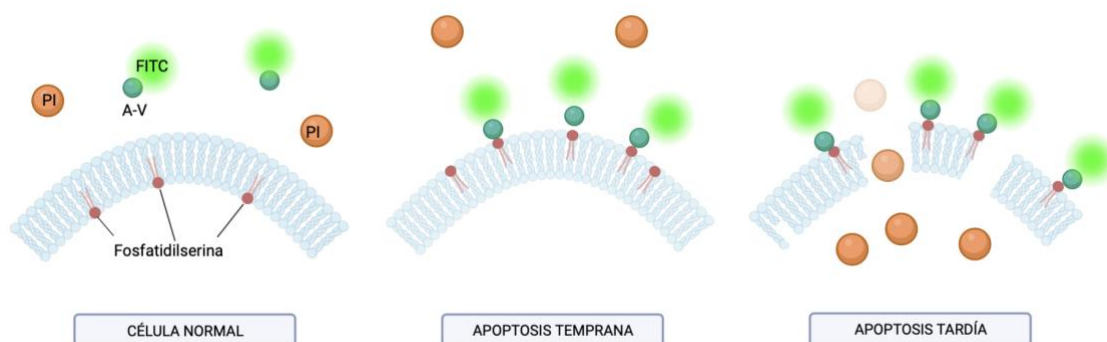


**Figura 31.** Esquema del protocolo aplicado para determinación de glutatión: irradiación de los cultivos celulares PNT2 y B16F10 con 20 Gy, recogida de medio de cultivo irradiado para valoración de efecto bystander en células no irradiadas. Realización de test de glutatión y determinación de niveles de glutatión en cada una de las condiciones estudiadas.

### 3.2.2.4. Test de anexina v para cuantificación de apoptosis.

Para la determinación de la apoptosis celular mediante citometría de flujo, se utilizó el Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog nos. V13241) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, España, Madrid), que permite la medición de la apoptosis temprana mediante la detección de la expresión de fosfatidilserina (PS).

Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes del calcio que se unen preferentemente a la PS. En condiciones fisiológicas normales, la PS se localiza predominantemente en la lámina interna de la membrana plasmática, permaneciendo en mayor concentración hacia el interior celular. Al iniciarse la apoptosis, la PS pierde su distribución asimétrica en la bicapa de fosfolípidos y se traslada a la lámina extracelular de la membrana, marcando a las células como objetivos para la fagocitosis. Una vez en la superficie externa de la membrana, la anexina V marcada con un fluoróforo puede detectar la PS de forma dependiente del calcio. La célula normal no apoptótica no presenta marcaje con Anexina-FITC ni con yoduro de propidio (PI). En los primeros estadios de apoptosis se externaliza la fosfatidilserina y se marca con Anexina V-FITC (figura 32). En los estadios más tardíos de apoptosis, la membrana celular se permeabiliza lo que permite la entrada del PI al interior celular y así marcar el ADN. En este estadio la célula se marca con Anexina V-FITC y PI.



**Figura 32.** Esquema de los estadios de apoptosis. Véase como en la célula normal la fosfatidilserina se sitúa en la capa lipídica interna de la membrana celular, observándose en el exterior las moléculas de anexina V (A-V) unida al fluoróforo (F). En la apoptosis temprana la fosfatidilserina comienza a presentarse en la capa lipídica externa, siendo detectable mediante la anexina V. En estadios posteriores la membrana pierde su estructura y se permeabiliza, produciéndose la destrucción celular.

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Las células tratadas se lavaron una vez con solución salina fría tamponada con fosfato (PBS) y se cosecharon.
2. Tras centrifugar y resuspender las células, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de anexina V Alexa Fluor® 488 (componente A) seguidos de la adición de 1  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PI a cada 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular.
3. Tras 15 min de incubación, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de tampón a las muestras en hielo.
4. Las células teñidas se analizaron inmediatamente por citometría de flujo, midiendo la fluorescencia a 530 nm y 575 nm utilizando 488 nm de excitación en FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).
5. Teñir las células con conjugados de Anexina V para microscopía.

#### **3.2.2.5. Test de determinación de proteínas.**

Previamente al ensayo de glutatión se realizó un ensayo para la determinación de proteínas. Este ensayo se basa en el método de Bradford [188], descrito en 1976, y consiste en cuantificar la concentración de proteínas solubles. Para ello se adiciona un colorante ácido a la solución de proteínas problema y posteriormente se realiza una medición en el espectrofotómetro a 595 nm. Los resultados se comparan con la curva estándar permitiendo una medición relativa de la concentración de proteínas en la muestra estudiada.

En el método Bradford se utiliza un colorante hidrofóbico (Coomassie blue G-250), cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico proporcionan un color pardo que reacciona con la parte hidrofóbica del interior de una proteína, fijándose a ella. El colorante de Coomassie se une a residuos de aminoácidos básicos aromáticos, en especial a arginina. Las proteínas se unen a la sustancia azul formando un complejo proteína-colorante que tiene un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. El colorante sufre un cambio en su absorbancia, pasando de 465 nm a 595 nm cuando se produce su unión a proteínas.

Para determinar el contenido protéico de una muestra se requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los valores de la curva de calibración construida a partir de cantidades conocidas de proteínas: a mayor cantidad de proteínas, mayor color

desarrollado y, por lo tanto, mayor será la absorbancia; es por ello que se considera un cromóforo exógeno. Dado que es un método que depende de una interacción relativamente inespecífica entre colorante y proteínas, es sensible a la presencia de contaminantes (restos de detergentes y líquidos orgánicos), a la pérdida de la estabilidad proteica (pérdida de su forma nativa). En dichos casos se podría producir una pérdida entre la unión del cromóforo y la región hidrofóbica proteica.

Para construir la curva de calibración se utiliza una proteína patrón, la seroalbúmina bovina en nuestro caso. Se preparan tubos testigos con cantidades conocidas de proteína y otra disolución llamada “blanco”, la cual sólo contiene agua y reactivo Bradford, mientras que en los tubos testigos se les mantiene constante el reactivo Bradford siendo los volúmenes de todos los tubos iguales. Una vez realizadas las diluciones de los tubos se mide la absorbancia de cada uno de ellos con una longitud de onda de 595 nm. El equipo es calibrado con el tubo blanco, que no contiene proteínas, construyéndose así la gráfica de absorbancia vs concentración.

Para la realización de este ensayo se utilizó una placa de 96 pocillos y se siguieron los pasos a continuación señalados:

1. Se mezcla suavemente el reactivo Bradford en la botella a temperatura ambiente.
2. Se preparan los estándares de proteína en tampón (concentraciones desde 0,1-1,4 mg/ml usando un patrón de BSA).
3. Se cogen 5 µl de cada uno y se añaden 250 µl de reactivo de Bradford. A los pocillos de blanco se le añaden 5 ml de tampón.
4. Se prepara la muestra desconocida(s) con una concentración aproximada entre 0,1 a 1,4 mg / ml.
5. A cada pocillo, se le añaden 250 µl del reactivo de Bradford y se mezclan en un agitador (30 segundos).
6. Se dejan las muestras incubando a temperatura ambiente durante 5-45 minutos. A continuación, se mide la absorbancia a 595 nm. El complejo proteína-colorante se mantiene estable hasta unos 60 minutos (la absorbancia

de las muestras deben ser registradas antes del límite de tiempo y dentro de los 10 minutos de diferencia).

7. Se traza la absorbancia neta vs la proteína concentración de cada estándar.
8. Se determina la concentración de proteína de la muestra desconocida (s) mediante la comparación de la A595 Net valores en contra de la curva estándar.
9. Se preparan las diluciones de las muestras de acuerdo con la siguiente tabla.

mg/ml (prot)	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5
µl (BSA)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15
µl (agua)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
µl total	20	20	20	20	20	20	20

### 3.3. Método estadístico.

El estudio estadístico ha sido realizado en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, utilizando el paquete BMDP Statistical Software, Inc (Versión 1988; IBM PC/DOS). En los ensayos de genoprotección ha consistido en comparaciones entre grupos realizando contrastes de igualdad de medias mediante análisis de varianza. Asimismo, hemos realizado análisis de regresión y correlación lineales y polinómicos. Consideramos los resultados estadísticamente significativos cuando p era menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

En los ensayos de determinación *in vivo* e *in vitro* de micronúcleos, apoptosis y glutatión intracelular, se ha utilizado el análisis de varianza complementado con contrastes de medias para evaluar el grado de correlación entre las variables. Las medias cuantitativas fueron comparadas mediante un análisis de regresión y correlación lineal.

Para evaluar la magnitud de la protección o factor de protección (FP) con respecto a la reducción de la frecuencia de MN, expresada como porcentaje de protección, descrito por Sarma y Kesavan (1993)[189], se utilizó la siguiente fórmula:

$$FP (\%) = (F_{\text{control}} - F_{\text{tratado}} / F_{\text{control}}) \times 100$$

En donde:

**FP** es la magnitud de protección expresada en %,

**F<sub>control</sub>** es la frecuencia de micronúcleos en las muestras controles irradiadas, y

**F<sub>tratados</sub>** es la frecuencia de micronúcleos en las muestras irradiadas y tratadas.

En el ensayo de supervivencia celular, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medias repetidas para comparar los porcentajes de supervivencia celular en los cultivos con diferentes concentraciones de los compuestos y complementando con contraste de igualdad de pares con el método de la mínima diferencia significativa (M.D.S.). En este caso, modificamos la fórmula anterior[189] para adaptar el FP a la supervivencia celular:  $FP (\%) = (Control\ Mirradiado - Tratado\ Mirradiado / Control\ Mirradiado) \times 100$ , donde M es el porcentaje de mortalidad respecto a las células control no irradiadas. Los análisis fueron realizados transformando logarítmicamente los datos para ajustarse a las condiciones de ANOVA.



## **IV. RESULTADOS.**





## **IV. Resultados.**

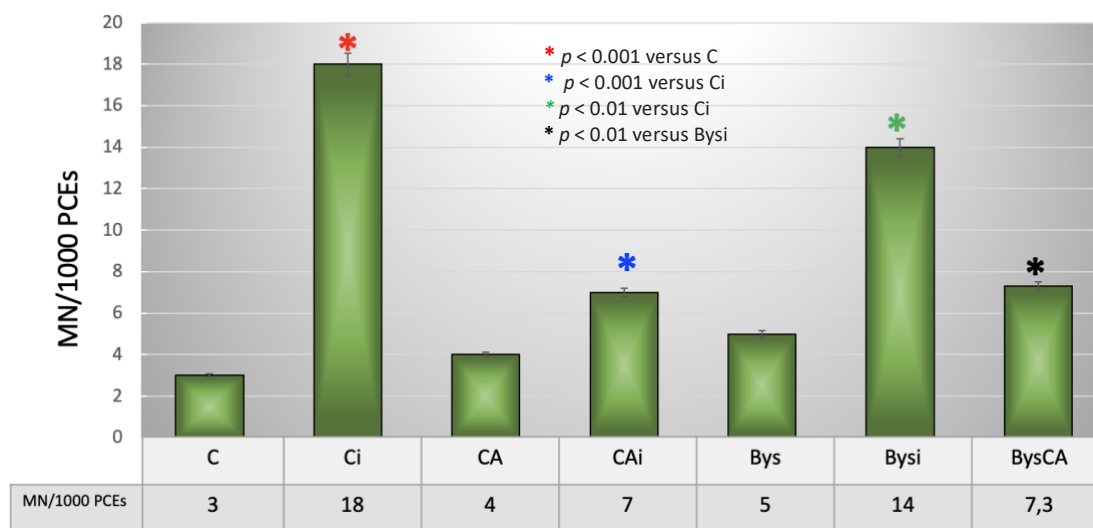
### **4.1. Resultados de efecto genotóxico mediante ensayo de micronúcleos.**

#### **4.1.1. Ensayo de micronúcleos *in vivo*.**

##### **4.1.1.1. Resultados de ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.**

En primer lugar, se determinó la frecuencia basal de MN en el grupo de animales control (C) expresado en MN por cada 1000 eritrocitos policromatófilos (MN/1000 PCEs). Como observamos en la tabla de la figura A1 la frecuencia de MN obtenida en el grupo control (C) y en el grupo que recibió tratamiento con AC (CA) fue similar, de 3 y 4 MN/1000 PCEs respectivamente, no observándose diferencias estadísticamente significativas, constatando la ausencia de efecto genotóxico del AC sobre los animales (Figura A1).

En el grupo control irradiado (Ci), la exposición a 50 cGy de rayos X produjo un aumento en la frecuencia de aparición de MN en comparación con los animales control (C), 18 MN/1000 PCEs vs 3 MN/1000 PCEs, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Estos datos son expresión del daño genotóxico inducido por los rayos X sobre los animales estudiados. Sin embargo, en el grupo de animales tratado con AC y expuesto a los rayos X (CAi), se objetivó una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) en la aparición de MN en comparación con los animales irradiados (Ci), 7 MN/1000 PCEs frente a los 18 MN/1000 PCEs en el grupo Ci. El grupo de animales que fue tratado con AC e irradiado (CAi) mostró un factor de protección (FP) del  $79,9 \pm 3,4\%$ , lo que refleja la capacidad genoprotectora del AC frente al daño inducido por los rayos X (Figura A1).



**Figura A1.** Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) en médula ósea de ratón (C, grupo control; CA, grupo tratado con ácido carnósico; Ci, grupo control irradiado; CAi, grupo tratado con CA e irradiado; Bys, grupo tratado con suero no irradiado; Bysi, grupo tratado con suero previamente irradiado; BysCA, grupo tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico).

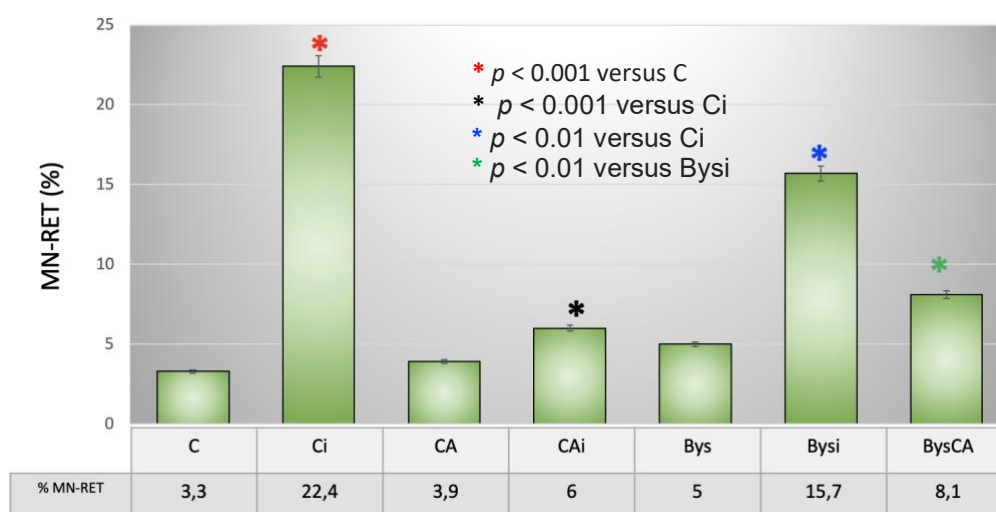
En aquellos animales que fueron tratados con 25 microlitros de suero de animales no irradiados (Bys), no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de aparición de MN respecto a los animales controles y a los tratados con AC; lo que expresa la ausencia de un efecto genotóxico inducido por el suero intraperitoneal administrado. Sin embargo, cuando los animales son tratados mediante la administración intraperitoneal del suero procedente de animales irradiados con rayos X (Bysi) se determina un aumento en la frecuencia de aparición de MN en comparación con su grupo control, tratado con el suero procedente de animales no irradiados (Bys) (14 MN/1000 PCEs frente a 5 MN/1000 PCEs), determinándose una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) y, por tanto, expresando la capacidad genotóxica del suero de los animales irradiados sobre la médula de los animales tratados (efecto RIBE).

La administración intraperitoneal de AC antes de la administración del suero de animales irradiados (BysCA) mostró una reducción significativa en la frecuencia de MN respecto a los animales irradiados y no tratados (Bysi) ( $p < 0,01$ ) (7,3 MN/1000 PCEs frente a 14 MN/1000 PCEs); lo que expresa la capacidad genoprotectora del AC en estos animales. Se ha determinado un FP de  $47,8 \pm 2,3\%$  producido por el AC en este grupo de animales.

Por tanto, los resultados obtenidos en los PCEs de médula ósea se puede establecer , de menor a mayor frecuencia de aparición de MN el siguiente orden: C  $\approx$  CA  $\approx$  Bys < CAi < BysCA < Bysi < Ci ( $p < 0,001$ ) (Figura A1).

#### **4.1.1.2. Citometría de flujo para micronúcleos (MN) en reticulocitos (RET).**

En la figura A2 se muestra el gráfico de barras y la tabla de resultados del porcentaje de MN en reticulocitos (MNRET), determinado mediante citometría de flujo, en cada uno de los seis grupos de animales estudiados. La frecuencia basal de micronúcleos determinada en los animales control (C) y en los tratados con AC (CA) es similar (3,3% y 3,9% respectivamente), no apreciándose diferencias estadísticamente significativas; lo que expresa la ausencia de efecto genotóxico del AC sobre los animales estudiados. La exposición de los animales a 2 Gy de rayos X (Ci) produjo un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de aparición de MN en comparación con los animales controles (C) (22,4%), ( $p < 0,001$ ), lo que expresa el daño genotóxico inducido por los rayos X en los animales estudiados. Cuando se administra AC antes de la exposición a los rayos X (CAi) se determina una reducción en la frecuencia de aparición de MN respecto al grupo de animales irradiados y no tratados (Ci) (6% de MNRET frente al 22,4%), determinándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ); lo que expresa la capacidad de genoprotección del AC frente al daño genotóxico inducido por la RI. El grupo que tratado con AC e irradiado (CAi) mostró un FP del  $73,2 \pm 3,12\%$ , lo que expresa la capacidad genoprotectora del AC frente al daño inducido por los rayos X (Figura A2).



**Figura A2.** Frecuencia de reticulocitos en sangre determinada por citometría de flujo 48h después de la exposición a radiación ionizante (% MNRET) (C, grupo control; CA, grupo tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CAi, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bys, tratado con suero no irradiado; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0.001$  frente a C; \*  $p < 0,001$  frente a Ci; \*  $p < 0,01$  frente a Ci; \*  $p < 0,01$  frente a Bysi).

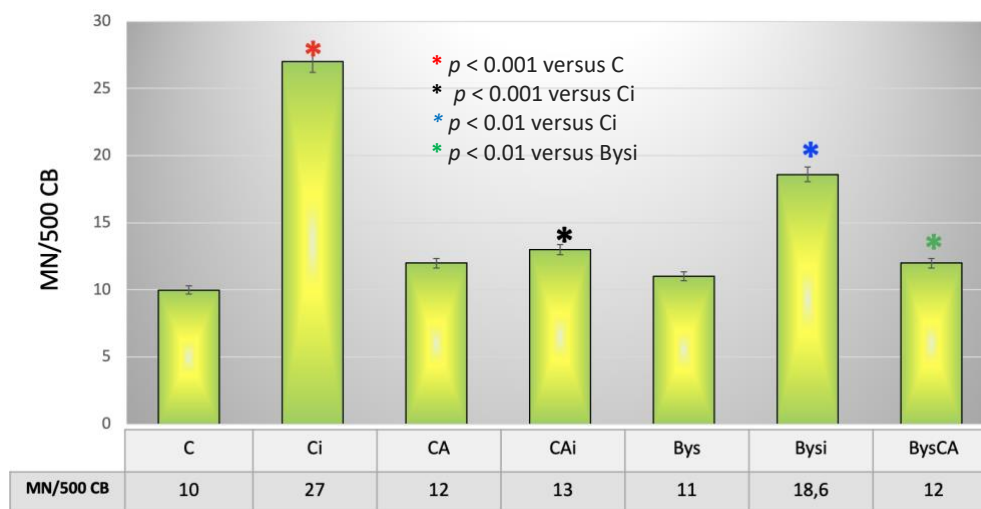
Los animales tratados con 25 microlitros de suero procedente de otros animales no irradiados (Bys), no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales controles (C) ni con los tratados con AC (CA); lo que expresa la ausencia de efecto genotóxico inducido por el suero cuando se administra por vía intraperitoneal a estos animales. Sin embargo, la administración intraperitoneal de suero procedente de animales previamente irradiados con rayos X (Bysi) produce un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) en la frecuencia de aparición de MN en comparación con el grupo tratado con suero de animales no irradiados (Bys) (15,7% frente al 5%); lo que expresa la capacidad genotóxica, efecto RIBE, del suero de los animales irradiados sobre los animales receptores. La administración intraperitoneal de AC antes de la administración del suero de animales irradiados (BysCA) produce una reducción significativa de la frecuencia de MN en comparación con los animales irradiados y no tratados (Bysi) (8,1% frente a los 15,7% de los animales bystander no tratados con carnósico), ( $p < 0,01$ ); lo que expresa la capacidad genoprotectora del AC en estos animales, en los que se determina un FP del  $48,48 \pm 2,4\%$ .

En función de los resultados en el ensayo de MN-RET determinado mediante citometría de flujo, se puede establecer el siguiente orden ascendente:  $C \approx CA \approx Bys < CAi < BysCA < Bysi < Ci$  ( $p < 0,001$ ) (Figura A2).

## 4.1.2. Ensayo de micronúcleos *in vitro*.

### 4.1.2.1. Prueba de micronúcleos en linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis con citocalasina B (CBMN).

En el ensayo de MN *in vitro* se determinó una frecuencia basal de MN que fue similar en el grupo control (C), en el grupo tratado con AC (CA) y en el grupo tratado con medio de cultivo (Bys) (10, 12 y 11 MN/500 CB respectivamente), no determinándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos; lo que expresa la ausencia de efecto genotóxico del AC y del medio no irradiado sobre los cultivos celulares de linfocitos receptores. En el grupo de cultivo de linfocitos tratados con 2 Gy de rayos X se observa un aumento significativo en la frecuencia de aparición de MNCB ( $p < 0,001$ ) respecto al grupo de cultivos controles; poniendo de manifiesto el daño genotóxico ocasionado por la RI.



**Figura A3.** Frecuencia de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos con bloqueo citocinético (CBMN) (C, control; CA, tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CAi, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bys, tratado con suero no irradiado; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico).

Cuando los cultivos de linfocitos son tratados con AC antes de la exposición a rayos X (CAi) se observa una disminución significativa en el recuento de MN respecto al grupo sólo irradiado; obteniéndose un recuento de 13 MN/500 CB frente a los 27 MN/500 CB ( $p < 0,001$ ). El grupo tratado con AC e irradiado (CAi) muestra un FP de  $41,9 \pm 3,12\%$ , expresando así también su capacidad genoprotectora frente al daño inducido por los rayos X (figura A3).

La administración de medio de cultivo procedente de linfocitos irradiados con 2 Gy de rayos X (Bysi) produce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de aparición de MN en comparación con los cultivos de linfocitos tratados con el medio de cultivo procedente de células no irradiadas (Bys) (18,6 MN/500 CB frente a 11 MN/ 500 CB), determinándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ); lo que expresa la capacidad genotóxica ocasionada por el medio de cultivo de linfocitos irradiados y poniendo de manifiesto el daño producido por el efecto RIBE. Sin embargo, cuando los cultivos de linfocitos son tratados con AC antes de la administración del medio de cultivo de linfocitos irradiados (BysCA), se determina una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) en la frecuencia de aparición de MN expresados en comparación con los cultivos tratados con el medio procedente de cultivos irradiados (Bysi). Esto expresa la capacidad genoprotectora de la AC, que alcanza un FP del  $35,5 \pm 2,5\%$ . Nuestros resultados con el ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados mediante bloqueo con citocalasina B (CBMN) muestran, en función de la frecuencia de aparición de MN, un orden de prioridad siguiendo un orden ascendente:  $C \approx Bys \approx CA < CAi \approx BysCA \approx CAi < Bysi < Ci$  ( $p < 0,001$ ) (Figura C3).

## 4.2. Resultados del ensayo de citotoxicidad.

### Ensayo del MTT.

#### 4.2.1. Resultados ensayo MTT en cultivos de células epiteliales de próstata humanas PNT2.

En primer lugar, se obtuvieron los resultados de supervivencia celular de las células PNT2 al ser expuestas a diferentes dosis de RI (0, 4, 6, 8 y 10 Gy, respectivamente), para elaborar la curva dosis-respuesta frente a la RI. En la tabla y figura B1 se muestran los porcentajes de supervivencia celular obtenidos en las células PNT2 con dos periodos de incubación diferentes: 24h y 48 horas.

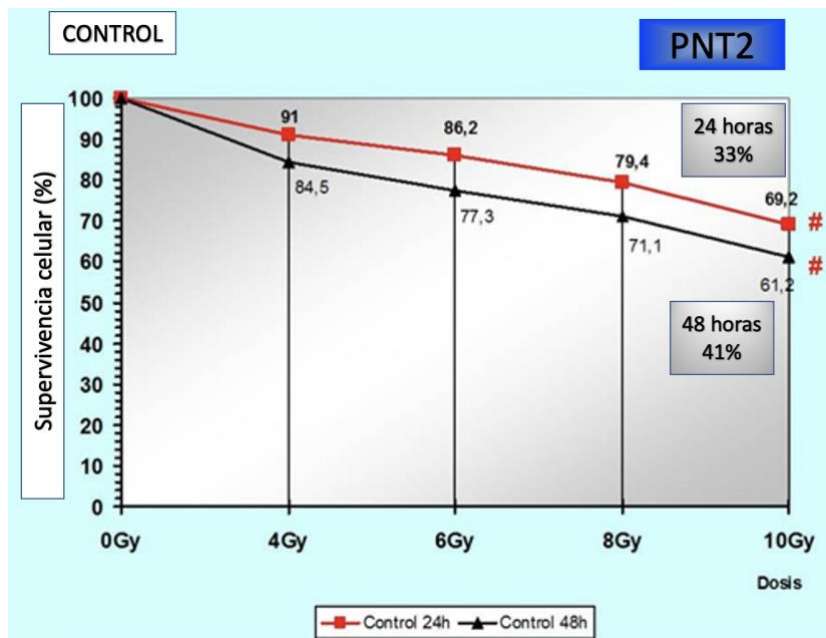
**Tabla B1.** Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares controles de células epiteliales de próstata humano normal PNT2.

<b>Tiempo/Dosis de Radiación</b>	<b>0 Gy</b>	<b>4 Gy</b>	<b>6 Gy</b>	<b>8 Gy</b>	<b>10 Gy</b>
<b>24 horas</b>	100,0 ± 5,8	92,0 ± 7,0	85,2 ± 7,3	80,4±5,6	70,2±5,2*
<b>48 horas</b>	100,0 ± 4,3	83,2 ± 8,1	76,3 ± 7,1	73,1±5,4	61,2±4,9*

Se observa una progresiva disminución en el porcentaje de células supervivientes que es inversamente proporcional a la dosis recibida, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) en ambos períodos de incubación estudiados. Los resultados muestran una supervivencia del 100% a las 24 h y 48 h en los cultivos controles que no fueron expuestos a RI. Cuando se exponen a una dosis de 4 Gy de rayos X se determina una disminución en el porcentaje de supervivencia celular del 8 % a las 24 h y del 16,8% a las 48 h. Cuando los cultivos fueron sometidos a 6 Gy, está disminución en el porcentaje de supervivencia celular es mayor, observándose una reducción del 14,8% y del 23,7% a las 24 y 48 horas, respectivamente. La curva dosis respuesta de supervivencia celular muestra una disminución progresiva de la supervivencia celular dosis dependiente con la dosis de radiación de rayos X administrada y con el tiempo de incubación celular analizada. Cuando las células PNT2 fueron expuestas a 10 Gy de rayos X, la proporción de células supervivientes se redujo en un 33% tras 24 horas de incubación y en un 41% tras 48 horas



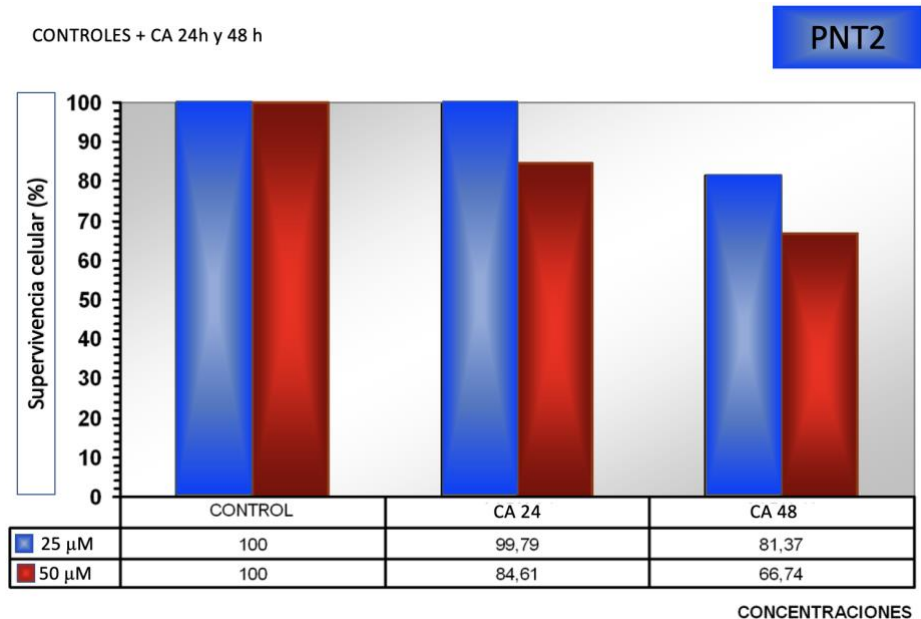
de incubación, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ), lo que expresa el daño citotóxico producido por la radiación ionizante.



**Figura B1.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares de epitelio de próstata humano normal PNT2 irradiados hasta 10 Gy (#): ( $p < 0,001$ ) versus células controles irradiadas).

#### 4.2.2 Resultados del ensayo MTT en cultivos de células de próstata humanas PNT2 tratadas con ácido carnósico (AC).

Se administraron 20 microlitros de AC (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ), para evaluar el porcentaje de supervivencia celular a las 24 y a las 48 horas de incubación. Como se observa en la figura B2 la adición de AC 25  $\mu\text{M}$  a las células PNT2 provoca una disminución del 0,21% y del 18,63% en la viabilidad celular a las 24 y 48 horas de incubación, respectivamente. En las condiciones de tratamiento con AC 50  $\mu\text{M}$  se produce una disminución de la viabilidad celular del 15,39% y del 33,26% a las 24 y 48 horas.



**Figura B2.** Efecto de la administración de AC al 25 μM y 50 μM en células PNT2 después de 24 h y 48 h de incubación.

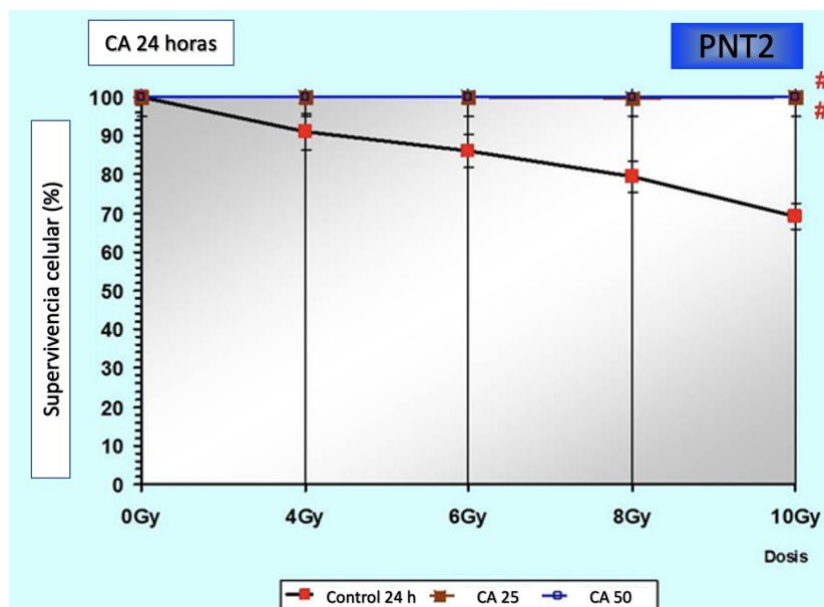
Los resultados del porcentaje de supervivencia celular en los cultivos celulares PNT2 que fueron tratados con 25 μM y 50 μM de AC y fueron posteriormente irradiados, e incubados durante 24 horas, se muestran en la tabla B3.

**Tabla B3.** Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con AC (25 μM y 50 μM) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

<b>Dosis de Radiación</b>	<b>0 Gy</b>	<b>4 Gy</b>	<b>6 Gy</b>	<b>8 Gy</b>	<b>10 Gy</b>
Control	100,0 ± 5,8	91,0 ± 7,1	86,2 ± 7,2	79,4 ± 5,4	69,2 ± 5,1
25μM AC	100,0 ± 8,2	100,0 ± 7,6	100,0 ± 6,9	100,0 ± 7,5	100,0 ± 9,2*
50μM AC	100,0 ± 7,9	100,0 ± 8,3	100,0 ± 7,5	100,0 ± 9,0	100,0 ± 10,2*

En el grupo de células controles irradiadas se produce una disminución significativa de la supervivencia celular, mayor cuanto mayor es la dosis de radiación administrada. Se observa una disminución significativa del porcentaje de células viables del 9, 13,8, 20,6 y 30,8% tras irradiación con 4, 6, 8 y 10 Gy, respectivamente. La mayor disminución en la supervivencia celular se produce con la dosis de radiación más alta utilizada en este ensayo (10 Gy), con una reducción del 30,8% de la supervivencia celular. Los cultivos celulares que fueron tratados con AC, tanto a 25 μM y 50 μM, no modificaron el porcentaje de

supervivencia celular en comparación con los cultivos controles irradiados y no tratados, en todas las dosis de rayos X ensayadas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (tabla B3; Figura B3).



**Figura B3.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con AC (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación ((#): ( $p < 0,001$ ) versus control irradiado).

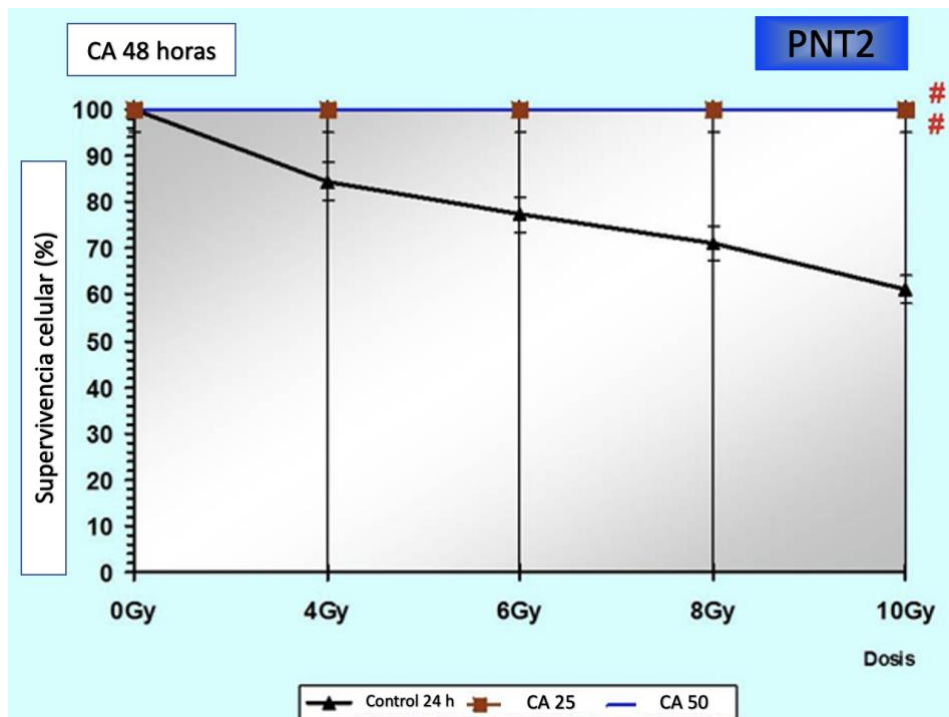
El FP obtenido de los cultivos celulares tratados con las dos concentraciones de AC e irradiados con la dosis más alta (10 Gy), tras 24 horas de incubación fue del 100% para ambas concentraciones estudiadas (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de AC).

**Tabla B4.** Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con AC (25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ ) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	84,5 $\pm$ 8,2	77,3 $\pm$ 7,4	71,1 $\pm$ 5,6	61,2 $\pm$ 5,2
AC 25 $\mu\text{M}$	100,0 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 7,4	100,0 $\pm$ 9,7	100,0 $\pm$ 5,7	100,0 $\pm$ 4,9*
AC 50 $\mu\text{M}$	100,0 $\pm$ 5,7	100,0 $\pm$ 9,1	100,0 $\pm$ 6,4	100,0 $\pm$ 5,7	100,0 $\pm$ 5,3*

En la tabla B4 se muestran los resultados en el porcentaje de supervivencia celular de los cultivos de células PNT2 control y tratadas con 25 y 50  $\mu\text{M}$  de AC, e irradiadas con distintas dosis de radiación X (0,4,6, 8 y 10 Gy) y un período de incubación de 48h. A las 48

horas de incubación la reducción de la supervivencia celular fue más acusada en todas las condiciones de irradiación que la previamente descrita a las 24 horas de incubación. Con la dosis más alta ensayada (10 Gy) se observa una mayor supervivencia celular en los grupos tratados con AC en comparación con los cultivos celulares controles irradiados. Tras los dos períodos de incubación (24 h y 48 h), la supervivencia celular fue similar, obteniéndose un incremento significativo (38,8%,  $p < 0,001$ ) de la supervivencia celular en comparación con los cultivos controles irradiados. En ambas concentraciones utilizadas, se ha determinado un aumento significativo de la supervivencia de las células PNT2 respecto a los cultivos celulares controles irradiados ( $p < 0,001$ ); lo que expresa la capacidad radioprotectora del AC frente al daño citotóxico inducido por la RI (Tabla B4; Figura B4).

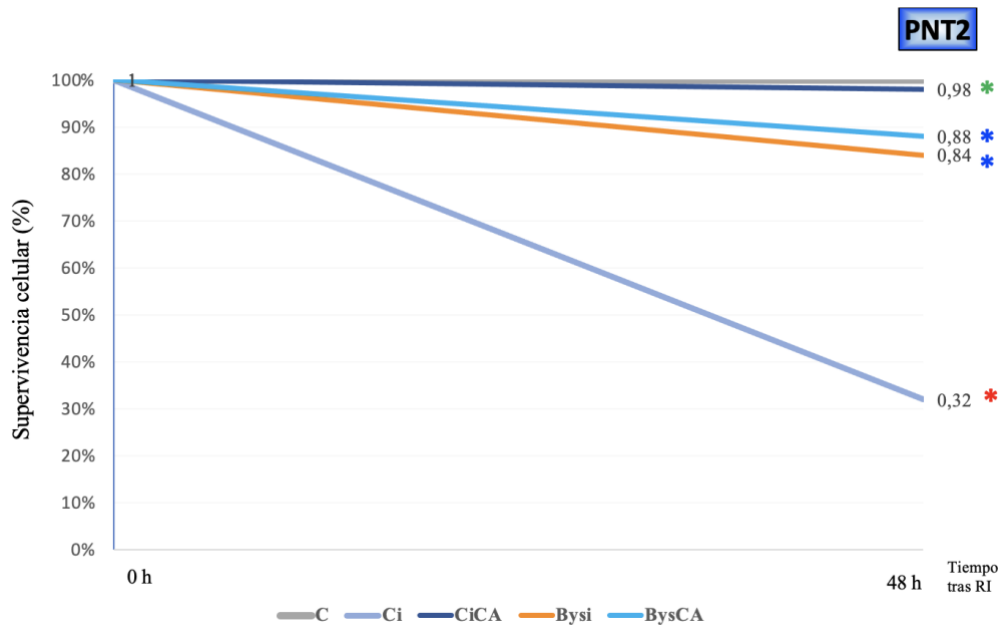


**Figura B4.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con AC (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ( $p < 0,001$ ) versus control irradiado).

El FP obtenido de los cultivos tratados con 25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de AC tras 48 horas desde la irradiación con la dosis de más alta (10 Gy) es del 100% para ambas concentraciones de AC ensayadas.

## Resultados RIBE en ensayo MTT en células PNT2.

Para valorar el efecto RIBE en las células PNT2 a través del ensayo MTT se modificó ligeramente el protocolo de estudio, evaluando el efecto con 0 y 20 Gy de radiación ionizante y midiendo los resultados a las 48 horas de incubación post-irradiación. En las células PNT2 receptoras del efecto RIBE, el grupo tratado con medio celular procedente de cultivos celulares irradiados con 2 Gy de RI (Bysi) muestra una disminución significativa de la supervivencia celular ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células PNT2 de control (C), lo que demuestra la citotoxicidad inducida por el medio de cultivo irradiado. Sin embargo, la administración de AC sobre estas células (BysCA) no muestra diferencias significativas en la supervivencia celular, expresando una falta de efecto del AC en estos cultivos de células Bys (Bysi).



**Figura B5.** Ensayo MTT: Supervivencia celular de todos los grupos estudiados en PNT2 (C, control; CA, tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CAi, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bys, tratado con suero no irradiado; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0,001$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a C; \*  $p < 0,001$  frente a Ci). Los grupos CA y Bys no están representados en la figura, ya que coinciden con el grupo C. Los datos son la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes.

Por lo tanto, en las células PNT2, el orden establecido en orden descendente de supervivencia celular fue  $C \approx CA \approx CAi > BysCA \approx Bysi > Ci$  ( $p < 0,001$ ) (Figura B5).

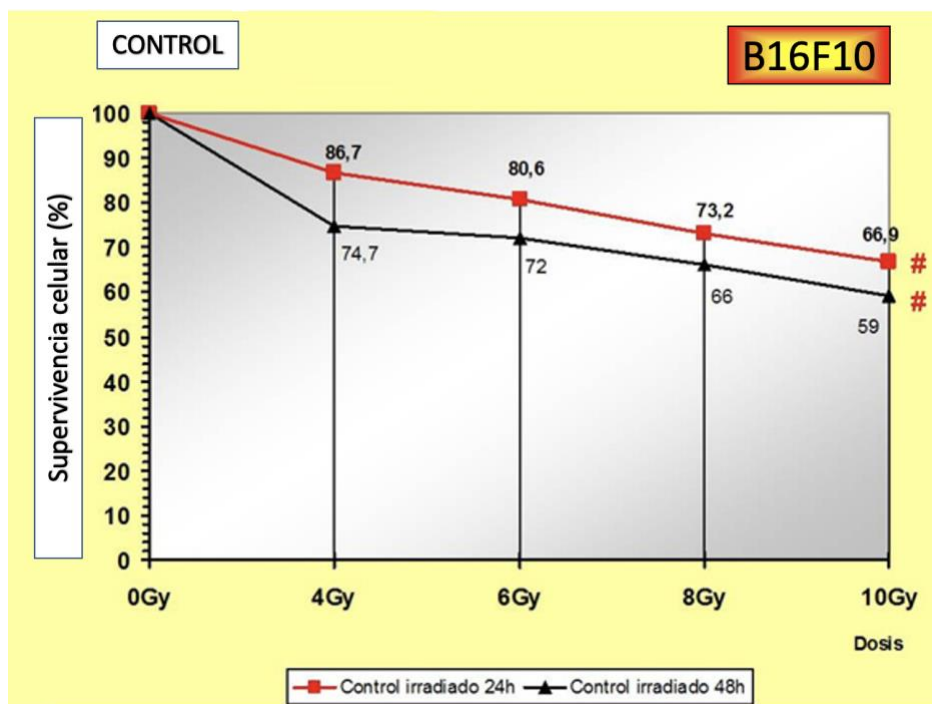
### 4.2.3. Resultados ensayo MTT en cultivos de células de melanoma metastásico B16F10.

Con el mismo protocolo seguido en los cultivos PNT2, en primer lugar, se evaluaron los porcentajes de supervivencia celular de los cultivos B16F10 expuestos a 0 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy y 10 Gy de rayos X, con determinaciones a las 24 y a las 48 horas de incubación postirradiación, sin tratamiento con ninguna sustancia. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla B6. Se observa una progresiva disminución en el porcentaje de células viables, determinándose una relación que es inversamente proporcional a la dosis de radiación administrada, así como al periodo de incubación tras la irradiación ( $p < 0,001$ ).

**Tabla B6.** Tabla dosis de radiación/tiempo de incubación donde se muestra el porcentaje de supervivencia celular (%) de cultivos de células B16F10 irradiadas con rayos X tras los dos periodos de incubación post-irradiación estudiados.

Tiempo/ Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
24 horas	100 ± 9,5	86,7 ± 7,4	80,6 ± 8,2	73,2 ± 6,8	66,9 ± 5,7*
48 horas	100 ± 2,5	74,7 ± 8,3	72 ± 6,8	66,0 ± 7,4	59,0 ± 5,9*

Las determinaciones muestran una supervivencia celular del 100% a las 24 h y 48 h en los cultivos controles que no fueron expuestos a RI. Cuando las células B16F10 son expuestas a 10 Gy de rayos X, la proporción de células supervivientes se reduce en un 33,1% tras 24 horas de incubación y en un 41% tras 48 horas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ); lo que expresa el daño citotóxico ocasionado por la RI (Tabla B6; Figura B6).



**Figura B6.** Curvas de supervivencia celular de cultivos celulares B16F10 controles ((#): ( $p < 0,001$ ) frente a las células control irradiadas).

#### 4.2.4. Resultados ensayo MTT en cultivos de células de melanoma metastásico B16F10 tratadas con ácido carnósico (AC).

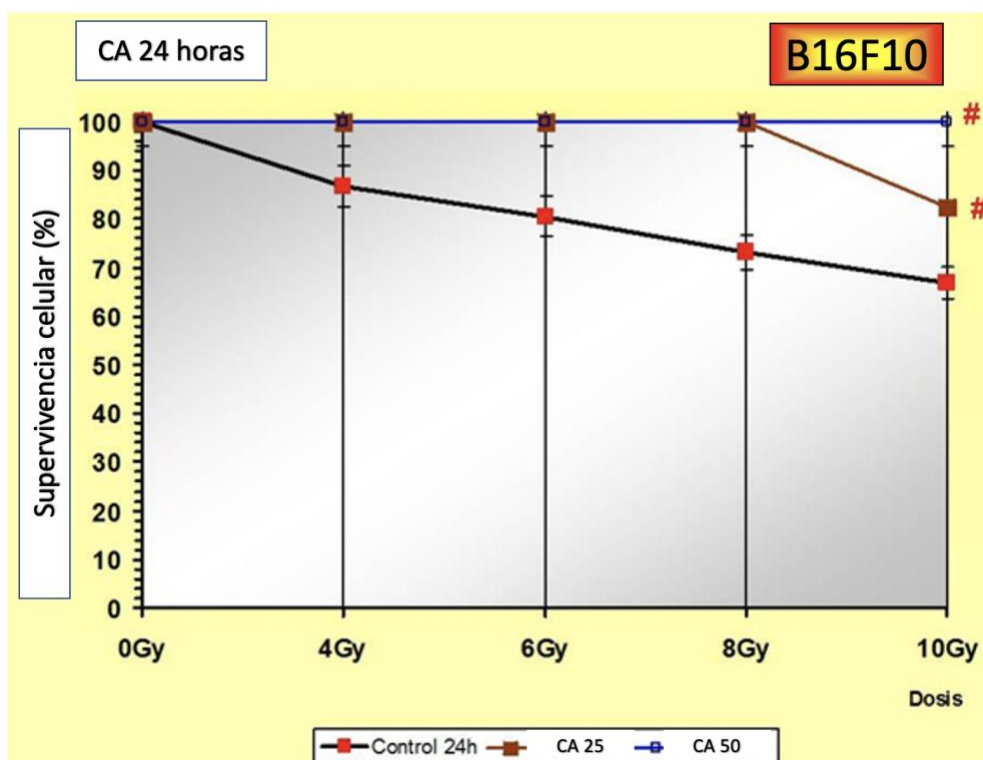
Para evaluar el efecto del AC sobre la supervivencia celular de las células de melanoma se realizó el ensayo MTT en cultivos celulares B10F16 tratados con 20 microlitros de AC 25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  durante 24 y 48 horas de incubación, en las distintas condiciones de irradiación utilizadas en este estudio. En la tabla D6 se pueden ver los resultados obtenidos. El tratamiento de los cultivos celulares B16F10 con AC 25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  no produce una disminución en la supervivencia celular de los cultivos B16F10 no irradiados, lo que muestra la ausencia de efecto citotóxico del AC sobre estas células (tabla B7).

La exposición a muestra, de manera generalizada, que en aquellos cultivos celulares que recibieron tratamiento con AC no se produce un descenso en el porcentaje de supervivencia celular o éste fue mucho menor respecto a sus cultivos controles. De esta forma, en los cultivos de B16F10 que son irradiados con 4 Gy, 6 Gy y 8 Gy de rayos X, no

se observa disminución significativa en el porcentaje de supervivencia celular, manteniendo tasas de supervivencia del 100% tanto a la concentración de 25  $\mu\text{M}$  como a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de AC.

**Tabla B7.** Tabla dosis radiación/concentración de AC donde se muestra el porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con AC (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 9,5	86,7 $\pm$ 7,4	80,6 $\pm$ 8,2	73,2 $\pm$ 6,8	66,9 $\pm$ 7,7
AC 25 $\mu\text{M}$	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 8,1	100,0 $\pm$ 7,6	100,0 $\pm$ 7,9	82,3 $\pm$ 9,2*
AC 50 $\mu\text{M}$	100,0 $\pm$ 7,9	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 8,2	100,0 $\pm$ 9,1	100 $\pm$ 0,2*



**Figura B7.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con AC a las concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas tras 24 horas de incubación ((#): ( $p < 0,001$ ) versus control irradiado).

Con las dosis de radiación más elevada, 10 Gy, se observa para ambas concentraciones de AC (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) que la supervivencia celular aumenta un 15,5%



para la concentración más baja (25  $\mu\text{M}$ ) y un 33,1% para la concentración más alta (50  $\mu\text{M}$ ) de AC cuando se comparan con los cultivos celulares controles irradiados. A ambas concentraciones de AC utilizadas, se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia de las células de melanoma B16F10 en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ( $p < 0,001$ ); lo que expresa una capacidad radioprotectora del AC frente al daño citotóxico inducido por la RI.

El FP obtenido para cultivos celulares B16F10 tratados con AC 25  $\mu\text{M}$  y expuestos a la dosis más alta de RI utilizada en este estudio (10 Gy) fue del 46,5% tras 24 horas de incubación. Cuando el tratamiento de los cultivos se realizó con AC a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  el FP determinado es del 100%.

Cuando los cultivos B16F10 se incubaron durante 48 horas tras la irradiación, el tratamiento con AC produce una disminución significativa en la supervivencia celular del 19% y 2% para las concentraciones 25  $\mu\text{M}$  y de 50  $\mu\text{M}$  respectivamente, en comparación con las células controles irradiadas. En ambas concentraciones de AC no se determinaron diferencias estadísticamente significativas con las obtenidas en los cultivos de células controles irradiados (Tabla B8; Figura B8). Por el contrario, la administración de AC muestra un efecto de radiosensibilizante, ya que provoca un incremento del daño citotóxico inducido por la RI (Figura B8).

**Tabla B8.** Tabla concentración AC/dosis de radiación donde se muestra el porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con AC (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10Gy
Control	100,0 $\pm$ 0	74,7 $\pm$ 8,3	72,0 $\pm$ 6,8	66,0 $\pm$ 7,4	59,0 $\pm$ 5,9
Ácido Carnósico 25 $\mu\text{M}$	100,0 $\pm$ 6,9	100,0 $\pm$ 7,9	77,7 $\pm$ 7,1	62,3 $\pm$ 6,2	39,8 $\pm$ 6 $\Delta$
Ácido Carnósico 50 $\mu\text{M}$	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 9,1	76,1 $\pm$ 7,4	71,2 $\pm$ 6,2	56,5 $\pm$ 6,7

El FP obtenido de los cultivos celulares B16F10 tras 48 horas de incubación tratados con las dos concentraciones de AC probadas (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) y expuestos a la dosis de radiación más alta en este estudio (10 Gy) es de cero, no determinándose capacidad de

protección del AC sobre este tipo celular, en contraposición a los resultados esperados previamente a la realización del estudio.

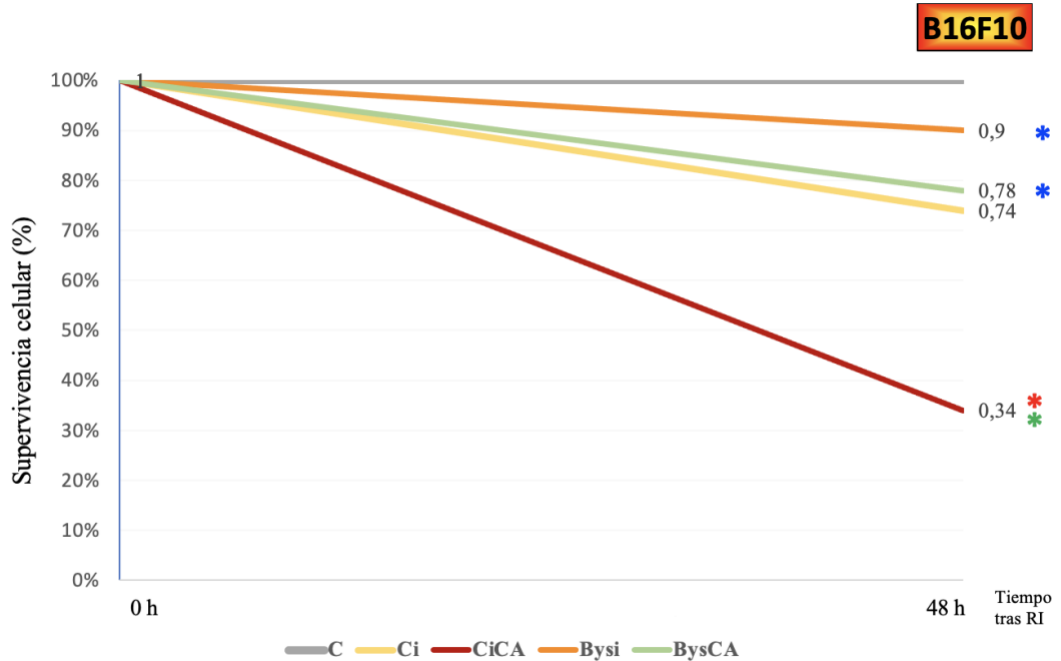


**Figura B8.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con AC a las concentraciones de 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas tras 48 horas de incubación ((O): ( $p < 0,001$ ) versus control irradiado).

### Resultados RIBE en ensayo MTT en células B16F10.

Para valorar el efecto RIBE en las células B16F10 a través del ensayo MTT se modificó ligeramente el protocolo de estudio, evaluando el efecto con 0 y 20 Gy de radiación ionizante y midiendo los resultados a las 48 horas de incubación post-irradiación. En las células B16F10 receptoras del RIBE, el grupo tratado con medio celular procedente de cultivos celulares irradiados con 2 Gy (Bysi), muestra una disminución significativa de la supervivencia celular ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células B16F10 control (C), lo que demuestra la capacidad citotóxica inducida por el medio de cultivo irradiado. La administración de AC a estas células antes de añadir el medio de cultivo celular irradiado (BysCA) mostró una disminución de la supervivencia celular ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo Bysi, lo que expresa un aumento del daño citotóxico inducido por la radiación X. No se ha establecido ningún factor de protección en estas células. Por el contrario, se

estableció una disminución de la supervivencia celular del  $100,1 \pm 3,5\%$  respecto al grupo tratado con suero irradiado (Bysi) que expresa la capacidad radiosensibilizadora del AC sobre las células B16F10 (Figura B9).



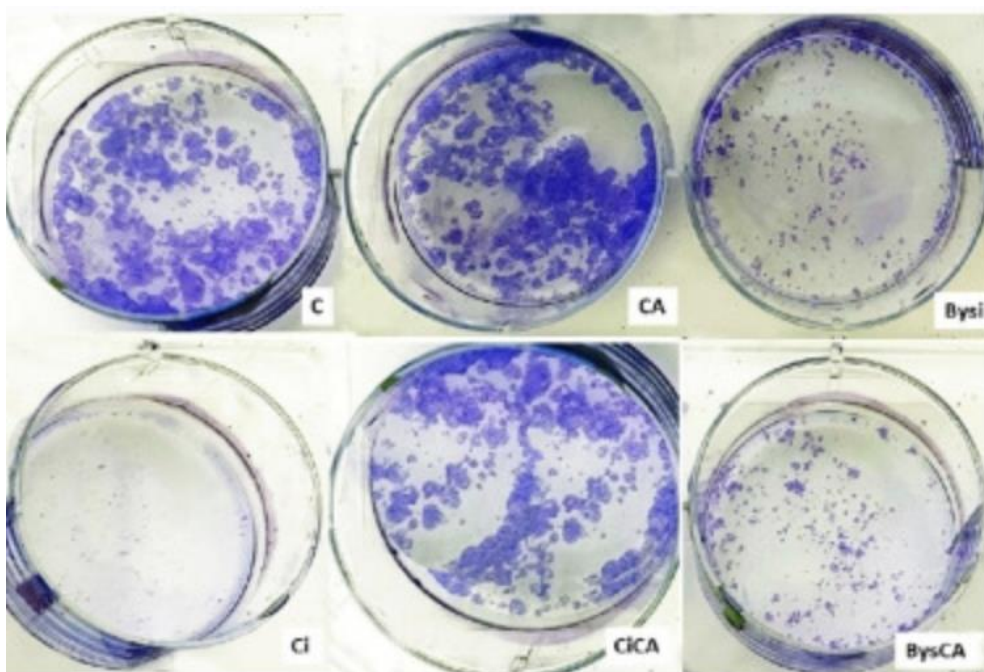
**Figura B9.** Ensayo MTT: Supervivencia celular de todos los grupos estudiados en B16F10 (C, control; CA, tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CAi, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bys, tratado con suero no irradiado; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0,001$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a C; \*  $p < 0,001$  frente a Ci). Los grupos CA y Bys no están representados en la figura, ya que coinciden con el grupo C. Los datos son la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes.

Por tanto, en las células B16F10, en orden descendente de supervivencia celular, se estableció el siguiente orden:  $C > Bysi > BysCA \approx Ci > CAi$  ( $p < 0,001$ ) (Figura B9).

### 4.3. Resultados de supervivencia celular mediante ensayo clonogénico.

#### 4.3.1. Ensayo clonogénico en cultivos celulares PNT2.

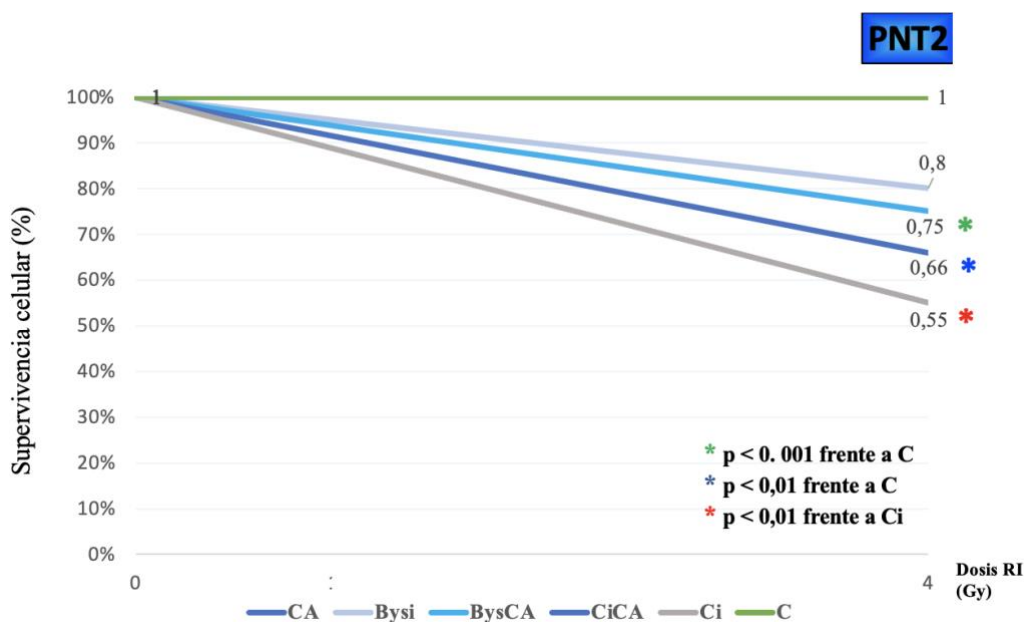
En los cultivos PNT2, la administración de AC o de medio obtenido a partir de cultivos celulares no irradiados (Bys) no modificó la fracción de supervivencia (FS) en comparación con la fracción de supervivencia (FS) determinada en las células control (C), lo que demuestra la ausencia de citotoxicidad del AC a las concentraciones ensayadas en este estudio. Por lo tanto, en la Figura C2 la representación del grupo de control (C) representa también a los grupos CA y Bys.



**Figura C1.** Resultados del ensayo clonogénico en las células PNT2 donde se observan las colonias supervivientes tras someter cada cultivo celular a las distintas condiciones de estudio (C, Ci, CA, CICA, Bysi, BysCA).

En los cultivos PNT2 sin tratamiento, la exposición a 4 Gy de rayos X (Ci) produce una disminución de la FS, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) en comparación con el grupo control no irradiado (C), lo que demuestra la capacidad

citotóxica de los rayos X. La administración del AC a los cultivos de células PNT2 preirradiación (CiCA) produce un aumento de la SF en comparación con el grupo control irradiado (Ci) ( $p < 0,01$ ), mostrando la capacidad citoprotectora del AC frente al daño citotóxico inducido por la RI. Se ha determinado un FP del  $24,4 \pm 2,1\%$ ; lo que expresa la capacidad radioprotectora del AC (Figura C1).



**Figura C2.** Ensayo clonogénico en cultivos de células PNT2. Fracción de supervivencia (FS) de células PNT2 irradiadas con 4 Gy de rayos X (C, control; CCA, tratadas con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CiCA, irradiadas previamente tratadas con ácido carnósico; Bys, tratadas con suero no irradiado; Bysi, tratadas con suero previamente irradiado; BysCA, tratadas con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0,001$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a Ci). Los datos son la media  $\pm$  desviación estándar de seis experimentos independientes.

En las células PNT2 que fueron tratadas con medio de cultivo procedente de cultivos PNT2 irradiados con 4 Gy de rayos X (Bysi) la FS disminuyó con respecto a la FS obtenida en las células PNT2 control (C) siendo dicha diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ); lo que muestra la citotoxicidad ocasionada por el medio celular irradiado y transferido al cultivo de células receptoras no expuestas a radiación (efecto bystander). No obstante, al administrar AC junto con medio de cultivo de células irradiadas (BysCA) no se observan diferencias significativas en la supervivencia celular, lo que puede interpretarse como una falta de efecto citoprotector del AC sobre las células bystander

(Bysi). Los grupos Bysi y BysCA muestran diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en la FS respecto a las células controles irradiadas (Ci), mostrando una mayor supervivencia celular que las células expuestas directamente a los rayos X (Ci).

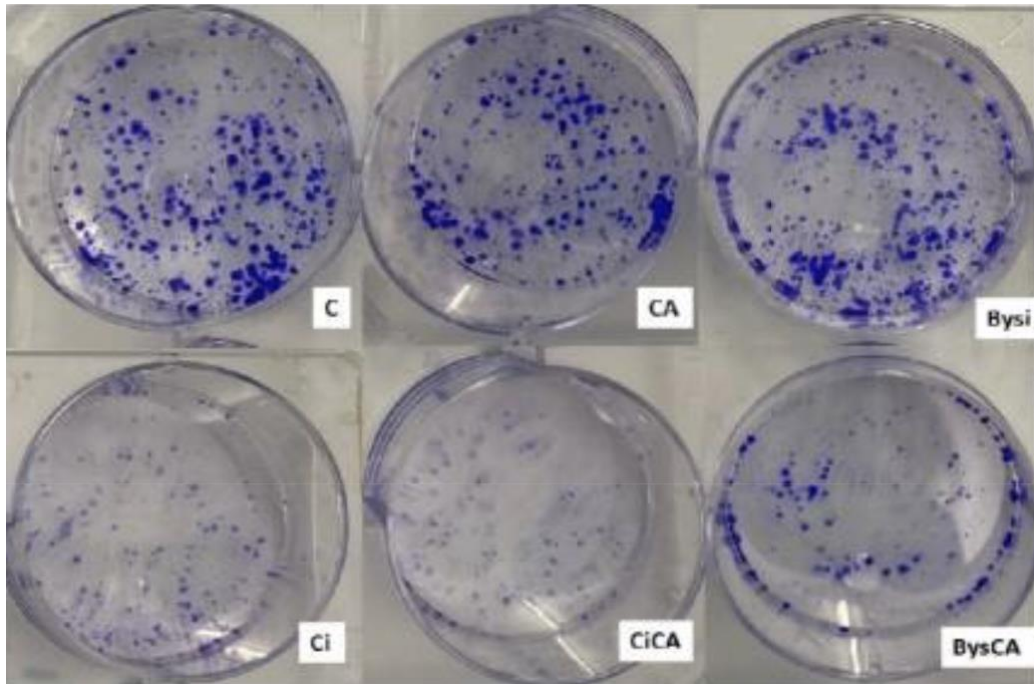
Por tanto, en los cultivos celulares PNT2 se establece el siguiente orden de supervivencia celular, ordenados de mayor a menor:  $C \approx CA \approx Bys > Bysi \approx BysCA > CiCA > Ci$  ( $p < 0,001$ ) (Figura C2).

#### **4.3.2. Ensayo clonogénico en cultivos celulares B16F10.**

En los cultivos celulares B16F10 la administración de AC no modifica la fracción de supervivencia (FS) respecto a la determinada para las células B16F10 controles (C), mostrando ausencia de citotoxicidad del AC a las concentraciones ensayadas. En las células B16F10, la exposición a 4 Gy de rayos X (Ci) produce una disminución de la FS celular, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ); lo que muestra la citotoxicidad inducida por los rayos X. La administración de AC a cultivos de células B16F10 preirradiación (Ci) produce una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) de la FS con respecto a la determinada para las células B16F10 irradiadas (CiCA), mostrando un aumento de la capacidad citotóxica del AC en estas células. Por todo ello, en estas células no se determina FP alguno; por el contrario, en las células controles irradiadas (Ci) se determina una disminución de la FS superior al  $60\% \pm 5,3\%$ , junto con un factor de radiosensibilización y potenciación del daño del  $32,7 \pm 3,1\%$ , que resulta superior al efecto dañino esperado en las células controles irradiadas con rayos X (Ci). Todo ello expresa una capacidad radiosensibilizadora del AC sobre las células B16F10 (Figura C3, Figura C4).

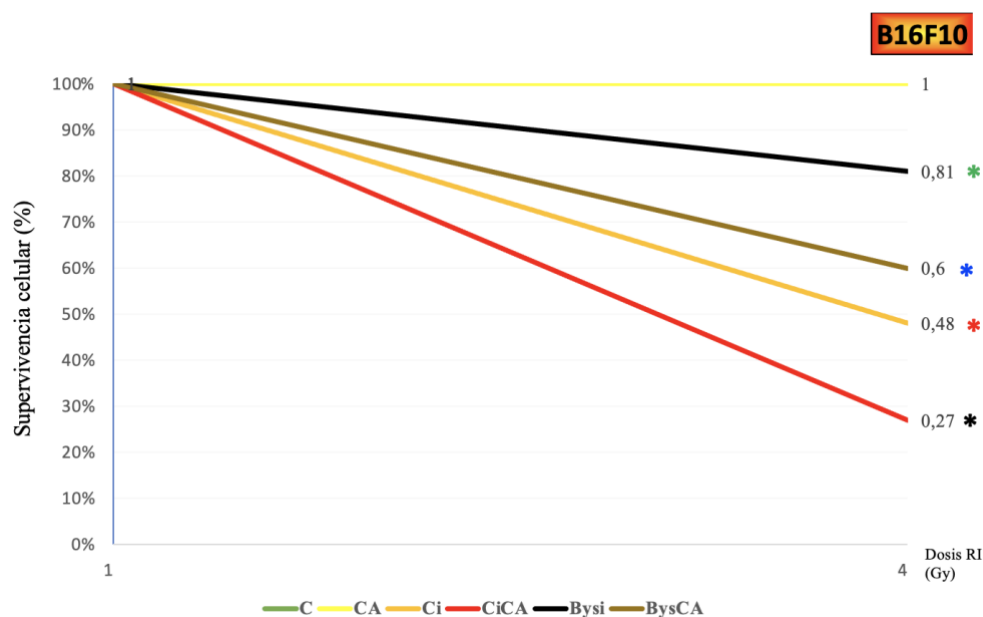
La FS de las células B16F10 tratadas con medio de cultivo procedente de cultivos celulares irradiados con 4Gy (Bysi) disminuye en comparación con las células controles (C) ( $p < 0,01$ ); lo que demuestra la citotoxicidad inducida por el medio de cultivo irradiado y así el efecto RIBE. En estas condiciones, la administración de AC a estas células (BysCA) no produce una disminución significativa de la FS respecto a las células tratadas con medio irradiado (Bysi); expresando una ausencia de efecto citotóxico del AC en estos cultivos

controles. Estos dos grupos (Bysi y BysCA) muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) respecto a las células controles irradiadas (Ci), determinándose una mayor supervivencia celular que la obtenida en las células expuestas directamente a los rayos X (Ci).



**Figura C3.** Resultados del ensayo clonogénico en las células B16F10 donde se observan las colonias supervivientes tras someter cada cultivo celular a las distintas condiciones de estudio (C, Ci, CA, CiCA, Bysi, BysCA).

El AC no muestra toxicidad en estas células no fueron expuestas directamente a los rayos X y en las que se muestra el efecto RIBE (BysCA), tal y como se determina en el grupo control tratado con AC y en el grupo irradiado (CiCA). Estos resultados expresan la pérdida de capacidad protectora del AC que en estas células adquieren una capacidad radiosensibilizadora sobre las células B16F10 receptoras (Figura C4). Por lo tanto, en las células B16F10, se establece el siguiente SF en orden descendente:  $C \approx CA \approx Bys \approx Bysi > BysCA > Ci > CiCA$  ( $p < 0,001$ ) (Figura C3, figura C4).



**Figura C4.** Ensayo clonogénico en cultivos de células B16F10. Fracción de supervivencia (FS) de células B16F10 irradiadas con 4 Gy de rayos X (C, control; CA, tratadas con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CiCA, irradiadas previamente tratadas con ácido carnósico; Bysi, tratadas con suero no irradiado; Bysi, tratadas con suero previamente irradiado; BysCA, tratadas con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0,001$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a Ci; \*  $p < 0,01$  Ci). Los datos son la media  $\pm$  desviación estándar de seis experimentos independientes.

#### 4.4. Resultados del ensayo de apoptosis con anexina v.

Los resultados en los ensayos de apoptosis mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas celulares estudiadas (PNT2 y B16F10).

##### 4.4.1. Resultados del ensayo de apoptosis en células PNT2.

En las células PNT2, la administración de AC produce una disminución significativa del porcentaje de células apoptóticas ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células controles (C), lo que muestra la capacidad del AC para disminuir significativamente la apoptosis en estas células. Cuando las células controles son expuestas a 20 Gy de rayos X (Ci) se produce un aumento significativo de células apoptóticas ( $p < 0,001$ ); lo que expresa el de daño celular inducido por la exposición directa a la RI. Nuestros resultados muestran que las células PNT2 tratadas con AC e irradiadas (CiCA) muestran una reducción



significativa del número de células apoptóticas respecto a las determinadas en las células irradiadas (Ci) ( $p < 0,001$ ). Esto expresa la capacidad radioprotectora de la AC frente al daño inducido por los rayos X, situando prácticamente el porcentaje de células apoptóticas al nivel obtenido por la administración de AC en células no irradiadas (CCA).

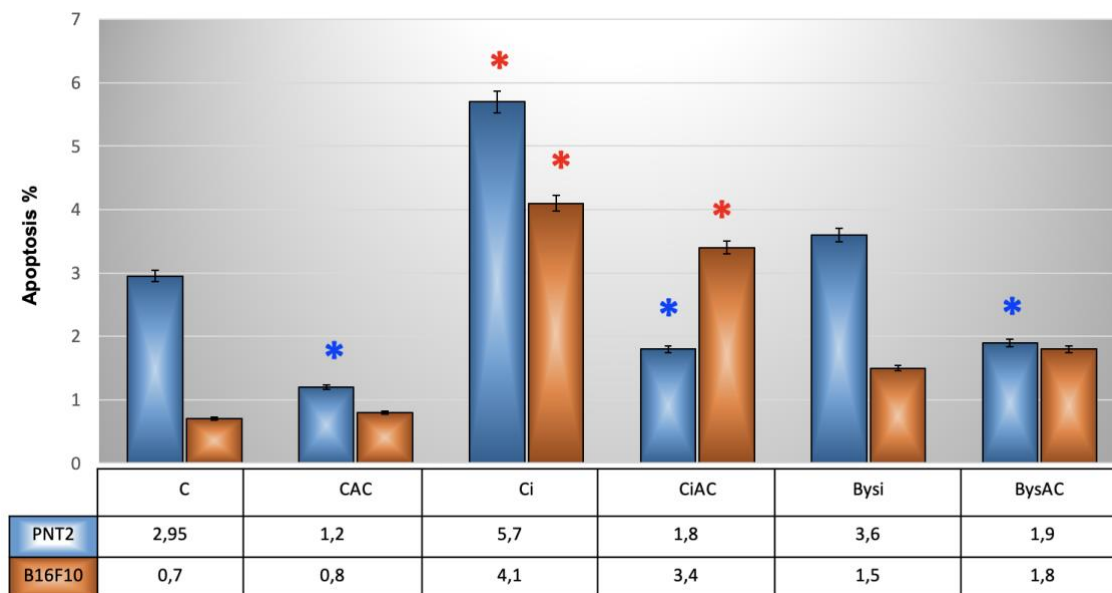
Además, la administración del medio de cultivo irradiado obtenido de cultivos de células PNT2 irradiadas (Bysi) muestra un aumento significativo de la apoptosis celular ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células controles (C); expresando un RIBE inducido sobre las células receptoras. Del mismo modo, la administración de AC en estas células produce una disminución del porcentaje de células apoptóticas ( $p < 0,01$ ). En resumen, se observa el siguiente orden en el porcentaje de células apoptóticas siguiendo un orden ascendente, de menor a mayor número de células apoptóticas:  $CA \approx CiCA \approx BysCA < C < Bysi < Ci$  ( $p < 0,001$ ) (Figura D1).

#### **4.4.2. Resultados del ensayo de apoptosis en células B16F10.**

En las células B16F10, la administración de AC no produce cambios significativos en el porcentaje de células apoptóticas respecto al determinado en las células controles (C), lo que expresa la falta de capacidad de la AC para disminuir la apoptosis en estas células. La exposición de las células controles irradiadas (Ci) con 20 Gy de rayos X produce un aumento significativo de células apoptóticas ( $p < 0,001$ ); lo que expresa el daño celular inducido por la exposición directa a RI. Las células B16F10 tratadas tanto con AC e irradiadas (CiCA) muestran una reducción significativa de células apoptóticas respecto a la observada en las células irradiadas (Ci) ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, puede observarse que el porcentaje de células apoptóticas sigue siendo cinco veces superior al determinado en las células control (C) o en las células no irradiadas tratadas con AC (CiCA) ( $p < 0,001$ ) (Figura D1).

La administración de medio de cultivo irradiado obtenido de cultivos de células B16F10 irradiadas (Bysi) muestra un aumento significativo de la apoptosis ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células controles (C); expresando un efecto bystander (RIBE) inducido en las células receptoras. Sin embargo, la administración de suero irradiado en células tratadas con AC (BysCA) no muestra una diferencia significativa en el porcentaje de células apoptóticas en comparación con el grupo no tratado con AC (Bysi).

Así, se determina el siguiente orden de menor a mayor porcentaje de células apoptóticas en las células B16F10:  $C \approx CA < Bysi \approx BysCA < CiCA < Ci$  ( $p < 0,001$ ) (Figura D1).



**Figura D1.** Porcentaje de células PNT2 y B16F10 en apoptosis 48 h después de la exposición a 20 Gy de rayos X (C, control; CA, tratadas con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CiCA, irradiadas previamente tratadas con ácido carnósico; Bysi, tratadas con suero previamente irradiado; BysCA, tratadas con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0,001$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a C). Los datos son la media  $\pm$  DE de seis experimentos independientes.

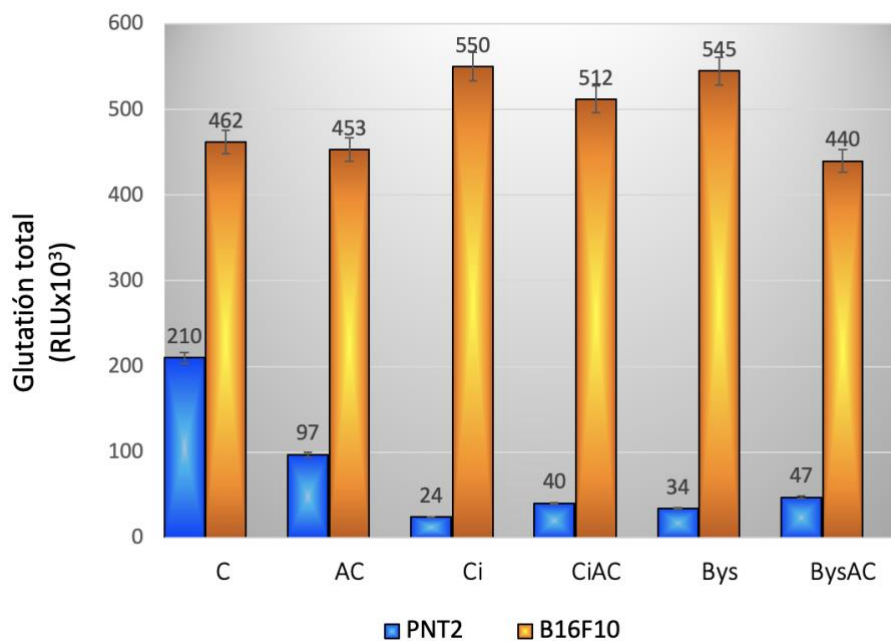
## 4.5. Resultados de supervivencia celular mediante ensayo de glutatión.

### 4.5.1. Determinación de glutatión total (GSH).

En primer lugar se evaluó la cantidad de glutatión total reducido (GSH) presente en los cultivos celulares PNT2 y B16F10 en las distintas condiciones de tratamiento e irradiación ensayadas mediante la medida de los valores de luminiscencia expresada en unidades relativas de luz (RLU) que se muestran en la tabla E1.

**Tabla E1.** Tabla en la que se muestran los resultados de luminiscencia de los cultivos celulares PNT2 y B16F10 en las distintas condiciones ensayadas (C=control sin irradiar, CA= control + ácido carnósico, Ci= control irradiado, CiCA= control irradiado + ácido carnósico, Bys= cultivo tratado con suero irradiado, BysCA= cultivo tratado con suero irradiado + ácido carnósico).

<b>GSH</b>	<b>PNT2</b>	<b>B16F10</b>
<b>C</b>	210	462
<b>CA</b>	97	453
<b>Ci</b>	24	552
<b>CiCA</b>	40	512
<b>Bys</b>	34	545
<b>BysCA</b>	47	440



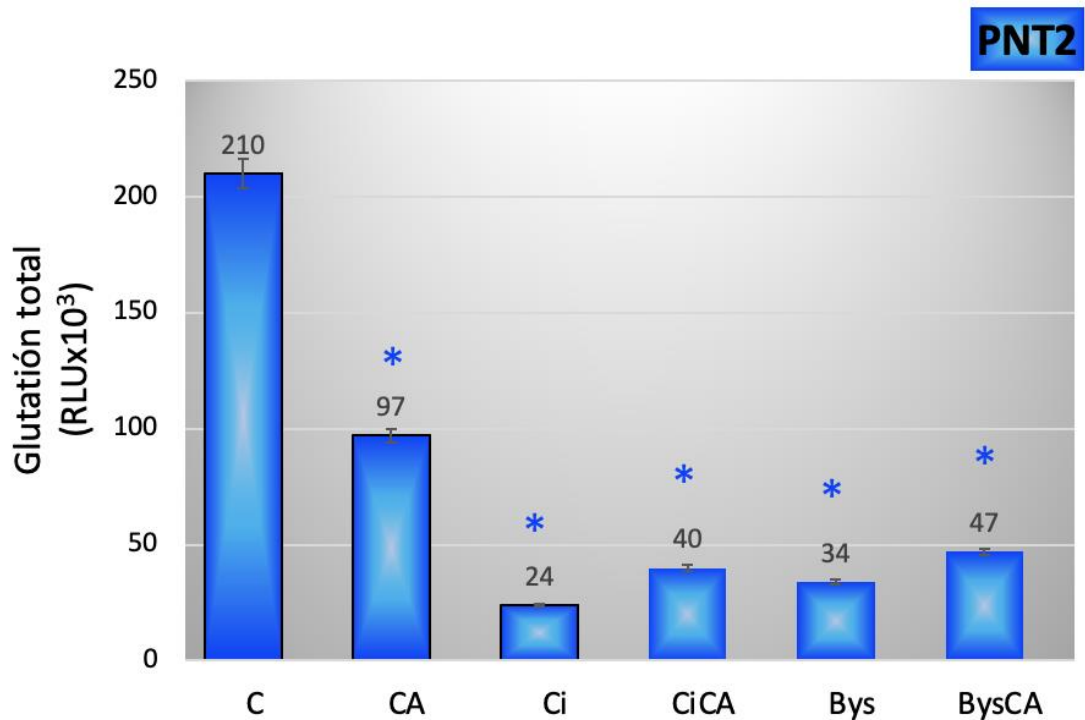
**Figura E1.** Gráfica comparativa de niveles de GSH de ambas líneas celulares, PNT2 y B16F10, al ser sometidas a las 6 condiciones del ensayo. En ella se observa el aumento en la cantidad de GSH total en todas las condiciones de la estirpe B16F10 con respecto a los valores obtenidos en las mismas condiciones para las células PNT2.

La determinación del contenido celular total de GSH mostró diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas celulares estudiadas. Las células B16F10 presentaron una cantidad mucho mayor de GSH total que las células PNT2 ( $p < 0,001$ ), que

fue prácticamente el doble de la concentración de GSH total determinada en las células PNT2 (B16F10 > PNT2,  $p < 0,001$ ).

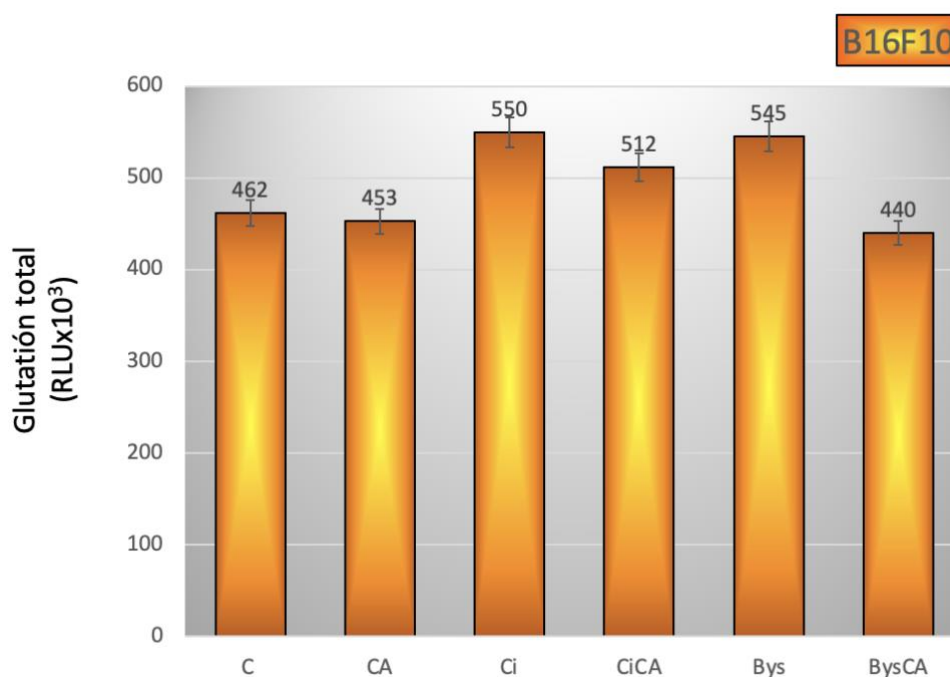
En las células PNT2 se observaron diferencias significativas entre las células control (C) y los otros grupos de células estudiados (CA, Ci, CiCA, Bysi y BysCA), observándose una reducción en los niveles de glutatión total reducido en el resto de condiciones, siendo dicho hallazgo reflejo de la disminución significativa en los niveles de glutatión total en comparación con las células control (C) ( $p < 0,001$ ).

En las células PNT2, se estableció el siguiente orden descendente en función de la concentración de glutatión total:  $C > CA \approx Ci \approx Ci+CA \approx Bysi \approx Bys+CA$  ( $p < 0,001$ ) (figura E2).



**Figura E2.** Ensayo GSH: concentraciones totales de glutatión de los distintos grupos estudiados en las células PNT2 (C, control; CA, tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CiCA, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0,001$  frente a control PNT2 (C)). Los datos son la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes.

Cuando se analizaron los niveles de GSH en las células B16F10, se observaron concentraciones mucho más elevadas que en las células PNT2 en todas las condiciones, sin embargo, las diferencias observadas entre los distintos grupos de las células B16F10 no fueron estadísticamente significativas (Figura E3).



**Figura E3.** Ensayo GSH: concentraciones totales de glutación de los distintos grupos estudiados en las células B16F10 (C, control; CA, tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CiCA, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico). Los datos son la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes.

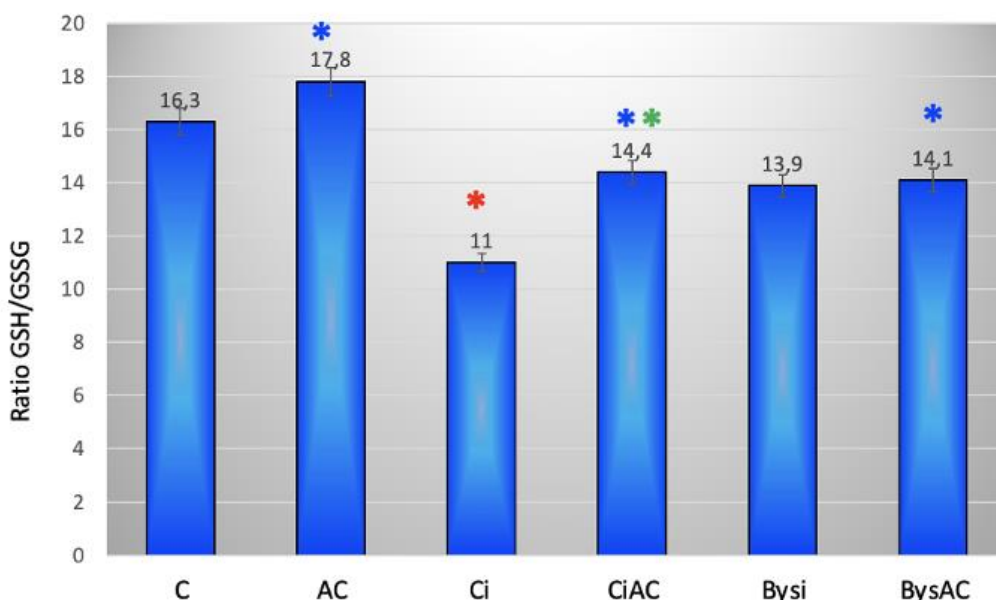
#### 4.5.2. Determinación de la ratio glutación reducido/glutación oxidado (GSH/GSSG).

##### 4.5.2.1. Relación GSH/GSSG en células PNT2.

En las células PNT2, la administración de AC produce un aumento significativo de la relación GSH/GSSG, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ); lo que expresa la capacidad del AC para aumentar la relación GSH/GSSG en las células tratadas, reduciendo así el aumento de la concentración de GSH en el citoplasma de estas células. Cuando las células PNT2 son expuestas a 20 Gy de rayos X (Ci) se produce una

disminución significativa de la ratio GSH/GSSG durante el periodo estudiado ( $p < 0,001$ ); lo que expresa la disminución de la concentración de glutatión reducido como consecuencia de la exposición directa a RI. Cuando las células PNT2 son tratadas con AC e irradiadas (CiCA) presentan una relación GSH/GSSG inferior a la obtenida en las células no irradiadas (C) ( $p < 0,01$ ); lo que expresa el daño inducido por los rayos X. Además, la ratio GSH/GSSG es superior en las células tratadas con AC e irradiadas (CiCA) respecto a las células controles irradiadas (Ci) ( $p < 0,05$ ); lo que expresa la capacidad citoprotectora del AC (Figura E4).

La administración del medio de cultivo obtenido a partir de cultivos de células PNT2 irradiadas (Bysi) muestra una reducción en la relación GSH/GSSH respecto a las células controles (C) ( $p < 0,01$ ), y refleja las lesiones producidas por la administración del medio irradiado (efecto RIBE) en las células receptoras. Sin embargo, cuando la administración del medio irradiado es precedida por la administración de AC (BysCA) no se observan diferencias significativas en la relación GSH/GSSH respecto a las células no tratadas con CA (Bys), mostrando una ausencia de capacidad citoprotectora del AC para estas células en las que se induce el RIBE. De mayor a menor ratio de GSH/GSSH obtenida en las células PNT2 se puede describir la siguiente relación:  $CA > C > CiCA \approx Bysi \approx BysCA > Ci$  ( $p < 0,001$ ) (Figura E4).



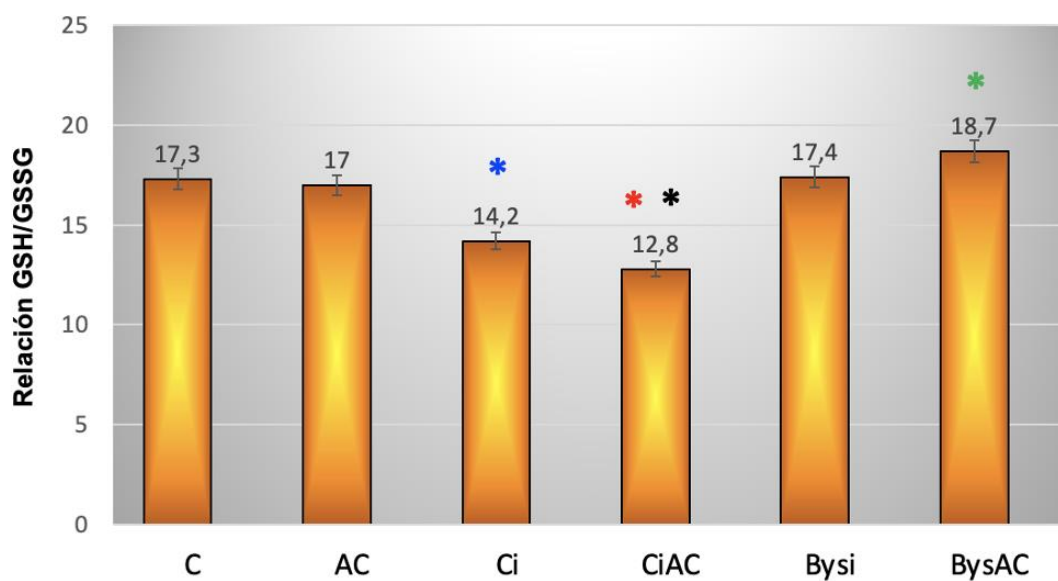
**Figura E4.** Proporciones GSH/GSSG de las células PNT2 (C, control; CA, tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CiCA, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\*  $p < 0,001$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a C; \*  $p < 0,01$  frente a Ci; \*  $p < 0,05$  frente a Ci). Los datos son la media  $\pm$  desviación estándar de seis experimentos independientes.

#### 4.5.2.2. Relación GSH/GSSG en células B16F10.

La ratio GSH/GSSG es similar en los cultivos celulares controles (C), en los cultivos tratados con AC (CA) y en los de células irradiadas (Bysi), sin determinarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Cuando las células controles fueron expuestas a 20 Gy de rayos X (Ci) se observa una disminución de la relación GSH/GSSG durante el periodo de estudio, siendo estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ); lo que expresa una disminución de la concentración de glutatión reducido como consecuencia de la exposición directa a la RI. Los resultados muestran que las células B16F10 que son tratadas con AC e irradiadas (CiCA) muestran una relación GSH/GSSG inferior a la que se determina en las células no irradiadas (C), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Estos resultados expresan el daño inducido a las células por los rayos X; pero, además, se observa una mayor disminución de la relación GSH/GSSG respecto a las células irradiadas (Ci) ( $p < 0,05$ ). Este resultado expresa la mayor radiosensibilización de estas células tras la administración de AC.

La administración de medio de cultivo irradiado procedente de cultivos de células B16F10 irradiadas (Bysi) no muestra diferencias significativas en la ratio GSH/GSSG respecto a las células controles (C). Sin embargo, la administración de AC a estas células (BysCA) produce un aumento significativo de la relación GSH/GSSG en comparación con el grupo control (C) ( $p < 0,01$ ) y el grupo Bysi ( $p < 0,01$ ). De mayor a menor ratio GSH/GSSG en las células B16F10, los resultados pueden expresarse en el siguiente orden: BysCA > C  $\approx$  CA  $\approx$  Bysi > Ci > CiCA ( $p < 0,001$ ) (Figura E5).



**Figura E5.** Proporciones GSH/GSSG de las células B16F10 (C, control; CA, tratado con ácido carnósico; Ci, control irradiado; CiCA, irradiado previamente tratado con ácido carnósico; Bysi, tratado con suero previamente irradiado; BysCA, tratado con suero irradiado previamente tratado con ácido carnósico) (\* p < 0,001 frente a C; \* p < 0,01 frente a C; \* p < 0,01 frente a Ci; \* p < 0,05 frente a Ci). Los datos son la media  $\pm$  desviación estándar de seis experimentos independientes.





## **V. DISCUSIÓN.**



## V. Discusión.

Durante mucho tiempo se ha aceptado que los efectos genéticos inducidos por la radiación requieren que el ADN sea alcanzado y dañado directamente por la radiación ionizante. Sin embargo, en las últimas décadas diversos estudios han descrito que en poblaciones celulares expuestas a dosis bajas de partículas alfa, los efectos biológicos se producen en una proporción mayor de células de las que se estima que han sido atravesadas por éstas partículas alfa, poniendo de manifiesto un efecto distinto que amplifica los efectos radioinducidos y que se ha descrito como efecto bystander inducido por la radiación ionizante (RIBE) [190]. El diseño de nuestro estudio parte de la necesidad de ampliar el conocimiento sobre estos efectos indirectos (RIBE), menos conocidos, derivados de una acción directa de las radiaciones ionizantes pero cuyo efecto ocurre en células que no se han expuestos directamente a esta radiación. El interés de conocer o evaluar el tipo de señales que conforman el RIBE deriva del amplio uso actual de la RI como terapia para erradicar o paliar gran cantidad de neoplasias, consiguiéndose un innegable beneficio, pero cuya eficiencia podría mejorar si se consigue minimizar los daños radioinducidos. Analizando las vías de inducción del daño celular desde las células diana (células irradiadas directamente) hasta las células bystander se podría estimar el riesgo de carcinogénesis por radiación, ya que se considera que este riesgo es producido fundamentalmente por dosis bajas de RI. En el caso de partículas alfa los efectos se detectan con dosis tan bajas como 0,6 cGy, siendo este umbral mayor en el caso de los rayos X ya que, el aumento de expresión de proteína p53 que se considera una proteína intermediaria, no se observa por debajo de los 10 cGy. Esto parece indicar la existencia de un umbral de daño del ADN relativamente más alto para la radiación poco ionizante [31,191].

Numerosos autores han estudiado aspectos de posibles factores que pueden contribuir a la aparición del RIBE. Koyama et al. (1998) describieron la existencia de radicales inductores del daño celular que presentaban distintos tiempos de vida media y concluyeron que las mutaciones y las transformaciones morfológicas son causadas probablemente por la presencia de radicales de vida larga, más que por radicales de vida corta, como  $H^{\bullet}$  u  $OH^{\bullet}$  [192].

Por otro lado, dada la alta capacidad antioxidante del AC, también hemos considerado de interés no sólo evaluar un posible efecto radioprotector sobre el daño directo de las células inducido por la RI, sino también el daño indirecto sobre estas células receptoras (RIBE) tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando diferentes técnicas que nos permiten determinar su capacidad genoprotectora del ADN y radioprotectora sobre la supervivencia celular. Con el objetivo de evaluar esta respuesta del AC decidimos realizar el estudio sobre dos tipos celulares con una sensibilidad a la RI completamente opuestas, uno con perfil de crecimiento normal y alta radiosensibilidad (células normales, no tumorales, de próstata humana, PNT2) y, por otro, células con elevada capacidad proliferativa y metastásica con una elevada radorresistencia intrínseca (células de melanoma metastásico de ratón, B16F10). Los distintos grados de radiosensibilidad de estas dos estirpes celulares podría atribuirse a las proteínas de señalización y reparación del daño del ADN, al microambiente tumoral, o las diferentes situaciones de hipoxia, metabolismo celular, concentración de glutatión y diferente equilibrio redox, las vías de señalización de la proteína quinasa, e incluso a la existencia de pigmentación y al contenido y/o producción de melanina [193].

Para evaluar el impacto sobre la supervivencia celular del AC frente a la RI hemos seleccionado una serie de ensayos que permiten cuantificar cada uno de los parámetros que hemos considerado interesantes en el estudio (genotoxicidad, supervivencia celular, niveles de glutatión y apoptosis) por su validez contrastada para dicho propósito. Para ello hemos podido realizar los ensayos de MN *in vivo* (sobre reticulocitos y sobre eritroblastos policromatófilos de médula ósea de ratón) e *in vitro* (sobre linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético), el ensayo de supervivencia celular con MTT y de formación de colonias *in vitro* (clonogénico), la determinación de GSH reducido y oxidado y la cuantificación de la apoptosis y muerte celular tardía inducida por la radiación ionizante.

El ensayo de micronúcleos (MN) es uno de los métodos más utilizados para evaluar el daño cromosómico causado por agentes químicos y físicos [194–196]. Es útil para evaluar la genotoxicidad causada por agentes como los rayos X y está avalado como prueba determinante del daño genotóxico por distintos organismos internacionales como el Organismo Internacional de la Energía Atómica (OIEA), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Organización Internacional para la

Normalización (OIN) [197]. El ensayo de MN *in vitro* en linfocitos humanos irradiados con bloqueo de la citocinesis (CBMN) es una técnica ampliamente validada que permite evaluar la inestabilidad del ADN inducida por agentes genotóxicos. Por sus características, esta técnica es especialmente útil en la búsqueda de sustancias genoprotectoras, ya que permite evaluar el aumento o disminución en la frecuencia de MN tras el tratamiento con la sustancia evaluada [198,199]. En este ensayo, el MN se define como un fragmento cromosómico que queda fuera del huso durante la mitosis y permanece aislado del resto de material cromosómico en el citoplasma tras la división celular.

Por otro lado, los ensayos de MN *in vivo* permiten evaluar otros parámetros biológicos complejos que complementan los resultados esperados. El ensayo de MN en médula ósea de roedores es el ensayo de MN más utilizado para la determinación de la genotoxicidad *in vivo* [200,201]. En los estudios *in vivo* en mamíferos, un MN se define como cuerpo citoplasmático de naturaleza nuclear que se corresponde con un fragmento de ADN que permanece en el citoplasma cuando el núcleo principal ya ha sido expulsado durante la eritropoyesis. Las células seleccionadas para la lectura de MN en este ensayo son los eritrocitos policromatófilos debido a que unas horas después de la finalización de la última mitosis, los eritroblastos expulsan su núcleo, pero los MN permanecen en el citoplasma, siendo más fácilmente reconocibles.

Estos MN que quedan en el citoplasma de los eritroblastos policromatófilos de la médula ósea de ratón son un reflejo de las aberraciones cromosómicas originadas por roturas de cromosomas, errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos.

Los MN son fácilmente reconocibles como estructuras redondeadas debido a sus características de tinción de la cromatina, que son similares en intensidad y textura a la tinción del núcleo principal localizado en el citoplasma, viéndose en un color violáceo intenso con microscopía óptica al ser teñidos con May-Grünwald y Giemsa [202,203]. La adición de técnicas de citometría de flujo para la determinación de reticulocitos en sangre representa la última modificación del ensayo de MN *in vivo*. Hemos utilizado este ensayo en este estudio como un test complementario para confirmar los resultados y reducir los

sesgos estadísticos debido a que la citometría permite la evaluación de cientos de miles de células en cada uno de los análisis realizados [204].

En definitiva, los MN reflejan aberraciones cromosómicas causadas por roturas cromosómicas inducidas por errores durante la replicación del ADN, las cuales se observan en el citoplasma tras la división celular. Aunque puede determinarse una frecuencia basal o espontánea de MN en poblaciones normales, esta frecuencia aumenta significativamente tras la exposición a agentes genotóxicos o sustancias mutagénicas [194–197,202,203,205]. No existe un único ensayo recomendado para la evaluación de la genotoxicidad. Por lo tanto, la interrelación de los resultados obtenidos entre los tres ensayos descritos anteriormente permite una evaluación más precisa de los efectos genotóxicos de cualquier agente o sustancia ensayada.

En nuestro estudio hemos utilizado estos tres ensayos citogenéticos diferentes de forma complementaria para confirmar la capacidad genotóxica de los rayos X mediante la determinación de la frecuencia de aparición de MN en linfocitos humanos irradiados y en los animales expuestos a RI. Asimismo, es un test de gran utilidad para evaluar posibles sustancias genoprotectoras ya que, pueden detectar una disminución en la frecuencia esperada de MN al someterse al tratamiento. En este caso de tratamiento con AC, los cultivos celulares y los animales evaluados presentan una reducción en la frecuencia de MN que confirma la capacidad genoprotectora o efecto antigenotóxico del AC frente al daño inducido por la RI [199,202,203,205]. Dentro del diseño del estudio hemos incluido la evaluación de los efectos a distancia ocasionados por la RI y que aparecen en las células receptoras utilizando también estos ensayos de MN. Determinando la frecuencia de MN ha sido posible cuantificar los efectos genotóxicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, del suero irradiado de animales receptores y del medio irradiado obtenido de células de cultivos irradiados, respectivamente, con el fin de caracterizar su influencia sobre las células receptoras y un posible efecto lesivo de los mismos sobre estas células (RIBE) [206].

No hemos encontrado referencias previas que describan el efecto del AC frente al daño genotóxico inducido en las células receptoras por la administración de medio irradiado o suero procedente de animales expuestos a radiación ionizante (RIBE). Nuestros resultados

en la determinación de la frecuencia de MN en células tratadas con medio irradiado y AC muestran una reducción significativa en la frecuencia de aparición de MN, lo que expresa una capacidad genoprotectora frente a este daño genotóxico inducido en las células receptoras o bystander. La homogeneidad de los resultados obtenidos en este estudio nos permite determinar la capacidad genoprotectora del AC tanto *in vivo* como *in vitro*; poniendo de manifiesto el efecto genoprotector del AC tanto en células expuestas directamente a la radiación ionizante como en las células receptoras no irradiadas o células bystander (RIBE).

El crecimiento o desarrollo celular se puede ver afectado por sustancias químicas y agentes físicos. La inhibición del desarrollo o proliferación celular en radiobiología también se denomina con el nombre de Supervivencia Celular[207] y es uno de los parámetros que hemos determinado en este estudio. Las técnicas más ampliamente utilizadas y recomendadas para dicho fin son: el ensayo con MTT [139,208–210] y, más recientemente, el ensayo clonogénico *in vitro*. La línea celular PNT2 es una estirpe que deriva de células de próstata humana normales con una elevada radiosensibilidad a la radiación ionizante y que hemos puesto de manifiesto en diferentes estudios previos [140,208–210]. Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura científica referencias previas que describan el efecto del AC en las células PNT2 expuestas a RI. En nuestro estudio se analizó este efecto al exponer los cultivos celulares de PNT2 a 20 Gy de rayos X, obteniendo un aumento significativo de la supervivencia celular cuando las células son tratadas con AC y poniendo de manifiesto la capacidad radioprotectora de esta sustancia con capacidad antioxidante. Esta capacidad radioprotectora es similar a la descrita para otras sustancias como el ácido rosmarínico[211] o el carnosol[140], y se ha atribuido a sus propiedades antioxidantes por las cuales son capaces de eliminar los radicales libres que son inducidos por la acción de la RI [208–210,212].

En algunos estudios previos hemos descrito el efecto citotóxico de la RI sobre las células B16F10 [208,209,212]. En nuestro estudio hemos utilizado las células B16F10 para evaluar los posibles efectos radioprotectores del AC. Sin embargo, contrariamente a los resultados que esperábamos, el tratamiento de las células B16F10 con AC produjo una disminución significativa en la supervivencia celular que no se correlaciona con las



capacidades del AC en otras líneas o ensayos celulares en donde siempre produce un incremento de la supervivencia celular [140,203,208,210].

No hemos encontrado en la literatura científica estudios previos sobre los efectos del AC en la supervivencia celular de las células B16F10 irradiadas. No obstante, sí que se dispone de estudios realizados con otros compuestos polifenólicos y diterpenos que han demostrado una actividad antiproliferativa inhibiendo el crecimiento celular de las células de melanoma B16F10 [213–215] y disminuyendo la capacidad de invasión metastásica *in vivo* [138,216]. Además se sabe que esta inhibición sobre el crecimiento celular producido por este tipo de sustancias es mayor si son administradas antes de la exposición a RI [140,217]. Por otro lado, diferentes autores han demostrado una sinergia entre el AC en combinación con distintos fármacos antitumorales potenciando la capacidad antiproliferativa sobre las células B16F10 [138,216,218–220], mostrando inhibición de la adhesión y migración metastásica de células de melanoma, que se ha atribuido a la inhibición de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y a la inactivación de AKT [138,218,219]. De igual forma, en diversos tipos de cáncer se ha descrito alteraciones en la vía fosfatidilinositol-3-quinasa/proteín-quinasa-B (PI3K/AKT) que pueden producir una alteración en los mecanismos que controlan el crecimiento y la supervivencia celular, aumentando el poder metastásico tumoral y la resistencia a los tratamientos disponibles [221].

El glutatión (GSH) es un compuesto tripéptido tiol predominante en muchos organismos procariontes y eucariotes, que se sintetiza a partir de sus aminoácidos precursores: gamma-glutamato, la cisteína (Cys) y la glicina. Interviene principalmente en los mecanismos de desintoxicación mediante reacciones de conjugación. Otras funciones incluyen la transferencia de tioles, la destrucción de radicales libres y el metabolismo de diversos compuestos exógenos y endógenos. Es imprescindible que la célula gestione una elevada concentración de GSH intracelular para protegerse de los desequilibrios químicos/endógenos. Las enzimas dependientes del glutatión: glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y gamma-glutamato transpeptidasa facilitan estas funciones protectoras. También se ha implicado al GSH en la muerte celular programada (apoptosis) [222].

A lo largo de los años, son muchos los autores que han encontrado en sus estudios datos que apuntan a una interrelación entre la radiosensibilidad y la radiorresistencia de las células expuestas a radiación ionizante con la existencia y concentración del glutatión [137,184,220,223–227] por lo que nos propusimos evaluar las concentraciones de glutatión en las dos líneas celulares estudiadas y su comportamiento frente a la exposición a los rayos X en las células de próstata humana normal PNT2 y las células de melanoma metastásico B16F10. El glutatión, y su precursor la cisteína (Cys), son compuestos sulfhidrilos (tioles) que constituyen importantes antioxidantes intracelulares con capacidad para eliminar el estrés oxidativo inducido por la RI. En el exterior de la célula, la Cys se encuentra en su forma oxidada, la cisteína, que debe reducirse a gamma-glutamilcisteína para ser transportada a través de la membrana celular por la GSH reductasa y liberada en el interior de la célula, donde se convierte en precursora de la GSH. Cys y GSH constituyen los principales antioxidantes intracelulares, siendo capaces de mantener la homeostasis contrarrestando los ROS inducidos por la RI y reduciendo el estrés oxidativo [228,229]. El GSH desempeña, además, un papel esencial en el metabolismo de la melanina. Dado que los cambios en el contenido intracelular de GSH pueden modificar los procesos de proliferación y detoxificación celular, esto podría determinar la respuesta terapéutica a algunas estrategias de tratamiento del cáncer. En nuestro estudio, una diferencia importante entre los dos tipos celulares estudiados es la capacidad única que presentan los melanocitos para producir melanina. En las células melánicas, la Cys tiene un destino adicional debido a su implicación con una de las vías de melanogénesis para formar feomelanina [228]. La activación de la vía de síntesis de la feomelanina o un aumento de la concentración intracelular de Cys y/o de los niveles de GSH aumenta su utilización en la síntesis de la feomelanina, en detrimento de su disponibilidad para la síntesis de eumelanina y de las otras actividades metabólicas celulares [184,224,227].

Nuestros resultados muestran que las células B16F10 tienen una concentración total de glutatión mucho mayor que las células PNT2, confirmando nuestros resultados ya descritos previamente [223]. Numerosos autores han atribuido la resistencia de las células al tratamiento con sustancias quimioterapéuticas y RI a la cantidad de glutatión intracelular [230–234]. Esta gran diferencia en la cantidad de glutatión intracelular total en las células

B16F10 podría ser una explicación, en nuestro estudio, de la mayor radiorresistencia frente a la presentada por las células PNT2.

No hemos encontrado referencias previas en la literatura científica sobre el efecto del AC en la concentración de GSH en las células PNT2 expuestas a RI. Nuestros resultados muestran que la administración de AC produce una disminución en la cantidad de concentración total de GSH en todos los grupos de células (Ci, CiAC, Bysi y BysAC) en comparación con el grupo control (C). Esto podría expresar la capacidad citotóxica de las células que recibieron AC, exposición a rayos X y medio de cultivo irradiado. Sin embargo, se determinó un aumento significativo de la ratio GSH/GSSG tanto en las células irradiadas como en las no irradiadas, lo que podría explicar parte de la capacidad radioprotectora del AC en las células PNT2. Nuestros resultados apoyan la hipótesis descrita por otros autores sobre el efecto radioprotector de un antioxidante intracelular, ya que actuaría de forma complementaria o aditiva con el glutatión endógeno intracelular, ayudando así a mantener niveles elevados de glutatión intracelular reducido [139,209,233,234].

Tampoco hemos encontrado en la literatura científica referencias previas sobre el efecto de la administración de AC sobre el GSH intracelular en células B16F10. En nuestro estudio, la administración de AC a células B16F10 no modificó la cantidad de glutatión total ni la ratio GSH/GSSG. Sin embargo, tras la exposición a los rayos X, la administración de AC produjo una disminución significativa de la ratio GSH/GSSG. Esto implica una reducción del glutatión reducido disponible por la célula para eliminar los radicales libres inducidos por la RI, lo que en términos generales está relacionado con el aumento del estrés oxidativo inducido por la RI, y puede interpretarse como un signo del daño inducido por la RI [235].

En otras líneas celulares, los efectos del AC aumentan la apoptosis mediante la inducción de la expresión de las caspasas 3, 8 y 9 y afectando a la vía Akt/mTOR [220,236,237]. En nuestro estudio, no encontramos diferencias en el porcentaje de células apoptóticas tras la administración de AC a las líneas celulares PNT2 y B16F10. Sin embargo, dado que las células irradiadas han sido obviamente sometidas a estrés oxidativo, establecimos una reducción en el porcentaje de células apoptóticas inducida por la radiación

en ambas líneas celulares, aunque con diferentes grados de intensidad. En este sentido, previamente se ha contemplado que la depleción de GSH intracelular podría ser un sello temprano en la progresión de la muerte celular en respuesta a diferentes estímulos apoptóticos [238–240]. El agotamiento de los niveles de GSH induce y/o estimula la apoptosis, mientras que los niveles elevados de GSH intracelular se han asociado con una disminución de la apoptosis en diferentes modelos celulares [238–240]. En nuestro estudio, hemos observado un aumento en la ratio GSH/GSSG en células PNT2 que implica un aumento de los niveles reducidos de GSH, lo que podría reducir el porcentaje de células apoptóticas esperadas por la exposición a RI. Por el contrario, en las células B16F10, la disminución de la ratio GSH/GSSG observada en las células tratadas con AC y expuestas a la radiación implica una reducción del GSH reducido, que, aunque disminuye ligeramente el porcentaje de células apoptóticas, no compensa el efecto dañino inducido por la RI.

En nuestro estudio, el efecto radiosensibilizante paradójico mediado por la disminución de la relación GSH/GSSG producida por el AC en células de melanoma B16F10 podría deberse a la suma de distintos factores. Por un lado, el AC podría, como se ha descrito previamente para el ácido cafeico [241] y el ácido rosmarínico [223,242], inducir la activación de la melanogénesis a través de la vía de la feomelanina y causar una disminución de los niveles intracelulares de GSH. Dado que éste es utilizado y consumido para la producción de esta feomelanina, no puede dirigirse a la vía de eliminación de las ROS inducidas por la RI. Además, la disminución de la relación GSH/GSSG con niveles reducidos de GSH podría deberse, como se ha sugerido por algunos autores, a la menor actividad de la superóxido dismutasa descrita en la línea celular B16F10 [219,243].

La glutatión reductasa (GR) es una enzima ubicua que cataliza la reducción dependiente de NADPH del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) [222]. En el ciclo catalítico del GR tienen un papel fundamental los aminoácidos cisteína, histidina y tirosina [244–246]. Se ha descrito que la GR es sensible a la modificación química de los grupos tiol redox activos. Las propiedades redox de esta enzima pueden ser inhibidas o activadas por varias sustancias químicas, fármacos o sustratos naturales [247].

Por otro lado, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la primera enzima y la que limita la velocidad de la vía de las pentosas fosfato y la principal fuente intracelular de la forma reducida de NADPH. El aumento de la expresión del gen G6PD se ha asociado con el aumento de los niveles de GSH y la resistencia al estrés oxidativo [248]. Se han estudiado algunos aminoácidos que actúan como sustrato y el lugar de su unión a coenzimas de la G6PD; los residuos de Cys, histidina, arginina y lisina están implicados en la unión a NADP<sup>+</sup> y son esenciales para la catálisis de la G6PD [249]. En base a estos resultados, tanto GR como G6PD son enzimas cruciales en el sistema antioxidante y las alteraciones en las actividades de estas enzimas pueden afectar al sistema de defensa celular redox. Por ello, este efecto radiosensibilizante podría deberse a un posible efecto inhibitor del AC sobre la G6PD, la GR [250] o la glutatión S-transferasa, como se ha descrito en diterpenos obtenidos de la familia de las lamiáceas (ácido rosmarínico y carnosol) [251], que disminuyen la capacidad celular para reducir el GSSG al reducir las concentraciones intracelulares de NADPH [223].

Además, el AC es una sustancia que puede tener actividad antioxidante y/o prooxidante en función de la dosis administrada, el pH y de las condiciones ambientales celulares. El estado de equilibrio en el que se encuentra el AC con el carnosol podría modificar también los resultados [252]. En este sentido, en los tumores, el pH extracelular suele ser ácido como consecuencia de la mala perfusión y la elevada producción de ácido en este microambiente [253]. En condiciones *in vivo*, las células de melanoma mantienen el pH intracelular en un rango viable para la supervivencia celular a pesar de que el pH extracelular del tumor es normalmente inferior a 7,0. Se sabe que hay transportadores que son capaces de eliminar los protones metabólicos, aunque todavía no se han identificado claramente los transportadores específicos del mantenimiento del pH intracelular y extracelular de los melanomas algunos autores apuntan a los transportadores de monocarboxilato ligados a H<sup>+</sup> (MCT) como los responsables [254]. Presumiblemente, se podrían aprovechar estas condiciones para aumentar el efecto objetivado del AC sobre las células tumorales, y, al igual que sucede con los agentes alquilantes y los compuestos de platino, hacerlo más selectivo, actuando mejor sobre las células que se encuentran en lechos tumorales ácidos [253,254]. Evidentemente, serían necesarios más estudios que confirmaran nuestros resultados y evaluaran otras características relacionadas con la capacidad radiosensibilizante del AC y su

interacción con las ROS inducidas por la radiación ionizante. Sería interesante plantear otros estudios con el ensayo DPPH, el ensayo del poder antioxidante reductor del hierro, el ensayo de reducción del nitroazul de terazolol (NBT) o el ensayo ROS, junto con la determinación de la capacidad de enzimas desintoxicantes como la SOD y las glutatión-peroxidasas (GPx).

Por otra parte, se ha descrito que el desencadenante de las respuestas en la RIBE sería la activación de una vía de señalización sensible al redox a través de la inducción mitocondrial de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS)[35,251,255]. Varios estudios han demostrado la importancia de las vías de señalización citoplasmática en la citoprotección y la mutagénesis. Las ROS y las RNS estimuladas por la RI son activadores esenciales de estas vías, además de comportarse como amplificadores de los eventos de ionización iniciales [255]. La amplificación y propagación de estas señales de estrés provoca daños en el ADN, apoptosis en los tejidos vecinos y la activación de una respuesta inflamatoria sistémica [256]. Esta cascada de señalizaciones produce diversos efectos en las células receptoras, como la producción de MN, intercambio de cromátidas hermanas, mutaciones, disminución de la supervivencia celular, aumento de la apoptosis y formación de focos de proteínas asociados a la respuesta al daño del ADN [35,256]. Las ROS y las RNS modifican la estructura y la función de las proteínas, por ejemplo, las interacciones con los grupos de tioles metálicos, la nitración de la tirosina de las proteínas, la oxidación de la cisteína de las proteínas, la S-tiolación y la S-nitrosilación. Algunos autores han propuesto que las ROS inducidas por la RI serán los iniciadores del proceso y que el óxido nítrico (NO-) o sus derivados son los efectores que activarían estas vías de transducción de señales. En respuesta a los eventos de ionización celular, la célula convertiría una señal oxidativa en una nitrosativa porque los ROS son demasiado reactivos e inespecíficos en sus reacciones con fines reguladores y la célula está equipada para modular con precisión los niveles de NO- [255].

En nuestro estudio, hemos determinado suficientemente los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos por los sueros sanguíneos procedentes de animales irradiados y por los medios de cultivo obtenidos a partir de cultivos celulares irradiados sobre las células receptoras, y hemos determinado el aumento de la frecuencia de MN en los tres tipos de ensayos utilizados. En el caso de las monocapas celulares confluentes y las agrupaciones

celulares tridimensionales, se ha observado que la comunicación intercelular entre uniones gap desempeña un papel fundamental en los efectos secundarios inducidos por la RI [88,257–259]. En otros casos, los factores extracelulares solubles, incluidas las ROS y las citocinas que se liberan de las células irradiadas contribuyen a las respuestas secundarias.

Anteriormente se ha descrito que los factores que pueden estar implicados en la RIBE son elementos producidos por las células irradiadas, entre lo que se encuentran: citoquinas, TGF- $\beta$ , ARN, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 y ROS [65,256,260]. Se puede suponer que un aumento sostenido de la producción de ROS contribuye al efecto genotóxico al inducir continuamente daño oxidativo en el ADN. Diferentes autores han sugerido que el mecanismo de la RIBE sobre el efecto genotóxico en el ADN de las células receptoras de la RIBE podría deberse a la acción de las ROS inducidas por la radiación ionizante sobre las células receptoras. Además, se ha sugerido que estas ROS podrían producir una amplia variedad de efectos modificando las vías de señalización [64,122,255,261,262].

En nuestro estudio, aquellos ensayos en los que se trató con AC previamente al tratamiento con suero irradiado o medio de cultivo de células irradiadas (EB) no observamos efectos citoprotectores significativos sobre las células receptoras del EB, de forma que no se encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados en cada uno de los estudios (MN, supervivencia celular, apoptosis, formación de colonias o niveles de GSH y ratios GSH/GSSG). Estos resultados apuntan a la incapacidad que presenta el AC, a pesar de su elevada capacidad antioxidante, para inhibir, eliminar o disminuir la actividad de las señales bystander que se envían a través del suero de los animales irradiados o del medio de cultivo de las células irradiadas en ambas líneas celulares evaluadas. Dichos hallazgos coinciden con lo descrito por Harada et al. (2013) [262], quienes describieron que los radicales libres radioinducidos participan en la formación de señales en las células directamente expuestas a la RI; sin embargo, es posible que no participen en la eliminación de señales transeúntes recibidas por células distantes receptoras. En sus conclusiones estos autores postularon la teoría de que el EB estaba relacionado con la inducción de radicales libres pero el papel de cada una de las especies de radicales es diferente entre las células irradiadas y las células bystander o receptoras. El óxido nítrico participaría en la formación de señales en células irradiadas, pero no en células transeúntes que reciben señales bystander o receptoras. Además, descartaron que los radicales hidroxilos estuvieran implicados en el

EB, al no disminuir la frecuencia de MN en células bystander en las células receptoras con el tratamiento con DMSO. De acuerdo con lo descrito por Harada et al. (2013) [262] nuestros resultados también apuntan a que cada tipo celular presenta unas señales distintas y las ROS estarían indirectamente implicadas en la producción de señales bystander.

Hace unas décadas, Konopackac et al. (2008) y Rzeszowska-Wolny et al. (2009) [121,263] propusieron que los interceptores de ROS y de la producción *in vitro* de peróxidos (como la vitamina C) reducen la frecuencia de rotura cromosómica y reducen su contribución a la producción de MN en células no bystander, protegiéndolas así del daño causado por el efecto RIBE. En sus conclusiones apuntaban que la formación de MN se debía a factores liberados por las células irradiadas en el medio más que por la ionización y el daño directo del ADN por la RI. En su estudio también confirmaban la idea de que el EB se correlaciona con una regulación al alza de los procesos oxidativos, que resultaría de la propagación de ROS que se produce después de la exposición a RI, y no de radicales que se generen en el momento de la irradiación. Ellos observaron que la disminución en la frecuencia de MN se producía también cuando se añadían antioxidantes ensayados incluso después de la irradiación, sugiriendo su participación en la fase tardía del daño por irradiación [121]. Recientemente, en un estudio previo, utilizando una sustancia antioxidante hidrosoluble, el ácido rosmarínico, nosotros describimos una reducción de la frecuencia de MN en las células bystander receptoras, aunque ningún efecto citoprotector que aumentara la supervivencia celular en estas células receptoras. Sugerimos que el ácido rosmarínico, a diferencia de la vitamina C, no presenta una actividad significativa contra los procesos de peroxidación lipídica que aumentan el daño oxidativo del ADN inducido por RI, lo que generalmente sería el mecanismo de producción de una RIBE [63,122,255,262,264,265]. Sin embargo, la sustancia estudiada en este estudio, el AC, es una sustancia liposoluble a la que se le atribuye una importante capacidad para actuar contra los procesos de peroxidación lipídica, mostrando resultados similares: reducción de la frecuencia de MN en el EB junto con una falta de protección de la supervivencia celular en las células receptoras. Por otro lado, la administración de AC a células bystander de melanoma B16F10 (BysCA) produce un aumento de la relación GSH/GSSG en comparación con las células no tratadas con AC, pero sí cuando son tratadas con suero de células irradiadas (Bysi). Este aumento del ratio GSH/GSSG es similar al determinado en células PNT2 normales tratadas con AC, y podría



interpretarse como un efecto aditivo o sinérgico del AC que permite un aumento del GSH celular reducido en ausencia de estrés oxidativo [216]. Por ello, estos resultados sugieren que los radicales libres inducidos por la RI en células diana no participan en la disminución de la supervivencia celular en células receptoras a través de RIBE, sino que debe de haber otras moléculas señalizadoras responsables de este daño celular.

Se ha sugerido que los efectos secundarios inducidos por la RI, incluida la inestabilidad genómica y el aumento de las mutaciones, pueden contribuir a la inducción de un segundo cáncer en células normales después de la radioterapia [256]. En la actualidad, millones de personas de todo el mundo se someten a tratamiento radioterápico tanto para el abordaje de patología oncológica como para ciertas patologías inflamatorias. Por otra parte, paralelamente a los recientes avances en la terapia del cáncer, la esperanza de vida de los pacientes oncológicos es cada vez mayor. Sin embargo, esto puede suscitar una creciente preocupación en relación con las consecuencias a largo plazo de la radioterapia (RT), incluidas las neoplasias malignas secundarias, en especial en la población pediátrica. Se considera que el riesgo de cáncer secundario entre los pacientes pediátricos que han recibido radioterapia es hasta diez veces mayor que en los pacientes adultos [266]. Posiblemente, el EB es una de las respuestas biológicas a la RI con mayor implicación en el segundo cáncer primario que se produce años después de la RT. Según los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados hasta la fecha, existe una relación directa entre el EB y el cáncer secundario en las células no irradiadas [267]. Teniendo en cuenta la importancia del EB en el tratamiento del cáncer con RI, el riesgo de neoplasias malignas secundarias causadas por este fenómeno debería tenerse en cuenta en un futuro próximo. Por ello, dados los resultados de nuestro estudio consideramos al AC como una alternativa complementaria con características prometedoras en el caso del tratamiento del melanoma debido a sus características (radioprotectora en células normales y radiosensibilizante en las células de melanoma) y comportamiento frente al RIBE.

## **VI. CONCLUSIONES.**



## VI. Conclusiones.

Las conclusiones que hemos obtenido en este estudio son las siguientes:

1<sup>a</sup>. El ácido carnósico es un potente agente genoprotector disminuyendo la aparición de micronúcleos tanto *in vivo* como *in vitro* en las células irradiadas y en las células receptoras del efecto bystander inducido por radiación ionizante.

2<sup>a</sup>. El ácido carnósico aumenta la supervivencia celular en las células de próstata expuestas a la radiación ionizante. Sin embargo, no presenta este grado de protección en las células receptoras del efecto bystander inducido por la radiación, lo que sugiere la existencia de mecanismos citotóxicos diferentes a la producción de radicales libres como mecanismo lesivo en estas células receptoras

3<sup>a</sup>. El ácido carnósico actúa como un agente radioprotector en las células de próstata (aumenta la supervivencia celular, reduce la apoptosis celular e incrementa la ratio GSH/GSSG). Sin embargo, en las células de melanoma no se han determinado estos efectos protectores.

4<sup>a</sup>. El ácido carnósico muestra un efecto paradójico en las células de melanoma metastásico actuando como un potente agente radiosensibilizante al reducir la supervivencia en estas células. Hemos sugerido que la activación de la melanogénesis producida por el ácido carnósico en estas células impediría la utilización del glutatión intracelular en la eliminación de los ROS radioinducidos aumentando así el daño celular. Esta situación podría suponer un nuevo mecanismo de acción que permitiría crear nuevas aplicaciones terapéuticas que ofrezcan protección a las células sanas al mismo tiempo que lesionen a las células neoplásicas, incluso en el caso de algunos cánceres tradicionalmente considerados radiorresistentes como el melanoma.



## **VII. RESUMEN.**



## VII. Resumen.

El ácido carnósico (AC) es un diterpeno fenólico derivado de la planta *Rosmarinus officinalis* caracterizado por su elevada actividad antioxidante. Por sus características presenta múltiples aplicaciones industriales, cosméticas y nutricionales. Este estudio pretende evaluar la capacidad radioprotectora del AC en células expuestas directamente a rayos X y en células no irradiadas que reciben las señales de células irradiadas con rayos X, conocidas como células receptoras del efecto bystander inducido por radiación ionizante (RIBE). La capacidad genoprotectora se evalúa mediante ensayos de genotoxicidad aplicando los ensayos de micronúcleos *in vivo* e *in vitro*. La capacidad radioprotectora mediante ensayos de supervivencia celular con MTT, clonogénico *in vitro*, apoptosis y de determinación de glutatión intracelular, comparando células radiosensibles (epitelio prostático humano normal, PNT2) con células radorresistentes (melanoma metastásico murino, B16F10). El AC presenta una capacidad genoprotectora en todas las células expuestas a la radiación ionizante ( $p < 0,001$ ) y en las células RIBE ( $p < 0,01$ ). En las células PNT2, el AC consigue un 97% de supervivencia celular tras la exposición a 20 Gy de rayos X, eliminando el 67% de la muerte celular inducida por la radiación ( $p < 0,001$ ), disminuyendo la apoptosis ( $p < 0,001$ ) y aumentando la relación GSH/GSSG ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, la administración de AC a las células B16F10 disminuye la supervivencia celular en un 32%, aumentando la muerte celular en un 200% ( $p < 0,001$ ), y aumentando la muerte celular en un 100% ( $p < 0,001$ ) en las células bystander ( $p < 0,01$ ). Además, incrementa la apoptosis celular ( $p < 0,001$ ) y disminuye la relación GSH/GSSG ( $p < 0,01$ ), expresando un efecto paradójico radiosensibilizador en estas células. El conocimiento de los posibles mecanismos de acción de sustancias como el AC en estos ámbitos podría ayudar a crear nuevas vías de tratamiento que permitan la protección de las células sanas y el daño exclusivo de las neoplásicas, presentando así una nueva estrategia deseable para los pacientes con cáncer que necesitan radioterapia.

**Palabras clave:** B16F10; PNT2; ácido carnósico, bystander; micronúcleos; efectos de la radiación; radioprotectores; radiosensibilizadores, apoptosis, melanoma.



## VII. Abstract.

Carnosic acid (CA) is a phenolic diterpene derived from the plant *Rosmarinus officinalis*, characterised by its high antioxidant activity. Due to its characteristics, it has multiple industrial, cosmetic and nutritional applications. This study aims to evaluate the radioprotective capacity of AC in cells directly exposed to X-rays and in non-irradiated cells that receive signals from X-ray irradiated cells, known as receptor cells of the bystander effect induced by ionising radiation (RIBE). The genoprotective capacity is assessed by genotoxicity assays using in vivo and in vitro micronucleus assays. Radioprotective capacity is assessed by MTT cell survival, in vitro clonogenic, apoptosis and intracellular glutathione assays, comparing radiosensitive cells (normal human prostate epithelium, PNT2) with radioresistant cells (murine metastatic melanoma, B16F10). AC exhibits genoprotective capacity in all cells exposed to ionising radiation ( $p < 0.001$ ) and in RIBE cells ( $p < 0.01$ ). In PNT2 cells, AC achieves 97% cell survival after exposure to 20 Gy of X-rays, eliminating 67% of radiation-induced cell death ( $p < 0.001$ ), decreasing apoptosis ( $p < 0.001$ ) and increasing the GSH/GSSG ratio ( $p < 0.01$ ). However, AC administration to B16F10 cells decreased cell survival by 32%, increased cell death by 200% ( $p < 0.001$ ), and increased cell death by 100% ( $p < 0.001$ ) in bystander cells ( $p < 0.01$ ). In addition, it increases cell apoptosis ( $p < 0.001$ ) and decreases the GSH/GSSG ratio ( $p < 0.01$ ), expressing a paradoxical radiosensitising effect in these cells. Knowledge of the possible mechanisms of action of substances such as AC in these areas could help to create new treatment pathways that allow the protection of healthy cells and the exclusive damage of neoplastic cells, thus presenting a new desirable strategy for cancer patients in need of radiotherapy.

**Keywords:** B16F10; PNT2; carnosic acid; bystander; micronuclei; radiation effects; radioprotectants; radiosensitizers; apoptosis; melanoma.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA.**



## VIII. Bibliografia.

1. Ravanat, J.L.; Breton, J.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Grand, A.; Rachidi, W.; Sauvaigo, S. Radiation-Mediated Formation of Complex Damage to DNA: A Chemical Aspect Overview. *Br. J. Radiol.* **2014**, *87*, doi:10.1259/BJR.20130715/ASSET/IMAGES/LARGE/BJR.20130715.G003.JPEG.
2. Seymour, C, Mothersill, C. Delayed Expression of Lethal Mutations and Genomic Instability in the Progeny of Human Epithelial Cells That Survived in a Bystander-Killing Environment. *Radiat Oncol Investig* **1997**, *5*, 106–110.
3. Blyth, B.J.; Sykes, P.J. Radiation-Induced Bystander Effects: What Are They, and How Relevant Are They to Human Radiation Exposures? *Radiat. Res.* **2011**, *176*, 139–157, doi:10.1667/RR2548.1.
4. Koturbash, I.; Rugo, R.E.; Hendricks, C.A.; Loree, J.; Thibault, B.; Kutanzi, K.; Pogribny, I.; Yanch, J.C.; Engelward, B.P.; Kovalchuk, O. Irradiation Induces DNA Damage and Modulates Epigenetic Effectors in Distant Bystander Tissue in Vivo. *Oncogene* **2006**, *25*, 4267–4275, doi:10.1038/SJ.ONC.1209467.
5. Ng, J.; Dai, T. Radiation Therapy and the Abscopal Effect: A Concept Comes of Age. *Ann. Transl. Med.* **2016**, *4*, doi:10.21037/ATM.2016.01.32.
6. Levy, A.; Chargari, C.; Cheminant, M.; Simon, N.; Bourcier, C.; Deutsch, E. Radiation Therapy and Immunotherapy: Implications for a Combined Cancer Treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2013**, *85*, 278–287, doi:10.1016/J.CRITREVONC.2012.09.001.
7. Shemetun, O. V.; Pilinska, M.A. Radiation-Induced Bystander Effect – Modeling, Manifestation, Mechanisms, Persistence, Cancer Risks (Literature Review). *Probl Radiac Med Radiobiol* **2019**, *24*, 65–92, doi:10.33145/2304-8336-2019-24-65-92.
8. Hatzi, V.I.; Laskaratou, D.A.; Mavragani, I. V.; Nikitaki, Z.; Mangelis, A.; Panayiotidis, M.I.; Pantelias, G.E.; Terzoudi, G.I.; Georgakilas, A.G. Non-Targeted Radiation Effects in Vivo: A Critical Glance of the Future in Radiobiology. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 34–42, doi:10.1016/j.canlet.2013.11.018.
9. Goodhead, D.T. New Radiobiological, Radiation Risk and Radiation Protection Paradigms. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2010**, *687*, 13–16,

- doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.01.006.
10. Pouget, J.P.; Georgakilas, A.G.; Ravanat, J.L. Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxidants Redox Signal.* **2018**, *20*;29, 1447–1487, doi:10.1089/ars.2017.7267.
  11. Frankenberg-Schwager, M. Induction, Repair and Biological Relevance of Radiation-Induced DNA Lesions in Eukaryotic Cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **1990**, *29*, 273–292, doi:10.1007/BF01210408.
  12. Goldberg, Z.; Lehnert, B.E. Radiation-Induced Effects in Unirradiated Cells: A Review and Implications in Cancer. *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 337–349, doi:10.3892/IJO.21.2.337/HTML.
  13. Little, J.B. Cellular Radiation Effects and the Bystander Response. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2006**, *597*, 113–118, doi:10.1016/J.MRFMMM.2005.12.001.
  14. Little, J.B. Radiation Carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 397–404, doi:10.1093/CARCIN/21.3.397.
  15. Barcellos-Hoff, M.H. Integrative Radiation Carcinogenesis: Interactions between Cell and Tissue Responses to DNA Damage. *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15*, 138–148, doi:10.1016/J.SEMCANCER.2004.08.010.
  16. Barber, R.C.; Dubrova, Y.E. The Offspring of Irradiated Parents, Are They Stable? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2006**, *598*, 50–60, doi:10.1016/J.MRFMMM.2006.01.009.
  17. Morgan, W.F. Non-Targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: II. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects In Vivo, Clastogenic Factors and Transgenerational Effects. *Radiat res* **2003**, *159*, 581–596, doi:10.1667/0033-7587(2003)159.
  18. Morgan, W.F. Non-Targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects In Vitro. *Radiat res* **2003**, *159*, 567–580, doi:10.1667/0033-7587(2003)159.
  19. Zhou, H.; Randers-Pehrson, G.; Waldren, C.A.; Vannais, D.; Hall, E.J.; Hei, T.K. Induction of a Bystander Mutagenic Effect of Alpha Particles in Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 2099–2104, doi:10.1073/pnas.030420797.
  20. Sax, K. Chromosome Aberrations Induced by X-Rays. *Genetics* **1938**, *23*, 494–516.

21. Elkind, M.; Sutton, H. Radiation Response of Mammalian Cells Grown in Culture. 1. Repair of X-Ray Damage in Surviving Chinese Hamster Cells. *Radiat. Res.* **1960**, *13*, 556–593, doi:10.2307/3570945.
22. Mothersill, C.; Rusin, A.; Fernandez-Palomo, C.; Seymour, C. History of Bystander Effects Research 1905-Present; What Is in a Name? *Int. J. Radiat. Biol.* **2018**, *94*, 696–707, doi:10.1080/09553002.2017.1398436.
23. H., H. Experimental Investigations on the Effects of X-Rays on the Bone Marrow, with Some Remarks on the Radiotherapy of Leukemia and Pseudoleukemia and Sarcoms. *Dtsch. Zeitschrift Fur Chir.* **1905**, *78*, 196–230.
24. Murphy JB, M.J. The Effect of Roentgen Rays on the Rate of Growth of Spontaneous Tumors in Mice. *J Exp Med.* **1915**, *22*, 800–803.
25. Mothersill, C.; Seymour, C. Radiation-Induced Bystander Effects: Past History and Future Directions. *Radiat. Res.* **2001**, *155*, 759–767.
26. Shemetun, O. V.; Pilinska, M.A. Radiation-Induced “Bystander” Effect. *Cytol. Genet.* **2007**, *41*, 251–255, doi:10.3103/S0095452707040111.
27. Verma, N.; Tiku, A.B. Significance and Nature of Bystander Responses Induced by Various Agents. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2017**, *773*, 104–121, doi:10.1016/J.MRREV.2017.05.003.
28. Burdak-Rothkamm, S.; Rothkamm, K. Radiation-Induced Bystander and Systemic Effects Serve as a Unifying Model System for Genotoxic Stress Responses. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2018**, *778*, 13–22, doi:10.1016/j.mrrev.2018.08.001.
29. Parsons WB, Watkins CH, Pease GL, C.D. Changes in Sternal Marrow Following Roentgen-Ray Therapy to the Spleen in Chronic Granulocytic Leukemia. *Cancer.* **1954**, *7*, 179–189.
30. Seymour, C.B.; Mothersill, C.; Alper, T. High Yields of Lethal Mutations in Somatic Mammalian Cells That Survive Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1986**, *50*, 167–179, doi:10.1080/09553008614550541.
31. Nagasawa, H.; Little, J.B. Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of  $\alpha$ -Particles. *Cancer Res.* **1992**, *52*.
32. Deshpande A, Goodwin EH, Bailey SM, Marrone BL, L.B. Alpha-Particle-Induced Sister Chromatid Exchange in Normal Human Lung Fibroblasts: Evidence for an Extranuclear Target. *Radiat Res.* **1996**, *145*, 260–267.

33. Prise, K.M.; Belyakov, O. V.; Newman, H.C.; Patel, S.; Schettino, G.; Folkard, M.; Michael, B.D. Non-Targeted Effects of Radiation: Bystander Responses in Cell and Tissue Models. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2002**, *99*, 223–226, doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.RPD.A006768.
34. Hill, M.A.; Stevens, D.L.; Kadhim, M.; Blake-James, M.; Mill, A.J.; Goodhead, D.T. Experimental Techniques for Studying Bystander Effects in Vitro by High and Low-LET Ionising Radiation. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2006**, *122*, 260–265, doi:10.1093/RPD/NCL429.
35. Burdak-Rothkamm, S.; Rothkamm, K. Radiation-Induced Bystander and Systemic Effects Serve as a Unifying Model System for Genotoxic Stress Responses. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **2018**, *778*, 13–22, doi:10.1016/J.MRREV.2018.08.001.
36. Thust, R.; Tomicic, M.T.; Gräbner, R.; Wutzler, P.; Kaina, B. Cytogenetic Detection of a Trans-Species Bystander Effect: Induction of Sister Chromatid Exchanges in Murine 3T3 Cells by Ganciclovir Metabolized in HSV Thymidine Kinase Gene-Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *Mutagenesis* **2004**, *19*, 27–33, doi:10.1093/MUTAGE/GEH002.
37. Desouky, O.; Ding, N.; Zhou, G. Targeted and Non-Targeted Effects of Ionizing Radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2015**, *8*, 247–254, doi:10.1016/J.JRRAS.2015.03.003.
38. Gwyneth E. Watson, Sally A. Lorimore, D.A.M. and E.G.W. Chromosomal Instability in Unirradiated Cells Induced in Vivo by a Bystander Effect of Ionizing Radiation. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5608–5611.
39. Morgan, W.F.; Hartmann, A.; Limoli, C.L.; Nagar, S.; Ponnaiya, B. Bystander Effects in Radiation-Induced Genomic Instability. *Mutat. Res.* **2002**, *504*, 91–100, doi:10.1016/S0027-5107(02)00083-0.
40. Morgan, W.F. Is There a Common Mechanism Underlying Genomic Instability, Bystander Effects and Other Nontargeted Effects of Exposure to Ionizing Radiation? *Oncogene* **2003**, *22*, 7094–7099, doi:10.1038/sj.onc.1206992.
41. Lorimore, S.A.; Chrystal, J.A.; Robinson, J.I.; Coates, P.J.; Wright, E.G. Chromosomal Instability in Unirradiated Hemopoietic Cells Induced by Macrophages Exposed in Vivo to Ionizing Radiation. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8122–8126, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0698.

42. Pant, G.S.; Kamada, N. Chromosome Aberrations in Normal Leukocytes Induced by the Plasma of Exposed Individuals. *Hiroshima J. Med. Sci.* **1977**, *26*, 149–154.
43. Emerit, I.; Quastel, M.; Goldsmith, J.; Merkin, L.; Levy, A.; Cernjavski, L.; Alaoui-Youssefi, A.; Pogossian, A.; Riklis, E. Clastogenic Factors in the Plasma of Children Exposed at Chernobyl. *Mutat. Res.* **1997**, *373*, 47–54, doi:10.1016/S0027-5107(96)00187-X.
44. Emerit, I.; Levy, A.; Cernjavski, L.; Arutyunyan, R.; Oganessian, N.; Pogossian, A.; Mejlumian, H.; Sarkisian, T.; Gulkandanian, M.; Quastel, M.; et al. Transferable Clastogenic Activity in Plasma from Persons Exposed as Salvage Personnel of the Chernobyl Reactor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, 558–561, doi:10.1007/BF01221035.
45. Ermakov, A. V.; Kon'kova, M.S.; Kostiuk, S. V.; Ershova, E.S.; Egolina, N.A.; Veïko, N.N. Extracellular DNA Fragments from Culture Medium of Low-Dose Irradiated Human Lymphocyte Trigger Instigating of the Oxidative Stress and the Adaptive Response in Non-Irradiated Bystander Lymphocytes. *Radiats. Biol. Radioecol.* **2008**, *48*, 553–564.
46. Ermakov AV, Kostiuk SV, Egolina NA, Malinovskaia EM, Veïko NN, S.D. The DNA Fragments Obtained from the Culture Media Exposed to Adaptive Doses of the Ionizing Radiation as Factors of Stress Signaling between Lymphocytes and Bystander Cells. *Radiats Biol Radioecol.* **2007**, *47*, 133–140.
47. Vorobtsova IE, K.I. Investigation of Radiation-Induced “Bystander Effect” Using Model of Adaptive Response in Mixed Lymphocyte Culture from Humans of Different Gender. *Radiats Biol Radioecol* **2007**, *47*, 645–649.
48. Barescut, J.; Lariviere, D.; Stocki, T.; Vasylenko, O.P.; Pronina, O.V.; Rushkovsky, S.R. Bystander Effect in Human Lymphocytes Incubated with Irradiated Mitochondrial DNA Deficient Yeast Cells. *Radioprotection* **2011**, *46*, S555–S559, doi:10.1051/RADIOPRO/20116908S.
49. IAEA *Dosimetría Citogenética: Aplicaciones En Materia de Preparación y Respuesta a Las Emergencias Radiológicas*; 2011;
50. WHO Environmental Health Criteria. Guidelines for Study of Genetic Effects in Human Populations. *46 WHO* **1985**, *46*, 126.
51. Wright, E.G. Manifestations and Mechanisms of Non-Targeted Effects of Ionizing



- Radiation. *Mutat. Res.* **2010**, *687*, 28–33, doi:10.1016/J.MRFMMM.2010.01.014.
52. Mothersill, C.; Seymour, C. Medium from Irradiated Human Epithelial Cells but Not Human Fibroblasts Reduces the Clonogenic Survival of Unirradiated Cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *71*, 421–427, doi:10.1080/095530097144030.
  53. Vines, A.M.; Lyng, F.M.; McClean, B.; Seymour, C.; Mothersill, C.E. Bystander Signal Production and Response Are Independent Processes Which Are Cell Line Dependent. *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 83–90, doi:10.1080/09553000701797062.
  54. Djordjevic, B. Bystander Effects: A Concept in Need of Clarification. *Bioessays* **2000**, *22*, 286–290, doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200003)22:3<286::AID-BIES10>3.0.CO;2-S.
  55. Cali, B.; Ceolin, S.; Ceriani, F.; Bortolozzi, M.; Agnellini, A.H.R.; Zorzi, V.; Predonzani, A.; Bronte, V.; Molon, B.; Mammano, F. Critical Role of Gap Junction Communication, Calcium and Nitric Oxide Signaling in Bystander Responses to Focal Photodynamic Injury. *Oncotarget* **2015**, *6*, 10161–10174, doi:10.18632/ONCOTARGET.3553.
  56. Azzam, E.I.; De Toledo, S.M.; Little, J.B. Direct Evidence for the Participation of Gap Junction-Mediated Intercellular Communication in the Transmission of Damage Signals from  $\alpha$ -Particle Irradiated to Nonirradiated Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 473, doi:10.1073/PNAS.011417098.
  57. Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Little, J.B. Oxidative Metabolism, Gap Junctions and the Ionizing Radiation-Induced Bystander Effect. *Oncogene* **2003**, *22*, 7050–7057, doi:10.1038/sj.onc.1206961.
  58. de Toledo, S.M.; Buonanno, M.; Harris, A.L.; Azzam, E.I. Genomic Instability Induced in Distant Progeny of Bystander Cells Depends on the Connexins Expressed in the Irradiated Cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **2017**, *93*, 1182–1194, doi:10.1080/09553002.2017.1334980.
  59. Facchetti, A.; Ballarini, F.; Cherubini, R.; Gerardi, S.; Nano, R.; Ottolenghi, A.; Prise, K.M.; Trott, K.R.; Zilio, C. Gamma Ray-Induced Bystander Effect in Tumour Glioblastoma Cells: A Specific Study on Cell Survival, Cytokine Release and Cytokine Receptors. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2006**, *122*, 271–274, doi:10.1093/RPD/NCL431.
  60. Morgan, W.F.; Sowa, M.B. Non-Targeted Bystander Effects Induced by Ionizing

- Radiation. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, *616*, 159–164, doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.11.009.
61. Mothersill, C.; Seymour, C.B. Cell-Cell Contact during Gamma Irradiation Is Not Required to Induce a Bystander Effect in Normal Human Keratinocytes: Evidence for Release during Irradiation of a Signal Controlling Survival into the Medium. *Radiat. Res.* **1998**, *149*, 256–262, doi:10.2307/3579958.
  62. Lehnert, B.E.; Goodwin, E.H. Extracellular Factor(s) Following Exposure to  $\alpha$  Particles Can Cause Sister Chromatid Exchanges in Normal Human Cells. *Cancer Res.* **1997**, *57*.
  63. Kashino, G.; Prise, K.M.; Suzuki, K.; Matsuda, N.; Kodama, S.; Suzuki, M.; Nagata, K.; Kinashi, Y.; Masunaga, S.I.; Ono, K.; et al. Effective Suppression of Bystander Effects by DMSO Treatment of Irradiated CHO Cells. *J. Radiat. Res.* **2007**, *48*, 327–333, doi:10.1269/JRR.07008.
  64. Chen, S.; Zhao, Y.; Zhao, G.; Han, W.; Bao, L.; Yu, K.N.; Wu, L. Up-Regulation of ROS by Mitochondria-Dependent Bystander Signaling Contributes to Genotoxicity of Bystander Effects. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2009**, *666*, 68–73, doi:10.1016/J.MRFMMM.2009.04.006.
  65. Lyng, F.M.; Howe, O.L.; McClean, B. Reactive Oxygen Species-Induced Release of Signalling Factors in Irradiated Cells Triggers Membrane Signalling and Calcium Influx in Bystander Cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **2011**, *87*, 683–695, doi:10.3109/09553002.2010.549533.
  66. Mitra, I.; Samant, U.; Sharma, S.; Raghuram, G. V.; Saha, T.; Tidke, P.; Pancholi, N.; Gupta, D.; Prasannan, P.; Gaikwad, A.; et al. Cell-Free Chromatin from Dying Cancer Cells Integrate into Genomes of Bystander Healthy Cells to Induce DNA Damage and Inflammation. *Cell death Discov.* **2017**, *3*, 17015, doi:10.1038/CDDISCOVERY.2017.15.
  67. Mitra, I.; Khare, N.K.; Raghuram, G.V.; Chaubal, R.; Khambatti, F.; Gupta, D.; Gaikwad, A.; Prasannan, P.; Singh, A.; Iyer, A.; et al. Circulating Nucleic Acids Damage DNA of Healthy Cells by Integrating into Their Genomes. *J. Biosci.* **2015**, *40*, 91–111, doi:10.1007/S12038-015-9508-6.
  68. Kirolikar, S.; Prasannan, P.; Raghuram, G. V.; Pancholi, N.; Saha, T.; Tidke, P.; Chaudhari, P.; Shaikh, A.; Rane, B.; Pandey, R.; et al. Prevention of Radiation-

- Induced Bystander Effects by Agents That Inactivate Cell-Free Chromatin Released from Irradiated Dying Cells. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1142, doi:10.1038/S41419-018-1181-X.
69. Ermakov, A. V.; Konkova, M.S.; Kostyuk, S. V.; Smirnova, T.D.; Malinovskaya, E.M.; Efremova, L. V.; Veiko, N.N. An Extracellular DNA Mediated Bystander Effect Produced from Low Dose Irradiated Endothelial Cells. *Mutat. Res.* **2011**, *712*, 1–10, doi:10.1016/J.MRFMMM.2011.03.002.
  70. Tamminga, J.; Koturbash, I.; Baker, M.; Kutanzi, K.; Kathiria, P.; Pogribny, I.P.; Sutherland, R.J.; Kovalchuk, O. Paternal Cranial Irradiation Induces Distant Bystander DNA Damage in the Germline and Leads to Epigenetic Alterations in the Offspring. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1238–1245, doi:10.4161/CC.7.9.5806.
  71. Brooks, A.L. Evidence for “bystander Effects” in Vivo. *Hum. Exp. Toxicol.* **2004**, *23*, 67–70, doi:10.1191/0960327104HT419OA.
  72. Ventura, J.; Lobachevsky, P.N.; Palazzolo, J.S.; Forrester, H.; Haynes, N.M.; Ivashkevich, A.; Stevenson, A.W.; Hall, C.J.; Ntargaras, A.; Kotsaris, V.; et al. Localized Synchrotron Irradiation of Mouse Skin Induces Persistent Systemic Genotoxic and Immune Responses. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6389–6399, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1066.
  73. Stephan, G.; Kampen, W.U.; Noßke, D.; Roos, H. Chromosomal Aberrations in Peripheral Lymphocytes of Patients Treated with Radium-224 for Ankylosing Spondylitis. *Radiat. Environ. Biophys.* **2005**, *44*, 23–28, doi:10.1007/S00411-005-0275-X.
  74. Guan, W.J.; Ni, Z.Y.; Hu, Y.; Liang, W.H.; Ou, C.Q.; He, J.X.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.L.; Hui, D.S.C.; et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **2020**, doi:10.1056/NEJMoa2002032.
  75. Calveley, V.L.; Khan, M.A.; Yeung, I.W.T.; Vandyk, J.; Hill, R.P. Partial Volume Rat Lung Irradiation: Temporal Fluctuations of in-Field and out-of-Field DNA Damage and Inflammatory Cytokines Following Irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **2005**, *81*, 887–899, doi:10.1080/09553000600568002.
  76. Gandhi, S.; Chandna, S. Radiation-Induced Inflammatory Cascade and Its Reverberating Crosstalks as Potential Cause of Post-Radiotherapy Second Malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 375–393, doi:10.1007/S10555-017-

- 9669-X.
77. Rube, C.E.; Wilfert, F.; Uthe, D.; Schmid, K.W.; Knoop, R.; Willich, N.; Schuck, A.; Rube, C. Modulation of Radiation-Induced Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF-Alpha) Expression in the Lung Tissue by Pentoxifylline. *Radiother. Oncol.* **2002**, *64*, 177–187, doi:10.1016/S0167-8140(02)00077-4.
  78. Zamarron, B.F.; Chen, W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* **2011**, *7*, 651–658, doi:10.7150/IJBS.7.651.
  79. Najafi, M.; Fardid, R.; Hadadi, G.; Fardid, M. The Mechanisms of Radiation-Induced Bystander Effect. *J. Biomed. Phys. Eng.* **2014**, *4*, 163.
  80. Liu, S.Z.; Jin, S.Z.; Liu, X.D. Radiation-Induced Bystander Effect in Immune Response. *Biomed. Environ. Sci.* **2004**, *17*, 40–46.
  81. Srivastava, A. Cytokine and Chemokine Networks Influencing Stem Cell Proliferation, Differentiation, and Marrow Homing. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **2002**, *38*, 29–38, doi:10.1002/JCB.10105.
  82. Sprung, C.N.; Ivashkevich, A.; Forrester, H.B.; Redon, C.E.; Georgakilas, A.; Martin, O.A. Oxidative DNA Damage Caused by Inflammation May Link to Stress-Induced Non-Targeted Effects. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 72–81, doi:10.1016/J.CANLET.2013.09.008.
  83. Hei, T.K.; Zhou, H.; Ivanov, V.N.; Hong, M.; Lieberman, H.B.; Brenner, D.J.; Amundson, S.A.; Geard, C.R. Mechanism of Radiation-Induced Bystander Effects: A Unifying Model. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 943–950, doi:10.1211/JPP.60.8.0001.
  84. Rastogi, S.; Boylan, M.; Wright, E.G.; Coates, P.J. Interactions of Apoptotic Cells with Macrophages in Radiation-Induced Bystander Signaling. *Radiat. Res.* **2013**, *179*, 135–145, doi:10.1667/RR2969.1.
  85. Chen, S.; Zhao, Y.; Han, W.; Zhao, G.; Zhu, L.; Wang, J.; Bao, L.; Jiang, E.; Xu, A.; Hei, T.K.; et al. Mitochondria-Dependent Signalling Pathway Are Involved in the Early Process of Radiation-Induced Bystander Effects. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 1839–1844, doi:10.1038/SJ.BJC.6604358.
  86. Yang, G.; Wu, L.; Chen, S.; Zhu, L.; Huang, P.; Tong, L.; Zhao, Y.; Zhao, G.; Wang, J.; Mei, T.; et al. Mitochondrial Dysfunction Resulting from Loss of Cytochrome c

- Impairs Radiation-Induced Bystander Effect. *Br. J. Cancer* **2009**, *100*, 1912–1916, doi:10.1038/SJ.BJC.6605087.
87. Zhou, H.; Ivanov, V.N.; Lien, Y.C.; Davidson, M.; Hei, T.K. Mitochondrial Function and Nuclear Factor-KappaB-Mediated Signaling in Radiation-Induced Bystander Effects. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2233–2240, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5278.
88. Zhou, H.; Randers-Pehrson, G.; Waldren, C.A.; Vannais, D.; Hall, E.J.; Hei, T.K. Induction of a Bystander Mutagenic Effect of Alpha Particles in Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 2099–2104, doi:10.1073/PNAS.030420797/ASSET/812990CB-22B1-4C06-AAF8-B51F487A8CF0/ASSETS/GRAPHIC/PQ0304207004.JPEG.
89. Albanese J, D.N. Ionizing Radiation Alters Fas Antigen Ligand at the Cell Surface and on Exfoliated Plasma Membrane-Derived Vesicles: Implications for Apoptosis and Intercellular Signaling. *Radiat Res.* **2000**, *153*, 49–61, doi:10.1667/0033-.
90. Ariyoshi, K.; Miura, T.; Kasai, K.; Fujishima, Y.; Nakata, A.; Yoshida, M. Radiation-Induced Bystander Effect Is Mediated by Mitochondrial DNA in Exosome-Like Vesicles. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, doi:10.1038/S41598-019-45669-Z.
91. Xu, S.; Wang, J.; Ding, N.; Hu, W.; Zhang, X.; Wang, B.; Hua, J.; Wei, W.; Zhu, Q. Exosome-Mediated MicroRNA Transfer Plays a Role in Radiation-Induced Bystander Effect. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 1355–1363, doi:10.1080/15476286.2015.1100795.
92. Holliday, R. Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics* **2006**, *1*, 76–80, doi:10.4161/EPI.1.2.2762.
93. Kalinich, J.F.; Catravas, G.N.; Snyder, S.L. The Effect of  $\gamma$  Radiation on DNA Methylation. *Radiat. Res.* **1989**, *117*, 185–197, doi:10.2307/3577319.
94. Sedelnikova, O.A.; Nakamura, A.; Kovalchuk, O.; Koturbash, I.; Mitchell, S.A.; Marino, S.A.; Brenner, D.J.; Bonner, W.M. DNA Double-Strand Breaks Form in Bystander Cells after Microbeam Irradiation of Three-Dimensional Human Tissue Models. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4295–4302, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4442.
95. Zaratiegui, M.; Irvine, D. V.; Martienssen, R.A. Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell* **2007**, *128*, 763–776, doi:10.1016/J.CELL.2007.02.016.
96. Ermakov, A. V.; Konkova, M.S.; Kostyuk, S. V.; Izevskaya, V.L.; Baranova, A.; Veiko, N.N. Oxidized Extracellular DNA as a Stress Signal in Human Cells. *Oxid.*

- Med. Cell. Longev.* **2013**, 2013, doi:10.1155/2013/649747.
97. Dickey, J.S.; Baird, B.J.; Redon, C.E.; Avdoshina, V.; Palchik, G.; Wu, J.; Kondratyev, A.; Bonner, W.M.; Martin, O.A. Susceptibility to Bystander DNA Damage Is Influenced by Replication and Transcriptional Activity. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 10274, doi:10.1093/NAR/GKS795.
  98. Merrifield, M.; Kovalchuk, O. Epigenetics in Radiation Biology: A New Research Frontier. *Front. Genet.* **2013**, *4*, 40, doi:10.3389/FGENE.2013.00040/BIBTEX.
  99. Ilnytskyy, Y.; Kovalchuk, O. Non-Targeted Radiation Effects-an Epigenetic Connection. *Mutat. Res.* **2011**, *714*, 113–125, doi:10.1016/J.MRFMMM.2011.06.014.
  100. Dickey, J.S.; Zemp, F.J.; Altamirano, A.; Sedelnikova, O.A.; Bonner, W.M.; Kovalchuk, O. H2AX Phosphorylation in Response to DNA Double-Strand Break Formation during Bystander Signalling: Effect of MicroRNA Knockdown. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2011**, *143*, 264–269, doi:10.1093/RPD/NCQ470.
  101. Kovalchuk, O.; Zemp, F.J.; Filkowski, J.N.; Altamirano, A.M.; Dickey, J.S.; Jenkins-Baker, G.; Marino, S.A.; Brenner, D.J.; Bonner, W.M.; Sedelnikova, O.A. MicroRNAome Changes in Bystander Three-Dimensional Human Tissue Models Suggest Priming of Apoptotic Pathways. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1882–1888, doi:10.1093/CARCIN/BGQ119.
  102. Sokolov, M. V.; Dickey, J.S.; Bonner, W.M.; Sedelnikova, O.A. Gamma-H2AX in Bystander Cells: Not Just a Radiation-Triggered Event, a Cellular Response to Stress Mediated by Intercellular Communication. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 2210–2212, doi:10.4161/CC.6.18.4682.
  103. Ilnytskyy, Y.; Koturbash, I.; Kovalchuk, O. Radiation-Induced Bystander Effects in Vivo Are Epigenetically Regulated in a Tissue-Specific Manner. *Environ. Mol. Mutagen.* **2009**, *50*, 105–113, doi:10.1002/EM.20440.
  104. Rugo, R.E.; Almeida, K.H.; Hendricks, C.A.; Jonnalagadda, V.S.; Engelward, B.P. A Single Acute Exposure to a Chemotherapeutic Agent Induces Hyper-Recombination in Distantly Descendant Cells and in Their Neighbors. *Oncogene* **2005**, *24*, 5016–5025, doi:10.1038/SJ.ONC.1208690.
  105. Asur, R.S.; Thomas, R.A.; Tucker, J.D. Chemical Induction of the Bystander Effect in Normal Human Lymphoblastoid Cells. *Mutat. Res.* **2009**, *676*, 11–16,

- doi:10.1016/j.mrgentox.2009.02.012.
106. Demidem, A.; Morvan, D.; Madelmont, J.C. Bystander Effects Are Induced by CENU Treatment and Associated with Altered Protein Secretory Activity of Treated Tumor Cells A Relay for Chemotherapy? *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 992–1004, doi:10.1002/IJC.21761.
  107. Jin, C.; Wu, S.; Lu, X.; Liu, Q.; Zhang, L.; Yang, J.; Xi, Q.; Cai, Y. Conditioned Medium from Actinomycin D-Treated Apoptotic Cells Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in Bystander Cells. *Toxicol. Lett.* **2012**, *211*, 45–53, doi:10.1016/J.TOXLET.2012.02.020.
  108. Rodier, F.; Coppé, J.P.; Patil, C.K.; Hoeijmakers, W.A.M.; Muñoz, D.P.; Raza, S.R.; Freund, A.; Campeau, E.; Davalos, A.R.; Campisi, J. Persistent DNA Damage Signalling Triggers Senescence-Associated Inflammatory Cytokine Secretion. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 973–979, doi:10.1038/NCB1909.
  109. Coppé, J.P.; Patil, C.K.; Rodier, F.; Sun, Y.; Muñoz, D.P.; Goldstein, J.; Nelson, P.S.; Desprez, P.Y.; Campisi, J. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the P53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0060301.
  110. Hubackova, S.; Krejcikova, K.; Bartek, J.; Hodny, Z. IL1- and TGF $\beta$ -Nox4 Signaling, Oxidative Stress and DNA Damage Response Are Shared Features of Replicative, Oncogene-Induced, and Drug-Induced Paracrine “Bystander Senescence.” *Aging (Albany. NY).* **2012**, *4*, 932–951, doi:10.18632/AGING.100520.
  111. Coghlin, C.; Murray, G.I. Current and Emerging Concepts in Tumour Metastasis. *J. Pathol.* **2010**, *222*, 1–15, doi:10.1002/PATH.2727.
  112. Solinas, G.; Marchesi, F.; Garlanda, C.; Mantovani, A.; Allavena, P. Inflammation-Mediated Promotion of Invasion and Metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2010**, *29*, 243–248, doi:10.1007/S10555-010-9227-2.
  113. Szatrowski, T.P.; Nathan, C.F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **1991**, *51*.
  114. Hiscox, S.; Barrett-Lee, P.; Nicholson, R.I. Therapeutic Targeting of Tumor-Stroma Interactions. *Expert Opin. Ther. Targets* **2011**, *15*, 609–621, doi:10.1517/14728222.2011.561201.
  115. Lisanti, M.P.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Lin, Z.; Pavlides, S.; Whitaker-Menezes,

- D.; Pestell, R.G.; Howell, A.; Sotgia, F. Hydrogen Peroxide Fuels Aging, Inflammation, Cancer Metabolism and Metastasis: The Seed and Soil Also Needs “Fertilizer.” *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2440, doi:10.4161/CC.10.15.16870.
116. Jüngst, C.; Cheng, B.; Gehrke, R.; Schmitz, V.; Nischalke, H.D.; Ramakers, J.; Schramel, P.; Schirmacher, P.; Sauerbruch, T.; Caselmann, W.H. Oxidative Damage Is Increased in Human Liver Tissue Adjacent to Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **2004**, *39*, 1663–1672, doi:10.1002/HEP.20241.
  117. Kryston, T.B.; Georgiev, A.B.; Pissis, P.; Georgakilas, A.G. Role of Oxidative Stress and DNA Damage in Human Carcinogenesis. *Mutat. Res.* **2011**, *711*, 193–201, doi:10.1016/J.MRFMMM.2010.12.016.
  118. Martinez-Outschoorn, U.E.; Balliet, R.M.; Rivadeneira, D.B.; Chiavarina, B.; Pavlides, S.; Wang, C.; Whitaker-Menezes, D.; Daumer, K.M.; Lin, Z.; Witkiewicz, A.K.; et al. Oxidative Stress in Cancer Associated Fibroblasts Drives Tumor-Stroma Co-Evolution: A New Paradigm for Understanding Tumor Metabolism, the Field Effect and Genomic Instability in Cancer Cells. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 3256–3276, doi:10.4161/CC.9.16.12553.
  119. Tsuyada, A.; Chow, A.; Wu, J.; Somlo, G.; Chu, P.; Loera, S.; Luu, T.; Li, A.X.; Wu, X.; Ye, W.; et al. CCL2 Mediates Cross-Talk between Cancer Cells and Stromal Fibroblasts That Regulates Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2768–2779, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3567.
  120. Martinez-Outschoorn, U.E.; Lin, Z.; Trimmer, C.; Flomenberg, N.; Wang, C.; Pavlides, S.; Pestell, R.G.; Howell, A.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. Cancer Cells Metabolically “Fertilize” the Tumor Microenvironment with Hydrogen Peroxide, Driving the Warburg Effect: Implications for PET Imaging of Human Tumors. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2504, doi:10.4161/CC.10.15.16585.
  121. Konopacka, M.; Rzeszowska-Wolny, J. The Bystander Effect-Induced Formation of Micronucleated Cells Is Inhibited by Antioxidants, but the Parallel Induction of Apoptosis and Loss of Viability Are Not Affected. *Mutat. Res.* **2006**, *593*, 32–38, doi:10.1016/J.MRFMMM.2005.06.017.
  122. Konopacka, M.; Rzeszowska-Wolny, J. The Bystander Effect-Induced Formation of Micronucleated Cells Is Inhibited by Antioxidants, but the Parallel Induction of Apoptosis and Loss of Viability Are Not Affected. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech.*



- Mutagen.* **2006**, *593*, 32–38, doi:10.1016/J.MRFMMM.2005.06.017.
123. Mosse, I.; Marozik, P.; Seymour, C.; Mothersill, C. The Effect of Melanin on the Bystander Effect in Human Keratinocytes. *Mutat. Res.* **2006**, *597*, 133–137, doi:10.1016/J.MRFMMM.2005.09.006.
124. Wenkert, E.; Fuchs, A.; McChesney, J.D. Chemical Artifacts from the Family Labiatae. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2931–2934, doi:10.1021/JO01020A012/ASSET/JO01020A012.FP.PNG\_V03.
125. Bahri, S.; Jameleddine, S.; Shlyonsky, V. Relevance of Carnosic Acid to the Treatment of Several Health Disorders: Molecular Targets and Mechanisms. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 569–582, doi:10.1016/J.BIOPHA.2016.09.067.
126. Munné-Bosch, S.; Alegre, L. Changes in Carotenoids, Tocopherols and Diterpenes during Drought and Recovery, and the Biological Significance of Chlorophyll Loss in *Rosmarinus Officinalis* Plants. *Planta* **2000**, *210*, 925–931, doi:10.1007/S004250050699.
127. Poeckel, D.; Greiner, C.; Verhoff, M.; Rau, O.; Tausch, L.; Hörnig, C.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Werz, O. Carnosic Acid and Carnosol Potently Inhibit Human 5-Lipoxygenase and Suppress pro-Inflammatory Responses of Stimulated Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 91–97, doi:10.1016/J.BCP.2008.04.013.
128. Yesil-Celiktas, O.; Sevimli, C.; Bedir, E.; Vardar-Sukan, F. Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65*, 158–163, doi:10.1007/S11130-010-0166-4.
129. Shin, H.B.; Choi, M.S.; Ryu, B.; Lee, N.R.; Kim, H.I.; Choi, H.E.; Chang, J.; Lee, K.T.; Jang, D.S.; Inn, K.S. Antiviral Activity of Carnosic Acid against Respiratory Syncytial Virus. *Viol. J.* **2013**, *10*, 303, doi:10.1186/1743-422X-10-303.
130. Tsai, C.W.; Lin, C.Y.; Lin, H.H.; Chen, J.H. Carnosic Acid, a Rosemary Phenolic Compound, Induces Apoptosis through Reactive Oxygen Species-Mediated P38 Activation in Human Neuroblastoma IMR-32 Cells. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*, 2442–2451, doi:10.1007/S11064-011-0573-4.
131. Barni, M. V.; Carlini, M.J.; Cafferata, E.G.; Puricelli, L.; Moreno, S. Carnosic Acid Inhibits the Proliferation and Migration Capacity of Human Colorectal Cancer Cells.

- Oncol. Rep.* **2012**, *27*, 1041–1048, doi:10.3892/OR.2012.1630.
132. Park, S.Y.; Song, H.; Sung, M.K.; Kang, Y.H.; Lee, K.W.; Park, J.H.Y. Carnosic Acid Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition in B16F10 Melanoma Cells: A Possible Mechanism for the Inhibition of Cell Migration. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 12698, doi:10.3390/IJMS150712698.
133. Rajasekaran, D.; Manoharan, S.; Silvan, S.; Vasudevan, K.; Baskaran, N.; Palanimuthu, D. Proapoptotic, Anti-Cell Proliferative, Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Potential of Carnosic Acid during 7,12 Dimethylbenz[a]Anthracene-Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* **2012**, *10*, 102–112, doi:10.4314/AJTCAM.V10I1.14.
134. Kar, S.; Palit, S.; Ball, W.B.; Das, P.K. Carnosic Acid Modulates Akt/IKK/NF-KB Signaling by PP2A and Induces Intrinsic and Extrinsic Pathway Mediated Apoptosis in Human Prostate Carcinoma PC-3 Cells. *Apoptosis* **2012**, *17*, 735–747, doi:10.1007/S10495-012-0715-4.
135. Pesakhov, S.; Khanin, M.; Studzinski, G.P.; Danilenko, M. Distinct Combinatorial Effects of the Plant Polyphenols Curcumin, Carnosic Acid, and Silibinin on Proliferation and Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 811–824, doi:10.1080/01635581003693082.
136. Jung, K.J.; Min, K. jin; Bae, J.H.; Kwon, T.K. Carnosic Acid Sensitized TRAIL-Mediated Apoptosis through down-Regulation of c-FLIP and Bcl-2 Expression at the Post Translational Levels and CHOP-Dependent up-Regulation of DR5, Bim, and PUMA Expression in Human Carcinoma Caki Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 1556–1568, doi:10.18632/ONCOTARGET.2727.
137. López-Jiménez, A.; García-Caballero, M.; Medina, M.Á.; Quesada, A.R. Anti-Angiogenic Properties of Carnosol and Carnosic Acid, Two Major Dietary Compounds from Rosemary. *Eur. J. Nutr. 2011 521* **2011**, *52*, 85–95, doi:10.1007/S00394-011-0289-X.
138. Lin, K.I.; Lin, C.C.; Kuo, S.M.; Lai, J.C.; Wang, Y.Q.; You, H.L.; Hsu, M.L.; Chen, C.H.; Shiu, L.Y. Carnosic Acid Impedes Cell Growth and Enhances Anticancer Effects of Carmustine and Lomustine in Melanoma. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20180005, doi:10.1042/BSR20180005.
139. Alcaraz, M.; Achel, D.G.; Olivares, A.; Olmos, E.; Alcaraz-Saura, M.; Castillo, J.

- Carnosol, Radiation and Melanoma: A Translational Possibility. *Clin. Transl. Oncol.* **2013**, *15*, 712–719, doi:10.1007/s12094-012-0994-9.
140. Alcaraz, M.; Achel, D.G.; Olivares, A.; Olmos, E.; Alcaraz-Saura, M.; Castillo, J. Carnosol, Radiation and Melanoma: A Translational Possibility. *Clin. Transl. Oncol.* **2013**, *15*, 712–719, doi:10.1007/S12094-012-0994-9.
141. Alcaraz, M.; Acevedo, C.; Castillo, J.; Benavente-Garcia, O.; Armero, D.; Vicente, V.; Canteras, M. Liposoluble Antioxidants Provide an Effective Radioprotective Barrier. *Br. J. Radiol.* **2009**, *82*, 605–609, doi:10.1259/BJR/30930369.
142. Doolaeghe, E.H.A.; Raes, K.; De Vos, F.; Verhé, R.; De Smet, S. Absorption, Distribution and Elimination of Carnosic Acid, A Natural Antioxidant from *Rosmarinus Officinalis*, in Rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2011**, *66*, 196–202, doi:10.1007/S11130-011-0233-5.
143. Romo Vaquero, M.; García Villalba, R.; Larrosa, M.; Yáñez-Gascón, M.J.; Fromentin, E.; Flanagan, J.; Roller, M.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C.; García-Conesa, M.T. Bioavailability of the Major Bioactive Diterpenoids in a Rosemary Extract: Metabolic Profile in the Intestine, Liver, Plasma, and Brain of Zucker Rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 1834–1846, doi:10.1002/MNFR.201300052.
144. Wang, Q.L.; Li, H.; Li, X.X.; Cui, C.Y.; Wang, R.; Yu, N.X.; Chen, L.X. Acute and 30-Day Oral Toxicity Studies of Administered Carnosic Acid. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 4348–4355, doi:10.1016/J.FCT.2012.08.057.
145. D’Mello, S.A.N.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Askarian-Amiri, M.E. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1144, doi:10.3390/IJMS17071144.
146. Sviderskaya, E. V.; Hill, S.P.; Balachandar, D.; Barsh, G.S.; Bennett, D.C. Agouti Signaling Protein and Other Factors Modulating Differentiation and Proliferation of Immortal Melanoblasts. *Dev. Dyn.* **2001**, *221*, 373–379, doi:10.1002/DVDY.1153.
147. Passeron, T.; Coelho, S.G.; Miyamura, Y.; Takahashi, K.; Hearing, V.J. Immunohistochemistry and in Situ Hybridization in the Study of Human Skin Melanocytes. *Exp. Dermatol.* **2007**, *16*, 162–170, doi:10.1111/J.1600-0625.2006.00538.X.
148. Rzepka, Z.; Buszman, E.; Beberok, A.; Wrześniok, D. From Tyrosine to Melanin: Signaling Pathways and Factors Regulating Melanogenesis. *Postepy Hig. Med. Dosw.*

- (Online) **2016**, *70*, 695–708, doi:10.5604/17322693.1208033.
149. Lu, Y.; Tonissen, K.F.; Di Trapani, G. Modulating Skin Colour: Role of the Thioredoxin and Glutathione Systems in Regulating Melanogenesis. *Biosci. Rep.* **2021**, *41*, doi:10.1042/BSR20210427.
  150. Plettenberg, A.; Ballaun, C.; Pammer, J.; Mildner, M.; Strunk, D.; Weninger, W.; Tschachler, E. Human Melanocytes and Melanoma Cells Constitutively Express the Bcl-2 Proto-Oncogene in Situ and in Cell Culture. *Am. J. Pathol.* **1995**, *146*, 651.
  151. Trappetti, V.; Fazzari, J.M.; Fernandez-palomo, C.; Scheidegger, M.; Volarevic, V.; Martin, O.A.; Djonov, V.G. Microbeam Radiotherapy-A Novel Therapeutic Approach to Overcome Radioresistance and Enhance Anti-Tumour Response in Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7755, doi:10.3390/IJMS22147755.
  152. Delaney, G.; Jacob, S.; Featherstone, C.; Barton, M. The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment: Estimating Optimal Utilization from a Review of Evidence-Based Clinical Guidelines. *Cancer* **2005**, *104*, 1129–1137, doi:10.1002/CNCR.21324.
  153. Roy, S.; Morgan, S.C. Hypofractionated Radiotherapy for Localized Prostate Cancer: When and for Whom? *Curr. Urol. Rep.* **2019**, *20*, doi:10.1007/S11934-019-0918-0.
  154. Sato, K.; Shimokawa, T.; Imai, T. Difference in Acquired Radioresistance Induction Between Repeated Photon and Particle Irradiation. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, doi:10.3389/FONC.2019.01213.
  155. Zhang, H.; Luo, H.; Jiang, Z.; Yue, J.; Hou, Q.; Xie, R.; Wu, S. Fractionated Irradiation-Induced EMT-like Phenotype Conferred Radioresistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J. Radiat. Res.* **2016**, *57*, 370–380, doi:10.1093/JRR/RRW030.
  156. Steel, G.G.; Mcmillan, T.J.; Peacock, J.H. The 5Rs of Radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* **1989**, *56*, 1045–1048, doi:10.1080/09553008914552491.
  157. Withers, H.R. The Four R's of Radiotherapy. **1975**, *5*, 241–271, doi:10.1016/B978-0-12-035405-4.50012-8.
  158. Harmer, C.L. The Radiotherapy of Melanoma. *Clin. Exp. Dermatol.* **1976**, *1*, 29–36, doi:10.1111/J.1365-2230.1976.TB01396.X.
  159. Shahbazian, D.; Bindra, R.S.; Kluger, H.M.; Glazer, P.M. Radiation Sensitivity and Sensitization in Melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **2013**, *26*, 928–930, doi:10.1111/pcmr.12147.

160. Zhao, H.; Jiang, H.; Li, Z.; Yafei, Z.; Liu, Y.; Zhou, S.; Xiao, Y.; Xie, C.; Zhou, F.; Zhou, Y. 2-Methoxyestradiol Enhances Radiosensitivity in Radioresistant Melanoma MDA-MB-435R Cells by Regulating Glycolysis via HIF-1 $\alpha$ /PDK1 Axis. *Int. J. Oncol.* **2017**, *50*, 1531–1540, doi:10.3892/IJO.2017.3924.
161. West, C.M.L.; Davidson, S.E.; Elyan, S.A.G.; Swindell, R.; Roberts, S.A.; Orton, C.J.; Coyle, C.A.; Valentine, H.; Wilks, D.P.; Hunter, R.D.; et al. The Intrinsic Radiosensitivity of Normal and Tumour Cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **1998**, *73*, 409–413, doi:10.1080/095530098142248.
162. Pajonk, F.; Vlashi, E.; McBride, W.H. Radiation Resistance of Cancer Stem Cells: The 4 R's of Radiobiology Revisited. *Stem Cells* **2010**, *28*, 639–648, doi:10.1002/STEM.318.
163. Schulz, A.; Meyer, F.; Dubrovskaja, A.; Cancers, K.B.-; 2019, U. Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond. *Cancers (Basel)* **2019**, *21*; *11*, 862, doi:10.3390/cancers11060862.
164. Baumann, M.; Krause, M.; Hill, R. Exploring the Role of Cancer Stem Cells in Radioresistance. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 545–554, doi:10.1038/NRC2419.
165. Clarke, M.F.; Dick, J.E.; Dirks, P.B.; Eaves, C.J.; Jamieson, C.H.M.; Jones, D.L.; Visvader, J.; Weissman, I.L.; Wahl, G.M. Cancer Stem Cells--Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9339–9344, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126.
166. Balmukhanov, S.B.; Yefimov, M.L.; Kleinbock, T.S. Acquired Radioresistance of Tumour Cells. *Nature* **1967**, *216*, 709–711, doi:10.1038/216709A0.
167. Galeaz, C.; Totis, C.; Bisio, A. Radiation Resistance: A Matter of Transcription Factors. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/FONC.2021.662840.
168. Ren, Z.; Mao, X.; Mertens, C.; Krishnaraj, R.; Qin, J.; Mandal, P.K.; Romanowski, M.J.; McMurray, J.S.; Chen, X. Crystal Structure of Unphosphorylated STAT3 Core Fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *374*, 1–5, doi:10.1016/J.BBRC.2008.04.049.
169. Obrador, E.; Liu-Smith, F.; Dellinger, R.W.; Salvador, R.; Meyskens, F.L.; Estrela, J.M. Oxidative Stress and Antioxidants in the Pathophysiology of Malignant Melanoma. *Biol. Chem.* **2019**, *400*, 589–612, doi:10.1515/HSZ-2018-0327/XML.
170. Olivares, A.; Alcaraz-Saura, M.; Achel, D.G.; Alcaraz, M. Effect of Rosmarinic Acid

- and Ionizing Radiation on Glutathione in Melanoma B16F10 Cells: A Translational Opportunity. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, *9*, 1–14, doi:10.3390/ANTIOX9121291.
171. Fenech, M.; Morley, A.A. Cytokinesis-Block Micronucleus Method in Human Lymphocytes: Effect of in Vivo Ageing and Low Dose X-Irradiation. *Mutat. Res.* **1986**, *161*, 193–198, doi:10.1016/0027-5107(86)90010-2.
  172. Fenech, M. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Nucleated Cells. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, *340B*, 195–206.
  173. Fenech, M. The in Vitro Micronucleus Technique. *Mutat. Res.* **2000**, *455*, 81–95, doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
  174. Min, Y.; Roche, K.C.; Tian, S.; Eblan, M.J.; McKinnon, K.P.; Caster, J.M.; Chai, S.; Herring, L.E.; Zhang, L.; Zhang, T.; et al. Antigen-Capturing Nanoparticles Improve the Abscopal Effect and Cancer Immunotherapy. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 877–882, doi:10.1038/nnano.2017.113.
  175. Almássy, Z.; Krepinsky, A.B.; Bianco, A.; Köteles, G.J. The Present State and Perspectives of Micronucleus Assay in Radiation Protection. A Review. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.* **1987**, *38*, 241–249, doi:10.1016/0883-2889(87)90033-5.
  176. Schmid, W. The Micronucleus Test. *Mutat. Res.* **1975**, *31*, 9–15, doi:10.1016/0165-1161(75)90058-8.
  177. Von Ledebur, M.; Schmid, W. The Micronucleus Test. Methodological Aspects. *Mutat. Res.* **1973**, *19*, 109–117, doi:10.1016/0027-5107(73)90118-8.
  178. Balmus, G.; Karp, N.A.; Ng, B.L.; Jackson, S.P.; Adams, D.J.; McIntyre, R.E. A High-Throughput in Vivo Micronucleus Assay for Genome Instability Screening in Mice. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 205–215, doi:10.1038/nprot.2015.010.
  179. James Carmichael; William G. DeGraff; Adi F. Gazdar; John D. Minna; James B. Mitchell Evaluation of a Tetrazolium-Based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Radiosensitivity. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 943–946.
  180. James Carmichael; William G. DeGraff; Adi F. Gazdar; John D. Minna; James B. Mitchell Evaluation of a Tetrazolium-Based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing . *Cancer Res.* **1987**, *47*, 936–942.
  181. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, B.M. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human

- Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res.* **1988**, *47*, 589–601.
182. Vicente, J.R., Ortega V.V., J.M.J. Valor Del Ensayo Calorimétrico Con MTT En El Estudio Del Crecimiento y Citotoxicidad in Vitro de Líneas de Melanoma. *Patologia (Mex)*. **1997**, *30*, 18–27.
  183. Franken, N.A.P.; Rodermond, H.M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic Assay of Cells in Vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *15* **2006**, *1*, 2315–2319, doi:10.1038/nprot.2006.339.
  184. Meister, A.; Anderson, M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711–760, doi:10.1146/ANNUREV.BI.52.070183.003431.
  185. Noctor, G.; Gomez, L.; Vanacker, H.; Foyer, C.H. Interactions between Biosynthesis, Compartmentation and Transport in the Control of Glutathione Homeostasis and Signalling. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1283–1304, doi:10.1093/JEXBOT/53.372.1283.
  186. Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardo, F. V.; Lloret, A.; Lehner, M.; Garcia-De-La Asuncion, J.; Viña, J. Ratio of Reduced to Oxidized Glutathione as Indicator of Oxidative Stress Status and DNA Damage. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 267–276, doi:10.1016/S0076-6879(99)99026-2.
  187. Kleinman, W.A.; Richie, J.P. Status of Glutathione and Other Thiols and Disulfides in Human Plasma. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 19–29, doi:10.1016/S0006-2952(00)00293-8.
  188. MM, B. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254, doi:10.1006/ABIO.1976.9999.
  189. Sarma, L.; Kesavan, P.C. Protective Effects of Vitamins C and E Against  $\gamma$ -Ray-Induced Chromosomal Damage in Mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* **2009**, *63*, 759–764, doi:10.1080/09553009314552161.
  190. Sawant, A.; Randers-Pehrson, G.; Brenner, D.J.; Hall, E.J. The Bystander Response in C3H 10T1/2 Cells: The Influence of Cell-to-Cell Contact. *Radiat. Res.* **2004**, *161*, 397–401, doi:10.1667/RR3137.
  191. Hickman, A. (Bert) W.  $\alpha$ -Particle-Induced P53 Protein Expression in a Rat Lung Epithelial Cell Strain. *Cancer Res.* **1994**, *15*, 5797–5800.
  192. Koyama, S.; Kodama, S.; Suzuki, K.; Matsumoto, T.; Miyazaki, T.; Watanabe, M.

- Radiation-Induced Long-Lived Radicals Which Cause Mutation and Transformation. *Mutat. Res.* **1998**, *421*, 45–54, doi:10.1016/S0027-5107(98)00153-5.
193. Krayem, M.; Ghanem, G.E.; Van Gestel, D. Recent Advances in Radiosensitivity Determinants in Melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* **2022**, *34*, 131–138, doi:10.1097/CCO.0000000000000818.
  194. Mitchell, J.C.; Norman, A. The Induction of Micronuclei in Human Lymphocytes By Low Doses of Radiation. <http://dx.doi.org/10.1080/09553008714552031> **2009**, *52*, 527–535, doi:10.1080/09553008714552031.
  195. Hayashi, M. The Micronucleus Test-Most Widely Used in Vivo Genotoxicity Test. *Genes Environ.* **2016**, *38*, 1–6, doi:10.1186/S41021-016-0044-X/FIGURES/1.
  196. Sommer, S.; Buraczewska, I.; Kruszewski, M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/IJMS21041534.
  197. J.A.H, K. Micronuclei as a Rapid and Inexpensive Measure of Radiation-Induced Chromosome Aberrations. In *Radiation Induced Chromosomal Damage in Man.*; Sasaki I.A., E., Ed.; Taylor & Francis: New York, 1983; Vol. 46, pp. 93–109.
  198. Balmus, G.; Karp, N.A.; Ng, B.L.; Jackson, S.P.; Adams, D.J.; McIntyre, R.E. A High-Throughput in Vivo Micronucleus Assay for Genome Instability Screening in Mice. *Nat. Protoc.* **2014**, *10*, 205–215, doi:10.1038/nprot.2015.010.
  199. Achel, D.G.; Alcaraz-Saura, M.; Castillo, J.; Olivares, A.; Alcaraz, M. Radioprotective and Antimutagenic Effects of Pycnanthus Angolensis Warb Seed Extract against Damage Induced by X Rays. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, Page 6 **2019**, *9*, 6, doi:10.3390/JCM9010006.
  200. Zhang, L.P.; Li, S.; Zhang, H.; Li, Q.; Liu, Y.; Li, F.F.; Gong, D.J. Effects of Heavy Ions (12C6+) on Malignant Melanoma B16F10 Cells. *Transl. Cancer Res.* **2022**, *11*, 1616–1629, doi:10.21037/TCR-21-1692/COIF.
  201. Schmid, W. The Micronucleus Test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **1975**, *31*, 9–15, doi:10.1016/0165-1161(75)90058-8.
  202. Alcaraz, M.; Olivares, A.; Achel, D.G.; García-gamuz, J.A.; Castillo, J.; Alcaraz-saura, M. Genoprotective Effect of Some Flavonoids against Genotoxic Damage Induced by X-rays in Vivo: Relationship between Structure and Activity. *Antioxidants* **2022**, *11*, 94, doi:10.3390/ANTIOX11010094/S1.
  203. Alcaraz, M.; Olmos, E.; Alcaraz-Saura, M.; Achel, D.G.; Castillo, J. Effect of Long-



- Term 50 Hz Magnetic Field Exposure on the Micronucleated Polychromatic Erythrocytes of Mice. <http://dx.doi.org/10.3109/15368378.2013.783851> **2014**, *33*, 51–57, doi:10.3109/15368378.2013.783851.
204. Hutter, K.J.; Stöhr, M. Rapid Detection of Mutagen Induced Micronucleated Erythrocytes by Flow Cytometry. *Histochemistry* **1982**, *75*, 353–362, doi:10.1007/BF00496738.
  205. Martínez, C.; Vicente Ortega, V.; Yáñez, J.; Alcaraz, M.; Castellás, M.T.; Canteras, M.; Benavente-García, O.; Castillo, J. The Effect of the Flavonoid Diosmin, Grape Seed Extract and Red Wine on the Pulmonary Metastatic B16F10 Melanoma. *Histol. Histopathol.* **2005**, *20*, 1121–1129, doi:10.14670/HH-20.1121.
  206. Olivares A., Alcaraz-Saura M., Achel DG., Berná-Mestre JD., A.M. Radiation-Induced Bystander Effect: Loss of Radioprotective Capacity of Rosmarinic Acid In Vivo and In Vitro. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2021**, *10*, 1–17, doi:10.3390/ANTIOX10020231.
  207. Ainsbury, E. et al *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*; Agency, I.A.E., Ed.; Viena, 2011;
  208. Alcaraz M., Olivares A., Achel D., A.-S.M. Effects of Bisphosphonates in Combination with Ionizing Radiation and Antioxidants on the Growth of Prostate and Melanoma Cells Lines. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 3217–3224.
  209. Alcaraz M, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Olivares A, López-Morata JA, C.J. Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1913–1921.
  210. Alcaraz, M.; Olivares, A.; Armero, D.; Alcaraz-Saura, M.; Achel, D. Zoledronic Acid and Radiation: Toxicity, Synergy or Radiosensitization? *Clin. Transl. Oncol.* **2013**, *15*, 300–306, doi:10.1007/S12094-012-0917-9/METRICS.
  211. Sánchez-Campillo, M.; Gabaldon, J.A.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Del Baño, M.J.; Alcaraz, M.; Vicente, V.; Alvarez, N.; Lozano, J.A. Rosmarinic Acid, a Photo-Protective Agent against UV and Other Ionizing Radiations. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 386–392, doi:10.1016/J.FCT.2008.11.026.
  212. Alcaraz, M.; Achel, D.G.; Olivares, A.; Olmos, E.; Alcaraz-Saura, M.; Castillo, J. Carnosol, Radiation and Melanoma: A Translational Possibility. *Clin. Transl. Oncol.* **2013**, *15*, 712–719, doi:10.1007/S12094-012-0994-9/METRICS.

213. Martínez, C; Yáñez, J; Vicente, V; Alcaraz, M; Benavente-García, O; Castillo, J; Lorente, J; Lozano, J.A. Effects of Several Polyhydroxylated Flavonoids on the Growth of B16F10 Melanoma and Melan-a Melanocyte Cell Lines: Influence of the Sequential Oxidation State of the Flavonoid Skeleton. *Melanoma Res.* **2003**, *13*, 3–9.
214. Rodriguez, J.; Yáñez, J.; Vicente, V.; Alcaraz, M.; Benavente-García, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Lozano, J.A. Effects of Several Flavonoids on the Growth of B16F10 and SK-MEL-1 Melanoma Cell Lines : Relationship between Structure and Activity. *Melanoma Res.* **2002**, *12*, 99–107.
215. Martínez, C.; Vicente, V.; Yáñez, M.J.; García, J.M.; Canteras, M.; Alcaraz, M. Experimental Model of Pulmonary Metastasis Treatment with IFN $\alpha$ . *Cancer Lett.* **2005**, *225*, 75–83, doi:10.1016/J.CANLET.2004.11.047.
216. Arakawa, N.; Okubo, A.; Yasuhira, S.; Takahashi, K.; Amano, H.; Akasaka, T.; Masuda, T.; Shibazaki, M.; Maesawa, C. Carnosic Acid, an Inducer of Nad(P)H Quinone Oxidoreductase 1, Enhances the Cytotoxicity of  $\beta$ -Lapachone in Melanoma Cell Lines. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 2393–2400, doi:10.3892/OL.2017.7618/HTML.
217. Miguel Alcaraz, Miguel Alcaraz-Saura, Daniel Gyingiri Achel, Amparo Olivares, José Antonio López-Morata, J.C. Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells | Anticancer Research. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 913–921.
218. Masuda, T.; Inaba, Y.; Takeda, Y. Antioxidant Mechanism of Carnosic Acid: Structural Identification of Two Oxidation Products. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5560–5565, doi:10.1021/JF010693I.
219. Huang, S.C.; Ho, C.T.; Lin-Shiau, S.Y.; Lin, J.K. Carnosol Inhibits the Invasion of B16/F10 Mouse Melanoma Cells by Suppressing Metalloproteinase-9 through down-Regulating Nuclear Factor-KappaB and c-Jun. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 221–232, doi:10.1016/J.BCP.2004.09.019.
220. Patwardhan, R.S.; Sharma, D.; Checker, R.; Thoh, M.; Sandur, S.K. Spatio-Temporal Changes in Glutathione and Thioredoxin Redox Couples during Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress Regulate Tumor Radio-Resistance. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2015.1056180> **2015**, *49*, 1218–1232, doi:10.3109/10715762.2015.1056180.
221. Pinzón, C.E.; Serrano, M.L.; Sanabria, M.C. Papel de La Vía Fosfatidilinositol 3

- Kinasa (PI3K/Akt) En Humanos. *Rev. Ciencias la Salud* **2009**, *7*, 47–66.
222. Rana, S.V.S.; Allen, T.; Singh, R. Inevitable Glutathione, Then and Now. *IJEB Vol.40(06) [June 2002]* **2002**, *40*, 706–716.
223. Olivares, A.; Alcaraz-Saura, M.; Achel, D.G.; Alcaraz, M. Effect of Rosmarinic Acid and Ionizing Radiation on Glutathione in Melanoma B16F10 Cells: A Translational Opportunity. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–14, doi:10.3390/ANTIOX9121291.
224. Kinnaert, E.; Duez, P.; Morandini, R.; Dubois, J.; Van Houtte, P.; Ghanem, G. Cysteine but Not Glutathione Modulates the Radiosensitivity of Human Melanoma Cells by Affecting Both Survival and DNA Damage. *Pigment Cell Res.* **2004**, *17*, 275–280, doi:10.1111/J.1600-0749.2004.00146.X.
225. Marí, M.; Morales, A.; Colell, A.; García-Ruiz, C.; Fernández-Checa, J.C. Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. <https://home.liebertpub.com/ars> **2009**, *11*, 2685–2700, doi:10.1089/ARS.2009.2695.
226. Nagane, M.; Kanai, E.; Shibata, Y.; Shimizu, T.; Yoshioka, C.; Maruo, T.; Yamashita, T. Sulfasalazine, an Inhibitor of the Cystine-Glutamate Antiporter, Reduces DNA Damage Repair and Enhances Radiosensitivity in Murine B16F10 Melanoma. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0195151.
227. Jimenez-Cervantes, C.; Solanos, F.; Kobayashiq, T.; Uraben, K.; Hearingn, V.J.; Lozanos, J.A.; Carlos, J.; Borrónsii, G.-; Gelb, L.M. A New Enzymatic Function in the Melanogenic Pathway. The 5,6-Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid Oxidase Activity of Tyrosinase-Related Protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17993–18000, doi:10.1016/S0021-9258(17)32408-0.
228. Del Mármol, V.; Ito, S.; Bouchard, B.; Libert, A.; Wakamatsu, K.; Ghanem, G.; Solanoi, F. Cysteine Deprivation Promotes Eumelanogenesis in Human Melanoma Cells. **1996**, doi:10.1111/1523-1747.ep12365591.
229. Palomares, T.; Alonso-Varona, A.; Alvarez, A.; Castro, B.; Calle, Y.; Bilbao, P. Interleukin-2 Increases Intracellular Glutathione Levels and Reverses the Growth Inhibiting Effects of Cyclophosphamide on B16 Melanoma Cells. *Clin. Exp. Metastasis* **1997**, *15*, 329–337, doi:10.1023/A:1018433701345/METRICS.
230. Tagde, A.; Singh, H.; Kang, M.H.; Reynolds, C.P. The Glutathione Synthesis Inhibitor Buthionine Sulfoximine Synergistically Enhanced Melphalan Activity against Preclinical Models of Multiple Myeloma. *Blood Cancer J. 2014 47* **2014**, *4*,

- e229–e229, doi:10.1038/bcj.2014.45.
231. Clark, E.P.; Epp, E.R.; Biaglow, J.E.; Morse-Gaudio, M.; Zachgo, E. Glutathione Depletion, Radiosensitization, and Misonidazole Potentiation in Hypoxic Chinese Hamster Ovary Cells by Buthionine Sulfoximine. *Radiat. Res.* **1984**, *98*, 370–380, doi:10.2307/3576244.
  232. Rodman, S.N.; Spence, J.M.; Ronnfeldt, T.J.; Zhu, Y.; Solst, S.R.; O'Neill, R.A.; Allen, B.G.; Guan, X.; Spitz, D.R.; Fath, M.A. Enhancement of Radiation Response in Breast Cancer Stem Cells by Inhibition of Thioredoxin- and Glutathione-Dependent Metabolism. <https://doi.org/10.1667/RR14463.1> **2016**, *186*, 385–395, doi:10.1667/RR14463.1.
  233. Mitchell, J.B.; Russo, A. The Role of Glutathione in Radiation and Drug Induced Cytotoxicity. *Br. J. Cancer. Suppl.* **1987**, *8*, 96.
  234. Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. Phenolics as Potential Antioxidant Therapeutic Agents: Mechanism and Actions. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *579*, 200–213, doi:10.1016/J.MRFMMM.2005.03.023.
  235. Olivares, A.; Alcaraz-Saura, M.; Achel, D.G.; Berná-Mestre, J. de D.; Alcaraz, M. Radiation-Induced Bystander Effect: Loss of Radioprotective Capacity of Rosmarinic Acid In Vivo and In Vitro. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–17, doi:10.3390/ANTIOX10020231.
  236. Moore, J.; Yousef, M.; Tsiani, E. Anticancer Effects of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. *Nutr.* **2016**, *Vol. 8*, Page 731 **2016**, *8*, 731, doi:10.3390/NU8110731.
  237. El-Huneidi, W.; Bajbouj, K.; Muhammad, J.S.; Vinod, A.; Shafarin, J.; Khoder, G.; Saleh, M.A.; Taneera, J.; Abu-Gharbieh, E. Carnosic Acid Induces Apoptosis and Inhibits Akt/MTOR Signaling in Human Gastric Cancer Cell Lines. *Pharm.* **2021**, *Vol. 14*, Page 230 **2021**, *14*, 230, doi:10.3390/PH14030230.
  238. Circu, M.L.; Aw, T.Y. Glutathione and Modulation of Cell Apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1767–1777, doi:10.1016/J.BBAMCR.2012.06.019.
  239. Franco, R.; Cidlowski, J.A. Apoptosis and Glutathione: Beyond an Antioxidant. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 1303–1314, doi:10.1038/cdd.2009.107.

240. Locatelli, C.; Leal, P.C.; Yunes, R.A.; Nunes, R.J.; Creczynski-Pasa, T.B. Gallic Acid Ester Derivatives Induce Apoptosis and Cell Adhesion Inhibition in Melanoma Cells: The Relationship between Free Radical Generation, Glutathione Depletion and Cell Death. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *181*, 175–184, doi:10.1016/J.CBI.2009.06.019.
241. Kudugunti, S.K.; Vad, N.M.; Ekogbo, E.; Moridani, M.Y. Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in Skin B16-F0 Melanoma Tumor Bearing C57BL/6 Mice. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 52–62, doi:10.1007/S10637-009-9334-5/METRICS.
242. Alcaraz, M.; Alcaraz-Saura, M.; Achel, D.G.; Olivares, A.; López-Morata, J.A.; Castillo, J. Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1913–1922.
243. Kudugunti, S.K.; Vad, N.M.; Ekogbo, E.; Moridani, M.Y. Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in Skin B16-F0 Melanoma Tumor Bearing C57BL/6 Mice. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 52–62, doi:10.1007/S10637-009-9334-5.
244. Untuch-Grau, R.; Schirmer, R.H.; Schirmer, I.; Krauth-Siegel, R.L. Glutathione Reductase from Human Erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *120*, 407–419, doi:10.1111/J.1432-1033.1981.TB05718.X.
245. Arscott, L.D.; Veine, D.M.; Williams, C.H. Mixed Disulfide with Glutathione as an Intermediate in the Reaction Catalyzed by Glutathione Reductase from Yeast and as a Major Form of the Enzyme in the Cell†. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4711–4721, doi:10.1021/BI9926431.
246. Deonarain, M.P.; Berry, A.; Scrutton, N.S.; Perham, R.N. Alternative Proton Donors/Acceptors in the Catalytic Mechanism of the Glutathione Reductase of Escherichia Coli: The Role of Histidine-439 and Tyrosine-99. *Biochemistry* **1989**, *28*, 9602–9607, doi:10.1021/BI00451A008/ASSET/BI00451A008.FP.PNG\_V03.
247. Bauer, H.; Fritz-Wolf, K.; Winzer, A.; Kühner, S.; Little, S.; Yardley, V.; Vezin, H.; Palfey, B.; Schirmer, R.H.; Davioud-Charvet, E. A Fluoro Analogue of the Menadione Derivative 6-[2'-(3'-Methyl) -1',4'-Naphthoquinoly]Hexanoic Acid Is a Suicide Substrate of Glutathione Reductase. Crystal Structure of the Alkylated Human Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10784–10794, doi:10.1021/JA061155V/SUPPL\_FILE/JA061155VSI20060707\_121750.PDF.
248. Wakao, S.; Andre, C.; Benning, C. Functional Analyses of Cytosolic Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases and Their Contribution to Seed Oil Accumulation in

- Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2008**, *146*, 277–288, doi:10.1104/PP.107.108423.
249. Bautista, J.M.; Mason, P.J.; Luzzatto, L. Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Lysine 205 Is Dispensable for Substrate Binding but Essential for Catalysis. *FEBS Lett.* **1995**, *366*, 61–64, doi:10.1016/0014-5793(95)00474-N.
250. Tandogan, B.; Kuruüzüm-Uz, A.; Sengezer, C.; Güvenalp, Z.; Demirezer, L.Ö.; Nuray Ulusu, N. In Vitro Effects of Rosmarinic Acid on Glutathione Reductase and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2010.533187> **2011**, *49*, 587–594, doi:10.3109/13880209.2010.533187.
251. Gülçin, İ.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T.; Koksall, Z.; Turkan, F.; Çetinkaya, S.; Bingöl, Z.; Huyut, Z.; Alwasel, S.H. Rosmarinic Acid Inhibits Some Metabolic Enzymes Including Glutathione S-Transferase, Lactoperoxidase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Carbonic Anhydrase Isoenzymes. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1135914> **2016**, *31*, 1698–1702, doi:10.3109/14756366.2015.1135914.
252. Aruoma, O.I.; Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J. Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of Active Rosemary Constituents: Carnosol and Carnosic Acid. <http://dx.doi.org/10.3109/00498259209046624> **2008**, *22*, 257–268, doi:10.3109/00498259209046624.
253. Martínez-Zaguilán, R.; Seftor, E.A.; Seftor, R.E.B.; Chu, Y.W.; Gillies, R.J.; Hendrix, M.J.C. Acidic PH Enhances the Invasive Behavior of Human Melanoma Cells. *Clin. Exp. Metastasis* **1996**, *14*, 176–186, doi:10.1007/BF00121214/METRICS.
254. Owen, M.L.W.J.A.O.R.B.R.A.H.S.S.N.U.R.D.B.D.B.L.C.S. Regulation of Intracellular PH in Human Melanoma: Potential Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 617–628.
255. Mikkelsen, R.B.; Wardman, P. Biological Chemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen and Radiation-Induced Signal Transduction Mechanisms. *Oncogene* **2003**, *22*, 5734–5754, doi:10.1038/sj.onc.1206663.
256. Shao, C.; Folkard, M.; Michael, B.D.; Prise, K.M. Bystander Signaling between Glioma Cells and Fibroblasts Targeted with Counted Particles. *Int. J. Cancer* **2005**, *116*, 45–51, doi:10.1002/IJC.21003.

257. Azzam, E.I.; De Toledo, S.M.; Little, J.B. Direct Evidence for the Participation of Gap Junction-Mediated Intercellular Communication in the Transmission of Damage Signals from  $\alpha$ -Particle Irradiated to Nonirradiated Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 473, doi:10.1073/PNAS.011417098.
258. Bishayee, A.; Hill, H.Z.; Stein, D.; Rao, D. V.; Howell, R.W. Free Radical-Initiated and Gap Junction-Mediated Bystander Effect Due to Nonuniform Distribution of Incorporated Radioactivity in a Three-Dimensional Tissue Culture Model. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0335:FRIAGJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0335:FRIAGJ]2.0.CO;2) **2001**, *155*, 335–344, doi:10.1667/0033-7587(2001)155.
259. Shao, C.; Furusawa, Y.; Aoki, M.; Ando, K. Role of Gap Junctional Intercellular Communication in Radiation-Induced Bystander Effects in Human Fibroblasts. <https://doi.org/10.1667/RR3044> **2003**, *160*, 318–323, doi:10.1667/RR3044.
260. Yang, L.; Pang, Y.; Moses, H.L. TGF- $\beta$  and Immune Cells: An Important Regulatory Axis in the Tumor Microenvironment and Progression. *Trends Immunol.* **2010**, *31*, 220–227, doi:10.1016/j.it.2010.04.002.
261. Kashino, G.; Prise, K.M.; Suzuki, K.; Matsuda, N.; Kodama, S.; Suzuki, M.; Nagata, K.; Kinashi, Y.; Masunaga, S.I.; Ono, K.; et al. Effective Suppression of Bystander Effects by DMSO Treatment of Irradiated CHO Cells. *J. Radiat. Res.* **2007**, *48*, 327–333, doi:10.1269/JRR.07008.
262. Harada, T.; Kashino, G.; Suzuki, K.; Matsuda, N.; Kodama, S.; Watanabe, M. Different Involvement of Radical Species in Irradiated and Bystander Cells. <http://dx.doi.org/10.1080/09553000802360844> **2009**, *84*, 809–814, doi:10.1080/09553000802360844.
263. Rzeszowska-Wolny, J.; Przybyszewski, W.M.; Widel, M. Ionizing Radiation-Induced Bystander Effects, Potential Targets for Modulation of Radiotherapy. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *625*, 156–164, doi:10.1016/j.ejphar.2009.07.028.
264. Castillo, J.; Benavente-García, O.; Lorente, J.; Alcaraz, M.; Redondo, A.; Ortuño, A.; Del Rio, J.A. Antioxidant Activity and Radioprotective Effects against Chromosomal Damage Induced in Vivo by X-Rays of Flavan-3-Ols (Procyanidins) from Grape Seeds (*Vitis Vinifera*): Comparative Study versus Other Phenolic and Organic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1738–1745, doi:10.1021/JF990665O.
265. C, V.S. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*; Springer Berlin

Heidelberg: Berlin, 2016;

266. Kumar, S. Second Malignant Neoplasms Following Radiotherapy. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 2012, Vol. 9, Pages 4744-4759 **2012**, 9, 4744–4759, doi:10.3390/IJERPH9124744.
267. Mancuso, M.; Pasquali, E.; Leonardi, S.; Tanori, M.; Rebessi, S.; Di Majo, V.; Pazzaglia, S.; Toni, M.P.; Pimpinella, M.; Covelli, V.; et al. Oncogenic Bystander Radiation Effects in Patched Heterozygous Mouse Cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 12445–12450, doi:10.1073/PNAS.0804186105.





## **IX. ANEXOS.**



## IX. ANEXOS.

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes dos publicaciones:

AUTORES/AS (p.o. de firma): Miguel Alcaraz, Amparo Olivares, Marina Andreu-Gálvez, Daniel Gyngiri Achel, Ana María Mercado and Miguel Alcaraz-Saura.

TÍTULO: **Paradoxical Radiosensitizing Effect of Carnosic Acid on B16F10 Metastatic Melanoma Cells: A New Treatment Strategy.**

REF. REVISTA/LIBRO: Antioxidants 2022, 11(11), 2166,  
<https://doi.org/10.3390/antiox11112166>.

**Antioxidants (Base)l (EISSN 2076-3921) (Journal Impact Factor de 7.675 en 2021. Categorías.**

**D1, Q1, Food science & Technology (11/143); D1, Q1, Chemistry, Medicine (6/62); Q1, Biochemistry & Molecular Biology (60/295) (anexo 1).**

---

AUTORES/AS (p.o. de firma): Marina Andreu-Gálvez, Amparo Olivares, Ana María Mercado y Miguel Alcaraz.

TÍTULO: **Efecto paradójico radiosensibilizante del ácido carnósico en células de melanoma metastásica B16F10: una nueva estrategia terapéutica.**

REF. REVISTA/LIBRO: I Congreso Nacional de Estudiantes de Radiología y Medicina Física (1 ed). vLA, Zaslavsky, Madrid, p 255-79. ISBN. 978-84-19845-12-2 y 978-84-19845-13-9 (anexo 2).

---

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas obtenidas del Programa Nacional de Investigación y Desarrollo CENIT del Ministerio de Ciencia y Tecnología; a una ayuda del CDTI sobre "Investigación Industrial y Experimental de alimentos inteligentes" (acrónimo SMARTFOODS y a una subvención I+D + I del Consejo de Seguridad Nuclear de España , según convocatoria aprobada por resolución de 17 de mayo de 2022 ya que las técnicas utilizadas se incluyen la "Elaboración de un protocolo nacional en dosimetría biológica" junto con la Fundación para la Investigación del Hospital de la Fé de la Comunidad Valenciana (anexo 3).



Article

# Paradoxical Radiosensitizing Effect of Carnosic Acid on B16F10 Metastatic Melanoma Cells: A New Treatment Strategy

Miguel Alcaraz <sup>1,\*</sup>, Amparo Olivares <sup>1</sup>, Marina Andreu-Gálvez <sup>1</sup>, Daniel Gyngiri Achel <sup>2</sup>, Ana María Mercado <sup>1</sup> and Miguel Alcaraz-Saura <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Radiology and Physical Medicine Department, School of Medicine, Campus de Excelencia Internacional de Ámbito Regional (CEIR)-Campus Mare Nostrum (CMN), University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

<sup>2</sup> Applied Radiation Biology Centre, Radiological and Medical Sciences Research Institute, Ghana Atomic Energy Commission, Legon, Accra GE-257-0465, Ghana

\* Correspondence: mab@um.es; Tel.: +34-868883601

**Abstract:** Carnosic acid (CA) is a phenolic diterpene characterized by its high antioxidant activity; it is used in industrial, cosmetic, and nutritional applications. We evaluated the radioprotective capacity of CA on cells directly exposed to X-rays and non-irradiated cells that received signals from X-ray treated cells (radiation induced bystander effect, RIBE). The genoprotective capacity was studied by in vivo and in vitro micronucleus assays. Radioprotective capacity was evaluated by clonogenic cell survival, MTT, apoptosis and intracellular glutathione assays comparing radiosensitive cells (human prostate epithelium, PNT2) with radioresistant cells (murine metastatic melanoma, B16F10). CA was found to exhibit a genoprotective capacity in cells exposed to radiation ( $p < 0.001$ ) and in RIBE ( $p < 0.01$ ). In PNT2 cells, considered as normal cells in our study, CA achieved 97% cell survival after exposure to 20 Gy of X-rays, eliminating 67% of radiation-induced cell death ( $p < 0.001$ ), decreasing apoptosis ( $p < 0.001$ ), and increasing the GSH/GSSH ratio ( $p < 0.01$ ). However, the administration of CA to B16F10 cells decreased cell survival by 32%, increased cell death by 200% ( $p < 0.001$ ) compared to irradiated cells, and increased cell death by 100% ( $p < 0.001$ ) in RIBE bystander cells ( $p < 0.01$ ). Furthermore, it increased apoptosis ( $p < 0.001$ ) and decreased the GSH/GSSG ratio ( $p < 0.01$ ), expressing a paradoxical radiosensitizing effect in these cells. Knowing the potential mechanisms of action of substances such as CA could help to create new applications that would protect healthy cells and exclusively damage neoplastic cells, thus presenting a new desirable strategy for cancer patients in need of radiotherapy.

**Keywords:** radiation effects; bystander; radioprotectors; radiosensitizers; micronucleus; B16F10; PNT2



**Citation:** Alcaraz, M.; Olivares, A.; Andreu-Gálvez, M.; Achel, D.G.; Mercado, A.M.; Alcaraz-Saura, M. Paradoxical Radiosensitizing Effect of Carnosic Acid on B16F10 Metastatic Melanoma Cells: A New Treatment Strategy. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2166. <https://doi.org/10.3390/antiox11112166>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 23 September 2022

Accepted: 28 October 2022

Published: 31 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Carnosic acid (CA) ( $C_{20}H_{28}O_4$ ), present in plant species of the Lamiaceae family (*Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*) is a phenolic diterpene. It is classified among the so-called terpenoids, otherwise known as isoprenoids or terpenes. Due to the presence of a phenolic group, CA is often classified among the polyphenols. However, their cellular distribution, biosynthetic pathway, solubility properties, and functions differ substantially from most classes of polyphenols, and closely resemble terpenoids such as tocopherols and carotenoids. It is a fat-soluble compound characterized by high antioxidant capacity, and is used in many industrial applications, such as food, cosmetics, health, and nutrition. Despite its economic potential, surprisingly few studies have been conducted on its absorption, transport, metabolism, and tissue distribution characteristics, which remain poorly understood [1–4].

CA has been shown to possess important radioprotective capacities against cellular damage induced by ionizing radiation. CA has been found to decrease the genotoxic and cytotoxic effects induced by ionizing radiation [5–10] and even ultraviolet radiation [11]

## Anexo 2.

### **EFFECTO PARADÓJICO RADIOSENSIBILIZANTE DEL ÁCIDO CARNÓSIKO EN CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁSICO B16F10: UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA.**

Marina Andreu Gálvez<sup>1,2</sup>, Amparo Olivares<sup>2</sup>, Ana María Mercado<sup>2</sup>, Miguel Alcaraz Baños<sup>2</sup>,

1. Servicio Otorrinolaringología, Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena, España
2. Departamento de Radiobiología y Medicina Física, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia.

#### **RESUMEN**

El ácido carnósico (AC) es un diterpeno fenólico caracterizado por su elevada actividad antioxidante. Se evaluó la capacidad radioprotectora del AC en células diana de rayos X y en células espectadoras que recibieron señales de células tratadas con rayos X (radiation induced bystander effect, RIBE). La capacidad radioprotectora se evaluó mediante ensayos de supervivencia celular clonogénica, MTT, apoptosis y glutatión intracelular comparando células radiosensibles (epitelio prostático humano normal, PNT2) con células radioresistentes (melanoma metastásico murino, B16F10). En las células PNT2, consideradas como células normales en nuestro estudio, el AC consiguió un 97% de supervivencia celular tras la exposición a 20 Gy de rayos X, eliminando el 67% de la muerte celular inducida por la radiación ( $p < 0,001$ ), disminuyendo la apoptosis ( $p < 0,001$ ) y aumentando la relación GSH/GSSH ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, la administración de AC a las células B16F10 disminuyó la supervivencia en un 32%, aumentó la muerte celular en un 200% ( $p < 0,001$ ) en comparación con las células irradiadas, y aumentó la muerte celular en un 100% ( $p < 0,001$ ) en las células bystander ( $p < 0,01$ ). Además, aumentó la apoptosis ( $p < 0,001$ ) y disminuyó la relación GSH/GSSG ( $p < 0,01$ ), expresando un efecto paradójico radiosensibilizador en estas células. El conocimiento de los mecanismos de acción de sustancias como el AC podría ayudar a crear nuevas estrategias terapéuticas más eficientes.

#### **INTRODUCCIÓN**

El ácido carnósico (AC) es un diterpeno fenólico presente en las especies *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*. Sin embargo, su distribución celular, vía biosintética, propiedades de solubilidad y funciones difieren sustancialmente de la mayoría de las clases de polifenoles, y se asemejan mucho a otros terpenoides. Es un compuesto liposoluble caracterizado con una elevada capacidad antioxidante, y que presenta múltiples aplicaciones (alimentación, cosmética, salud y nutrición). A pesar de su potencial

## Anexo 3. Relación de aprobaciones de los diferentes Comités éticos de Investigación:



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de Investigación

### INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Lucía Periago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de Investigación y del Plan Propio y Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.

#### CERTIFICA:

Que D. Miguel Alcaraz Baños presentó la memoria de trabajo el Proyecto de Investigación titulado *"Efecto antimutagénico y genoprotector de diferentes sustancias frente a la radiación ionizante: análisis comparativo mediante ensayo de micronúcleos in vitro"*, al Comité de Bioseguridad en Experimentación.

Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día siete de abril de dos mil veintidós<sup>1</sup>, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión.

Vº Bº  
LA PRESIDENTA DEL COMITÉ  
DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN  
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: 472/2021

<sup>1</sup> A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación



Código seguro de verificación: RUXFMnkC-8pEuM+oO-pUY+74eK-/1yy8382

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>



Miguel Alcaraz Baños  
Área de Radiología y Medicina Física  
Facultad de Medicina/Odontología  
Universidad de Murcia

El Director General de Ganadería, Pesca y Acuicultura, con fecha 14 de diciembre de 2021, ha dictado la siguiente **Resolución**:

“Vista la solicitud para la autorización de la realización de un proyecto de investigación con animales presentada con fecha 17/10/2019 y nº registro de entrada 201990000289883, por D. Miguel Alcaraz Baños, como responsable del mismo.

Vista la subsanación de documentación recibida el 25/11/2021 por correo electrónico.

Vista la propuesta del proyecto denominado: “Disminución del daño producido por radiación ionizante mediante efecto bystander con distintas sustancias antioxidantes”.

Visto el informe favorable del comité ético del establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

Visto el resumen no técnico del proyecto.

Visto el resultado favorable de la evaluación del proyecto por el órgano habilitado “Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia”.

Visto que en dicha evaluación se clasifica como Tipo II, y no se indica que se requiera llevar a cabo la evaluación retrospectiva del proyecto.

Visto que solicita autorización expresa por las siguientes situaciones:

- Ejecución de algún procedimiento fuera de un establecimiento usuario, concretamente, en las dependencias del Servicio de Radioprotección del SAI de la Universidad de Murcia.

14/12/2021 13:56:59  
MAYABARRETE JIMENEZ, ENRIQUE JESUS  
Este es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según artículo 27.2.c) de la Ley 39/2015. Los firmantes y los datos de firma se muestran en los recuadros.  
Su autenticidad puede ser contrastada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.com.es/verificar-documentos> e introduciendo el código de verificación (CV) CANM-93038907-5cd4-9d79-9768-00505994280







- Personal que no dispone de la capacitación necesaria, en particular, D<sup>a</sup> Amparo Olivares Rueda.

Visto el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Considerando la competencia que tiene atribuida la Dirección General de Ganadería, Pesca y Acuicultura, sobre la base de lo dispuesto en el Decreto 118/2020, de 22 de octubre, del Consejo de Gobierno, por el que se establecen los Órganos Directivos de la Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente.

Teniendo en cuenta lo expuesto, y el Informe emitido por el Servicio de Producción Animal, el Director General de Ganadería, Pesca y Acuicultura **RESUELVE**:

Que se le conceda autorización a D. Miguel Alcaraz Baños para la realización del proyecto solicitado, como responsable del mismo, asignándole el código de identificación **Nº A13211208**, con las siguientes consideraciones:

- El proyecto se llevará a cabo según memoria y evaluación presentada en establecimiento usuario con código REGA ES300305440012 y en las dependencias del Servicio de Radioprotección del SAI de la Universidad de Murcia, y con una utilización de, aproximadamente, 60 ratones.
- D<sup>a</sup> Amparo Olivares Rueda, mientras no obtenga el reconocimiento de la capacitación, sólo podrá participar durante los primeros seis meses bajo supervisión en los procedimientos con severidad leve o sin recuperación.
- Toda la documentación pertinente del proyecto, incluida la información referida a los protocolos de supervisión y su cumplimentación, tratamientos administrados a los animales durante los procedimientos, informes veterinarios previos a la reutilización de animales, bajas imprevistas y fechas y métodos de eutanasia, deberá estar a disposición del personal del "Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia" y de la autoridad competente, desde el inicio del proyecto hasta al menos cinco años después de finalizar el mismo. Así mismo, deberá informar expresamente al Comité de su establecimiento usuario, con carácter anual y preferiblemente durante el mes de enero,

MARIBETE JIMENEZ, ENRIQUE JESUS  
14/12/2021 13:56:53  
Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico administrativo archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según artículo 27.3.c) de la Ley 39/2015. Los firmantes y los hechos de firma se muestran en los recuadros.  
Su autenticidad puede ser contrastada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.com.es/verificardocumentos> e introduciendo el código seguro de verificación (CSV) CCM-32ca98972-5d8-79-79-afbb-8d59596528b





respecto al número de animales sobre los que se haya finalizado su utilización en el año anterior en el contexto de su proyecto, con indicación de la severidad real sufrida por los mismos.

- Esta autorización tendrá una validez de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en los procedimientos, o una modificación del establecimiento usuario, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización."

En cumplimiento del artículo 40 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, se le notifica la presente Resolución, indicándole que la misma no pone fin a la vía administrativa, pudiendo interponer recurso de Alzada ante el Sr. Consejero de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente, en el plazo de un mes, contado desde la recepción de la presente notificación, de acuerdo con lo establecido en los artículos 121 y 122 de la citada Ley, y sin perjuicio de poder ejercitar, en su caso, cualquier otro que estime procedente. Transcurrido dicho plazo sin que el recurso se haya interpuesto, la Resolución se hará firme a todos los efectos.

El Jefe de Servicio de Producción Animal  
(Documento firmado electrónicamente al margen)  
Enrique J. Navarrete Jiménez

14/12/2021 13:54:53  
NAVARETE JIMENEZ, ENRIQUE JESUS  
Este es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico administrativo archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según artículo 27.3.d) de la Ley 39/2015. Los firmantes y los hechos de firma se muestran en los recuadros.  
Su autenticidad puede ser contrastada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.carm.es/verificaldocumentos> e introduciendo el código seguro de verificación (CSV) CABM-923d8902-5ad4-9479-4786-005054984280



