



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**Efecto Radioprotector del Licopeno, Curcumina,
Hidroxitirosol y Melatonina sobre
Glándula Parótida de Ratas**

D. Ekaitz Antoni Valle Rodríguez

2016

Agradecimientos

A toda la gente que me ha apoyado para llegar donde estoy.

Gracias a todos los que creyeron en mí desde pequeño

y me han empujado hasta lo que hoy soy.

Gracias a los que siguieron a mi lado en todo momento,

en especial a mis padres y a mi hermano.

Gracias a mi mujer por hacerme mejor cada día,

sin su ayuda esta Tesis no habría sido posible.

Dedicatoria especial para nuestro hijo recién nacido.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno, Curcumina, Hidroxitirosol y Melatonina sobre Glándula Parótida de Ratas

ÍNDICE



1-. INTRODUCCIÓN	5
1.1-. BASES ANATÓMICAS.....	7
1.1.1-. Embriología de las glándulas salivares	7
1.1.2-. Estructura de las glándulas salivares	8
1.1.3-. Descripción de los diferentes grupos glandulares	11
1.2-. BASES FISIOLÓGICAS	12
1.2.1-. Aspectos Cualitativos de la Secreción Salival	12
1.2.2-. Aspectos Cuantitativos de la Secreción Salival.....	15
1.2.3-. Fisiología de la Secreción Salival	16
1.3-. NEOPLASIAS SOBRE LA GLÁNDULA PARÓTIDA	18
1.4-. RADIOTERAPIA.....	25
1.4.1-. Efectos de la Radiación	25
1.4.2-. Efectos de la Radiación sobre la Glándula Parótida	28
1.4.3-. Radioprotección en Medicina	31
1.5-. ANTIOXIDANTES.....	37
1.5.1-. Licopeno	37
1.5.2-. Curumina	42
1.5.3-. Hidroxitirosol	48
1.5.4-. Melatonina	52
2-. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	59
3-. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
3.1-. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	67



3.2-. AGENTES UTILIZADOS	68
3.3-. IRRADIADOR.....	70
3.4-. MICROSCÓPIO ÓPTICO.....	71
3.5-. PROCESADOR.....	72
3.6-. MICROTOMO.....	73
3.7-. DISEÑO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL	73
3.8-. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	73
3.8.1-. Irradiación	73
3.8.2-. Sacrificio y Toma de Muestras	74
3.9-. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	75
3.10-. ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO.....	83
3.11-. MÉTODO ESTADÍSTICO.....	93
4-. RESULTADOS.....	95
4.1-. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS DE LAS GLÁNDULAS PARÓTIDAS	95
4.2-. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES HISTOMORFOMÉTRICAS DE LAS GLÁNDULAS PARÓTIDAS	99
5-. DISCUSIÓN.....	103
6-. CONCLUSIONES	123
7-. BIBLIOGRAFÍA.....	127
8-. ANEXO: Trabajos en Relación con la Tesis.....	149



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno, Curcumina, Hidroxitirosol y Melatonina sobre Glándula Parótida de Ratas

INTRODUCCIÓN



1- INTRODUCCIÓN.

1.1 BASES ANATÓMICAS.

1.1.1-. Embriología de las glándulas salivales.

Las glándulas salivales derivan embrionariamente del ectodermo. El ectodermo es la primera capa germinal y emerge del epiblasto. Lo hace durante la fase de gastrulación, en la 3ª semana del embrión, que sigue a la fase de blástula. Las glándulas parótidas son las primeras glándulas salivales que se forman, y su desarrollo comienza durante el inicio de la 6ª semana intrauterina. Al final de la 6ª semana, se comienzan a formar las glándulas submaxilares y entre la 7ª-8ª semana lo hacen las glándulas sublinguales. Las glándulas salivares menores aparecen más tardíamente, a lo largo del 3r mes de gestación. (Moore-Persaud 1997).

Las yemas epiteliales que formarán la glándula parótida proliferan del recubrimiento ectodérmico existente entre la fusión del proceso maxilar y mandibular. A medida que estos van definiendo la cavidad oral, la glándula se aísla persistiendo una pequeña comunicación que será el futuro conducto de Stenon cuya salida se produce a través de la mucosa yugal a nivel del segundo molar superior (en adultos). Estas yemas tienen la peculiaridad que crecen, se ramifican y se extienden siguiendo el trayecto del nervio facial, para posteriormente canalizarse y transformarse en conductos hacia la 10ª semana intrauterina, que es cuando quedan formadas definitivamente, aunque las secreciones salivales no se inician hasta la 18ª semana intrauterina. Aunque el germen parotídeo es el primero en aparecer, es el que más tardíamente se encapsula produciéndose en este periodo el desarrollo del sistema linfático por atrapamiento de linfocitos que colonizan previamente la parótida,



formando ganglios peri e intraparotídeos e incluso en el espesor de la cápsula (Martin-Granizo y cols. 2011).

Los primordios de las glándulas submaxilares crecen desde el suelo de la boca a ambos lados de la línea media, en la hendidura paralingual medial desembocando en la cavidad oral mediante el conducto de Warthon, justo al lado de la línea media.

El primordio de la glándula sublingual crece en la hendidura paralingual medial en forma de varias yemas epiteliales adyacentes a las glándulas submaxilares cuyo drenaje se realiza a través de múltiples conductos directamente a boca (conductos de Walther) o junto al conducto de Warthon mediante el conducto de Rinivus.

1.1.2-. Estructura de las Glándulas Salivales.

Las glándulas salivales se dividen según su tamaño en mayores y menores y según la naturaleza de su secreción en: serosas, mucosas o mixtas. Las glándulas salivales mayores son pares y pertenecen a este grupo la glándula parótida, la glándula submaxilar o submandibular y la glándula sublingual (Martin-Granizo y cols. 2011).

La glándula parótida es la glándula salival más voluminosa. Tiene un peso en el ser humano de aproximadamente 25 gramos. Se localiza en la fosa parotídea que se sitúa por delante del pabellón auricular. Está limitada por arriba con el arco cigomático y por abajo con la mastoides, gónion, borde anterior del músculo esternocleidomastoideo (ECM) y vientre posterior del músculo digástrico. Por dentro, se encuentra el músculo masetero y está recubierta por la fascia parotídea que integra el sistema musculo aponeurótico superficial -smas-. El nervio facial o VII par craneal es un nervio eminentemente motor que se encarga de los

movimientos musculares de la cara. Se hace extracraneal a través del agujero estilomastoideo, atraviesa la glándula parótida dividiéndola en lóbulo profundo y lóbulo superficial. Dentro de ella, el tronco principal del nervio se bifurca en tronco temporofacial y tronco cervicofacial que a su vez dan ramas terminales: frontotemporales, cigomáticas, bucales, mandibulares y ramas cervicales (Rouviere y Delmas 2007).

La vascularización arterial de la glándula parótida depende de ramas de la arteria carótida externa, justamente de la arteria maxilar interna y de la arteria temporal superficial. La vascularización venosa de la glándula nace de la vena maxilar interna, que drena a la vena retromandibular y de la vena temporal superficial que a su vez junto con la vena retromandibular drena en la vena yugular externa. El drenaje linfático se efectúa por ganglios linfáticos intra y yuxtáglandulares que drenan a ganglios yugulares profundos (Rouviere y Delmas 2007).

Está inervada eferentemente por nervios simpáticos y parasimpáticos. El sistema simpático por el plexo carotideo externo y el sistema parasimpático por el ramo timpánico del nervio glossofaríngeo (IX par craneal) haciendo estación en el ganglio ótico y llegando a la glándula por el nervio auriculotemporal (Rouviere y Delmas 2007).

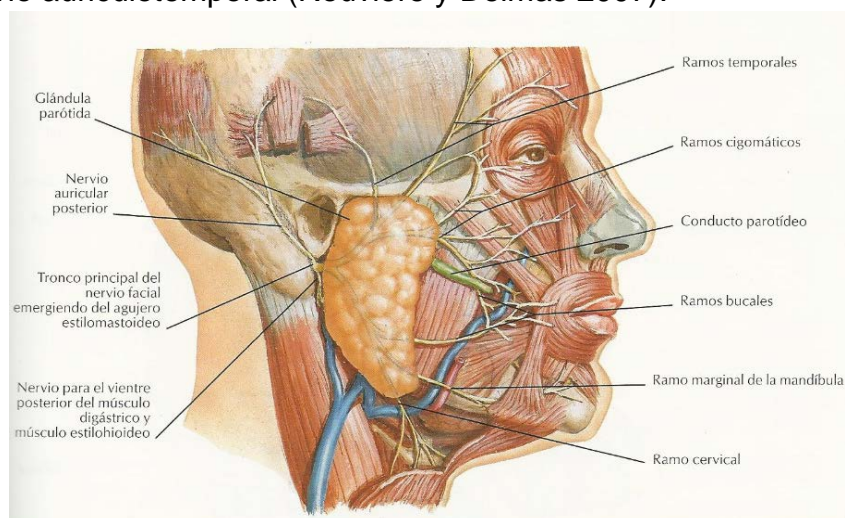


Fig. 1.1. Imagen Disección Anatómica de la Glándula Parótida (Netter 2003)



La glándula parótida, al igual que el resto de glándulas salivales, consta de una serie de conductos que finalizan en estaciones terminales o acinos. El conducto secretor principal de la parótida se conoce como conducto de Stenon y a través de él la saliva es secretada a la cavidad oral. Este conducto se ramifica en conductos progresivamente más pequeños llamados conductos estriados, que a su vez se ramifican en conductos intercalares más pequeños que se abren a un fondo de saco ciego llamado estación terminal o acino. Los acinos muestran gran diversidad en cuanto a forma, tamaño y número de células. La forma de estos acinos terminales puede ser circular, tubular o multilobular. Constan de unas células encima de una lámina basal que rodean un espacio central, que es la luz del acino. Entre las células hay canalículos que se abren a la luz del conducto, constituyendo el comienzo del sistema de conductos. Las formas del acino en las glándulas serosas es circular, mientras que en la mucosa suele ser tubular. En el acino pueden hallarse diferentes tipos celulares: células mucosas, células serosas y células mioepiteliales. El número y distribución de cada una varía de una glándula a otra (Bermejo-Fenoll 2000).

La glándula parótida es un tipo de glándula acinar. Su conducto secretor principal está recubierto de epitelio columnar pseudoestratificado. Los conductos estriados están formados por una sola capa de células cuboides a columnares con estriaciones basales. Los conductos intercalados también tienen una sola capa de células, pero en este caso, de planas a cuboidales, formando conductos intercalados largos y estrechos. El acini o unidad secretora terminal es de tipo seroso. El estroma o tejido intersticial es de tipo lobulado, formado por un tabique de tejido conectivo con abundante tejido graso (Bermejo-Fenoll 2000).



1.1.3-. Descripción de los diferentes grupos glandulares.

Existen dos grupos de glándulas salivales. Las glándulas salivales mayores al que pertenecen la glándula parótida, la glándula submaxilar o submandibular y la glándula sublingual. El otro grupo lo forman las glándulas salivales menores.

Hemos hablado anteriormente de la glándula parótida, vamos ahora a hacer una breve mención del resto. La glándula submaxilar o submandibular está situada por debajo de la basal mandibular y por encima del músculo digástrico, en la celda submaxilar. Las secreciones salivales de esta glándula llegan a la boca a través del conducto de Warthon, que drena lateral al frenillo lingual, recubierto por epitelio columnar pseudoestratificado, al igual que el conducto de Stenon. Esta glándula es de menor tamaño que la glándula parótida. Sus conductos estriados tienen la misma estructura que la glándula parótida (una sola capa de células de cuboidales a columnares, con estriaciones basales) pero con conductos más largos y abundantes. Los conductos intercalados también tienen la misma estructura que la glándula parótida (una sola capa de células de planas a cuboidales) pero de menor cantidad y menor longitud. En la unidad secretora o acino terminal predominan los acinos serosos, aunque también existen túbulos mucosos, por lo que la secreción es de tipo mixto con predominio seroso. El estroma o tejido intersticial es lobulado, con tabique de tejido conectivo pero sin presencia de tejido adiposo como sí ocurre con el estroma o tejido intersticial de la glándula parótida (Bermejo-Fenoll 2000).

La glándula sublingual se localiza a nivel del suelo de la boca. Está formada por un conjunto de pequeñas glándulas, con sus propios conductos de drenaje (10-30). El más voluminoso es el conducto de Bartholin o Rinivus, que drena directamente al conducto de Warthon o por fuera de él. El resto se abren a la cavidad oral en un pliegue o carúncula



sublingual. Están recubiertos de epitelio columnar pseudoestratificado. El acino terminal es mayoritariamente tubular mucoso con algunos acinos serosos, por lo que la secreción es de tipo mixto con predominio mucoso. Es la de menor tamaño de las glándulas salivales mayores.

Las glándulas salivales menores se localizan en la submucosa oral y drenan la saliva individualmente mediante un conducto muy corto. Están distribuidas por toda la boca, excepto en la encía y parte anterior del paladar duro. Se estima que hay entre 1000-1500 glándulas salivales menores (Bermejo-Fenoll 2000).

1.2 BASES FISIOLÓGICAS.

1.2.1-. Aspectos cualitativos de la secreción salival.

La saliva tiene un papel importante en la salud oral. Las alteraciones en la secreción se dividen en dos grupos: a) aumento del flujo salival y b) descenso del flujo salival. Es más frecuente este último grupo y según la Federación Dental Internacional (FDI), la hiposecreción salival o sialopenia puede llegar a afectar hasta en un 50% a la población mayor de 50 años y hasta en un 70% a la población mayor de 70 años (Llena-Puy 2006).

La saliva se presenta como una solución acuosa formada mayoritariamente por agua (99%) junto con sustancias tanto orgánicas como inorgánicas. La composición salival entre individuos es bastante constante. Existen variaciones de volumen en función de la naturaleza, intensidad, duración del estímulo que provoca la secreción y momento del día en el que se produce (Kaufman y cols. 2002).

La composición química de la saliva depende de la glándula que la segrega. En general, la glándula parótida produce mayor cantidad de



sustancias que la glándula submaxilar, a excepción del calcio. La glándula parótida segrega una saliva serosa, la glándula submaxilar segrega una saliva mucosa y la glándula sublingual una saliva más viscosa.

En cuanto a los componentes orgánicos, las proteínas son las más abundantes. Su concentración es aproximadamente 300mg por 100 ml. Se han visto mediante electroforesis más de 40 proteínas distintas. La glándula salival que más proteínas segrega es la glándula parótida. Las proteínas más frecuentes son las ricas en prolina (mucinas, proteínas ácidas ricas en prolina y glucoproteínas básicas ricas en prolina) que constituyen entre el 60-70% del total. Existen también proteínas enzimáticas (amilasa, lisozima y lactoperoxidasa), proteínas aromáticas (gustina, estaterina y lactoferrina) e inmunoglobulinas (Ig). Vamos a describir brevemente alguna de ellas (López-Jornet 2000).

1-. Glucoproteínas (mucinas). Facilitan la función mecánica de la saliva respecto al deslizamiento de los alimentos y función de limpieza.

2-. Amilasa. Es la enzima bucal más destacada e importante y su acción principal es la de metabolizar el almidón de los residuos alimenticios que permanecen en la boca después de las comidas, más que contribuir al proceso de digestión. Los carbohidratos favorecen su secreción y es la glándula parótida la que en mayor porcentaje la segrega en comparación con la demás glándulas salivales .

3-. Peroxidasa salival (lactoperoxidasa). Produce lisis de bacterias en el medio bucal por lo que influye en la flora oral. Su eficacia depende del ph. La glándula submaxilar y sublingual la segrega en mayor concentración que la glándula parótida.

4-. Lipasas (actividad lipolítica) Hidrolizan los triglicéridos de cadena larga para liberar ácidos grasos.



5-. Lactoferrina. Es una proteína básica que se une al hierro. Tiene propiedades bacteriostáticas para microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Además tiene una función de inmunidad nutricional al evitar que el hierro en forma férrica sea utilizado por las bacterias.

6-. Inmunoglobulinas salivales . Los anticuerpos secretores de la saliva interfieren en la adhesión de los microorganismos a la membrana mucosa. Forman la primera barrera de defensa. La inmunoglobulina (Ig) A es la más frecuente en la saliva, siendo su concentración hasta diez veces superior con respecto a la IgG y la IgM. La IgA salival se diferencia de la sérica porque contiene un glucopéptido adicional llamado componente secretorio.

Los lípidos son otro gran grupo de sustancias orgánicas que se encuentran en la saliva. Podemos encontrar ácidos grasos libres, colesterol, lecitina y fosfolípidos.

Los hidratos de carbono o carbohidratos de la saliva están formados por hexosaminas, como la galactosa, manosa, fucosa, glucosa y ácido siálico.

En cuanto a los componentes inorgánicos de la saliva, encontramos fundamentalmente: calcio, sodio, potasio, magnesio, cloruro, sulfato y tiocianato. También fluoruro, yoduro, bromuro, hierro, estaño, nitrito aunque en menores cantidades. Entre las numerosas funciones de estos compuestos, destaca el sistema tampón por bicarbonatos y fosfatos fundamentalmente. Además de esta función tampón, los electrolitos inorgánicos remineralizan las estructuras duras, tienen actividad enzimática y participan en los mecanismos de defensa del huésped (López-Jornet 2000).



Cuando se estimula la secreción de saliva, el sodio y el bicarbonato aumentan, mientras que el fosfato disminuye, permaneciendo constantes tanto el calcio como el potasio.

Los fármacos, la edad y el estado de salud influyen en la concentración de los diferentes componentes inorgánicos.

1.2.2-. Aspectos cuantitativos de la secreción salival y factores influyentes

La cantidad de saliva segregada en 24 horas oscila entre 0,6-1,5 litros. Esta gran variedad de volumen se debe a múltiples factores como: edad, sexo, dieta, tabaco, cambios estacionales, enfermedades orgánicas, drogas, mecanismo estimulador, ritmo circadiano, etc.

La glándula parótida tiene una tasa de secreción en reposo de 0,04 ml/min, y la submaxilar y sublingual de 0,12 ml/min. Tras estimularlas, las tres segregan un rango de volumen salival que oscila entre 0,5-0,8 ml/min. Esto permite decir que la glándula que mayor poder de secreción tiene tras ser estimulada es la glándula parótida que segrega hasta 10 veces su volumen basal, siendo 5 veces el volumen segregado por la glándula submaxilar y sublingual (Proctor 2016).

Con la edad existen cambios morfológicos ya que el parénquima funcional de la glándula se va sustituyendo por depósitos grasos y tejido conectivo.

En general, la cantidad de saliva segregada por los hombres es mayor que la segregada por las mujeres, pero a medida que avanza la edad ésta se iguala.

En cuanto a la raza, se ha descrito que hay una mayor tasa de secreción de saliva en pacientes de raza negra.



En cuanto a los ritmos circadianos, hay que decir que durante el día se segrega mayor cantidad de saliva que a su vez aumenta con la masticación. Durante las horas de sueño se recogen las menores tasas de secreción salival (Proctor 2016).

La ansiedad y el stress también tienen influencia en la secreción salival produciendo una disminución de la misma.

1.2.3-. Fisiología de la Secreción Salival.

La regulación de la secreción salival depende del sistema nervioso autónomo, a través de la estimulación simpática (efecto adrenérgico) y parasimpática (efecto colinérgico). Ante los estímulos gustativos, el sistema parasimpático produce un aumento rápido de volumen salival, siendo la intensidad del flujo mayor en el primer momento, estabilizándose posteriormente. La estimulación simpática también produce un aumento de secreción, aunque de menor intensidad. Ambos sistemas, el simpático y el parasimpático aumentan la concentración de componentes orgánicos e inorgánicos salivales y ambos son responsables de la salivación fisiológica (Pfaffe y cols. 2011).

La secreción continua de saliva en reposo está relacionada con la secreción constante de pequeñas cantidades de acetilcolina en el interior glandular (Kaufman y cols. 2002).

La saliva estimulada se origina por dos tipos de reflejo: el reflejo salival incondicionado y el condicionado. El primero se produce por el estímulo gustativo masticatorio, por dolor o por irritación oral, faríngea o gástrica. El estímulo sensitivo alcanza los centros salivatorios a través de las vías aferentes de la cuerda del tímpano (rama del nervio facial o VII par craneal), ramas faríngeas de los nervios glossofaríngeo (IX par



craneal) y vago (X par craneal) y fibras sensitivas de la segunda y tercera ramas del trigémino (V par craneal). El reflejo salival condicionado se desencadena por los órganos de los sentidos (vista y olfato fundamentalmente) (Pfafe y cols. 2011).

Tanto en el reflejo incondicionado como en el condicionado, las vías eferentes, que partiendo de los centros salivatorios parasimpáticos alcanzan las glándulas salivales, vienen constituidas por las fibras secretoras de la cuerda del tímpano procedentes del núcleo salivatorio superior y con destino a las glándulas submaxilar y sublingual, y por la rama timpánica del nervio glosofaríngeo, con fibras procedentes del núcleo salivatorio inferior y con destino a la glándula parótida.

La inervación simpática de las glándulas salivales deriva del asta lateral de la médula espinal entre el primero y segundo segmento torácico. Los axones del asta lateral salen de la médula por las raíces ventrales y penetran en el tronco simpático paravertebral, continuando en sentido cefálico hasta el ganglio cervical superior, dónde establecen sinapsis con células ganglionares. De estas neuronas salen los axones que siguen hasta las glándulas salivales (Martin-Granizo y cols. 2011).

La cantidad de saliva segregada se mide en tasa de flujo salival que corresponde a ml/min. Puede estar aumentada (hipersecreción, sialorrea o ptialosis) o disminuida (hiposialia o sialopenia). La variación de la tasa salival tiene repercusión tanto en los componentes orgánicos como en los inorgánicos. Es más frecuente la hiposialia o sialopenia.

La causa más frecuente de hiposialia es la ingesta de determinados fármacos con efecto sobre el sistema nervioso o reguladores de los líquidos corporales. Por ejemplo fármacos antiparkinsonianos, antihistamínicos, antiespasmódicos, hipotensores,



relajantes musculares, anticolinérgicos, anticonvulsionantes, antidepresivos, diuréticos, hipnóticos, narcóticos y simpaticomiméticos.

Otra causa de hiposialia puede ser la existencia de una enfermedad de base como el síndrome de Sjögren, de causa autoinmune, que afecta a la secreción de saliva por destrucción de las glándulas salivales por autoanticuerpos (Spilmann y cols. 2011).

Para el tratamiento de la hiposialia se suelen utilizar estimulantes mecánicos, gustativos o fármacos parasimpaticomiméticos entre los que destaca la pilocarpina, el betanecol, el carbacol, la neostigmina y la distimina. Estos fármacos son eficaces en aquellos pacientes que todavía tienen parénquima salival funcional, sin embargo deben tenerse en cuenta los efectos secundarios a nivel cardiocirculatorio. El ceveline ha demostrado tener menos efectos secundarios que la pilocarpina. En el caso que no exista parénquima salival funcional, como ocurre en el caso de haber recibido un tratamiento oncológico mediante radiación ionizante (radioterapia), se suelen utilizar sustitutos salivales, que intentan asemejarse en lo posible a la saliva tanto en componentes como en viscosidad (Spilmann y cols. 2011).

1.3-. NEOPLASIAS SOBRE LA GLÁNDULA PARÓTIDA.

El tejido glandular salival de la parótida puede sufrir procesos tumorales, como cualquier otra parte del organismo. Los tumores malignos de parótida representan hasta el 20% de los que se originan sobre ella. Sin embargo, sobre glándula submaxilar representa hasta el 35% y sobre glándula sublingual y glándula salivar menor, hasta el 80%. Los tumores malignos de parótida son entre el 1-3% de los tumores de cabeza y cuello. Se clasifican en si son de origen epitelial, no epitelial o metastásico-secundario (Ellis y Auclair 1996).



Los más frecuentes son los de origen epitelial. Dentro de este grupo, en la glándula parótida el más frecuente es el carcinoma mucoepidermoide (55-65%) (Speight y Barret 2002). En cambio, la neoplasia más frecuente de origen epitelial sobre glándula submaxilar y sublingual es el carcinoma adenoide quístico o cilindroma (Spiro y cols. 1978; Everson y cols. 1985). También pertenecen al grupo de origen epitelial: el adenocarcinoma, el carcinoma de células acinares, el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado, carcinoma de células basales, claras y escamosas, cistoadenocarcinoma o cistoadenoma papilar maligno, tumor mixto malignizado, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas, carcinoma indiferenciado y carcinoma anaplásico (Martín-Granizo y cols. 2011).

Las neoplasias no epiteliales agrupan los linfomas y las lesiones malignas de origen mesenquimatoso como los schwannomas, los hemangiopericitomas, los histiocitomas fibrosos malignos, los rabdomiosarcomas y los fibrosarcomas. En el estudio que Ellis y Auclair publicaron en 1996, describieron que los linfomas de las glándulas salivales mayores son característicamente del tipo no Hodgkin, y que constituyen el 16% de todos los tumores malignos en las glándulas salivales mayores; de ellas el 80% sucede en la glándula parótida. Las neoplasias de origen mesenquimatoso, en las glándulas salivales mayores, representan aproximadamente 0,5% de todos los tumores de las glándulas salivales benignos y malignos, y aproximadamente 1,5% de todos los tumores malignos (Luna y cols. 1991).

En cuanto a la neoplasia metastásica o secundaria, la mayoría procede de tumores malignos primarios de cabeza y cuello (los más frecuentes carcinomas de células escamosas y melanomas de la cabeza y el cuello) (Gnepp 1991) que presumiblemente llegan a la glándula parótida vía el sistema linfático y tumores malignos infraclaviculares tales

como el pulmón, riñón y mama que alcanzan las glándulas salivales mediante vía hematógica (Batsakis y Bautina 1990).

El tratamiento de elección, tanto en tumores benignos como malignos, es la cirugía. En el caso de las neoplasias parotídeas, la cirugía suele ser más o menos radical, en función de la extensión del tumor, con el objetivo de conseguir buenos márgenes libres de enfermedad. La técnica utilizada en este caso puede ser la parotidectomía superficial o la total con o sin conservación del nervio facial.

En el caso de que el tumor sea maligno, se puede realizar además un vaciamiento cervical. Se realiza en N+, T3 y T4 siempre y N0 con alto grado de malignidad independientemente del tamaño tumoral. (NCCN Guide Line 2015). El vaciamiento cervical consiste en realizar la exéresis de los ganglios linfáticos cervicales para evitar la diseminación tumoral primaria, puesto que es la vía más frecuente de diseminación tumoral en cáncer de cabeza y cuello, y realizar un mejor estadiaje para saber el pronóstico y elegir un posterior tratamiento complementario.

Existen cinco niveles ganglionares cervicales en función de su localización. El nivel I: ganglios submentonianos y submandibulares. El nivel II: ganglios yugulares superiores y mastoideos. El nivel III: ganglios yugulares o yugulocarotídeos medios. El nivel IV: ganglios yugulares o yugulocarotídeos inferiores. El nivel V: ganglios supraclaviculares y triángulo posterior. También se considera un nivel VI: ganglios cervicales anteriores y un nivel VII: ganglios traqueoesofágicos y mediastínicos (Valle y Villanueva 2008).

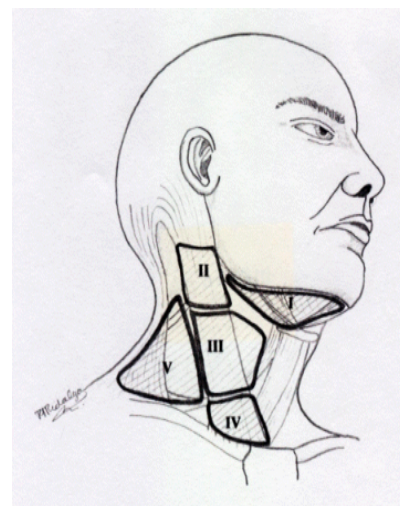


Fig. 1.2 Principales Niveles Ganglionares Cervicales
(Capote y cols. 2004)



El vaciamiento cervical en cáncer de parótida suele ser de tipo supraomohioideo, en el que se extirpan los niveles I, II y III. Si hay ganglios metastásicos cervicales al diagnóstico (N+) se realiza un vaciamiento más amplio en función de la localización y posibilidad de extirpación de la o las adenopatías. El más amplio es el vaciamiento cervical radical, en el que se extirpa: nervio espinal, músculo esternocleidomastoideo (ECM), vena yugular interna, músculo omohioideo, glándula submaxilar y plexo sensitivo cervical. Cuando no es necesario reseca tantas estructuras anatómicas se puede realizar un vaciamiento cervical radical modificado con el fin de mejorar la morbilidad de la cirugía. El vaciamiento radical modificado tipo I conserva el nervio espinal y reseca todo lo demás. El vaciamiento radical modificado tipo II conserva el nervio espinal y ECM, reseca todo lo demás. El vaciamiento radical modificado tipo III conocido como vaciamiento cervical funcional, se reseca todo lo descrito para el vaciamiento radical excepto nervio espinal, ECM y vena yugular interna (Capote y cols. 2004).

Cuando hay ganglios cervicales metastásicos (N+), se realiza tratamiento con radioterapia (Fig. 1.3). La radioterapia además está indicada en el carcinoma adenoide quístico, en tumores de medio y alto grado de malignidad, en márgenes afectos, e invasión perineural y/o vascular. En los tumores T4b, solo se trata con radioterapia. En las recurrencias locoregionales sin radioterapia previa que sean irresecables, se administra radioterapia y las recurrencias locoregionales o segundos primarios con radioterapia previa, resecables o no, pueden recibir radioterapia o cirugía (NCCN Guide Line 2015).

Se deben administrar entre 44-66 Gy (2Gy/día) a partir de las 6 semanas de la cirugía, de lunes a viernes hasta completar la dosis total (NCCN Guide Line 2015).



La afectación de la radioterapia sobre la glándula parótida no sólo sucede cuando esta forma parte del tratamiento de un cáncer parotídeo, sino que además también se puede afectar la glándula parótida por la radiación utilizada como tratamiento de otros cánceres de cabeza y cuello como el cáncer de cavidad oral por ejemplo, ya sea por necesidad de atravesarla o por la radiación dispersa.

El cáncer de la cavidad oral representa el 2-4% de todos los tumores malignos. Dentro de este, las localizaciones más frecuentes son lengua y suelo de boca, pudiendo afectar también la mucosa yugal, el trigono retromolar, reborde alveolar y paladar (Cortez 2013).

Aproximadamente la mitad de los casos de cáncer oral se diagnostican en estadios avanzados (estadios III y IV) en el momento del diagnóstico, por lo que la radioterapia se utiliza como tratamiento de la enfermedad en al menos el 50% (Fig. 1.4). En esta localización, la radioterapia se utiliza para los mismos casos que en el cáncer de glándula parótida (y glándulas salivares en general).

Cabe destacar que existen diferentes protocolos en los que se administra quimioterapia junto con la radioterapia, de forma concomitante. El número de ciclos de quimioterapia es menor que las sesiones de radioterapia y se añade cuando existen márgenes afectos, cuando hay invasión extracapsular y/o invasión perineural (NCCN Guide Line 2015).

Además existen otras áreas de cabeza y cuello en las que la radioterapia puede formar también parte del tratamiento como es el cáncer de orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, glótico, supraglótico, cáncer de seno etmoidal y maxilar.



<p>T. Tumor primario.</p> <ul style="list-style-type: none">- Tx. No es posible establecer la existencia de un tumor primario.- T0. Sin evidencia de tumor primario.- T1. Tumor de hasta 2 cm en su diámetro máximo sin extensión parenquimatosa.- T2. Tumor de entre 2 y 4 cm en su diámetro mayor sin extensión parenquimatosa.- T3. Tumor mayor de 4 cm y/o con extensión parenquimatosa.- T4. Invasión de estructuras adyacentes.<ul style="list-style-type: none">- T4a. Extensión tumoral a estructuras vecinas: piel facial, hueso cortical mandibular, seno maxilar. Enfermedad local moderadamente avanzada.- T4b. Extensión a base de cráneo, espacio masticatorio, apófisis pterigoides, infiltración carótida interna. Enfermedad local muy avanzada.
<p>N. Ganglios linfáticos regionales.</p> <ul style="list-style-type: none">-Nx. No es posible establecer la existencia de ganglios linfáticos afectados.-N0. Sin metástasis linfáticas regionales.-N1. Metástasis en un único ganglio ipsilateral de hasta 3 cm en su diámetro mayor.-N2.<ul style="list-style-type: none">-N2a. Metástasis en un único ganglio ipsilateral de entre 3-6 cm.-N2b. Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno mayor de 6 cm.-N2c. Metástasis ganglionares bilaterales o contralaterales, ninguna mayor de 6 cm.-N3. Metástasis ganglionar mayor de 6 cm.
<p>M. Metástasis a distancia.</p> <ul style="list-style-type: none">-Mx. No es posible establecer la presencia de metástasis a distancia.-M0. Sin metástasis a distancia.-M1. Metástasis a distancia.

Figura 1.3. Clasificación TNM. (Martin-Granizo y cols. 2011)



GRUPOS DE ESTADIAJE	
ESTADIO I	T1 N0 M0 T2 N0 M0
ESTADIO II	T3 N0 M0
ESTADIO III	T1 N1 M0 T2 N1 M0
ESTADIO IV	T4 N0 M0 T3 N1 M0 T4 N1 M0 Cualquier T, N2 M0 Cualquier T, N3 M0 Cualquier M1

Figura 1.4. (Martin-Granizo y cols. 2011)



1.4-. RADIOTERAPIA.

La Radioterapia (RT) se comienza a utilizar como tratamiento terapéutico tras el descubrimiento de los rayos X por Roetgen en 1895 y del radio por Curie en 1898. En España fue introducida por Celedonio Calatayud en 1906. Es una forma de tratamiento que se utiliza en algunas lesiones neoplásicas. Se basa en la utilización de radiación ionizante de alta energía (rayos gamma y partículas alfa) con la finalidad de eliminar células neoplásicas. Se aplica sobre la zona del tumor maligno de forma externa (radioterapia, propiamente dicha) o interna (braquiterapia). Se puede usar de forma aislada (resecado previamente mediante cirugía o no), de forma adyuvante, tras un tratamiento principal (generalmente la cirugía), neoadyuvante, previo al mismo con el objetivo de reducir el tamaño del tumor y facilitar así la exéresis o bien de forma concomitante, simultáneamente con otro tratamiento, generalmente la quimioterapia. Existe también un efecto sobre el tejido vecino sano aunque este es más radioresistente y tiene mayor capacidad de reparar las lesiones celulares producidas por la radioterapia. Por este motivo surge la radioterapia conformada en 3D y posteriormente la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) en la que se modula o controla la intensidad del haz de radiación, obteniendo una alta dosis sobre el lecho tumoral y minimizando la dosis en los tejidos sanos, mediante aceleradores lineales con colimador multilaminar y sofisticados sistemas informáticos de planificación dosimétrica y verificación de dosis (ASTRO 2014).

1.4.1-. Efectos de la Radiación.

Las radiaciones utilizadas en medicina tienen como denominador común su capacidad para ionizar. A partir de esta acción física elemental se desencadenan una serie de efectos químicos en cascada, ya que los



átomos ionizados tienen una gran capacidad reactiva al intentar recuperar su estabilidad química. Así, cuando estas reacciones tienen lugar en las moléculas de ADN, aparecen una serie de lesiones nivel genético y cromosomal. Muchas de estas reacciones no producen muerte celular directa, por lo que forman parte del daño celular subletal, mientras que otras lesiones, directas o por acumulación de daño subletal, llevan a la muerte celular. La lesión radioinducida es inespecífica y no selectiva, si bien determinadas células son más sensibles que otras al efecto de la radiación (Esco y cols. 2004).

En 1906 Bergonie y Tribondeau describieron unos postulados que permiten conocer el grado de radiosensibilidad o radiorresistencia de los diferentes tipos celulares. En ella se dice que los rayos X actúan más sobre las células cuanto mayor es su actividad reproductora, mayor número de divisiones deba realizar para adoptar su forma y funciones definitivas y cuando no haya alcanzado su grado de diferenciación definitiva. Una célula no diferenciada es una célula inmadura cuya función fundamental es dividirse para mantener su propia población y para reemplazar a las células maduras perdidas. Las células indiferenciadas se pueden considerar como células precursoras o células madre de una población.

Sin embargo, una excepción significativa a esta ley lo constituye el linfocito. El linfocito es la célula más radiosensible del organismo, sin poseer ninguna de las tres características enunciadas en los postulados anteriores de Bergonié y Tribondeau. (Alcaraz-Baños 2003).

Aunque la muerte celular se produce más fácilmente si la radiación interacciona más fácilmente con el núcleo que si lo hace sobre cualquier otra estructura citoplasmática, es mucho más frecuente la interacción esencialmente con el agua celular, lo que induce la formación de radicales activos con capacidad de difusión suficiente como para alcanzar las



moléculas diana de ADN. Así se produce el efecto indirecto de la radiación, cuyo resultado final será igualmente la muerte celular por lesión sobre el ADN. Este efecto indirecto está producido por la formación de radicales activos que se forman por la ionización del agua, siendo sobre todo radicales OH y O con gran capacidad oxidante (Steel 1993).

Todos estos efectos se producen inmediatamente después de la radiación (del orden de milisegundos al cubo) y en la proximidad del territorio irradiado (del orden de 2nm de diámetro en torno al mismo).

En el cuerpo humano existen sistemas de radioprotección específica mediante el sistema enzimático de la Superóxido Dismutasa (SOD) que cataliza la reacción de radicales de oxígeno libres con hidrógeno para formar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno que será convertido a agua por las catalasas o peroxidasas intracelulares. Cuando el sistema se satura aparece el estrés oxidativo (Esco y cols. 2004).

Existen también los modificadores de respuesta biológica (MRB) que actúan sobre las citoquinas, reparación del ADN, regulación del ciclo celular, la apoptosis o la oxigenación celular.

De una u otra manera, cuando la consecuencia final es la muerte celular se liberan elementos intracelulares que conduce a fenómenos inflamatorios agudos y situaciones de depleción celular. Cuando esta depleción se produce sobre tejido tumoral estaríamos alcanzando la curación, pero sobre tejidos sanos serían la destrucción del órgano con pérdida de su función (Esco y cols. 2004).



1.4.2-. Efecto de la Radiación sobre la glándula Parótida.

Aproximadamente el 70% de los pacientes que reciben radioterapia para cáncer de cabeza y cuello desarrollarán hiposialia por afectación de las función glandular. El descenso de la tasa de salivación se cree que es debido a la alteración en la transducción de señales como resultado del daño por estrés oxidativo radioinducido en la membrana celular.

El área de tejido expuesto y la dosis de radiación son los principales factores que influyen en los cambios glandulares. El daño tisular es dosis dependiente. A más dosis de radiación, y a más área expuesta, peor tasa de salivación (Acauan y cols. 2015).

La radiación sobre la glándula parótida tiene consecuencias devastadoras debido al daño radio-inducido sobre el parénquima salival. El efecto principal es la hiposialia o pérdida de función secretora de saliva por parte de la glándula. Esto hace que el paciente tenga sensación de falta de secreción o xerostomía que le provoca: alteraciones del gusto y masticación, dificultad para la deglución, dificultad para el habla e incluso para el sueño. Además existe una disminución de la protección de la cavidad oral contra diferentes agresiones sobre la encía y sobre los dientes debido a alteraciones de la microflora bacteriana que es más patógena, causando úlceras mucosas dolorosas, mayor incidencia de caries y dificultad para llevar una prótesis mucosoportada (Nagler 2002).

El primero que describió el daño radioinducido sobre las glándulas salivales fue Bergonie en 1911, aunque a día de hoy todavía no se sabe el mecanismo con certeza por el que se produce el daño. Se acepta que ante una misma dosis de radiación, la glándula parótida es más radiosensible que otras glándulas salivales mayores. Se cree que es por la mayor radiosensibilidad de las células serosas con respecto a las



células mucosas. La función secretora de la glándula parotídea se ve disminuida hasta en un 50 % (Nagler 1998).

Los modelos de estudio sobre la secreción salival llevada a cabo en ratas en la última década han descrito que con una radiación absorbida de entre 2,5 y 20 Gy a nivel de cabeza y cuello existe una función claramente reducida de secreción salival en torno a los 3-14 días post-radiación (Baum y cols. 1998). Al final de la segunda semana hay una recuperación de la secreción de flujo salival en ratas, pero luego sigue una fase de profunda hiposecreción salival. En las primeras 2 semanas post-radiación existen además efectos derivados de una mucositis oral como dificultad para comer, masticar y deglutir. A partir del día 40 post-radiación se observa una reducción de la tasa de secreción tanto de la glándula parótida como de la glándula submaxilar, aunque sucede de forma más temprana y severa en la primera. Tras 9-12 meses, la secreción parotídea sufre una reducción de hasta el 75% del flujo, aunque el descenso más importante se produce a partir del tercer mes. La afectación inicial se debe al daño del acino y en cambio la hiposecreción tardía a la pérdida de capacidad secretoria celular (Nagler 1998).

Durante los primeros 15 días el efecto agudo de la radiación provoca una mucositis oral que indirectamente provoca una hipofunción secretora de la glándula, que no parece estar relacionada con el parénquima glandular debido a la recuperación de la tasa de secreción pasado este primer periodo.

La posterior hipofunción a partir del día 40 y de forma más importante a partir del tercer mes post-radiación se cree que se debe al daño sobre el ADN durante la mitosis en células con un bajo potencial mitótico de entre 1-3 meses, ya sea por afectación de la membrana nuclear vía lipoperoxidación lipídica o bien por la radiosensibilidad del ADN debida a la existencia de iones metálicos que producen actividad



oxidativa y radicales libres dañinos para la célula que finalmente entra en apoptosis (Nagler 2002).

A nivel macroscópico, existe una reducción del volumen entre 40-60% sobre glándulas parótidas de ratas irradiadas entre 2,5-15 Gy con respecto al grupo control no radiado (Nagler 1998) y un 30% menos de volumen con radiaciones de 25-37 Gy (IMRT: radioterapia hiperfraccionada) (Fiorentino y cols. 2012).

A nivel microscópico, dosis por encima de 10 Gy de radiación sobre la glándula parótida han mostrado alteraciones en el parénquima glandular de las ratas radiadas a las 6 horas post-radiación.

La pérdida de células acinares por muerte celular ha sido descrita por numerosas publicaciones (Coppes y cols. 2001; Vissink y cols. 2003; Xu y cols. 2010) tras radiación sobre glándulas salivares, aunque el aumento de células apoptóticas se considera la mayor causa de disfunción glandular tras la radioterapia. Estas se identifican morfológicamente por acumulación de cromatina condensada cerca de la membrana nuclear. Se forman cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos que desencadenan una reacción inflamatoria.

En cuanto a la forma de administrar la radiación, esta se puede hacer a dosis única o bien mediante dosis fraccionadas. Se refiere a hiperfraccionada (IRMT) para dosis diarias menores a 2 Gy. La toxicidad temprana o aguda de la radiación única es mayor que la que se encuentra en la radiación fraccionada, sobre todo a nivel de piel y mucosas (dermatitis y mucositis). La toxicidad tardía, sobre todo la mielopatía a nivel del sistema nervioso central, también es más frecuente en casos de irradiación a dosis única. Esto es debido a la mayor dosis de radiación administrada de una sola vez, aun cuando la dosis total de radiación



administrada en la forma fraccionada es igual o superior (Esco y cols. 2004)

La radiación causa daño en el ADN celular, privación de factores de crecimiento e hipoxia que a su vez provocan un cambio en la membrana mitocondrial (degeneración mitocondrial), alterando la homeostasis celular, interrumpiendo la síntesis de ATP y produciendo ROS (especies reactivas al oxígeno) que a su vez inducirán factores inductores de apoptosis que causarán condensación de cromatina y fragmentación de ADN. Existe también vacuolización citoplasmática, hipovascularización, fibrosis y edema (Dossena y cols. 2015). En cuanto al núcleo, este está desplazado con respecto a su posición original y existen áreas densas de cromatina en su periferia. Se pueden ver alteraciones de la membrana celular, y cuando esto ocurre es la antesala la muerte celular por apoptosis (Boraks y cols. 2008).

1.4.3-. Radioprotección en Medicina.

Algunos de los campos de aplicación de la radiación ionizante son la radioterapia, el radiodiagnóstico, la medicina nuclear y la investigación biomédica. En estos procedimientos tanto los pacientes como los trabajadores son expuestos a diferentes tipos y dosis de radiación (Arora y cols. 2008). En el caso de la radioterapia por ejemplo, es frecuente su uso como un componente de la terapia contra el cáncer (Citrin y cols. 2010).

El propósito de la radioterapia en el caso del cáncer es destruir las células cancerígenas causando el mínimo daño posible a las células normales. Siempre se intenta dar la dosis necesaria para dañar al máximo las células tumorales sin perjudicar a las no tumorales, sin embargo, se suele causar cierto daño a las células normales y, a partir de ahí, se



pueden derivar efectos colaterales adversos. La naturaleza y el grado de ese daño indeseado depende de la dosis de la radiación ionizante y de la sensibilidad de los órganos irradiados (Hosseinimehr 2007). Para minimizar el daño producido se busca mejorar el índice terapéutico por diferentes vías pero pese a los esfuerzos, un pequeño volumen de células no tumorales resulta afectado por la radiación (Sebastià-Fabregat 2013).

Por esta razón, cobra especial importancia la utilización de sustancias radioprotectoras para la protección de los tejidos sanos, de modo que se disminuyan los efectos secundarios producidos por la radiación. Los radioprotectores se engloban dentro de los compuestos llamados radiomoduladores, es decir, que modifican la respuesta a la radiación en los sistemas biológicos e incluyen compuestos químicos y naturales (Arora y cols. 2008). El concepto de radioprotector se podría definir como agente químico o droga que reduce el efecto dañino de la radiación, cuando se administra a organismos vivos (Arora y cols. 2006). Pero las definiciones de radioprotectores han ido cambiando con el tiempo según el ámbito clínico donde se pretendían utilizar o por otras diversas razones (Sebastià-Fabregat 2013).

La primera tentativa acerca del uso de compuestos químicos como radioprotectores con el fin de proteger de los efectos nocivos de la radiación fue llevada a cabo después de la Segunda Guerra Mundial ya que se pensó en la posible necesidad de salvaguardar a los humanos del uso militar de las radiaciones ionizantes (Jagetia 2007). El grupo de Patt y cols. en 1949 fueron los primeros en investigar el efecto del aminoácido cisteína en ratas expuestas a dosis letales de rayos X. De esta forma, en los últimos 60 años, como resultado de la gran necesidad clínica de agentes radioprotectores efectivos, muchos han sido sintetizados y estudiados para encontrar el más efectivo a la vez que menos tóxico (Hosseinimehr 2007). Para ser útiles en la radioterapia clínica, los



radioprotectores deberían poseer diferentes características ideales relacionadas con su habilidad para mejorar el ratio terapéutico. Primero, deben de ser selectivos y proteger a los tejidos normales de la radiación sin proteger al tejido tumoral, de otra forma el índice terapéutico no mejorará. Segundo, estos compuestos deben proteger a los tejidos normales a los que se les considere sensibles de desarrollar una toxicidad a corto o largo plazo que comprometa una reducción en la calidad de vida (mucositis, pneumonitis, mielopatía y xerostomía entre otros) (Citrin y cols. 2010).

Se puede definir un decálogo del radioprotector ideal, que contendría las siguientes características:

1. Protección significativa contra los efectos de la radiación.
2. Amplio espectro de protección sobre tejidos sanos y órganos.
3. Disposición en una vía de administración sencilla, si es posible no invasiva.
4. Adecuado perfil de estabilidad de la masa activa y del compuesto final.
5. Compatible con el amplio rango de otros fármacos y alimentos que puedan estar utilizando los pacientes o personal sometido a radiaciones.
6. Debe poseer un perfil de toxicidad aceptable.
7. No debe poseer toxicidad propia.
8. Largo tiempo de protección.
9. Si es utilizado para terapia antitumoral, debe preservar su eficacia, permitiendo que no se observen efectos positivos sobre la masa tumoral.
10. Relación coste/efectividad razonable que permita su uso en la medicina clínica.



En general, aquellos agentes biológicos o químicos utilizados para modificar la toxicidad que provoca la radiación sobre los tejidos pueden clasificarse en tres categorías en función del momento en el que se proporcionan en relación a la emisión de la radiación: radioprotectores químicos, mitigadores y de tratamiento de los efectos secundarios. Se denominan *radioprotectores* a aquellos agentes proporcionados antes o en el momento de la irradiación con la intención de prevenir o reducir el daño a los tejidos normales. Aquellos que se administran en el momento de la irradiación o después del fin de la misma, pero siempre antes de que se manifieste cualquier toxicidad en el tejido normal, se describen como *mitigadores* de las lesiones de los tejidos normales. Finalmente, los agentes facilitados para mejorar la toxicidad ya manifiesta en el tejido normal se consideran *agentes de tratamiento* (Stone y cols. 2004).

Dependiendo del tipo de radioprotector, su mecanismo de acción puede ser diferente, desde impedir la formación de radicales libres, detoxificar las especies reactivas inducidas por la radiación, estimular a los radioprotectores celulares como la superóxido dismutasa, el glutatión, las prostaglandinas y la interleucina-1, aumentando los mecanismos de reparación propios del ADN o retrasando la división celular e inducir hipoxia en los tejidos (Maurya y cols. 2006).

De la familia de los radioprotectores más estudiados, la Amifostina®. Es un citoprotector específico (radioproteje solo el tejido sano sin proteger tejido tumoral), un compuesto tiofosfato formado por un grupo sulfhidrilo unido a un fosfato, siendo convertido en un tiol libre por la fosfatasa alcalina (FA). La citoprotección específica viene dada porque en los tejidos tumorales existe baja concentración de FA debido al pH ácido en los tumores, a las diferencias estructurales en la membrana celular tumoral con respecto a la sana y por último al paso a través de la



membrana celular gracias a un sistema de transporte activo en células sanas y difusión pasiva en células tumorales (Esco y cols. 2014).

Los principales efectos secundarios descritos son la hipotensión, emesis, somnolencia, gusto metálico, náuseas, vómitos, hipocalcemia, estornudos, hipo, sofocos, fiebre y reacciones cutáneas graves (eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, necrolisis epidérmica tóxica). Parece que su toxicidad es sensiblemente inferior cuando se administra de forma subcutánea siendo la efectividad similar en modelos animales (Koukourakis y cols. 2000).

Así pues, los tioles, aunque son muy efectivos desde el punto de vista de protección de los tejidos normales de la radiación y no de los cancerígenos, poseen una alta toxicidad que ha hecho necesaria la búsqueda de agentes alternativos, que pudieran ser menos tóxicos y altamente eficaces. Se pensó que los productos o compuestos aislados de fuentes naturales podrían ser usados sustancialmente como radioprotectores no tóxicos (Jagetia y cols. 2007). Muchos de los compuestos presentes en la naturaleza son conocidos por sus propiedades antioxidantes, como la gran mayoría de compuestos presentes en las plantas. Además, en la medicina moderna un gran número de compuestos procedentes de plantas se usa para mitigar y tratar los radicales libres mediados por enfermedades como el cáncer, la diabetes y los desórdenes neurodegenerativos (Arora y cols. 2006). Teniendo esto en cuenta, resulta lógico pensar que los daños provocados por los radicales libres producidos por la radiación ionizante también pueden ser modificados por compuestos naturales con propiedades antioxidantes presentes, por ejemplo, en plantas. El motivo por el que los compuestos antioxidantes son capaces de neutralizar estos radicales libres es por su afinidad química por los grupos hidroxilo (OH-) (Sebastià-Fabregat 2013).



Los agentes antioxidantes más comunes de la dieta son probablemente las vitaminas; entre ellas las vitaminas A, C y E han demostrado ser radioprotectoras. Por ejemplo, la vitamina E, administrada a una dosis de 400 IU/kg de peso corporal antes de irradiar a ratones, mostró un aumento en el ratio de supervivencia de hasta un 79% frente a un 4% en el grupo control (Hosseinimehr y cols. 2007). Y la vitamina A, a una dosis de 150000 IU/kg de dieta administrada a ratones ofreció protección contra una exposición a radiación del esófago o del intestino (Weiss y Landauer 2003). Además de los antioxidantes comunes, un gran número de plantas contienen fitoquímicos antioxidantes que han demostrado ser radioprotectores en varios modelos. De entre los principios activos que han demostrado su capacidad radioprotectora se puede nombrar a modo de ejemplo la melatonina (Vijayalaxmi y cols. 1995), la naringina (Jagetia y cols. 2003), el eugenol (Tiku y cols. 2004), el sesamol (Prasad y cols. 2005), el ácido ferúlico (Prasad y cols. 2006), la quercetina (Devipriya y cols. 2008), el licopeno (Cavusoglu y Yalcin 2009), al ácido rosmarínico (Sánchez-Campillo y cols. 2009), entre otros.

Las investigaciones biomédicas sobre la curcumina han provisto evidencias suficientes de amplio rango de actividades moleculares y celulares, la mayoría de ellas relacionadas con reacciones redox y transducción de señales (Aftab y Vieira 2010). Estas actividades son las de antioxidante, antiinflamatorio, antiproliferativo, proapoptótico, antibacteriano y anticancerígeno (Epstein y cols. 2010). La curcumina es un potente antioxidante que puede proteger contra el daño inducido por los radicales libres en varios tejidos. Puede también proteger de la inducción de roturas simples de cadena por radicales del oxígeno en plásmidos, y reduce el número de roturas de cadena inducido por agentes genotóxicos en el ADN de levaduras (Polasa y cols. 2004).



1.5-. ANTIOXIDANTES.

1.5.1-. Licopeno.

Nuestro organismo está expuesto a una variedad de sustancias prooxidantes o radicales libres capaces de dañar las moléculas biológicamente importantes, como el ácido desoxirribonucleico (ADN), las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. Por tal motivo, el cuerpo humano cuenta con un sistema de enzimas que contrarrestan el efecto de estos compuestos oxidantes y actúan como antioxidantes, estos bloquean la reactividad de los radicales libres, que en cantidades elevadas pueden ser dañinos y causantes de muerte celular. Los radicales libres son átomos que poseen un electrón desapareado por lo cual son sumamente reactivos y tienden a robar un electrón de moléculas químicamente estables con la única finalidad de alcanzar la estabilidad química. Una vez que esto sucede, la molécula que cede el electrón se convierte en un radical libre con lo cual robará electrones a las demás moléculas, dando lugar a una reacción en cadena que no terminará hasta que un agente reductor proporcione los electrones que requieren para que los capte el agente oxidante, que en este caso es el radical libre. Cabe mencionar que no todos los radicales libres producidos en nuestro organismo son dañinos; de hecho el sistema inmune los produce en cantidades moderadas para protegernos contra las bacterias y los virus, o en la producción de hormonas y la activación de enzimas necesarias para la vida. Los radicales libres que cumplen con ciertas funciones en el organismo son fácilmente neutralizados por la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Sin embargo, el problema surge cuando se excede el número de radicales libres en el cuerpo dando lugar a un estado conocido como estrés oxidativo, ocasionando cambios estructurales y funcionales en la célula que pueden repercutir en la promoción de enfermedades como el cáncer. Así los antioxidantes como el licopeno,



neutralizan la acción oxidante de los radicales libres antes de que logren dañar al cuerpo al proporcionar un electrón a las moléculas inestables y estabilizándolas antes de que utilicen electrones de otras moléculas y ocasionen daños a su estructura (Herrera-Covarrubias y cols. 2013).

El licopeno es un carotenoide de estructura acíclica, isómero del beta caroteno, que carece de actividad pro-vitamina A (por no contar con el anillo de beta-ionona) cuya fórmula es $C_{40}H_{56}$ (fig.1.5). Se encuentra en la naturaleza como pigmento natural liposoluble responsable del color rojo y naranja de algunas frutas y verduras y se caracteriza por poseer una estructura química de cadena abierta alifática formada por cuarenta átomos de carbono con trece enlaces dobles de los cuales once son conjugados, por lo que es muy reactivo frente al oxígeno y a los radicales libres. Se sintetiza exclusivamente por las plantas y los microorganismos y una de sus funciones principales es absorber la luz durante la fotosíntesis para proteger a la planta contra la fotosensibilización (Vitale y cols. 2010).

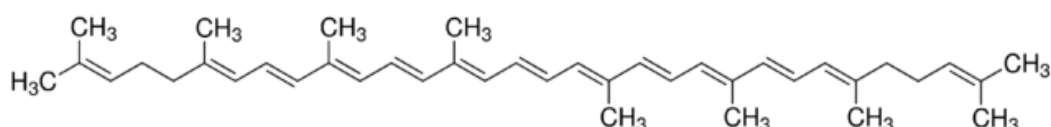


Fig. 1.5 Estructura química del licopeno (Cruz y cols 2013).

Una de sus fuentes principales es el tomate (80-90%), que es un producto básico considerado saludable por su bajo contenido en kilocalorías y grasa y su contenido en fibra, proteínas, vitaminas E, A, C, y potasio. Otras fuentes importantes de licopeno son la sandía, la toronja rosada, la guayaba rosada, el pimiento rojo y la papaya (Vitale y cols. 2010).



Además de estar presente en los alimentos, el licopeno es uno de los carotenoides que se encuentra distribuido en mayores cantidades en el suero humano (21-43% de los carotenoides totales) y los diferentes tejidos (hígado, riñón, glándulas renales, testículos, ovarios y próstata). Su concentración depende de su ingestión alimentaria, pero está poco influenciada por la variación del día a día, debido a que la vida media del licopeno en plasma es de 12 a 33 días (Waliszewski y cols. 2010; Lu y cols. 2011).

En los alimentos, el licopeno se encuentra ligado a la matriz en su forma *trans*, lo que impide su liberación completa y lo hace menos susceptible para la digestión y absorción en el aparato digestivo humano. Se recomienda que para lograr un mejor aprovechamiento, se procese mediante el calor para romper las paredes celulares, debilitando las fuerzas de enlace entre el licopeno y la matriz del tejido, lo que aumenta el área superficial disponible para la digestión debido a que el tratamiento térmico de la cocción transforma las formas isoméricas *trans* del licopeno, a *cis* (5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* y 15-*cis*) mejorando su biodisponibilidad. Debido a su carácter liposoluble, para mejorar su absorción basta con agregar aceite, preferentemente de oliva, girasol o canola a la preparación. Un factor importante que mejora la biodisponibilidad del licopeno es la sinergia que se produce con otros compuestos antioxidantes, como sucede con las vitaminas E y C (Waliszewski y cols. 2010).

Después de unos treinta minutos de su ingestión el licopeno se incorpora dentro de las micelas de los lípidos que forman parte de la dieta y se absorbe por difusión pasiva en la mucosa intestinal, donde se incorpora a los quilomicrones y luego se libera para ser transportado por las lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL respectivamente) a través del sistema linfático hacia el hígado y otros órganos (glándulas suprarrenales, próstata y testículos)



Liu y cols. 2006, mostraron en células prostáticas que el 55% del licopeno se localiza en las membranas nucleares, el 26% en la matriz nuclear y el 19% en los microsomas. Esto pudiera explicar el mecanismo por el cual el licopeno protege a la célula del estrés oxidativo. Debido a que el licopeno se encuentra en mayor cantidad dentro de la membrana nuclear, puede ejercer un efecto de protección directa contra los radicales libres extracelulares, neutralizando su acción oxidante e impidiendo su acción dentro del núcleo y el desarrollo de mutaciones en el ADN de la célula, por lo que si las defensas antioxidantes de la célula son menores que los oxidantes se origina lo que se conoce como el estrés oxidativo, el cual está vinculado con el desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer, sobre todo muy estudiado la prevención del cáncer de próstata. (Herrera-Covarrubias y cols. 2013)

Sólo entre el 10 y 30% del licopeno es absorbido, el resto se excreta en una cuantía que depende de algunos factores biológicos y de estilo de vida tales como el sexo, la edad, la composición corporal, el estado hormonal, los niveles de lípidos en sangre, el consumo de alcohol, de tabaco y la presencia de carotenoides en la dieta (Galhardo y cols. 2009).

Los carotenoides en altas concentraciones pueden interferir con la biodisponibilidad de otros, produciendo un desequilibrio, como sucede entre el beta-caroteno y el licopeno. Además, está comprobado que la eficacia de los carotenoides individuales depende de las concentraciones de otros, por lo que la suplementación con uno solo puede resultar ineficaz, recomendándose la mezcla de ellos para obtener una mayor actividad antioxidante (Perdomo y cols. 2012).

Las propiedades funcionales del licopeno se basan en la inhibición de la proliferación celular y su importante potencial antioxidante capaz de



eliminar derivados nocivos resultantes del estrés oxidativo (Gonzalez-Gallego y cols. 2010).

La función del licopeno se ha vinculado principalmente a su potente efecto antioxidante; sin embargo, se conoce que el licopeno también inhibe la proliferación celular al interferir con la señalización de IGF-1, el cual ha sido implicado como un factor importante de riesgo de cáncer. Por ejemplo, se ha asociado que niveles sanguíneos altos de IGF-I incrementan el riesgo de cáncer de próstata, mama, colorrectal y pulmón (Konijeti y cols. 2011).

Investigaciones realizadas por Siler y cols. 2005, reportan que el licopeno, además de reducir la expresión de IGF-I en tejido de próstata, disminuye las citocinas inflamatorias como IL-1 y las quimiocinas (CXC), IP-2 y LIX, sugiriendo un efecto antiinflamatorio del licopeno y posiblemente anti-cancerígeno.

El papel del licopeno en la salud de los huesos está basado en sus propiedades como potente antioxidante; son bien conocidos el papel del estrés oxidativo en la salud de los huesos y los reportes limitados de estudios del efecto del licopeno en cultivos de células de huesos. Las especies reactivas del oxígeno (EROS) inducidas por el estrés oxidativo están asociadas con la patogénesis de la osteoporosis y la baja densidad ósea. La evidencia epidemiológica sugiere que ciertos antioxidantes, como la vitamina C, E y β -caroteno, pueden reducir el riesgo de padecer osteoporosis, por lo que se ha considerado estudiar el efecto del licopeno en este tipo de casos por su alto poder antioxidante (Rao y cols. 2006; Mackinnon y cols. 2011).

Las EROS generadas endógenamente pueden afectar múltiples tejidos, ya sea directamente o a través de la depleción del óxido nítrico e inclusión de contracción y disfunción endotelial vascular, remodelamiento



hipertrófico en los vasos sanguíneos y miocardio (Lassegue y cols. 2004). Además existe una relación inversa con las enfermedades cardiovasculares por su efecto hipocolesterolémico a expensas de la LDL y una relación inversa entre los niveles de licopeno sérico y aterosclerosis debido a una disminución del IL-6 y TNF-alfa (Burton y cols. 2012; Lorenz y cols. 2012).

Se ha sugerido el estrés oxidativo como un importante factor que contribuye en la infertilidad masculina. Se han detectado niveles significativos de EROS en semen por arriba de 25% de hombres infértiles, mientras que los hombres fértiles no producen niveles detectables de EROS en su semen (Iwasaki y cols. 1992)

El estrés oxidativo está empezando a ser considerado un importante factor causal y también como factor secundario en la patogénesis de estas enfermedades. El alto contenido lipídico del sistema nervioso, la baja capacidad antioxidante y la presencia de hierro, además de su elevada actividad metabólica, lo hacen particularmente susceptible de daño oxidativo. Diversos estudios *in vitro* han demostrado la efectividad de los antioxidantes al proteger el tejido nervioso del daño de los radicales libres (Rao y cols. 2003).

1.5.2-. Curcumina.

La curcumina (diferuloilmetano) es la sustancia causante del color amarillo característico de los rizomas de la planta *Curcuma Longa*, y es uno de los ingredientes activos responsable de su actividad biológica. La síntesis de este compuesto es conocida y su estructura fue determinada en 1910 (fig. 1.6).

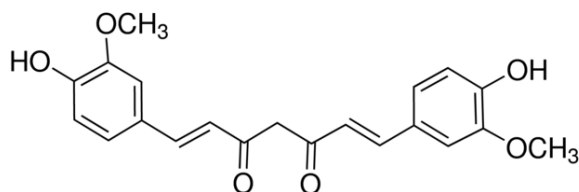


Fig. 1.6 Estructura química de la curcumina (Pan y cols. 1999).

Se sabe que la curcumina es inestable a pH básico. En las condiciones del estómago (pH 1-2) y del intestino delgado (pH 6.5), la curcumina es estable, ya que a pH entre 1 y 7, su degradación es extremadamente lenta (Tønnesen y Karlsen 1985). Su elevada lipofilia permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva. Aproximadamente el 35% de dosis orales se excreta por heces a las 48 horas, absorbiéndose el 65%. Tras la administración de curcumina se biotransforma primero a dihidrocurcumina y tetrahidrocurcumina, y estos compuestos son convertidos, posteriormente, a conjugados monoglucurónidos por la UDP-glucuronil transferasa. (Pan y cols. 1999).

Desde antiguo, son muchas las propiedades atribuidas a los extractos de *Curcuma longa* y a su principal componente, la curcumina. Se conoce su actividad antimicrobiana in vitro contra bacterias gram-positivas, su actividad antifúngica y antiparasitaria. Otra actividad interesante de la curcumina es la inhibición de la replicación final de la expresión genética del virus HIV-1, sin causar un efecto significativo en las células (Li y cols. 1993).

Tiene acciones específicas sobre la piel, tracto gastrointestinal, hígado y sistema respiratorio, además de una actividad antiinflamatoria, hipolipidémica, inmunomoduladora y antioxidante.

Sobre la piel actúa en procesos de reparación tisular e inhibiendo el proceso de oxidación del ADN de la epidermis (Parshad y cols. 1998).



Sobre el tracto gastrointestinal Munzenmaier y cols. 1997 comprobaron que la curcumina inhibe la producción de IL-8 inducida por el *Helicobacter pylori* la cual juega un importante papel en el desarrollo de gastritis, úlcera y adenocarcinoma gástrico. Zhang y cols. 1999, observaron que la curcumina inhibe la proliferación de las células de cáncer de colon *in vitro*, independientemente de su capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas.

Una de las principales propiedades de la curcumina es su actividad hepatoprotectora, que fue revisada por Luper en 1999 demostrando este efecto frente a varios tóxicos hepáticos *in vitro* e *in vivo* en distintos modelos animales. A bajas dosis, disminuye las cantidades de sólidos en la bilis, mientras que a altas dosis incrementa la excreción de sales biliares, bilirrubina y colesterol. Induce la contracción de la vesícula biliar y previene la formación de piedras de colesterol en la bilis de ratones (Hussain y Chandrasekhara 1994). En 1994 Donatus observó una disminución de la hepatotoxicidad y de la metahemoglobinemia originadas por el paracetamol, en ratones, tras un pretratamiento de 6 días con 1.87 mg/kg/d de curcumina. Sin embargo, altas dosis (60 mg/kg/d) de curcumina potencian dicha toxicidad.

En el sistema respiratorio se han encontrado efectos alentadores sobre la citotoxicidad inducida de la ciclofosfamida, bleomicina y paracuato, además de ser un potente agente antiproliferativo de cáncer de pulmón (Venkatesan 2000).

Se ha demostrado que la cúrcuma es un compuesto antiinflamatorio en modelos de inflamación aguda, subaguda y crónica en ratones y ratas, mediante la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, ya que inhibe las actividades cicloxigenasa y lipooxigenasa aunque no tiene fuertes efectos analgésicos ni antipiréticos, tampoco produce una significativa irritación gástrica, ni tiene efectos en el sistema



nervioso central (Srimal y Dharvan 1973 y 1985). Posteriormente, se ha atribuido el efecto antiinflamatorio y anticancerígeno de la curcumina a su capacidad para inhibir la fosfolipasa D y la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Yamamoto y cols. 1997).

Otra propiedad atribuida a la cúrcuma es su capacidad inmunomoduladora. Se ha demostrado que la cúrcuma incrementa las respuestas de los linfocitos esplénicos frente a mitógenos en ratas, y altera la población de linfocitos en ratones (Yasni y cols. 1993). Antony y cols. 1999, observaron un incremento en la actividad fagocítica de los macrófagos en animales tratados con curcumina. Así mismo, Kang y cols. 1999, han comprobado que la curcumina puede inhibir la producción de interleukina-12 por los macrófagos, alterando el perfil de citoquinas Th 1 las células T helper, lo que puede ser de utilidad terapéutica para las enfermedades inmunológicas mediadas por Th I.

Algunos autores han estudiado el efecto de la suplementación diaria de 0.5% de curcumina en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, en las que detectaron una mejora significativa del estado metabólico a la vez que una reducción del colesterol sanguíneo (debido a la fracción LDL), de los triglicéridos y de los fosfolípidos (Babu y Srinivasan 1995).

Los ácidos grasos poliinsaturados son moléculas muy susceptibles al ataque peroxidativo, lo que conlleva la alteración de las membranas de los tejidos. Existen muchos trabajos que muestran la capacidad de la cúrcuma para prevenir la peroxidación lipídica, proceso clave en el inicio y desarrollo de múltiples enfermedades. Por otro lado, también se ha demostrado la capacidad de la curcumina para estabilizar membranas (Venkatesan 2000). El hígado es el órgano con el mayor índice de estrés oxidativo dado su papel fundamental en el metabolismo de las grasas y en la biotransformación de xenobióticos y sustancias tóxicas, procesos



que conllevan a un gran incremento de la peroxidación lipídica, lo cual puede perjudicar seriamente su funcionalidad (Mesa 2000). La aterosclerosis, es una enfermedad multifactorial en la que se produce una gran alteración del metabolismo lipídico vascular. Se ha observado que la cúrcuma disminuye los peróxidos lipídicos plasmáticos, moléculas que juegan un papel importante en la patogénesis de dicha enfermedad y contribuyen a la disminución de la susceptibilidad de la oxidación de las LDL (Ramírez-Boscá y cols. 1995), posee un efecto antitrombótico, aumenta la actividad fibrinolítica, tiene un efecto hipotensor transitorio y es antiagregante plaquetario in-vivo e in-vitro. Se ha comprobado que la curcumina puede proteger otros órganos de las alteraciones que surgen como consecuencia de la peroxidación lipídica tisular. Así pues, previene la aparición de cataratas y disminuye las lesiones renales en diabéticos.

El mecanismo antioxidante más conocido de la curcumina es la capacidad de retirar especies reactivas de oxígeno, principales responsables de la peroxidación de los lípidos celulares. Estas sustancias son capaces de eliminar principalmente el radical hidroxilo, el radical superóxido, el oxígeno singlete, el dióxido de nitrógeno y el óxido nítrico. Además inhibe la generación del radical superóxido. El óxido nítrico es un compuesto con propiedades fisiológicas cuyo papel en la aterosclerosis es muy discutido, ya que se puede considerar como antiaterogénico, por su efecto vasodilatador y antiagregante plaquetario, y sin embargo otros autores lo consideran un factor aterogénico que puede reaccionar con moléculas reactivas de oxígeno dando peroxinitrito, una molécula muy oxidante. La curcumina es un *scavenger* potente del óxido nítrico, es capaz de eliminarlo y, por lo tanto, de prevenir sus efectos adversos (Sreejayan y Rao 1997).

La curcumina puede impedir la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina inducida por el dióxido de nitrógeno, eliminando este



intermediario que es fundamental para dicha oxidación (Unnikrishnan y Rao 1995). El daño que se produce en las biomacromoléculas, por unión covalente con electrófilos o por la abstracción de protones que ocasionan los radicales, conduce a la pérdida de su actividad biológica (Nelson y Pearson 1990); que a su vez puede llevar a la muerte celular.

El incremento del calcio intracelular y la depleción del ATP son factores importantes implicados en la muerte celular (Nicotera y cols. 1990). Además, el daño de las membranas plasmáticas debido a la peroxidación lipídica y a la producción de proteínas carbonilo produce un aumento en la concentración de calcio citosólico que puede activar proteasas, fosfolipasa y endonucleasas que rompen los constituyentes celulares críticos, tales como el citoesqueleto, las membranas plasmáticas y el DNA.

Por otra parte, la xantina deshidrogenasa celular se puede convertir en xantina oxidasa gracias a la acción de una proteasa que se activa cuando aumentan los niveles de calcio (Waud y Rajagopalan 1976). La xantina oxidasa puede reducir directamente el oxígeno molecular y producir superóxido y peróxido de hidrógeno (Greene y Paller 1994). Todas estas alteraciones bioquímicas pueden aumentar los radicales libres de oxígeno en las células, y pueden conducir a muerte celular. En 1994 Lin y Shin observaron que la curcumina era capaz de inhibir la xantina oxidasa *in vitro*.

La curcumina se ha estudiado por su actividad antiproliferativa, antitumoral y anticancerosa. Se ha comprobado el efecto preventivo y curativo de la curcumina frente al cáncer y la formación de tumores. Los agentes estudiados han sido administrados oralmente, por inyección o probados en sistemas *in vitro*, y su actividad ha sido demostrada usando varios modelos y midiendo algunos marcadores enzimáticos. Mehta y cols. en 1997 demostraron un efecto antiproliferativo de la curcumina en



cultivos de células de tumor de mama. Verma y cols. en 1998 han comprobado que la combinación de curcumina con isoflavonoides tiene un efecto preventivo y terapéutico en el cáncer de mama y de pulmón inducido por agentes estrogénicos, como algunos pesticidas químicos, y que este efecto es mayor que el que produce la curcumina por sí sola. También se ha estudiado el efecto citoprotector y quimioprotector de la curcumina mediante un mecanismo apoptótico como explicación de la actividad antitumoral.

Posteriormente, en 1998 Thresiamma y cols. comprobaron que la curcumina protege contra el daño cromosómico producido por las radiaciones en células de médula espinal. Además, la curcumina puede proteger el sistema de la glioxilasa contribuyendo a su actividad radioprotectora (Choudhary y cols.1999).

1.5.3-. Hidroxitirosol.

El hidroxitirosol (2-(3,4-dihidroxifenil)-etanol) (fig. 1.7) es un compuesto fenólico presente en la hoja del olivo (*Olea europaea* L., perteneciente a la familia botánica *Oleaceae*) y el aceite de oliva, con múltiples actividades biológicas entre las que destaca su actividad antioxidante pues es una de las más elevadas entre los polifenoles, siendo incluso superior a la de la vitamina E.

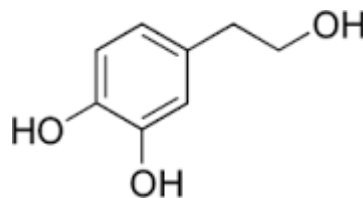


Fig. 1.7 Estructura química del hidroxitirosol (Chimi y cols. 1988)



El hidroxitirosol ha sido objeto de numerosos estudios debido a su potente actividad neutralizadora de radicales libres. Este sencillo compuesto fenólico se encuentra en gran cantidad tanto en la hoja de olivo como en sus preparados (extractos), en forma libre o esterificado como oleuropeína. Además, la composición cuantitativa de compuestos fenólicos en el olivo es el resultado de una compleja interacción entre diversos factores, incluyendo el clima, grado de maduración, cultivo, secado de la planta, etc. (Ryan y cols. 2003).

El hidroxitirosol es conocido por su elevada capacidad para frenar el estrés oxidativo y neutralizar los radicales libres (Chimi y cols. 1991). Diversos estudios han demostrado otras actividades biológicas, tales como antiagregante plaquetario (Petroni y cols. 1995), antioxidante de las lipoproteínas LDL (Visioli y cols. 1998) e inhibidor de las lipooxigenasas (implicadas en el proceso inflamatorio) (De la Puerta 1999), así como capacidad para inducir apoptosis en células HL-60 (Della y cols. 2000) y actividad in vitro contra bacterias Gram-negativo y Gram-positivo (Basignano y cols. 1999).

La capacidad de los agentes antioxidantes, como el Hidroxitirosol, ayuda a disminuir el daño oxidativo causado por la presencia de radicales libres.

Los compuestos fenólicos predominantes en el aceite de oliva virgen son tirosol e hidroxitirosol, seguidos de ácido caféico y oleuropeína. La influencia de la estructura química sobre la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido descrita en la literatura. Chimi y cols. 1988 mostraron que en oscuridad y a 50°C la capacidad antioxidante de dichos compuestos seguía el orden decreciente: hidroxitirosol > ácido caféico > oleuropeína > tirosol.



Los radicales libres son moléculas que presentan una gran capacidad oxidante y que generalmente dan lugar a reacciones en cadena oxidativa en las que, a su vez, se van formando otros radicales con gran capacidad oxidante. La actividad antioxidante determina la capacidad que tiene una molécula para introducirse en una cadena oxidativa y eliminar de la misma dichos radicales, poniendo fin a dicha cadena.

Los test *in vitro* realizados sobre la eliminación de anión superóxido mostraron una elevada capacidad para el hidroxitirosol. Es importante destacar en este punto la ineficacia de antioxidantes como la vitamina E frente a la producción de radical superóxido (Visioli y cols. 1998).

Otro método por el que se ha determinado la actividad antioxidante de los polifenoles procedentes del fruto de olivo es el ataque por radicales hidroxilo sobre el ácido salicílico. En este ensayo, la IC50 más baja resultó ser la del hidroxitirosol (1,34 mM), lo que indicó mayor potencia antioxidante que la vitamina E como Trolox (12,24 mM) e incluso que el DMSO (2,30 mM) (Owen y cols. 2000).

Todos estos datos *in vitro* se ven confirmados *in vivo* (en humanos y ratas) al estudiar la excreción urinaria de la 8-iso-PGF2 α , un biomarcador del estrés oxidativo. Dichos estudios mostraron una correlación inversa dosis-dependiente entre la excreción urinaria de la prostaglandina y la cantidad administrada de compuestos fenólicos provenientes de aceite de oliva (Visioli y cols. 2000).

En resumen, numerosos estudios han demostrado *in vitro* la enorme capacidad antioxidante del hidroxitirosol, superior incluso a la de las vitaminas C y E. Esta capacidad puede ser beneficiosa en patologías relacionadas con el estrés oxidativo.



En la patogénesis de la aterosclerosis, existen evidencias del papel desempeñado por la peroxidación de lipoproteínas. Cuando las LDL son modificadas por peroxidación, pueden actuar sobre receptores de superficie de macrófagos y monocitos, lo que conduce a la formación de depósitos grasos que a su vez conducirán a la formación de ateromas (Steinbrecher y cols. 1990).

Estudios realizados en rata mostraron que aquellas tratadas con una dieta rica en aceite de oliva presentaban una mayor resistencia a la peroxidación lipídica *in vivo*. Más aún, la fracción lipoproteica (VLDL+LDL) plasmática de este grupo de ratas mostró una mayor resistencia a la oxidación *in vitro* que aquellas sometidas a otras dietas (Scaccini y cols. 1992).

Igualmente existen evidencias procedentes de estudios en humanos y en animales de que los leucocitos polimorfonucleares, están involucrados en el desarrollo de enfermedades coronarias, anginas y otras secuelas de la aterosclerosis. La localización y la activación de estas células están controladas localmente por mediadores tales como el leucotrieno B₄, generado por la 5-lipooxigenasa. Se ha probado que esta enzima es inhibida por los compuestos fenólicos del aceite de oliva, con una efectividad del 35-100% para concentraciones de 200 μ M, y con valores de EC₅₀ de 15, 20, 80, y 500 μ M para hidroxitirosol, ácido cafeico, oleuropeína y tirosol, respectivamente (De la Fuente y cols. 2004).

Se ha demostrado que el hidroxitirosol se presenta como un buen candidato para ser empleado como agente antimicrobiano contra bacterias patógenas en seres humanos, obteniéndose concentraciones mínimas inhibitorias que van de 0,97 a 31,25 μ g/ml para cepas aisladas clínicamente, siendo en ocasiones efectivo a menor concentración que la eritromicina y la ampicilina (De la Fuente y cols. 2004).



Dentro del tratamiento del cáncer, la quimioprevención (administración de agentes químicos, tanto sintéticos como naturales, con el objeto de prevenir la carcinogénesis) está cobrando especial importancia últimamente. Entre los agentes capaces de disminuir la tasa de transformación celular maligna, los antioxidantes parecen ser especialmente prometedores. Estudios epidemiológicos indican que el aceite de oliva ejerce un remarcable efecto preventivo del desarrollo de cáncer de mama y colon. Diversos descubrimientos sugieren que la fracción polifenólica y más concretamente el 2-(3,4-dihidroxifenil)-etanol, es responsable de algunos de estos efectos beneficiosos. Se han obtenido datos según los cuales el hidroxitirosol inhibe el 100% de la proliferación celular de células HL60 a concentraciones de 100 μM e induce la apoptosis en más de un 65% de las células estudiadas en 24 h. Estos resultados contrastan con la débil actividad inductora de apoptosis observada en el tirosol, análogo del hidroxitirosol que carece del grupo hidroxilo en posición orto (De la Fuente y cols. 2004).

1.5.4-. Melatonina.

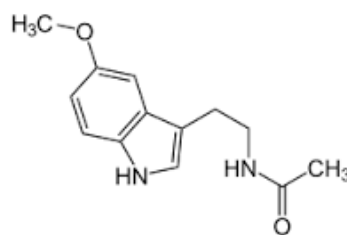


Fig. 1.8 Estructura química de la melatonina (Guerrero y cols. 2007).

La melatonina (N-acetyl-5-metoxitriptamina) (fig. 1.8) es una hormona que se sintetiza a partir del triptófano en la glándula pineal. Una vez sintetizada se secreta a sangre, penetrando en diversos fluidos



corporales como el líquido cefalorraquídeo, ya que al ser una molécula lipofílica atraviesa la barrera hematoencefálica. La melatonina es una hormona involucrada en la regulación del eje neuroendocrino es un secuestrador de radicales libres y un antioxidante altamente eficiente. Cuando se ha administrado la melatonina antes de la exposición de los ratones a la radiación, esta ofrece una radioprotección significativa (Malhotra y cols. 2004).

La melatonina regula los ciclos biológicos que participan en procesos fundamentales fisiológicos y fisiopatológicos del organismo como por ejemplo el control del sueño, la producción y secreción de otras hormonas (hipofisarias, testosterona por el testículo, cortisol por la suprarrenal), los ciclos reproductivos estacionales y de neurotransmisores, la modulación del sistema inmunitario, del metabolismo óseo, la función cardiovascular, la fisiología gastrointestinal, la protección contra el daño oxidativo y la inhibición de varios tumores (Reiter y cols. 2010).

La melatonina se evidencia que no es una hormona en el sentido clásico, sino que actúa como un protector celular debido a (Hardeland y cols. 2007):

1. No se sintetiza en un órgano específico. Se sabe que las enzimas requeridas para la biosíntesis de la melatonina se encuentran en otros tejidos además del la pineal. Diversos de estos tejidos, entre los cuales están la retina, el bazo, el timo, los linfocitos B, el ovario, el testículo y el intestino, producen melatonina. De todas formas, la melatonina circulante deriva esencialmente de la producida por la pineal, que pasa tanto a la circulación cerebral y sistémica, como al líquido cefalorraquídeo. La melatonina extrapineal es producida por órganos específicos para su uso y no sale a la circulación.



2. No actúa en un órgano diana específico. La melatonina alcanza todos los tejidos de la economía y, al ser altamente lipofílica, puede actuar a todos los niveles de la célula (Acuña-Catroviejo y cols. 2002).

La melatonina actúa a través de receptores localizados en la membrana de las células aunque los efectos anti-oxidantes los ejerce directamente neutralizando los radicales libres y protegiendo de esta manera el ADN del daño oxidativo sin la participación de receptores. Se han descrito dos receptores de melatonina, (MT1 y MT2). Dependiendo del tipo de célula, estos receptores activan una serie de segundos mensajeros que actúan sobre determinados genes en el núcleo que participan en la inhibición de los procesos inflamatorios y en la estimulación de enzimas anti-oxidativas (Malhotra y cols. 2004).

La melatonina estimula el sistema inmunitario en los humanos y es un antioxidante natural con importantes propiedades anti-envejecimiento- (Srinivasen y cols. 2011). El progresivo deterioro del sistema inmunitario ocasionado por la disminución de los linfocitos B y T y por la disminución de la interleucina 2 se produce alrededor de los 60 años de edad.

El sueño es un requisito imprescindible para mantener el ritmo circadiano de secreción de melatonina. La elevación de los niveles de melatonina en la oscuridad contribuye significativamente al descenso de la temperatura corporal, al descenso de la tensión arterial sistólica y diastólica y a la propensión a dormir. Actualmente, la Academia Americana de Medicina del sueño recomienda la utilización de esta para el jet lag y otras situaciones que alteran el sueño por desajustes del ritmo circadiano (Morgenthaler y cols. 2007; Wasdell y cols. 2008; Reiter y cols. 2009).

En resumen, los efectos principales de la melatonina podrían clasificarse en:



1. Regulador del ritmo sueño/vigilia.
2. Antioxidante.
3. Antiinflamatorio; estimulante de las defensas inmunológicas. Además efectos oncostáticos, reduciendo la proliferación celular en el cáncer, y neuroprotectores
4. La melatonina actúa a través de una serie de mecanismos celulares como son: modulación del ciclo celular, inhibición de la proliferación, inducción de apoptosis, inhibición de la telomerasa, inhibición de la aromatasa, anti-angiogénesis, interferencia con el receptor de estrógenos, inhibición de las metástasis

Efectos antioxidantes de la melatonina, principal producto secretado por la glándula pineal, es un “scavenger” directo de radicales libres y un antioxidante indirecto. En términos de su actividad “scavenging” se ha mostrado como neutralizadora de los radicales hidroxilo, anión superóxido, oxígeno singlete, peróxido y anión peroxinitrito. Además, las acciones antioxidantes de melatonina probablemente se deriven de su efecto estimulador sobre superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y su acción inhibitoria sobre el óxido nítrico sintetasa.

Finalmente, actúa estabilizando membranas celulares, haciéndolas más resistentes al ataque oxidante, y está desprovista de acciones prooxidantes. En modelos de estrés oxidativo, la melatonina ha mostrado su resistencia a la lipoperoxidación inducida, lipopolisacáridos. En los seres humanos, la capacidad antioxidante total del suero es relacionada con los niveles de melatonina (Korkmaz y cols. 2009).

Se han indicado el descenso de los niveles de melatonina con la progresión de varios cánceres. Los tumores en los que se han estudiado los efectos de la melatonina son: mama, próstata, colorectal, ovario,



endometrio, linfomas y leucemia, pulmón, melanoma, sarcomas, hepatocarcinomas, carcinoma de piel, tumores neurales, cuello uterino y carcinomas laríngeos. En general, inhibe la proliferación celular, induce a la apoptosis (muerte celular programada), reduce la carcinogénesis y disminuye el crecimiento del tumor (Mediavilla y cols. 2010; Jung y Ahmad 2006; Mills y cols. 2005).

Seely y cols. revisaron en 2011 diferentes ensayos clínicos en los que se utilizaba melatonina asociada a quimioterapia o radioterapia como tratamiento de tumores sólidos con o sin metástasis. Se analizaron 3697 pacientes con cáncer de mama, colorrectal, pulmón, riñón, hígado y glioblastomas. Se observó que los pacientes que habían recibido melatonina tenían menor riesgo de mortalidad y mayor probabilidad de respuesta completa, respuesta parcial o estabilización de la enfermedad que los pacientes que no habían recibido melatonina. Además, los pacientes que habían recibido melatonina mostraron menor incidencia de efectos adversos producidos por la quimioterapia o la radioterapia.

Wang y cols. publicaron en 2012 una revisión de ensayos clínicos aleatorizados y controlados de pacientes con tumores sólidos en los que se utilizó melatonina con quimioterapia o radioterapia. La asociación de melatonina mostró respuesta objetiva (completa + parcial) en 33% de los casos, frente a 17% en los que no habían recibido. La incidencia de efectos adversos por la radioterapia o quimioterapia fue menor con melatonina trombopenia (2,2% versus 19,7%), neurotoxicidad (2,5% versus 15,2%) y fatiga (17,2% versus 49,1%).

Se han mostrado que la melatonina reduce la toxicidad de varios agentes quimioterápicos como el 5-fluoracilo, cisplatino, etopósido, antraciclinas. Se ha observado reducción estadísticamente significativa de la toxicidad neurológica, renal, cardíaca y de la médula ósea (Lissoni y



cols. 2003; Sánchez-Barceló y cols. 2010). La radiación rompe la estructura química de las moléculas produciendo radicales libres que reaccionan inmediatamente con las moléculas de la vecindad produciendo daño oxidativo. Se considera que el 60-70% del daño producido por la radiación en los tejidos se debe a los radicales libres y al daño oxidativo.

Una parte muy importante de ese daño se produce sobre la estructura del ADN (Hara y cols. 2001; Nahleh y cols. 1995; Vijayalaxmi y cols. 2004; Shirazi y cols. 2007).

Es un potente antioxidante que ejerce una triple acción:

- a- captando directamente los radicales libres
- b- incrementando la actividad de las enzimas antioxidativas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.)
- c- disminuyendo la actividad de las enzimas pro-oxidativas

El tratamiento con melatonina, actuando a nivel celular sobre los genes implicados en el reloj circadiano, ha sincronizado los ritmos alterados lo que puede ser potencialmente terapéutica en varios tumores. Por otro lado, la melatonina es la única molécula con propiedades tanto sobre el receptor de estrógenos como sobre las enzimas que participan en la síntesis de los estrógenos lo que le confiere ventajas potenciales en el tratamiento de los tumores hormono dependientes.

La baja toxicidad junto a los efectos antitumorales demostrados hace de la melatonina una molécula de gran interés en el tratamiento de tumores. La reducción de la toxicidad de los tratamientos oncológicos (quimioterapia y radioterapia).



Un artículo publicado en 2016 por Karaer y cols. sobre daño radioinducido sobre glándula salivar en ratas, evidencia que entre el grupo RT+Melatonina (administrada 30 min después de la radiación a 5mg/kg de peso) y el grupo RT (33Gy en 5 sesiones), existe en este último grupo de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$): mayor pérdida de densidad de acino, mayor inflamación de las células acinares, mayor vacuolización y mayor existencia de células polimorfonucleadas. Sin embargo, las diferencias acerca de la pérdida de estructura acinar y la cantidad de mastocitos no fueron estadísticamente significativas a favor del grupo con melatonina. Además presentaba menores tasas de marcadores de estrés oxidativo

Un artículo publicado en 2015 por Isola y Lilliu sobre la localización de la melatonina en glándulas salivares humanas, describieron mediante técnicas de inmunohistoquímica que la melatonina se localiza solo en células serosas, por lo que su presencia era sobre todo en la glándula parótida porque es una glándula en la que la totalidad del acino secretor es de tipo seroso. Menor cantidad en la glándula submaxilar y casi nada en glándulas salivares menores. La melatonina estaba localizada intracelularmente en pequeñas vesículas cerca de la membrana celular que se creía pasaba por difusión pasiva pero ellos además evidencian que es captada de la sangre mediante receptores proteína G transmembrana MT1 y MT2 para melatonina mediante activación de señales y que es secretada junto con otros productos a la saliva cuando estos gránulos se abren al conducto secretor bien de forma continuada por estímulos menores o bien por estímulos mayores como la masticación.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno,
Curcumina, Hidroxitirosol y
Melatonina sobre Glándula Parótida
de Ratas

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



2-. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

La radioterapia constituye hoy en día un pilar importante en el tratamiento oncológico. Su objetivo es administrar cada vez dosis mayores en los tejidos tumorales, cuanto mayor sea la dosis administrada en un tumor, mayor será la probabilidad de control local. Pero esta escalada de dosis está condicionada por la lesión que la radioterapia produce en los tejidos sanos (Cox 1995; Trotti y cols. 2000).

Hoy en día, la tecnología nos permite mejorar notablemente el índice terapéutico, gracias a una mejor definición de los volúmenes tumorales y de los órganos críticos con el empleo de herramientas de imagen (TC, Resonancia Magnética), y la incorporación de la tomografía por emisión de positrones (PET). El siguiente paso tecnológico lo representa la radioterapia de dosis de intensidad modulada (IMRT), que supone la máxima exactitud en cuanto al depósito de dosis a nivel del tejido tumoral con la mayor protección posible del tejido sano adyacente (Cox 1995; Trotti y cols. 2000).

Por otro lado, es de gran interés poder modificar la respuesta biológica a la irradiación para mejorar el citado índice terapéutico. Por esta razón, es de especial importancia la utilización de sustancias radioprotectoras para la protección de los tejidos sanos, de modo que se disminuyan los efectos secundarios producidos por la inclusión de tejidos sanos en los volúmenes del tratamiento radioterápico.

El tratamiento de radioterapia aplicado en zona de cabeza y cuello puede provocar efectos secundarios en el organismo. La radiación ionizante en las glándulas salivales produce efectos inflamatorios y degenerativos en el parénquima de las glándulas salivales, especialmente en las células acinares serosas. La respuesta temprana del tejido de la glándula salival a la radiación produce una disminución de las tasas de



flujo salival en la primera semana de tratamiento y la xerostomía se hace evidente; esta disfunción salival resultante puede implicar infecciones orales, caries dentales, y dificultades para comer, algunos de los cuales persistir mucho tiempo después del final del tratamiento, incluso permanentemente (Nagler 1998; Boraks y cols. 2008).

El tratamiento con radiaciones ionizantes siempre se preconiza de que el beneficio que el paciente recibe es mayor que el riesgo al que se expone, es un reto para la ciencia intentar paliar los efectos adversos, por este motivo, el intento de utilizar sustancias radioprotectoras (Nagler 2002; Jagetia y cols. 2004; Aftab y cols. 2010).

El papel de los compuestos radioprotectores es muy importante en la clínica, por lo tanto la búsqueda de nuevos compuestos y el estudio de sus mecanismos de acción constituyen una vía para desarrollar metodologías más efectivas (Hosseinimehr 2007; Weiss y Landauer 2003).

Los radioprotectores pueden ejercer su acción por distintos mecanismos :

1-. Supresión de la formación de especies reactivas que puedan interferir en la distribución de oxígeno a los tejidos irradiados. Este tipo de acción suelen ser realizados por los compuesto sulfhidrilos.

2-. Eliminación de las radicales libres inducidos por la radiación, ejercido por las sustancias antioxidantes.

3-. Interacción con blancos celulares, como el ADN, y prevenir el daño de la radiación.

4-. Recuperación y reparación celular (cadena simple de ADN).



Los radioprotectores disminuyen el daño a los tejidos sanos sin ejercer acción citoprotectora sobre los tumores. Dentro de los productos de origen natural, aquellos que proceden de sustancias naturales han mostrado gran efectividad como radiomoduladores y su futuro parece bastante prometedor ya que los daños provocados por los radicales libres producidos por la radiación ionizante también pueden ser modificados por compuestos derivados de las plantas (Inano y cols. 2000; Jagetia 2007).

En la actualidad no hay ningún agente radioprotector que posea todos los prerequisites de un *radioprotector ideal*: que no produzca toxicidad acumulativa o irreversible, que ofrezca una protección a largo plazo; y que proteja contra los efectos agudos y crónicos de diferentes tipos de radiación además de que sea fácilmente administrable.

Los objetivos de este trabajo se plantearon teniendo en cuenta la siguiente hipótesis basada en que la incorporación en los protocolos de irradiación de cantidades terapéuticas de licopeno, curcumina, hidroxitirosol y melatonina en el tejido glandular parotídeo en ratas Sprague Dawley inhibirá el daño en las glándulas parótidas.

Los objetivos de este trabajo se subdividen en dos niveles: Un objetivo general que pauta la línea general del estudio, y unos objetivos más específicos que desarrollan aspectos más concretos y que se desarrollan a partir del objetivo general.

El objetivo general de esta tesis es la evaluación del efecto radioprotector de la melatonina, curcumina, hidroxitirosol y licopeno en las glándulas parótidas de ratas Sprague Dawley a dosis única de 20Gy de radiación.

A continuación se ordenarán los objetivos específicos que se desarrollan a partir del objetivo general. A partir del estudio de ellos podremos llegar al planteamiento del primero.



1. Analizar las variables histopatológicas en las glándulas parótidas: necrosis celular, pérdida de estructura acinar, daño de conductos y vacuolización en cada uno de los grupos de estudio.
2. Determinar los valores histomorfométricos, el área y perímetro de los acinos de la glándula parótida en ratas Sprague Dawley tratadas con licopeno, curcumina, hidroxitirosol y melatonina.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno,
Curcumina, Hidroxitirosol y
Melatonina sobre Glándula Parótida
de Ratas

MATERIAL Y MÉTODOS



3-. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1-. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

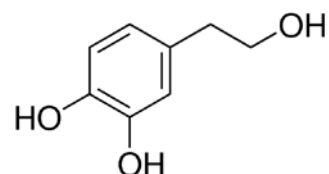
Los animales de experimentación utilizados en este estudio fueron obtenidos del animalario del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia. Se emplearon un total de 30 ratas Sprague Dawley hembras con un peso medio de 249,87 gr (rango 210-382 gr). Antes de iniciar el estudio, se aclimató a los animales durante dos semanas mediante su estabulación en cajas de 480 x 270 x 200 cm cada una, en grupos de 3 animales. Las condiciones ambientales se mantuvieron de forma constante a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a temperatura ambiente, con acceso ad libitum al agua y comida comercial estándar para ratas para experimentación (Panlab ® , Barcelona, España) en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia (SAI; nº REGAES 300305440012).

Los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la normativa sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos siguiendo las normas de la Unión Europea 86/609/CEE, 2010/63/EU.

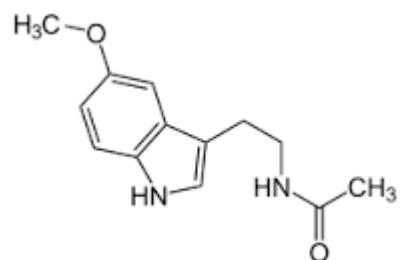




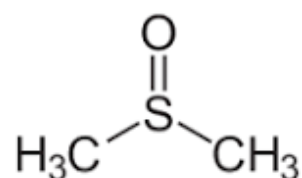
➤ Concentrado de **Hidroxitirosol** 98% de pureza (Sigma-Aldrich Química, S.A. Madrid, España).



➤ **Melatonina** polvo 98% de pureza (HPLC) (Sigma-Aldrich Química, S.A. Madrid, España).



➤ **Dimetilsulfoxido (DSMO)** a concentración 2M.





El dimetilsulfóxido (DMSO, CH_3SOCH_3) es una molécula anfipática, con un grupo altamente polar y dos grupos no-polares. Esto hace que sea soluble tanto en agua como en medios orgánicos. Debido a estas propiedades físico-químicas el DMSO es un disolvente muy eficaz para componentes hidrófobos e hidrófilos. Fue descubierta por Saytzeff en 1866, pero no fue hasta la década de 1960 cuando se empezaron a conocer sus propiedades biológicas.

Tiene la propiedad de atravesar la barrera hemato-encefálica, lo que lo convierte en un extraordinario transportador de medicamentos (Alamar y Olaya 2012).

Nosotros hemos utilizado el DMSO como transportador de todos los antioxidantes usados en los diferentes grupos para facilitar su biodisponibilidad. Además lo hemos utilizado de forma aislada en un grupo del estudio para estudiar su comportamiento con respecto al resto.

3.3-. IRRADIADOR.

Equipo de rayos X modelo Smart 583 E, con un tubo de rayos X modelo Smart 200 E (200 kV y 4'5 mA) YXLON Internacional AS, Copenhague, Dinamarca.





Servicio de Radioprotección y Residuos del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación), de la Universidad de Murcia.

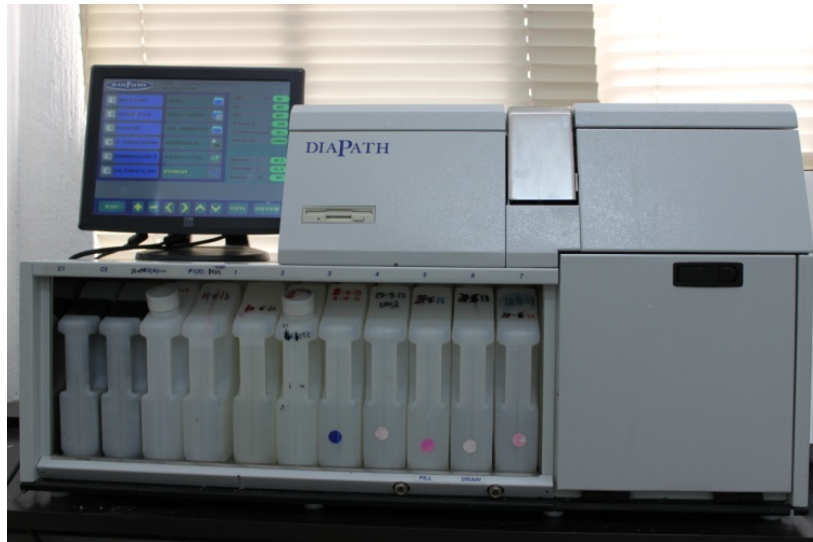


3.4-. MICROSCÓPICO ÓPTICO.



El estudio microscópico y microfotográfico se realizó con un microscopio LEICA DM 4000 B. Wetzlar. Alemania.

3.5-. PROCESADOR.



Procesador de tejidos Tisbe. Diapath, Spa. Italia.

3.6-. MICROTOMO.



Microtomo Microm HM355S. Thermo Scientific.



3.7-. DISEÑO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL.

30 animales fueron divididos en 6 grupos (utilizando una lista de aleatorización generada software <http://www.randomization.com>).

En total 58 parótidas fueron estudiadas debido a la pérdida de 2 muestras en el grupo control durante el procesado.

Grupo I (n=10) Curcumina + irradiación
Grupo II (n=10) Licopeno+ irradiación
Grupo III (n=10) DMSO+ irradiación
Grupo IV(n=10) Melatonina + irradiación
Grupo V (n=10) Hidroxitirosol+ irradiación
Grupo VI (n=8) irradiación RT

3.8-. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

3.8.1-. Irradiación.

Los animales fueron previamente anestesiados mediante una mezcla de Ketamina (Imalgene ® 1000) y Xilacina (Xilagesic ® 2%) al 50% administrada por vía intramuscular en dosis de 0,1ml/100g. Hipnótico de acción rápida y potente analgésico, de escasa acción como relajante muscular. No causa depresión respiratoria ni tiene efectos acumulativos, consiguiendo una acción anestésica suficiente.



Grupo I (n = 10), tratadas con Curcumina a dosis de 50 mg/kg de peso corporal, administrado por vía intraperitoneal + irradiación (según Jagetia y cols. 2007) disueltos en 0,5 ml de DMSO 2M.

Grupo II (n = 10), tratadas con Licopeno a dosis de 20 mg/kg de peso corporal administrado por vía intraperitoneal + irradiación (según Srinivasan y cols. 2009) disueltos en 0,5 ml de DMSO 2M.

Grupo III (n = 10) tratadas con DMSO administrado por vía intraperitoneal + irradiación. 0,5 ml de concentración 2M (según Raju y cols. 1996).

Grupo IV (n = 10), tratadas con Melatonina a dosis de 100 mg/kg de peso corporal administrada vía intraperitoneal + irradiación (según Serin y cols. 2007) disueltos en 0,5 ml de DMSO 2M.

Grupo V (n=10), tratadas con Hidroxitirosol a dosis de 20 mg/kg de peso corporal administrado por vía intraperitoneal + irradiación (según Capasso y cols. 2008) disueltos en 0,5 ml de DMSO 2M.

Grupo VI (n=8), sin tratamiento con ningún antioxidante, solo irradiación.

Todos los compuestos se administraron 24 horas antes de la irradiación.

La irradiación se realizó en una única sesión a dosis de 20 Gy y a una profundidad de 3 cm, a una distancia de 100 cm de la piel.

3.8.2-. Sacrificio y toma de muestras.

Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la irradiación, usando una cámara de CO₂. Posteriormente, se procedió a la



necropsia con la extracción de ambas parótidas en cada animal para su procesado histológico.

DISEÑO DEL ESTUDIO



3.9-. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.

Las muestras obtenidas se fijaron en formol neutro tamponado al 10% para posteriormente ser embebidas en parafina y cortadas mediante microtomo en secciones de 5mm de espesor en un plano perpendicular a la incisión. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina por el método habitual en la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia. Las preparaciones histológicas fueron estudiadas por dos observadores cegados a la asignación de los grupos de cada espécimen. Las alteraciones morfológicas evaluadas fueron las siguientes: necrosis, pérdida de la estructura acinar, daño a los conductos y vacuolización de las glándulas salivales. Para cada uno de estos parámetros se concedió una puntuación del 1 al 4 según la intensidad observada: 1 = nada, 2 = leve, 3 = moderado, y 4 = grave.



Criterios valoración histopatológica

Necrosis celular	(1 = nada, 2 = leve, 3 = moderado, y 4 = grave)
Pérdida de la estructura acinar	(1 = nada, 2 = leve, 3 = moderado, y 4 = grave)
Daño conductos	(1 = nada, 2 = leve, 3 = moderado, y 4 = grave)
Vacuolización glándulas salivales	(1 = nada, 2 = leve, 3 = moderado, y 4 = grave)

Definición de las diferentes variables a estudio:

Necrosis Celular: es sinónimo de muerte celular. Es un proceso irreversible.

Perdida de Estructura Acinar: se refiere a la alteración de la morfología del acino.

Daño de Conductos: se refiere a la existencia de afectación de conductos excretores y secretores.

Vacuolización: se refiere a la formación de cavidades o vacuolas en el citoplasma celular.



A continuación se muestran imágenes histopatológicas de los diferentes grupos de estudio en hematoxilina-eosina a 40x.

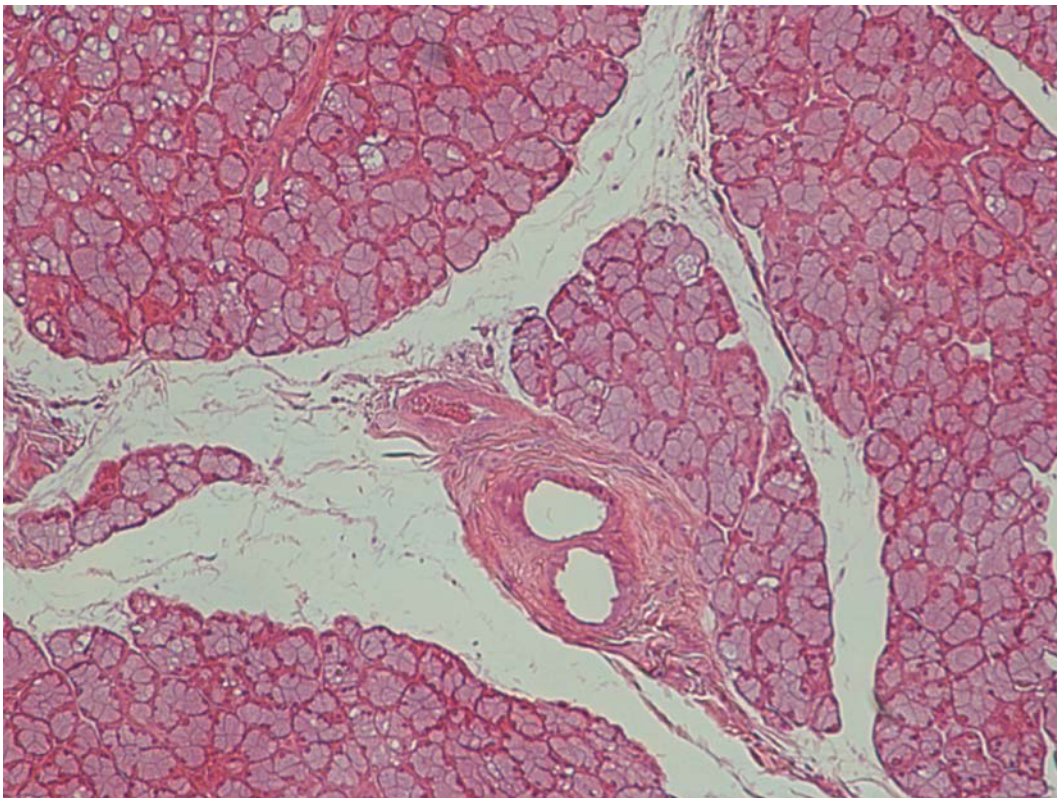


Fig. 3.1. Tinción glándula parótida con hematoxilina y eosina (40x). Grupo I: Curcumina + RT.

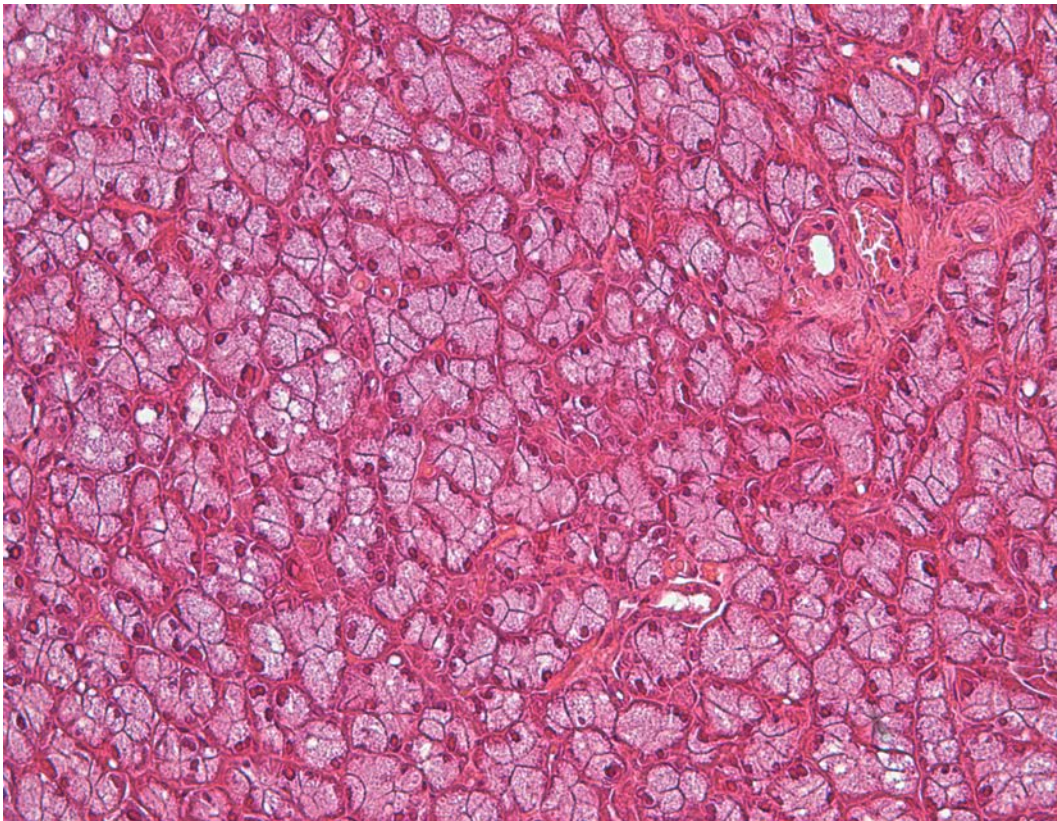


Fig. 3.2. Tinción glándula parótida con hematoxilina y eosina (40x). Grupo II:
Licopeno + RT.

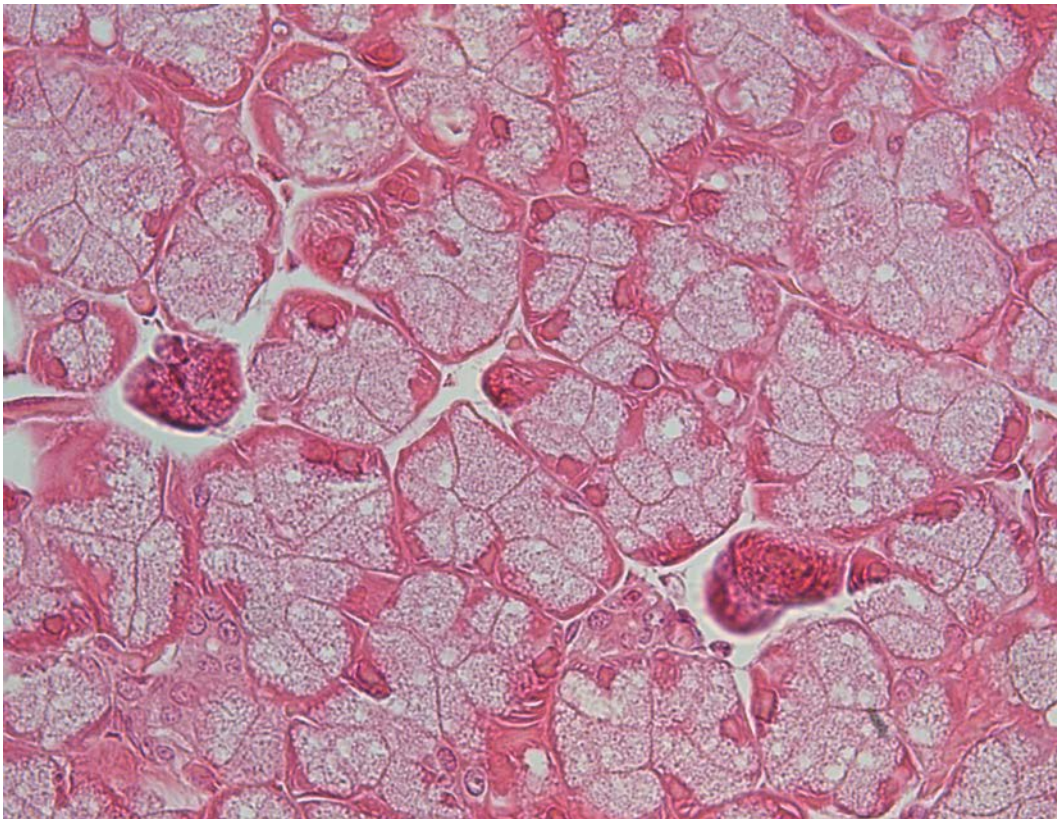


Fig. 3.3. Tinción glándula parótida con hematoxilina y eosina (40x). Grupo III: DSMO + RT.

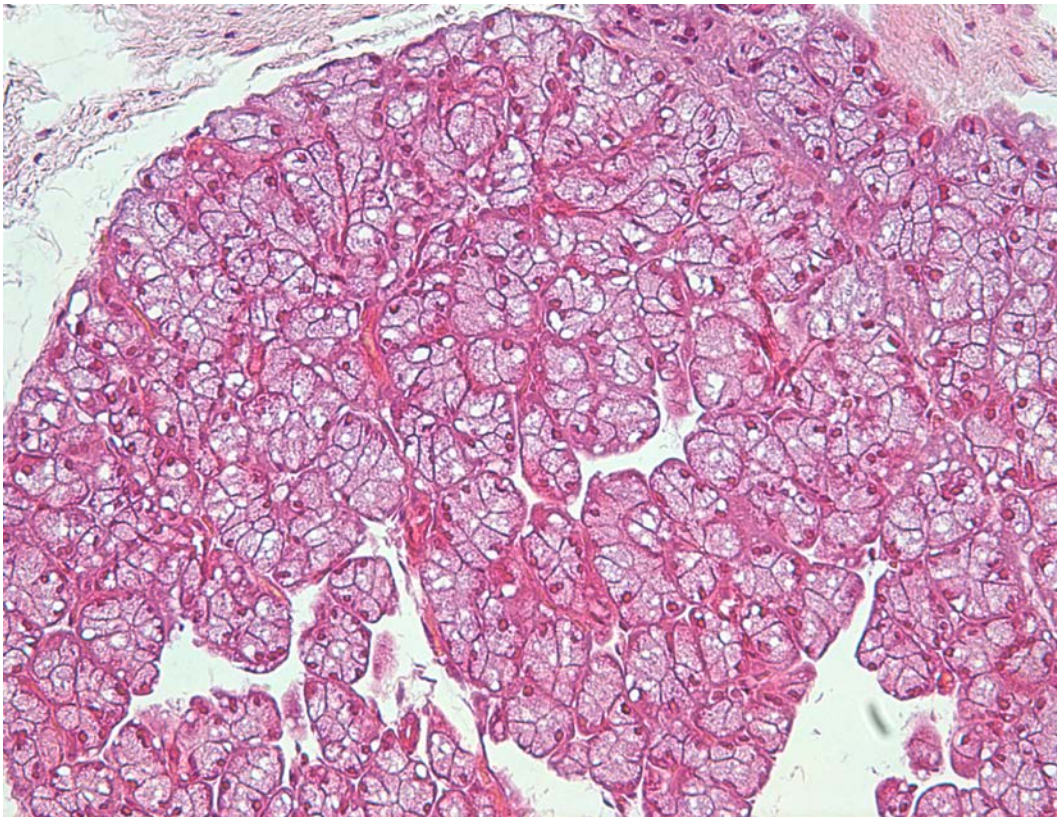


Fig. 3.4. Tinción glándula parótida con hematoxilina y eosina (40x). Grupo IV: Melatonina + RT.

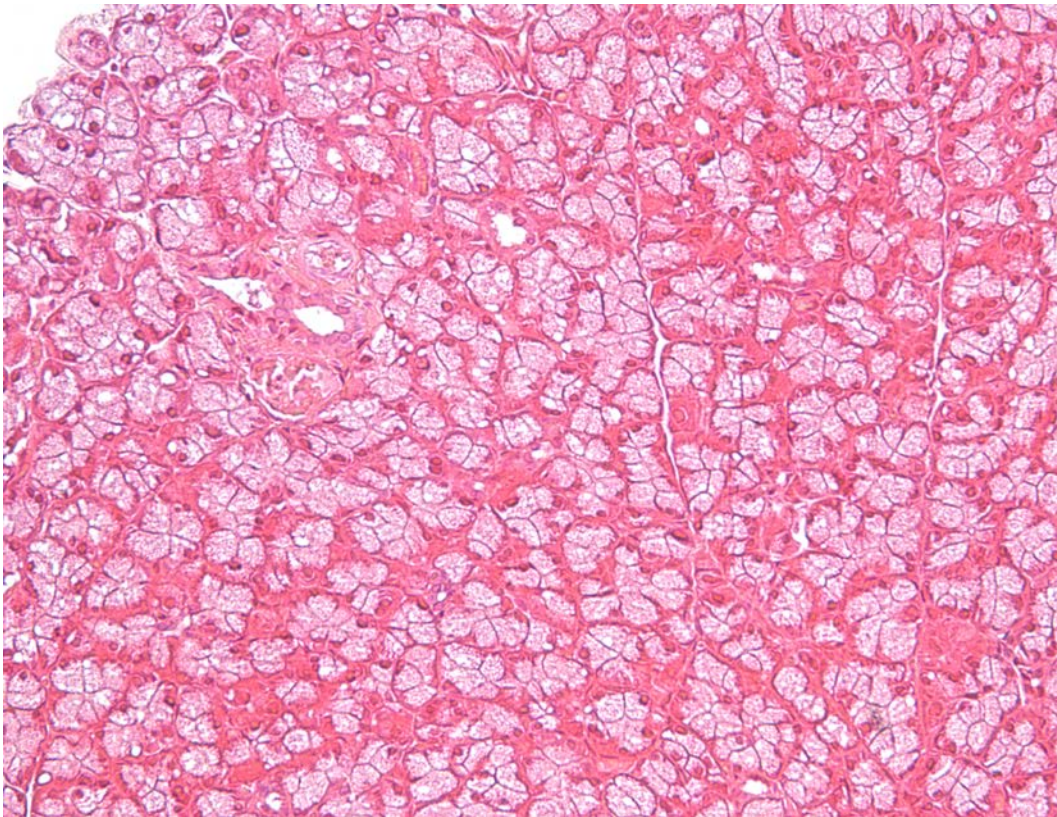


Fig. 3.5. Tinción glándula parótida con hematoxilina y eosina (40x). Grupo V: Hidroxitirosol + RT.

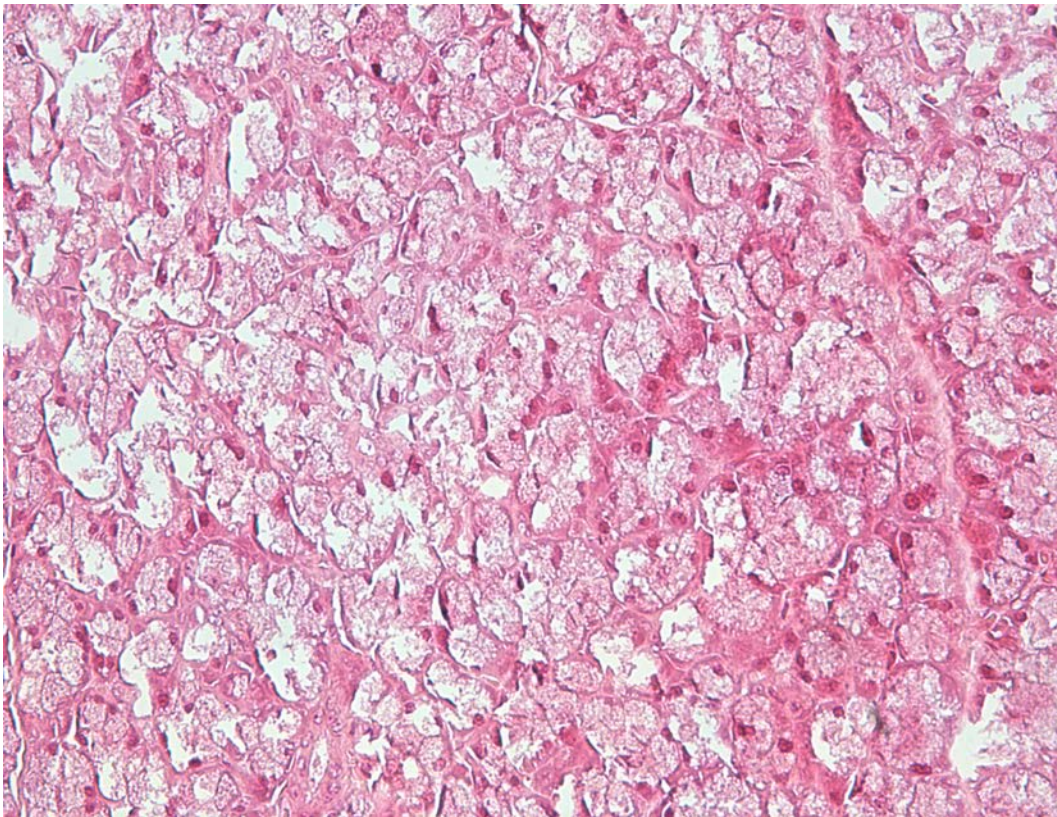


Fig. 3.6. Tinción glándula parótida con hematoxilina y eosina (40x). Grupo VI: RT.

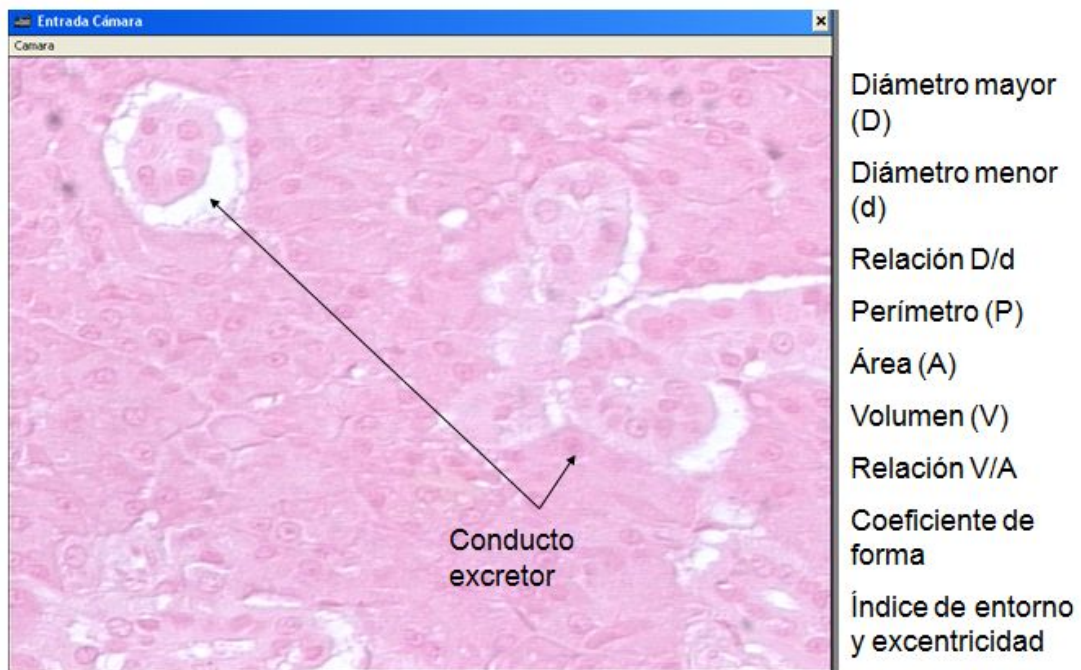


3.10-. ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO.

Con la finalidad de evaluar cuantitativamente las alteraciones celulares ocurridas en los adenómeros de las glándulas salivales parotídeas, fueron usadas técnicas morfológicas de análisis de imagen (histomorfometría). Las mediciones fueron realizadas en el Servicio de Análisis de Imagen del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia (Edificio de Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales, SACE). Fueron estimados los siguientes parámetros citométricos: diámetros mayor (D), menor (d) y medio (M), relación D/d, perímetro (P), área (A), volumen (V), relación V/A, coeficiente de forma, índice de contorno y excentricidad (Sala y cols. 1994).

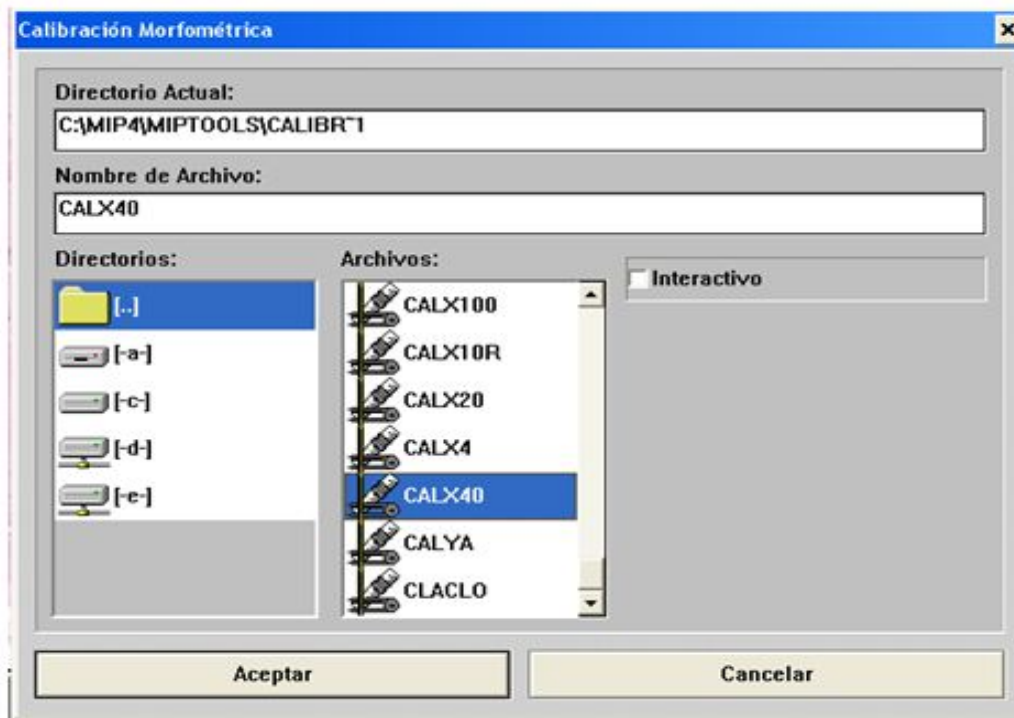
Para ello, las preparaciones histológicas fueron previamente digitalizadas utilizando el equipo Leica SCN 400F (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se tomaron imágenes de 8 bits a 40x de áreas con abundancia de acinos. Las imágenes se visualizaron utilizando la aplicación web Digital Image Hub (Slidepath, Leica microsystems). Esta aplicación nos permite acceder en remoto a las imágenes de alta resolución y obtener capturas de las áreas de interés. A continuación, se realizaba una calibración morfológica para obtener la equivalencia entre píxel y micrómetros. Posteriormente, de forma interactiva con el ratón, se trazaban los diámetros mayor y menor de cada acino y se dibujaba su contorno del mismo modo. El programa informático realizaba los cálculos pertinentes para obtener los parámetros a estudio, que eran recogidos en una base de datos.

A continuación se muestran los pasos a seguir, a modo de ejemplo, para la medida histomorfométrica de un conducto excretor:



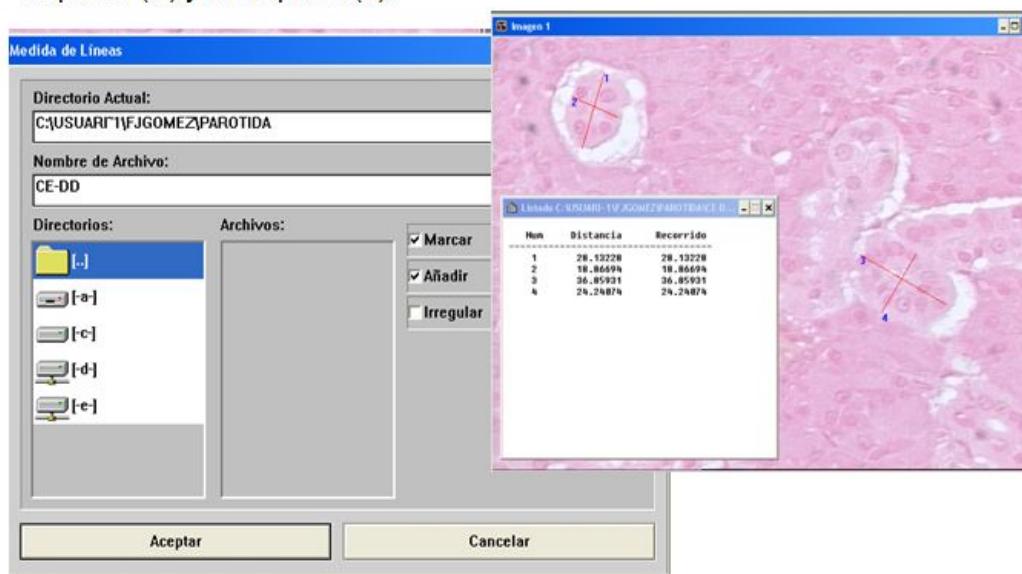


Calibración 40X



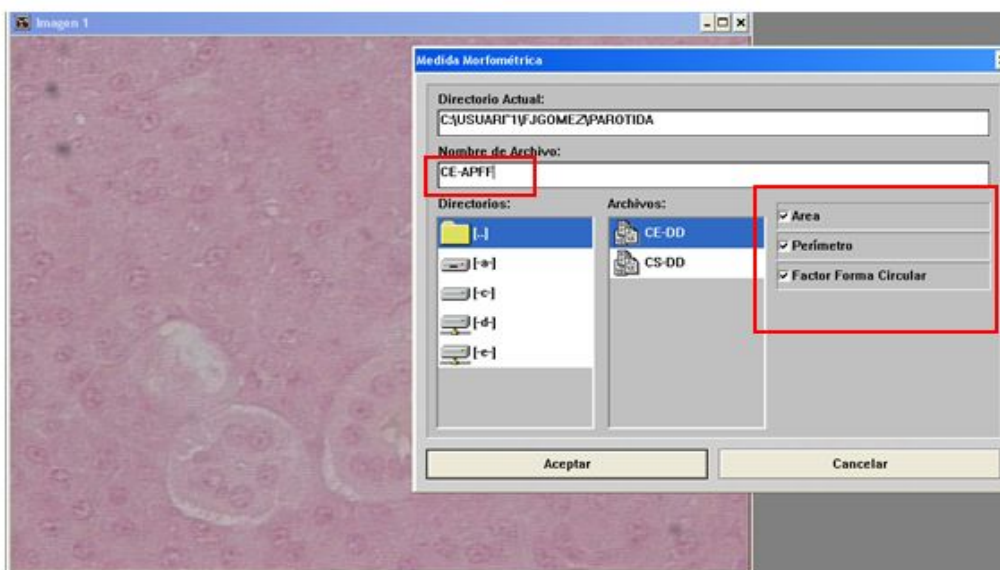
Medida de Diámetro mayor y menor **CONDUCTOS EXCRETORES** (Archivo **CE-DD**)

Mido primero el mayor y luego el menor, de tal forma que los medidas van en parejas (D-d, para el mismo conducto) 1-2, 3-4, 5-6, 7-8... siendo los números impares (D) y los pares (d).

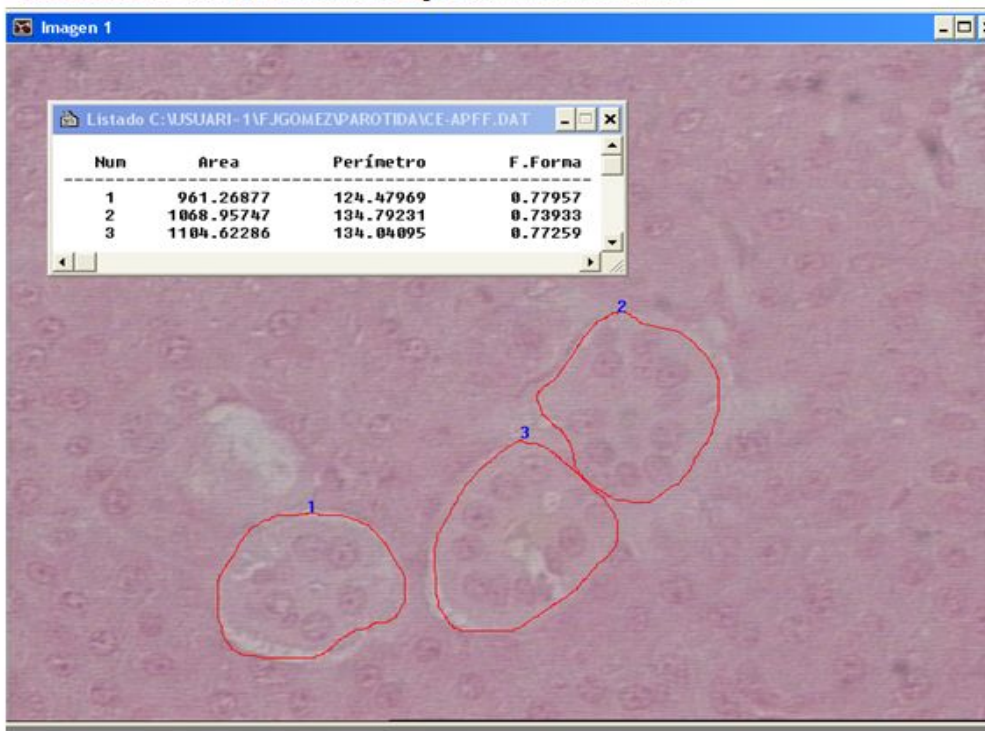




Medida de área, Perímetro y Factor de forma CONDUCTOS EXCRETORES (Archivo_CE-APFF)



Medida de área, Perímetro y Factor de forma

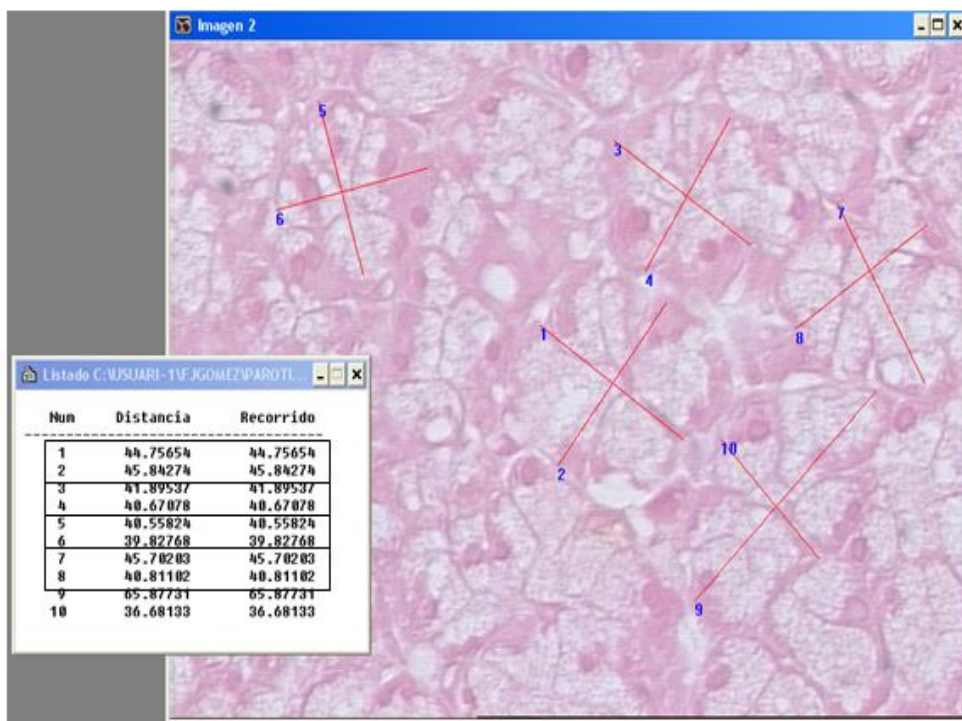




Medida de Diámetro mayor y menor **CONDUCTOS SECRETORES** (Archivo_CS-DD)

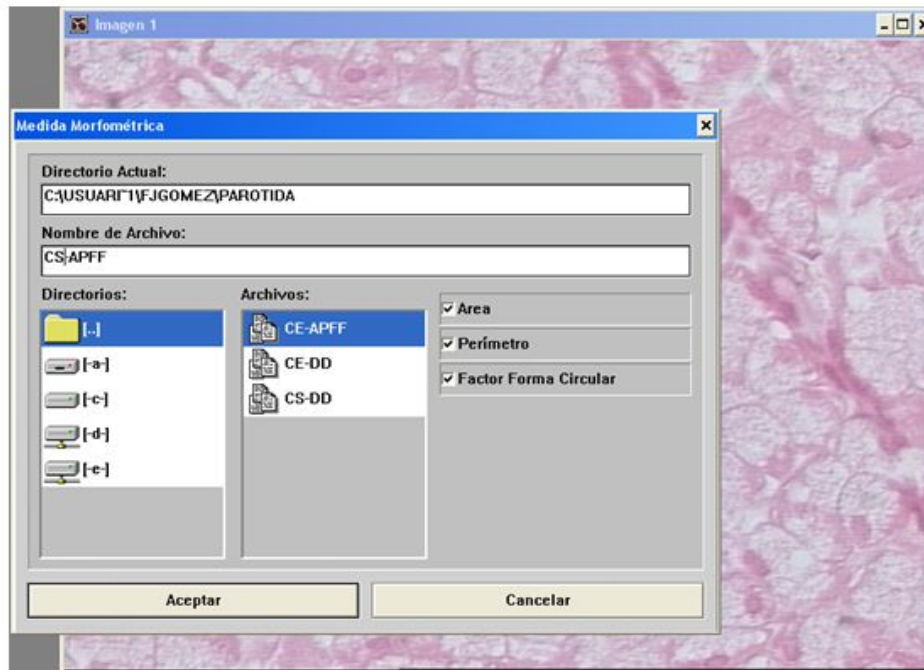
Mido primero el mayor y luego el menor, de tal forma que los medidas van en parejas (D-d, para el mismo conducto) 1-2, 3-4, 5-6, 7-8...siendo los números impares (D) y los impares (d).

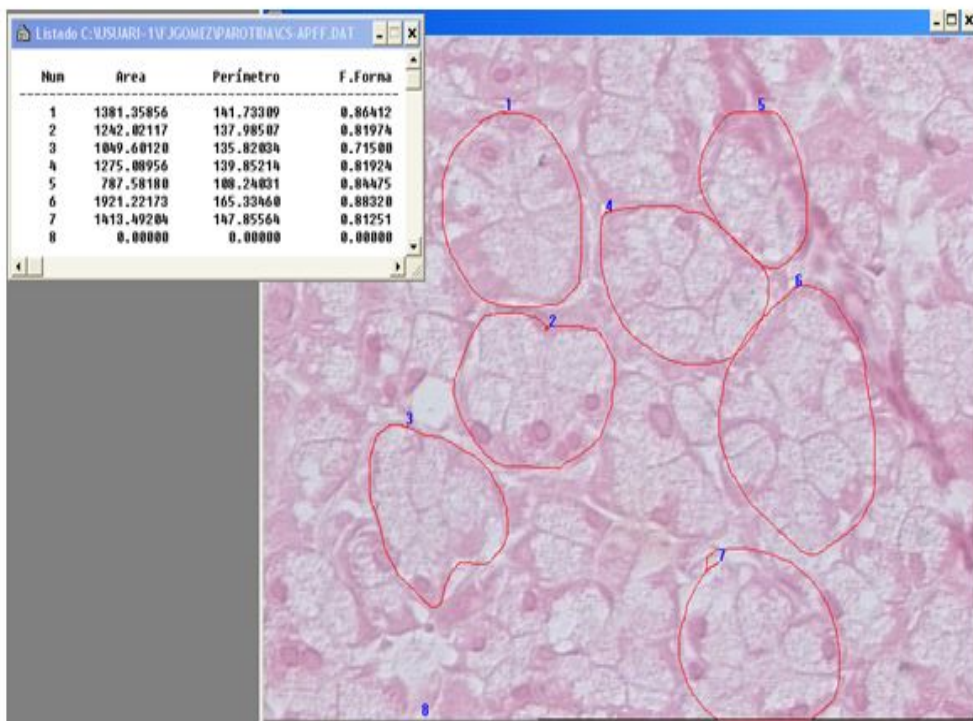






Medida de área, Perímetro y Factor de forma CONDUCTOS SECRETORES (Archivo_CS-APFF)







3.11-. MÉTODO ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico descriptivo de la muestra se han empleado los métodos descriptivos básicos, de modo que, para las variables cuantitativas del estudio histomorfométrico se han usado los valores mínimo, máximo, media, desviación típica y para las variables cuantitativas del estudio histopatológico, la mediana y el rango intercuartílico (RI).

El test ANOVA se ha empleado para el caso de más de dos grupos una vez comprobados los supuestos de normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov y el de homogeneidad con el test de Levene. En los casos en los que las diferencias resultaron significativas se han realizado las comparaciones dos a dos de Tukey para contrastar qué grupos de tratamiento son los responsables de las diferencias.

En caso de incumplimiento del supuesto de homogeneidad, se efectuó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En los casos en los que las diferencias han resultado significativas se ha realizado las comparaciones dos dos mediante el test no paramétrico U Mann-Whitney para contrastar qué grupos de tratamiento son los responsables de las diferencias.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 22.0 para Windows. Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya $p \leq 05$.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno, Curcumina, Hidroxitirosol y Melatonina sobre Glándula Parótida de Ratas

RESULTADOS



4- RESULTADOS.

4.1. Análisis de las variables histopatológicas de las glándulas parótidas.

Las parótidas irradiadas presentaban adenómeros de pequeño tamaño y conductos de paredes más delgadas y estriaciones menos evidentes, respecto a las parótidas sanas. Aunque no han sido medidos, los núcleos de las células acinares también eran de pequeño tamaño. En la Tabla 4.2.1 se muestran los resultados para las variables histopatológicas de las glándulas parótidas en función del grupo experimental.

Respecto a la **necrosis celular**, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,048$), de forma que las áreas necróticas parotídeas en los grupos de animales tratados con curcumina y con melatonina, fueron significativamente menores que las observadas en el grupo control ($p=0,008$ y $p=0,010$ respectivamente). Entre los grupos tratados no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) para esta variable.

En cuanto a la **pérdida de estructura acinar**, también existían diferencias significativas entre de los grupos ($p=0,029$), de forma que en el grupo control, la alteración de los adenómeros glandulares fue significativamente superior respecto al resto de grupos experimentales: curcumina ($p=0,020$), licopeno ($p=0,020$), melatonina ($p=0,002$), DMSO ($p=0,020$) e hidroxitirosol ($p=0,035$). Entre los grupos tratados con antioxidantes/dmsol no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$).



El **daño en los conductos** también mostró diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ($p=0,001$). Así, la degeneración de conductos glandulares observada en el grupo control, fue significativamente más severa respecto al resto de grupos: curcumina ($p=0,003$), licopeno ($p=0,006$), melatonina ($p<0,001$), DMSO ($p=0,001$) e hidroxitirosol ($p=0,014$). Además, existían diferencias estadísticamente significativas para esta variable entre el grupo tratado con melatonina, donde el daño a los conductos fue menor, respecto a los grupo tratados con curcumina y licopeno ($p=0,039$ y $p=0,019$ respectivamente).

Respecto a la presencia de **vacuolas citoplasmáticas**, existían diferencias significativas entre de los grupos ($p=0,047$), de forma que el grupo tratado con DMSO mostró una vacuolización significativamente inferior respecto al resto de grupos: control ($p=0,009$), curcumina ($p=0,048$), licopeno ($p=0,014$), melatonina ($p=0,048$), hidroxitirosol ($p=0,042$).

Tabla 4.1 resumen de las Variables histopatológicas en función grupos experimentales.

Variable	Control (n=8)	Curcumina (n=10)	Licopeno (n=10)	Melatonina (n=10)	DMSO (n=10)	Hidroxitirosol (n=10)	Kruskall- Wallis
	Mediana; RI	Mediana; RI	Mediana; RI	Mediana; RI	Mediana; RI	Mediana; RI	p
Necrosis celular	3; 2-3,5 a	1; 1-2 b	2; 1-2 a,b	1,5; 1-2 b	1,5; 1-3 a,b	2; 1-3 a,b	0,048
Pérdida estructura acinar	3; 3-3,5 a	1,5; 1-3 b	1,5; 1-3 b	2; 1-2 b	1,5; 1-3 b	1; 1-3 b	0,029
Daño conductos	3,5; 3-4 a	2; 1-3 b	2; 1-3 b	1; 1-1 c	1,5; 1-2 b,c	1; 1-3 b,c	0,001
Vacuolización	3,5; 2,5-4 a	3; 2-4 a	3; 3-3 a	3; 2-4 a	1; 1-3 b	3; 2-3 a	0,047

RI: rango intercuartílico. a-c: diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas a nivel $p < .05$ (U-Mann-Whitney)



4.2. Análisis de las variables histomorfométricas de los adenómeros parotídeos.

En relación a los supuestos paramétricos, la prueba de Kolmogorov-Smirnov indicó que en los grupos las variables: Control, Curcumina, Licopeno, Melatonina, DMSO e Hidroxitirosol se distribuían de forma normal y homogénea. En la Tabla 4.3.1 se presentan los resultados.

Tabla 4.2 Pruebas de normalidad y homogeneidad varianzas.

Variable	Grupo (n)	Normalidad [†]	Homogeneidad [‡]
Área			0,591
	Control (64)	0,153	
	Curcumina (64)	0,141	
	Licopeno (64)	0,156	
	Melatonina (64)	0,138	
	DMSO (64)	0,107	
	Hidroxitirosol (64)	0,159	
Perímetro			0,562
	Control (64)	0,178	
	Curcumina (64)	0,187	
	Licopeno (64)	0,166	
	Melatonina (64)	0,179	



DMSO (64)	0,101
Hidroxitirosol (64)	0,126

[†]Test Kolmogorov-Smirnov. [‡]Test de Levene

En la Tabla 4.3 se muestra el descriptivo de las variables: Control, Curcumina, Licopeno, Melatonina, DMSO e Hidroxitirosol en función del grupo experimental.

Tabla 4.3 Descriptivo variables área y perímetro en función del grupo experimental.

Variable	Control (n=64)		Curcumina (n=64)		Licopeno (n=64)	
	Rango	Media (DT)	Rango	Media (DT)	Rango	Media (DT)
Área	11,57 -35,19	21,07 (6,23)	17,34 -70,16	33,66 (7,94)	12,69 -40,59	24,07 (6,13)
Perímetro	8,04 -24,44	14,64 (4,33)	12,05 -48,73	23,38 (5,52)	8,81 -28,19	16,72 (4,26)

Variable	Melatonina (n=64)		DMSO (n=64)		Hidroxitirosol (n=64)	
	Rango	Media (DT)	Rango	Media (DT)	Rango	Media (DT)
Área	16,69 -41,62	32,18 (5,67)	12,16 -35,23	23,84 (6,07)	17,64 - 41,32	30,68 (5,54)
Perímetro	11,59 -28,91	22,35 (3,94)	8,45 -24,48	16,56 (4,22)	12,25 - 28,70	21,31 (3,85)



La prueba ANOVA mostró diferencias significativas en el **área media de los acinos** glandulares entre los grupos ($p < 0,001$). En la Figura 4.1 se muestra el resultado de las comparaciones múltiples realizadas para detectar entre qué grupos se dan las diferencias (Tukey). Se puede observar que el área media de los acinos del grupo control era significativamente menor ($21,07 \mu\text{m}^2$), respecto a los grupos tratados con curcumina, melatonina e hidroxitirosol ($33,66$; $32,18$; y $30,68 \mu\text{m}^2$ respectivamente) ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias entre el control y el licopeno o dmsa.

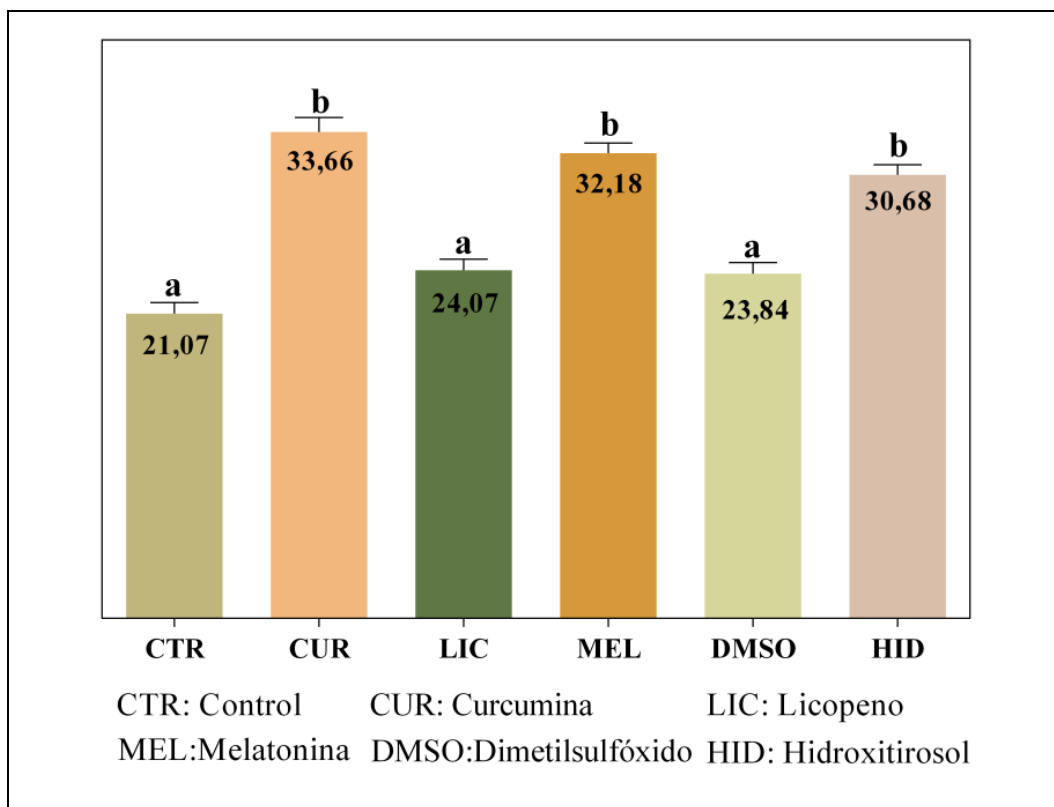


Figura 4.1 Comparación del área media entre grupos.
a-b: diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas a nivel $p < 0,05$

Respecto al **perímetro acinar**, la prueba ANOVA mostró diferencias significativas entre grupos ($p < 0,001$). En la Figura 4.2 se muestra el resultado de las comparaciones múltiples realizadas para detectar entre qué grupos se dan las diferencias (Tukey), pudiéndose observar una reducción del perímetro acinar del grupo control (14,64 μm), estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto a los grupos tratados con curcumina (23,38 μm), melatonina (22,35 μm) e hidroxitirosol (21,31 μm). No se encontraron diferencias significativas del control respecto al licopeno.

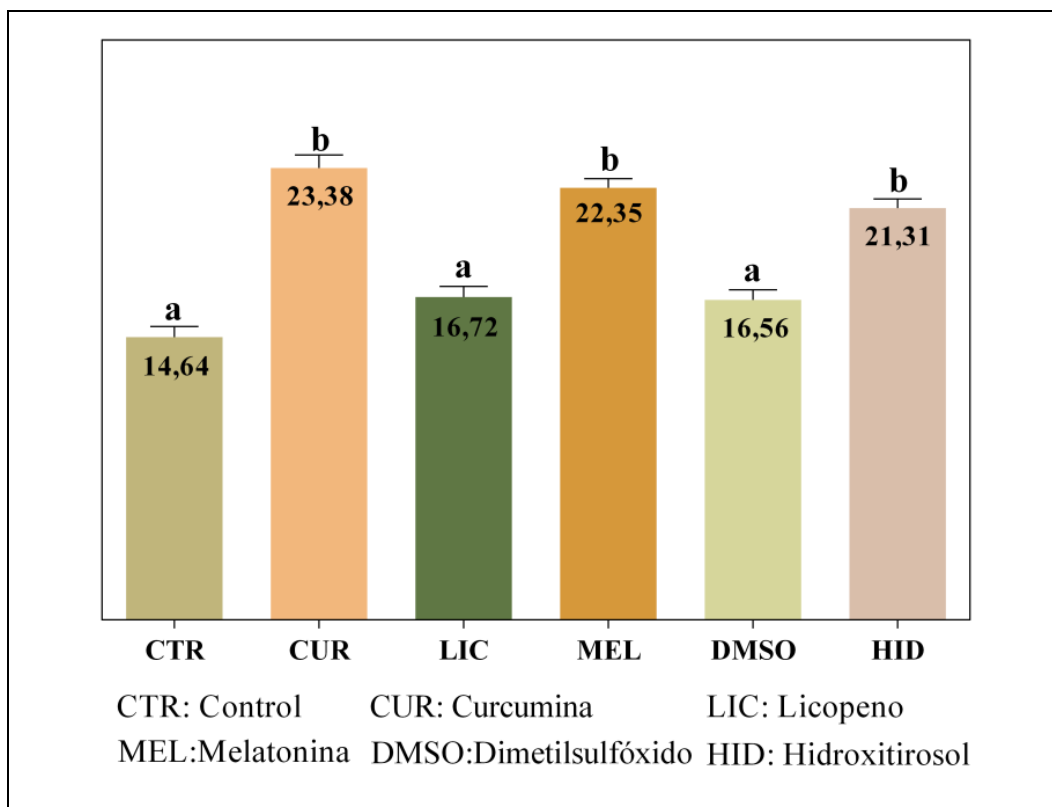


Figura 4.2 Comparación del perímetro medio entre grupos.
a-b: diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas a nivel $p < 0,05$.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno,
Curcumina, Hidroxitirosol y
Melatonina sobre Glándula Parótida
de Ratas

DISCUSIÓN



5-. DISCUSIÓN.

Cada año alrededor de 500.000 pacientes con cáncer de cabeza y cuello son tratados con radioterapia en el mundo, hecho que ha aumentado considerablemente la supervivencia de las neoplasias que afectan a esta localización (Citrin y cols. 2010). Sin embargo, en un 40% de los pacientes, la calidad de vida se ve gravemente comprometida a causa de la xerostomía consecuyente a la hipofunción salival secundaria al daño glandular. Por este motivo, en los últimos años, las nuevas técnicas de tratamiento radioterápico han intentado preservar la mayor parte de tejido glandular funcional posible, principalmente en la glándula parótida, que es la que más cantidad de saliva aporta (Luijk y cols. 2015).

La disfunción de la glándula parótida tras la radioterapia para el cáncer de cabeza y cuello sigue siendo un grave problema clínico. Durante la radioterapia, los intentos de minimizar el riesgo de esta complicación se han focalizado en reducir la dosis media aplicada a la glándula salival. La radiación ionizante en las glándulas salivales produce efectos inflamatorios y degenerativos en el parénquima de las mismas, especialmente es las células acinares serosas. La respuesta temprana del tejido de la glándula salival a la radiación produce una disminución de las tasas de flujo salival en la primera semana de tratamiento, apareciendo sequedad bucal (Nair y cols. 2001).

Las glándulas salivales son sensibles a la radioterapia y responden a dosis bajas de radiación aunque sus efectos a esas dosis son reversibles. Se produce un compromiso vascular con afectación de los pequeños vasos que rodean las unidades funcionales salivales. Existe atrofia y necrosis de las células acinares y ductales con cambios en el tejido conectivo. La proporción de pérdida de flujo estará en proporción a la cantidad de tejido salival incluido en el campo afectado y de la cantidad



de dosis suministrada. A dosis acumulativas superiores a 70 Gy pueden ser irreversibles con degeneración y fibrosis del tejido glandular (Vissink y cols. 2003; Silvestre y cols. 2009).

Se suelen afectar más las glándulas serosas que las mucosas volviéndose la saliva viscosa (Friedrich y cols. 2002). Nagler en 1998, describe 3 fases en la pérdida de función glandular: a) 3-14 días postradiación existe una pérdida de flujo salival, b) sobre la segunda semana hay una recuperación de la tasa de secreción (lo que hace pensar, según él, que la causa de la pérdida de los primeros días es por un efecto indirecto de la mucositis), c) a partir del día 40 y más importante a partir del tercer mes cae la tasa de secreción hasta el 50 %, siendo de hasta el 75% tras 9-12 meses de la radiación. Según algunos autores existe recuperación del tejido acinar entre 120-240 días postradiación (Vissink y cols. 2003; Silvestre 2009).

Los radioprotectores (RP) son distintos tipos de sustancias o fármacos, que reducen el efecto letal de las radiaciones. Pueden ser específicos (solo protegen tejido sano) o inespecíficos (protegen tejido sano pero también tejido tumoral). Estos últimos no tienen sentido porque no permitiría la curación de la enfermedad. La protección del tejido irradiado se conoce como citoprotección (Esco y cols. 2004).

La amifostina es el único fármaco aprobado por la "Food and Drug Administration" (FDA) para la prevención de la xerostomía. Es un citoprotector específico, un compuesto tiofosfato formado por un grupo sulfhidrilo unido a un fosfato, siendo convertido en un tiol libre por la fosfatasa alcalina (FA). La citoprotección específica viene dada porque en los tejidos tumorales existe baja concentración de FA debido al pH ácido en los tumores, a las diferencias estructurales en la membrana celular tumoral con respecto a la sana y por último al paso a través de la



membrana celular gracias a un sistema de transporte activo en células sanas y difusión pasiva en células tumorales (Esco y cols. 2014).

Estudios realizados in vitro demuestran que la amifostina debe ser administrada entre 30-60 minutos antes de la exposición a la radiación ionizante, ya que el compuesto debe estar en la célula en el momento de recibirla.

La distribución y difusión de la amifostina presenta diferencias tisulares, siendo las glándulas salivares, tejido hematopoyético y mucosa intestinal, los tejidos más beneficiados. No se observa paso del fármaco al sistema nervioso central por su carácter hidrofílico que le impide atravesar la barrera hematoencefálica (Esco y cols. 2004).

Hay descritos otros mecanismos implicados en el mecanismo de acción de la amifostina que afecta al factor de transcripción NF-Kappa, la timidin kinasa y a los niveles de fosforilación proteica (Grdina y cols. 2002).

Los principales efectos secundarios descritos son la hipotensión, emesis, somnolencia, gusto metálico, náuseas, vómitos, hipocalcemia, estornudos, hipo, sofocos, fiebre y reacciones cutáneas graves (eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, necrolisis epidérmica tóxica). Parece que su toxicidad es sensiblemente inferior cuando se administra de forma subcutánea siendo la efectividad similar en modelos animales (Koukourakis y cols. 2000).

En cáncer de cabeza y cuello se ha publicado un ensayo fase III dónde administrando 200 mg/m² de amifostina en infusión 3 minutos antes de cada sesión de radioterapia se reducía la xerostomía de grado 2 o superior de un 76% a un 54% (p=0.0004) (Brizzel y cols. 2000).



Vacha y cols. 2003, en otro ensayo fase III publicaron una reducción de la xerostomía aguda y una evidencia a la mejoría sobre la mucositis.

Gu y cols. 2014, publicaron un meta-análisis que incluya 1167 pacientes donde demostraron una reducción estadísticamente significativa de mucositis grado 2 o superior, de la xerostomía aguda y tardía, sin protección tumoral en pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados con radioterapia.

Actualmente, la amifostina solo está autorizada para reducir la incidencia y severidad de la xerostomía en pacientes sometidos a radiación de tumores de cabeza y cuello.

Es difícil encontrar el radioprotector ideal ya sea por su falta de efectividad o por su elevada toxicidad (Maurya 2006). Por eso, en un intento de cambiar la perspectiva de intentar sintetizar el radioprotector ideal, se dio un giro hacia el desarrollo de agentes procedentes de productos naturales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 80% de la población mundial depende de medicamentos a base de compuestos herbales alternativos; los productos llamados naturales están siendo utilizados por el potencial efecto protector para minimizar los daños de la radiación.

Los fitoquímicos son componentes presentes en frutas y vegetales, con actividad biológica. El consumo de polifenoles provenientes de varias plantas y frutas se ha relacionado con actividades quimiopreventivas, tal como ocurre con el resveratrol, la curcumina y el licopeno (Ortega Cabello 2013; Rao y cols. 2006; Owen y cols. 2000; Perdomo y cols. 2012).

El uso de fitoquímicos en la radioprotección ha recibido gran atención en la última década debido a que una amplia variedad de



fitoquímicos, además de ser antioxidantes, previenen el daño causado por radicales libres provenientes de la radiación. Dichas sustancias son capaces de inducir la apoptosis en células cancerosas, por lo que pueden tener un uso potencial como adyuvantes potenciales en la terapia contra el cáncer, protegiendo a las células normales de los efectos agudos y tardíos de los radicales producidos durante el tratamiento. En particular, aquellas plantas cuyo efecto radioprotector ha sido demostrado, contienen una gama de compuestos incluyendo antioxidantes, inmunoestimulantes, estimuladores de la proliferación celular, agentes anti-inflamatorios y antimicrobianos (Ortega Cabello 2013; Seed 2005).

Dicha actividad puede ser mediada a través de diferentes mecanismos, tales como la captura de radicales libres, mejora en el estado antioxidante y potencial anti-peroxidación lipídica. Los polifenoles pueden regular el mRNA de enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión transferasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, contrarrestando el estrés oxidativo inducido por la radiación ionizante (Arora y cols. 2005; Ortega Cabello 2013).

Existen diferentes radioprotectores de origen natural como minerales y oligoelementos (selenio, manganeso o zinc entre otros), aceites esenciales, resinas como el propóleo, aminoácidos (triptófano, lisina, etc.), alcaloides. (cafeína), vitaminas (vitaminas C y E) y otros como la curcumina.

En el año 2000, Suarez y cols. estudiaron extractos etanólicos de dos tipos diferentes de propóleos (resina que se obtiene de las yemas de los árboles) suministrados ocho horas antes y después de una irradiación única de 8 Gy, siendo más efectivo pre-irradiación, puesto que sobreviven entre un 20 y un 50% frente a un 10% de aquellos a los cuales se les suministra después de la irradiación.



Uno de los mecanismos patogénicos implicados en el daño a las glándulas salivales provocado por la irradiación, es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas sustancias son átomos o moléculas con un electrón desaparejado que derivan del oxígeno y que son altamente reactivos con otras moléculas orgánicas, a las que oxidan. Las ROS se generan en los organismos vivos como consecuencia del metabolismo celular normal, pero también pueden ser producidas en grandes cantidades por la radiación ionizante, la quimioterapia, los metales de transición y otros oxidantes químicos. (Burnham 2001). Estas especies reactivas van a reaccionar con los lípidos (peroxidación lipídica), proteínas y ácidos nucleicos, generando estrés oxidativo y daño en dichas macromoléculas. Especialmente dañinas son las interacciones con el ADN, al que pueden lesionar de diferentes formas, afectando químicamente a las bases nitrogenadas o provocando rupturas de cadena simple o de la doble hélice, entre otras. Además, dichas lesiones pueden conducir a mutaciones que activen oncogenes o inactiven genes supresores de tumores, así como alteraciones del ciclo celular o la apoptosis, relacionados todos ellos con la génesis de neoplasias malignas (Karihtala y Soini 2007).

La primera línea de defensa para el daño oxidativo es el sistema antioxidante endógeno, compuesto por sistemas enzimáticos como la superóxido-dismutasa, glutatión peroxidasa o catalasas y otros no enzimáticos como el ácido ascórbico o determinadas hormonas. Cuando la presencia de radicales libres supera la capacidad de nuestro organismo para eliminarlos, se genera estrés oxidativo. Pero existen sustancias antioxidantes exógenas, muchas de ellas presentes en la dieta, que pueden colaborar en la eliminación o atenuación de estas especies reactivas. Así, durante los últimos 50 años, ha sido ampliamente estudiado el efecto de diferentes agentes antioxidantes en la citotoxicidad provocada por la radiación ionizante. Parece que algunos de ellos pueden



proteger del daño al ADN ocasionado por fuentes endógenas y exógenas, incluyendo la radiación ionizante, como ha sido comprobado tanto in vivo como in vitro. Entre ellos se encuentran las vitaminas C y E, algunos carotenoides como xantinas o licopeno, entre otros (Fang y cols. 2002).

Sobre la vitamina E, Abedi y cols. publicaron en 2015 un estudio en el que con dosis de 400 UI/kg había menor daño histopatológico en glándulas parótidas de rata a dosis única de 15 Gy con respecto al grupo sin vitamina E, de forma estadísticamente significativa a nivel de los acinos y de los conductos secretores.

Son diversos los estudios que han investigado el efecto de la radioterapia en la morfología de glándula salival (Coppes y cols. 2001; Hakim y cols. 2005; Henriksson y cols. 1994; Limesand y cols. 2006; Stephens y cols. 1986 y Xu y cols. 2010). Entre las alteraciones microscópicas agudas y tardías observadas en el tejido glandular, existe apoptosis y muerte celular, vacuolización citoplasmática, hipovascularización, formación de tejido fibroso y edema.

El uso de la rata como modelo experimental para la radioprotección ha sido ampliamente documentado y desarrollado en la bibliografía (Acauan y cols. 2015). Nosotros nos planteamos en este trabajo la evaluación del efecto radioprotector del licopeno, curcumina, hidroxitirosol y melatonina, en las glándulas salivales parotídeas de ratas Sprague Dawley a dosis única de 20 Gy de radiación.

La dosis administrada en forma intraperitoneal está de acuerdo con los estudios de trabajos de Srinivasan y cols. 2009 para el licopeno, de Jagetia y cols. 2007 para la curcumina, de Capasso y cols. 2008 para el hidroxitirosol, de Serin y cols. 2007 para la melatonina y de Raju y cols. 1996 para el DSMO.



En nuestro estudio hemos visto como el grupo de ratas control (no radioprotegidas) ofrecía de forma significativa peores resultados en todas las variables a estudio (necrosis celular, pérdida de estructura acinar, daño de conductos y vacuolización) con respecto a al menos uno de los radioprotectores estudiados.

En cuanto a las variables histopatológicas: la necrosis celular ($p=0,008$) y la pérdida de estructura acinar ($p=0,020$) son significativamente menores en los grupos de las ratas radioprotegidas, no habiendo diferencias entre los diferentes radioprotectores.

La necrosis de células acinares resultantes de la radioterapia se analizó en distintos trabajos (Hakim y cols. 2005; Henriksson y cols. 1994; Limesand y cols. 2010; Lombaert y cols. 2008; Radfar y Sirois 2003; Stephens y cols. 1986 y Xu y cols. 2010). La muerte celular es evidente, no sólo por la disminución en el número de células acinares en los tejidos irradiados, sino también por la presencia de células apoptóticas, así como otros cambios nucleares y citoplasmáticos (Coppes y cols. 2002; Lombaert y cols. 2008a).

En nuestro estudio se refleja que el daño de conductos ($p=0,001$) es significativamente menor en los grupos de las ratas radioprotegidas siendo la melatonina la que obtuvo resultados significativamente mejores con respecto a la curcumina y el licopeno. Tanto en humanos como en animales de experimentación (ratón y rata), parece que la mayor cantidad de células stem y progenitoras reside en la región parotídea donde se encuentran los conductos mayores. Ha sido demostrado que la inclusión de los conductos en el campo de irradiación en parótidas de rata provoca una pérdida de la capacidad de regeneración que ocasiona disfunción glandular crónica con disminución de la secreción salival (Nagler 2002).



Autores como Gajowik y cols. 2014 publicaron que la dosis de radiación administrada en la zona donde se concentran las células stem y progenitoras puede ser un factor predictivo para determinar la función salival y proponen su protección frente a la radiación ionizante para reducir el riesgo de xerostomía post-irradiación.

Microscópicamente, la vacuolización se caracteriza por áreas claras que pueden ser esférica u oval y que varían en tamaño (Chen y cols. 2008). Este proceso se induce bajo escasez de nutrientes, la infección y el estrés oxidativo, en el que las células necesitan para generar nutrientes intracelulares y energía y deshacerse de los componentes citoplasmáticos perjudiciales (Levine y Kroemer 2008). En cuanto a la vacuolización ($p=0,047$), el grupo del DSMO presentó un menor grado que el resto de grupos a estudio, no habiendo diferencias entre ellos.

Varios autores han descrito la presencia de vacuolización citoplasmática en las glándulas salivales de animales irradiados (Coppes y cols. 2001; Hakim y cols. 2005; Limesand y cols. 2010) En 1986 Stephens y cols. encontraron células vacuoladas hasta 72 h después de la radiación en las glándulas de monos irradiados con dosis de 12,5 y 15 Gy. Un aumento del número de células acinares vacuoladas también fue observado por Coppes y cols. en 2001. En algunos casos, esta vacuolización está asociada con atrofia acinar y desplaza el núcleo de su posición original y se vuelve polimorfo y condensado. Algunos autores han observado que la vacuolización citoplasmática en células irradiadas se debe a la expansión del retículo endoplásmico y se asocia a un estatus celular que precede a la apoptosis (Takahashi y cols. 2005).

Las variables histomorfométricas de nuestro estudio (área y perímetro de los acinos), podemos decir que la melatonina, la curcumina y



el hidroxitirosol tienen un mayor área y perímetro de forma significativa ($p < 0,001$) con respecto a los grupos control, licopeno y DMSO. A mayor área y perímetro, menor afectación del acino.

Con los resultados de nuestro estudio, las diferentes sustancias antioxidantes administradas en dosis única intraperitoneal: licopeno, curcumina, hidroxitirosol y melatonina tienen efecto radioprotector desde el punto de vista anatomopatológico.

Tabla 5.1 Cambios macroscópicos y microscópicos evaluados en glándulas salivales de los animales irradiados modificada de Acauan y cols. 2015.

Autor	Modelo	Reducción peso/tamaño Glandular	Fibrosis	Cambios Vasculares	Edema	Vacuolización citoplasmática	Cambios Nuclear	Pérdida células acinares
Stephens y cols(1986)	Monorata	+	+	+	+	+	+	+
Henriksson	rata		+		+			+
Coppes cols (2001)	rata		+		+	+	+	+
Coppes y cols (2002)	rata	+	+					+
Friedrich y cols (2002)	rata	+	+					
Radfar y Sirois (2003)	cerdo	+	+			+	+	+
Hakim y cols (2005)	rata					+	+	+



Lombaert y cols (2008)	ratón		+					+
Limesand y cols (2009)	ratón		+				+	+
Xu y cols (2010)	cerdo		+	+				
Hakim y cols (2012)	rata		+				+	
Nanduri y cols (2013)	ratón		+	+				+
Xiang y cols (2013)	rata		+				+	+
Autor	Modelo	Reducción peso/tamaño o Glandular	Fibrosis	Cambios Vasculares	Edema	Vacuolización citoplasmática	Cambios Nuclear	Pérdida células acinares

El empleo de radioprotectores naturales no solo debe centrarse en el estudio de los compuestos activos o en organismos naturales, sino también en preparados o combinaciones de compuestos de origen natural, puesto que en los últimos años el número de publicaciones sobre ellos ha crecido exponencialmente (Sebastià-Fabregat 2013).

El licopeno es un carotenoide de estructura acíclica, isómero del betacaroteno que se encuentra en frutas y verduras y tiene grandes propiedades antioxidantes (Cruz y cols. 2013). Estudios in-vitro y en animales demuestran el efecto protector contra daños inducidos por radiaciones ionizantes por su actividad como antioxidante (Gonzalez-Gallego y cols. 2010; Konijeti y cols. 2011).

El licopeno es un antioxidante con efecto radioprotector contra lesiones radioinducidas sobre ADN de linfocitos humanos evitando



lipoperoxidación lipídica por aumento de la superoxidodismutasa, catalasa, y glutatión peroxidasa a dosis de 4 Gy (Srinivasan y cols. 2009). También está descrito su efecto protector contra el cáncer de próstata (Holzapfer y cols. 2013). También se ha descrito su efecto antioxidante sobre riñón, hígado y colon de ratas mediante aumento de la actividad de la enzima superoxidodimutasa reduciendo los efectos de la lipoperoxidación lipídica (Liu y cols. 2013).

Nuestros datos están de acuerdo con Boraks y cols. 2008. El tratamiento con curcumina se asocia a un descenso significativo del daño a nivel de glándula parótida irradiada dado que existe menos necrosis celular y menos daño ductal y pérdida de estructuras acinares comparado con el grupo control ($p < 0.05$) aunque no existe diferencia significativa entre los marcadores de necrosis.

La curcumina es otro antioxidante sobre el que se han publicado diferentes artículos aunque los avances clínicos están limitados por su pobre solubilidad y baja biodisponibilidad. Se ha demostrado que su administración disminuye la inflamación y fibrosis pulmonar en ratas tras radiación en el que está involucrado la disminución de los niveles de factor de necrosis tumoral, IL-6 e IL-8. Induce además el factor de crecimiento beta (Yamamoto y cols. 1997).

La curcumina también tiene efecto radioprotector en hígado, riñón, mucosa oral y tejido cardíaco mediante actividad de NRF2 y su inducción para expresar encimas antioxidantes (hemoxigenasa-1, glutatión peroxidasa y NADPH-Quinona reductasa (Goel y Aggarwal 2010). También aumenta la encima hemoxigenasa-1 en endotelio pulmonar y células fibroblásticas. Disminuye la fibrosis e inflamación pulmonar y bloquea la producción de especies oxígeno reactivas (Lee y cols. 2010). También se ha descrito radioprotección sobre células mamarias en ratas (Iano y cols. 2000), así como efectos antioxidantes y antiinflamatorios



sobre el daño oxidativo hepatorenal en ratas (Yilmaz y cols. 2013; Buyuklu y cols. 2014).

Tiene efecto radiosensibilizante sobre células tumorales en cáncer de colon por inducción del factor de necrosis KB (NF-KB) (Sandur y cols. 2009). Tiene un efecto radiosensibilizante sobre células tumorales, aumentando el nivel de apoptosis celular, disminuyendo así el crecimiento tumoral (Shi y cols. 2012).

Los compuestos que presentan actividad radiosensibilizadora actúan a diferentes niveles de las fases celulares, y uno de los objetivos sugeridos con los radiosensibilizadores administrarlos antes de que ocurra la irradiación consiste en sincronizar dichos compuestos con las fases sensitivas del ciclo celular. Se han propuesto los siguientes mecanismos (Ortega Cabello 2013):

- Mejoría en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS).
- Eliminación selectiva de antioxidantes y enzimas antioxidantes presentes en las células tumorales.
- Incremento de la peroxidación lipídica por la eliminación de glutatión.
- Daño al ADN de células tumorales, por la formación de fragmentos de ADN, inhibiendo su reparación y síntesis.
- Inducción del paro al ciclo celular.
- Inducción de la apoptosis.
- Depuración de la proteínquinasa C.



El hidroxitirosol es otro antioxidante que protege del estrés oxidativo inducido por ciclosporina en riñones de ratas (Capasso y cols. 2008).

El hidroxitirosol también actúa como antioxidante sobre el ADN de células mamarias humanas, lo que según Warleta y cols. 2011 podría disminuir la incidencia del cáncer de mama.

El hidroxitirosol tiene efecto radioprotector a nivel cromosómico por aumento de la actividad anticlastogénica, que tiene correlación lineal con la capacidad antioxidativa existiendo la capacidad secuestradora de radicales libres (Benavente-García y cols. 2002).

Respecto a la melatonina encontramos mayor número de estudios. La melatonina (N-acetil-5-Metoxitriptamina) es una hormona sintetizada por la glándula pineal que tiene relación con los ritmos circadianos, la regulación del sistema inmune, es un potente antioxidante y radioprotector, protege de la carcinogénesis y de desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer (Kostoglov 2013).

En ratas se ha estudiado el efecto radioprotector de la melatonina sobre diferentes tejidos. Kucuktulu en 2012 describió su efecto radioprotector de forma significativa ($p < 0,05$) a dosis de 10 mg/kg administrados de forma intraperitoneal sobre riñón de ratas radiadas a 20 Gy en 5 sesiones.

Shirazi y cols. describieron en 2013 el efecto radioprotector de la melatonina de forma significativa ($p < 0,05$) a dosis de 30 mg/kg administrados de forma intraperitoneal sobre tejido hepático de rata radiada a 10 Gy demostrando unos bajos niveles de Malondialdehído (marcador de peroxidación lipídica) y elevados niveles de Glutatión. El mismo grupo de autores en 2011 ya describieron radioprotección mediante reducción del estrés oxidativo a dosis de melatonina de



30mg/kg 30 min antes de la radiación y 5 mg/kg/día durante 10 días post-radioterapia a dosis de 8 Gy sobre el cristalino de ratas.

Un artículo publicado en 2016 por Karaer y cols. sobre daño radioinducido sobre glándula salival en ratas, evidencia que entre el grupo RT+Melatonina (administrada 30 min después de la radiación, por su vida media corta y su actividad no superior a 20-30 min, a 5mg/kg de peso) y el grupo RT (33Gy en 5 sesiones), existe en este último grupo de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$): mayor pérdida de densidad de acino, mayor inflamación de las células acinares, mayor vacuolización y mayor existencia de células polimorfonucleadas. Sin embargo, las diferencias acerca de la pérdida de estructura acinar y la pérdida de mastocitos no fueron estadísticamente significativas a favor del grupo con melatonina.

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo observaron que en el grupo RT+Melatonina presentaba menor cantidad de ácido malondialdheído y un incremento de los niveles de catalasa y glutatión, por falta de estrés oxidativo. La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno producido por radicales superóxido por lo que en presencia de estrés oxidativo su nivel disminuye. El ácido malondialdheído se incrementa en situaciones e peroxidación lipídica. No encontraron incremento de los niveles de superóxido dismutasa que cataliza el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Karaer y cols. 2016; Jang y cols. 2013).

En 2015 Isola y Lilliu estudiaron la localización de la melatonina en glándulas salivales humanas. Describieron mediante técnicas de inmunohistoquímica que la melatonina se localiza solo en células serosas, por lo que su presencia era sobre todo en la glándula parótida porque es una glándula en el que la totalidad del acino secretor es de tipo seroso. Menor cantidad en la glándula submaxilar y casi nada en glándulas



salivares menores. La melatonina estaba localizada intracelularmente en pequeñas vesículas cerca de la membrana celular que se creía pasaba por difusión pasiva pero ellos además evidencian que es captada de la sangre mediante receptores proteína G transmembrana MT1 y MT2 para melatonina mediante activación de señales y que es secretada junto con otros productos a la saliva cuando estos gránulos se abren al conducto secretor bien de forma continuada por estímulos menores o bien por estímulos mayores como la masticación.

El DMSO (dimetilsulfóxido) es un excelente disolvente que puede actuar de vehículo transportador de sustancias hidrofóbicas además de tener efecto radioprotector por sí mismo, descrito sobre piel de ratas en 1978 por Moulder y Fischer.

En nuestro experimento, el DMSO lo hemos usado como transportador de todos los antioxidantes utilizados en los diferentes grupos para facilitar su biodisponibilidad. Autores como Skov y cols. en 1984 encontraron un efecto radioprotector sobre el ADN de células mamarias de ratas con bajos niveles del radical hidroxilo (OH⁺). Raju y cols. en 1996 describieron un factor protector sobre linfocitos T de rata radiada con rayos X. También está descrito el efecto radioprotector del DMSO sobre ADN de células renales de ratas (Benavente-García y cols. 2002).

El DMSO se ha utilizado en el tratamiento de la cistitis intersticial mediante administración intravesical. Se ha utilizado también en enfermedades por depósito amiloide (amiloidosis) a nivel cutáneo, urinario, pulmonar y renal. Tiene capacidad antiinflamatoria y antioxidante y se ha utilizado en el tratamiento del edema cerebral traumático, desordenes musculoesqueléticos, adenocarcinoma de pulmón, enfermedades reumatológicas, prostatitis crónica, enfermedades



dermatológicas, esquizofrenia, como analgésico tópico y en la Enfermedad de Alzheimer (Santos y cols. 2003).

Se han descrito efectos secundarios como náuseas, vómitos, anemia hemolítica, reacciones anafilácticas, broncoespasmo, fallo renal, hipertensión sistólica y diastólica, bradicardia, bloqueo cardiaco y edema pulmonar. Es significativo el sabor y aliento a ajo debido a la excreción pulmonar del DMSO como dimetil sulfito. La aplicación tópica está bien tolerada aunque se han descrito casos de rash y prurito cutáneo (Santos y cols. 2003).

En cuanto a la forma de administrar la radiación, esta se puede hacer a dosis única o bien mediante dosis fraccionadas. La toxicidad temprana o aguda de la radiación única es mayor que la que se encuentra en la radiación fraccionada, sobre todo a nivel de piel y mucosas (dermatitis y mucositis) (Howell y cols. 2013).

La toxicidad tardía, sobre todo la mielopatía a nivel del sistema nervioso central, también es más frecuente en casos de irradiación a dosis única. Esto es debido a la mayor dosis de radiación administrada de una sola vez, aun cuando la dosis total de radiación administrada en la forma fraccionada es igual o superior (Esco y cols. 2004).

Como limitaciones de este estudio podemos decir que no hemos realizado estudios funcionales como: la medición de flujo salival en las ratas antes y después de la radiación, así como la falta de medición de marcadores de estrés oxidativo y marcadores inmunohistoquímicos. No podemos saber si los resultados hubieran variado administrando la radiación de forma fraccionada en vez de a dosis única.

Nuestros resultados reflejan la administración intraperitoneal de curcumina, licopeno, melatonina e hidroxitirosol en dosis única 24 horas antes de la radiación a dosis de 20 Gy en modelo animal en ratas



Sprague Dawley encontramos que producen protección estructural de las glándulas parótidas. Sin embargo, se requieren de un mayor número de estudios que determinen el efecto radioprotector en las glándulas salivales y es necesario e importante seguir investigando y en un futuro abrir nuevos campos de estudio en humanos.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno, Curcumina, Hidroxitirosol y Melatonina sobre Glándula Parótida de Ratas

CONCLUSIONES



6-. CONCLUSIONES.

Se formulan finalmente las conclusiones del estudio después de la discusión de los resultados obtenidos. Estas conclusiones, como se hizo con el análisis de los resultados, se estructuran en torno a los objetivos planteados para la elaboración del presente estudio.

La radioterapia es una importante herramienta en el tratamiento contra el cáncer, es importante proteger al tejido no cancerígeno cuando se aplica la radioterapia a fin de minimizar los efectos adversos. Así la administración intraperitoneal de licopeno, curcumina, hidroxitirosol y melatonina 24 horas antes de la radiación de las glándulas parótidas a dosis única de 20 Gy en modelo animal en ratas Sprague Dawley encontramos que se producen una serie de cambios histopatológicos.

1-. La necrosis celular en glándula parótida de rata es menor en los grupos tratados con antioxidantes con respecto al grupo control.

2-. La pérdida de estructura acinar de glándula parótida es menor en los grupos tratados con antioxidantes con respecto al grupo control.

3-. El daño en el conducto glandular observado en glándula parótida de rata es menor en los grupos tratados antioxidantes con respecto al grupo control. El compuesto que mejor protege el daño de los conductos es la administración de la melatonina.

4-. La vacuolización citoplasmática en células de glándula parótida de rata Sprague Dawley es menor en el grupo tratado con el DSMO con respecto a los otros grupos.

5-. Al analizar el área y perímetro de los acinos de glándula parótida de rata encontramos que es mayor en los grupos en los que se administra curcumina, hidroxitirosol y melatonina.



6-. En nuestro estudio hemos observado que el grupo de ratas control ofrecían peores resultados en todas las variables a estudio con respecto a al menos uno de los antioxidantes estudiados.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno, Curcumina, Hidroxitirosol y Melatonina sobre Glándula Parótida de Ratas

BIBLIOGRAFÍA



7- BIBLIOGRAFÍA.

Abedi SM, Yarmand F, Motallebnejad M, Seyedmajidi M, Moslemi D, Ashrafpour M, Bijani A, Moghadamnia A, Mardanshahi A, Hosseinimehr SJ. Vitamin E protects salivary glands dysfunction induced by ionizing radiation in rats. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 1403-9.

Acauan MD, Figueiredo MA, Cherubini K, Gomes AP, Salum FG. Radiotherapy-induced salivary dysfunction: Structural changes, pathogenetic mechanisms and therapies. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 1802-10.

Acuña-Catroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial related diseases. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2: 133-151.

Aftab N, Vieira A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. *Phytother. Res* 2010, 24: 500-2.

Alamar R, Olaya V. Dermatitis de Contacto por Dimetil Sulfoxido. *Enfermeria Dermatológica* 16 (mayo-agosto 2012): 42-44.

Alcaraz-Baños M. Bases Físicas y Biológicas del Radiodiagnósticos Médico. 1ª ed. Murcia: Editum; 2003.

Antony S, Kuttan R, Kuttan G. Immunomodulatory activity of curcumin. *Immunol Invest* 1999; 28(56): 291-303.

Arora R. Phytodefence molecules for defence forces: utility and future prospects. In: Gupta M, Kumar IP, Arora, R, editors. *Herbs for Health: Application in Armed Forces*. Instit of Nuclear Med and Allied Sci; 2006. p. 58–62.

Arora R, Gupta D, Chawla R, Sagar R, Sharma A, Kumar R. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother Res* 2005; 19: 1-22.

Arora R, Kumar R, Sharma A, Tripathi RP. Radiomodulatory compounds of herbal origin for new frontiers in medicine, homeland security, management of radiological incidents and space applications. In: Arora R. editor. *Herbal radiomodulators. Applications in medicine, homeland defence and space*. CAB International; 2008. p. 89-97.



ASTRO. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. Answers to your radiation therapy questions. Accessed at www.rtananswers.org on October 23, 2014.

Babu PS, Srinivasan K. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat. *Mol Cell Biochem* 1995; 152: 13 -21.

Batsakis JG, Bautina E: Metastases to major salivary glands. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99 (6): 501-3.

Baum BJ, Bodner L, Fox PC, Isutzu KT, Pizzo PA, Wrigth WE. Therapy induced dysfunction of salivary glands: Implications for oral health. *Spec Care Dent* 1985; 5: 274-275.

Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M. Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *olea europea L.* leaves against x-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfur-containing compounds. *J of med food* 2002; 5 (3): 125-135.

Bermejo-Fenoll A. Recuerdo morfológico de las glándulas salivares. En: Bermejo-Fenoll A, editor. *Medicina Bucal* vol. I. Síntesis; 2000. p. 305-320.

Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharmacol* 1999; 51: 971-974.

Boraks G, Tampelini F, Pereira K, Chopard F; Effect of Ionizing Radiation on Rat Parotid Gland. *Braz Dent* 2008; 19(1): 73-76

Brenner W, Kampen WU, Brümmer C, Von Forstner C, Zuhayra M, Muhle C, Czech N, Henze E. Myeloprotective effects of different amifostine regimens in rabbits undergoing high-dose treatment with ¹⁸⁶rethium-(tin)1,1- hydroxyethylidene diphosphonate (¹⁸⁶Re-HEDP). *Cancer Biother. Radiopharm* 2003; 18: 887-93.

Brizel DM, Wasserman TH, Henke M. Estudio fase III randomizado de amifostina como radioprotector en cáncer de cabeza y cuello. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3339-45.

Burnham J. *Biological Effects of Radiation*. New Brunswick Power Corporation 2001; 87-108.

Burton B, Talbot J, Park E, Krishnankutti S, Eridisinghe I. Protective activity of processed tomato products on postprandial oxidation and



inflammation: a clinical trial in healthy weight men and women. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 622-631.

Buyuklu M, Mehmet F, Ozkaraca M, Set T, Murat E, Topal E. Protective effect of curcumin against contrast induced nephropathy in rat kidney: what is happening to oxidative stress, inflammation, autophagy and apoptosis? *European Rev for Med Pharmacol Sciences* 2014; 18: 461-470.

Capasso G, Di Gennaro CI, Manna C, Ciarcia R, Florio S, Perna A, Pollastro RM, Damiano S, Mazzoni O, Galletti P, Zappia V. In vivo effect of the natural antioxidant hydroxytyrosol on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 1186-1195.

Capote AL, Martos PL. Disección Cervical. En: Martin-Granizo R, editor. *Cirugía Oral y Maxilofacial vol. II*. Madrid: SECOM; 2004. p. 1105-1133.

Cavusoglu K, Yalcin E. Radioprotective effect of lycopene on chromosomal aberrations (CAs) induced by gamma radiation in human lymphocytes. *J. Environ. Biol* 2009; 30: 113-7.

Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *JAOCS* 1991; 68: 307-312.

Chimi H, Sadik A, Letutour B, Rahmani M, Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique de l'oleuropéine et de BHT. *Rev Fran Corps Gras* 1988; 35: 339.

Choudhary D, Chandra D, Kale RK. Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 1-7.

Citrin D, Cotrim AP, Hyodo F, Baum BJ, Krishna MC, Mitchell JB. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist* 2010; 15: 360-71.

Coppes RP, Vissink A, Konings AW. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. *Radiother and Oncol* 2002; 63: 321-328.

Coppes RP, Zeilstra LJW, Kampinga HH, Konings AW. Early to late sparing of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. *Br J Cancer* 2001; 85: 1055-1063.

Cortez MG. Análisis epidemiológico del carcinoma del suelo de boca en la Región de Murcia. [Tesis Doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia, Facultad de Medicina, 2013.



Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 1341-6

Cruz RM, González J, Sanchez P. Propiedades Funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutr Hosp* 2013; 28(1): 6-15

De la Fuente P, Chamorro P, Moreno P, Poza MA. Propiedades Antioxidantes del Hidroxitirosol procedentes de la hoja del olivo. *Revista de Fitoterapia* 2004; 4 (2): 137-149

De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Robin J, Hoult S. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 445-449.

Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, Della Pietra V, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Com* 2000; 278: 733-739.

Devipriya N, Sudheer AR, Srinivasan M, Menon VP. Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res* 2008; 654: 1-7.

Donatus I. Interaction between curcumin and paracetamol. Studies on the pharmacological and toxicological aspects of paracetamol metabolism. [PhD thesis]. Yogyakarta: Universitas Gadjah-Mada, 1994.

Esco R, Valencia J, Polo S. Radioterapia y citoprotección. *Estado Actual. Oncología* 2004; 27 (7): 420-426.

Epstein J, Docena G, MacDonald TT, Sanderson IR. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. *Br J Nutr* 2010; 103:824-32.

Ellis GL, Auclair PL: Tumors of the Salivary Glands: Atlas of Tumor Pathology. Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology; 1996. p. 357-75

Esquifino AI, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Circadian organization of the immune response: A role for melatonin. *Clin Appl Immunol Rev* 2004; 4: 423-33.



Eveson JW, Cawson RA: Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol* 1985; 146 (1): 51-8.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutr* 2002; 18: 872-9.

Fiorentino A, Caivano R, Metallo V, Chiumento C, Califano G. Parotid gland volumetric changes during IMRT in head and neck cancer. *British J Rad* 2012; 85: 1415-19.

Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Holzhausen HJ, Lautenschlager C. The effect of external fractionated irradiation on the distribution pattern of extracellular matrix proteins in submandibular salivary glands of the rat. *J Cranio-Maxillo-Facial Sur* 2002; 30: 246–254.

Fox PC. Acquired salivary dysfunction: drugs and radiation. *Ann NY Acad Sci* 1998; 15: 132-137.

Gajowik A, Dobrzyńska MM. Lycopene - antioxidant with radioprotective and anticancer properties. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2014; 65(4): 263-71.

Galhardo R, Ferraz Da Silva E. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev Int* 2009; 25: 313-325.

Gnepp DR: Metastatic disease to the major salivary glands. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, editors. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia, Pa: Saunders 1991; 9: 560-9.

Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutrition and Cancer* 2010; 62 (7): 919-930.

Gomes CC, Ramos-Perez FM, Perez DE, Novaes PD, Bóscolo FN, Almeida SM. Radioprotective effect of vitamin E in parotid glands: a morphometric analysis in rats. *Braz Dent J* 2013; 24(3): 183-7.

González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr* 2010; 104: 15-27.

Grdina D, Murley J, Kataoka Y, Epperly W. Relationships between citoprotection and mutation prevention by WR-1065. *Mil Med* 2002; 167: 51-53.



Greene EC, Paller MS. Calcium and free radicals in hypoxia/reoxygenation injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol*.1994; 166: 13-20.

Gu J, Zhu S, Li X, Wu H, Li Y, Hua F. Effect of Amifostine in Head and Neck Cancer Patients treated with Radiotherapy: A systematic review and Meta-Analysis base don randomized controlled trials. *PLoS One* 2014; 9 (5): e95968

Guerrero JM, Carrillo-Vico A, Lardone PJ. La Melatonina. *Investigación y Ciencia*. Octubre 2007:30-38.

Hakim SG, Benedek GA, Su YX, Jacobsen HC, Klinger M, Dendorfer A. Radioprotective effect of lidocaine on function and ultrastructure of salivary glands receiving fractionated radiation. *Int J Radiation Oncol Biol Physics* 2012; 82: e623–e630.

Hakim SG, Kosmehl H, Lauer I, Nadrowitz R, Wedel T, Sieg P. A comparative study on the protection profile of lidocaine, amifostine, and pilocarpin on the parotid gland during radiotherapy. *Cancer Research* 2005; 65: 10486–10493.

Hara M, Yoshida M, Nishijima H. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 2001; 30: 129-38.

Hardeland R, Poeggeler B. Actions of melatonin, it's structural and functional analogs in the Central Nervous System and the significance of metabolism. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2007; 7: 289-303.

Henriksson R, Fröjd O, Gustafsson H, Johansson S, Yi-Qing C, Franzén L. Increase in mast cells and hyaluronic acid correlates to radiation-induced damage and loss of serous acinar cells in salivary glands: the parotid and submandibular glands differ in radiation sensitivity. *Br J Cancer* 1994; 69: 320–326.

Herrera-Covarrubias D. Fernández Pomares C, Aranda Abreu GE, Domínguez Ortiz MA, Hernández Aguilar ME. El licopeno y su papel de prevención en el cáncer de próstata. *Rev Neurobiol* 2013; 4(8): 810-13.

Holzapfel NP, Holzapfel BM, Champ S, Feldthusen J, Clements J, Hutmacher DW. The potential role of lycopene for the prevention and therapy of prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical evidence. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 14620-14646.

Hosseinimehr SJ. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today* 2007; 12: 794-805.



Howell DD, James JL, Hartsell WF, Suntharalingam M, Machtay M, Suh JH, Demas WF, Sandler HM, Kachnic LA, Berk LB. Single-fraction radiotherapy versus multifraction radiotherapy for palliation of painful vertebral bone metastases. *Oncol* 2013; 15: 888-896.

Hussain M, Chandrasekhara N. Effects of curcumin of cholesterol gallstone induction in mice. *Indian J Med Res* 1992; 96: 288-291.

Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogen* 2000; 21 (10): 1835-1841.

Isola M, Lilliu MA. Melatonin localization in human salivary glands. *J Oral Pathol Med* 2015; doi: 10111/jop.12409.

Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-416.

Jagetia GC, Baliga MS. Influence of the leaf extract of *Mentha arvensis* Linn. (mint) on the survival of mice exposed to different doses of gamma radiation. *Strahlenther Onkol* 2002; 178: 91-8.

Jagetia GC, Venkatesha VA, Reddy TK. Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis* 2003; 18: 337-43.

Jagetia GC, Malagi KJ, Baliga MS, Venkatesh P, Veruva RR. Triphala, an ayurvedic rasayana drug, protects mice against radiation-induced lethality by free-radical scavenging. *J Altern Complement Med* 2004; 10: 971-8.

Jagetia GC. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 301-20.

Jang SS, Kim HG, Lee JS. Melatonin reduces X-ray radiation-induced lung injury in mice by modulating oxidative stress and cytokine expression. *Int J Radiat Biol* 2013; 89: 97-105.

Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res* 2006; 20: 9789-93.

Kalher CP. Evaluatio of the use of the solvent dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. *Bood Cells Mol Dis* 2000; 26: 626-33

Kang BY, Song YJ, Kim KM, Choe YK, Hwang SY, Kim TS. Curcumin inhibits Th1 cytoline in CD4+ T cell by suppressing interleukin-12 profuction in macrophages. *Br J Pharmaco* 1999; 128(2): 380-384.



Karaer IC, Simsek G, Yildiz A, Vardi N, Polat A, Tanbek K, Gurocak S, Parlakpinar H. Melatonin's protective effect on the salivary gland against ionized radiation damage in rats. *J Oral Pathol Med* 2016; doi: 10.1111/jop.12386.

Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81–103.

Kaufman E, Lamster B. The Diagnostic Applications of Saliva: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.

Kim JH, Park SH, Moon YW, Hwang S, Kim D, Jo SH. Histamine H1 receptor induces cytosolic calcium increase and aquaporin translocation in human salivary gland cells. *J Pharma Exp Therapeutics* 2009; 330: 403–412.

Konijeti R, Henning S, Moro A, Sheikh A, Elashoff D, Shapiro A, Said, J, Heber D, Cohen P, Aronson W. Chemoprevention of prostate cancer with lycopene in the tramp model. *Prostate* 2011; 70: 1547-1554.

Koristoglou I. Therapeutic applications of melatonin. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2013; 4 (1): 13-24.

Koukourakis MI, Kyrias G, Kakolyris S, Kouroussis C, Frangiadaki C, Giatromanolaki A, Retalis G, Georgoulas V. Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2226-33.

Kucuktulu E. Protective effect of melatonin against radiation induced nephrotoxicity in rats. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012; 13: 4101-4105.

Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Lycopene modulates nitric oxide pathways against 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *Life Sci* 2009; 85: 711-718.

Lassegue B, Griending KK. Reactive oxygen species in hypertension. *Am J Hypertens* 2004; 17: 852-860.

Lee J., Kinniry PA., Arguiri E., Serota M., Kanterakis S., Chatterjee S., Solomides CC., Javvadi P., Koumenis C., Cengel KA. Dietary curcumin increases antioxidant defenses in lung, ameliorates radiation-induced pulmonary fibrosis and improves survival in mice. *Radiat Res* 2010; 173 (5): 590-601.

Li ZJ, Zhang LJ, Dezube DJ, Crumpacker CS, Pardee AB. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed



gene expression and virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1839-1842.

Limesand KH, Said S, Anderson SM. Suppression of radiation-induced salivary gland dysfunction by IGF-1. *PLoS One* 2009; 4: e4663.

Lissoni P, Chilelli M, Villa S. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *J Pineal Res* 2003; 35: 12-25.

Lin JK, Shih CA. Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis* 1994; 15(8): 1717-1721.

Liu A, Pajkovic N, Pang Y, Zhu D, Calamini B, Mesecar AL, van Breemen RB. Absorption and subcellular localization of lycopene in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2879-2885.

Liu C, Wang R, Zhang B, Hu C, Zhang H. Protective effects of lycopene on oxidative stress, proliferation and autophagy in iron supplementation rats. *Biol Res* 2013; 46: 189-200.

Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: e449-55.

Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Kampinga HH, de Haan G, Coppes RP. Keratinocyte growth factor prevents radiation damage to M.D. *Archives of Oral Biology* 2015; 60: 1802–1810.

Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Kok T. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One* 2008; 3: e2063.

Lombaert IM, Wierenga PK, Kok T, Kampinga HH, de Haan G, Coppes RP. Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 1804–1812.

López-Jornet P. Alteraciones del flujo salivar. En Bermejo-Fenoll A, editor. *Medicina Bucal vol. I. Síntesis*; 2000. p. 321-338.

Lorenz M, Fechner M, Kalkowsky J, Fröhlich K, Trautmann A, Böhm V, Liebisch G, Lehneis S, Schmitz G, Ludwig A, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Effect of lycopene on the initial state of atherosclerosis in New Zealand White (NZW) rabbits. *PLoS One* 2012; 7: e30808.



Lu R, Dan H, Wu R, Meng W, Liu N, Jin X, Zhou M, X, Zhou G, Chen Q. Lycopene features and potential significance in the oral cancer and precancerous lesions. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 361-368.

Luijk P, Pringle S, Deasy JO, Moiseenko VV, Faber H, Hovan A, Baanstra M, van der Laan HP, Kierkels RG, van der Schaaf A, Witjes MJ, Schippers JM, Brandenburg S, Langendijk JA, Wu J, Coppes RP. Sparing the region of the salivary gland containing stem cells preserves saliva production after radiotherapy for head and neck cancer. *Sci Transl Med* 2015 Sep 16; 7(305): 305ra147.

Luna MA, Tortoledo ME, Ordóñez NG. Primary sarcomas of the major salivary glands. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117 (3): 302-6.

Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. *Altern Med Rev* 1999; 4(3): 178-188.

Lutomski J, Kedzia B, Debska W. Effect of an alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. *Planta Med* 1974; 26(1): 9-19.

Mackinnon ES, Rao AV, Josse RG, Rao LG. Supplementation with the antioxidant lycopene significantly decreases oxidative stress parameters and the bone resorption marker N-telopeptide of type I collagen in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2011; 22: 1091-1101.

Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: A review of the science. *Med GenMed* 2004; 6: 35-41.

Martin-Granizo R, Redondo LM, Sanchez LA. *Patología de las glándulas salivares*. 1ª ed. Madrid: Ripano; 2011.

Maurya DK, Devasagayam TP, Nair CK. Some novel approaches for radioprotection and the beneficial effect of natural products. *Indian J. Exp. Biol* 2006, 44: 93-114.

Mediavilla MD, Sánchez Barceló EJ, Tan DX, et al. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010; 17: 4462-81.

Mehta K, Pantazis P, McQueeb T, Aggarwal B. Antiproliferative effects of curcumin (diferuloilmethane) against human breast tumor cell lines. *Anti-cancer Drugs* 1997; 8: 470-481.



Mesa MD. Influencia de la ingesta oral de un extracto de *Curcuma longa* sobre el desarrollo de aterosclerosis en conejos. [Tesis Doctoral]. Granada: Univesidad de Granada, Facultad de Farmacia, 2000.

Mesa M.D.; Ramirez-Tortosa M. C.; Aguilera C. M.; Ramirez-Bosca A.; Gil, A. Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma longa*. Extracts and curcuminoids. *Ars Pharmaceutica* 2000; 41(3): 307-32.

Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer. A systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005; 39: 360-6.

Montoro A, Almonacid M, Serrano J, Saiz M, Barquinero JF, Barrios L, Verdú G, Pérez J, Villaescusa JI. Assessment by cytogenetic analysis of the radioprotection properties of propolis extract. *Radiat. Prot. Dosimetry* 2005; 115: 461-4.

Moore K, Persaud TVN. *Embriología Clínica*. 5ª ed. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 1997.

Morgenthaler TI, Lee-Chiong T, Alessi C, et al. Standards of practice committee of the american academy of sleep medicine: Practice parameters for the clinical evaluation and treatment of circadian rhythm sleep disorders. *Sleep* 2007; 3: 445-47.

Moulder JE., Fischer JJ. Effect of combined metronidazole and DMSO on tumour control and skin tolerance in the rat. *Br J. Cancer* 1978; 37 (3): 216-220.

Munzenmaier A, Lange C, Glocker E, Covacci A, Moran A, Berswill S, Baeuerle PA, Kist M, Palh HL. A secreted/ shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 1997; 159(12): 6140-6147.

Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Diseases* 2002; 8: 141-146

Nagler RM. Short and Long.-term functional vs morphometrical salivary effects if irradiation in a rodent model. *Anticancer Res* 1998; 18: 315-320

Nahleh Z, Pruemmer J, Lafollette J, Sweany S. Melatonin, a promising role in taxane-related neuropathy. *Clin Med Insights Oncol* 2010; 4: 35-41.

Nair CK, Parida DK, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res* 2001; 42: 21-37.



Nanduri LS, Maimets M, Pringle SA, van der Zwaag M, van Os RP, Coppes RP. Regeneration of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Radiother and Onc* 2001; 99: 367–372.

NCCN Guide Line Version 1.2015 Salivary Gland Tumors.

Nejaim Y, Silva A, Vasconcelos T, Silva E, Almeida S. Evaluation of radioprotective effect of aloe vera and zinc/copper compounds against salivary dysfunction in irradiated rats. *J Oral Sci* 2014; 56(3): 191-4.

Nelson SD, Pearson PG. Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemical. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 169-195.

Netter FH. *Atlas de Anatomía Humana*. 3ª ed. Barcelona: Elsevier-Masson; 2003.

Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. The role of Ca²⁺ in cell killing. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 484-494.

Oncology Division Advisory Committee (ODAC). Fulfillment of the Accelerated Approval Requirements for the Non-Small Cell Lung Cancer Indication: "Ethyol (Amifostine) Reduces the Cumulative Renal Toxicity Associated with Repeated Administration of Cisplatin in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer". 2003.

Ortega Cabello L. Resveratrol: un polifenol de origen natural con gran potencial adyuvante en la radioterapia de cabeza y cuello. *Ciencias Clínicas* 2013; 14(2): 56-60.

Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chem Toxicol* 2000, 38: 647-659.

Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucoronidation in mice. *Drug Metab Dispo* 1999; 27: 486-494.

Parshad R; Sanford KK; Price FM, Steele VE; Tarone RE; Kelloff GJ; Boone CW. Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res* 1998; 18: 3263-3266.

Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smith DE. Cysteine Protection against X Irradiation. *Sci* 1949, 110:213-4.



Perdomo F, Cabrera Fránquiz F, Cabrera J, Serra-Manjem. Influence of cooking procedure on the bioavailability of lycopene in tomatoes. *Nutr Hosp* 2012; 27: 1542-1546.

Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995; 78(2): 151-160.

Pfaffe T, Cooper J, Beyerlein P. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin Chem* 2011; 57: 675-687.

Polasa K, Naidu AN, Ravindranath I, Krishnaswamy K. Inhibition of B(a)P induced strand breaks in presence of curcumin. *Mutat. Res* 2004; 557: 203-13.

Prasad NR, Mahesh T, Menon VP, Jeevanram RK, Pugalendi KV. Photoprotective effect of sesamol on UVB-radiation induced oxidative stress in human blood lymphocytes in vitro. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 2005; 20: 1-5.

Prasad NR, Srinivasan M, Pugalendi KV, Menon VP. Protective effect of ferulic acid on gamma-radiation-induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat. Res* 2006; 603: 129-34.

Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol* 2000 2016; 70: 11-25.

Radfar L, Sirois DA. Structural and functional injury in minipig salivary glands following fractionated exposure to 70 Gy of ionizing radiation: an animal model for human radiation-induced salivary gland injury. *Oral Sur Oral Med, Oral Patho, Oral Radi and Endodontics* 2003; 96: 267-274.

Raju MR., Schillaci ME., Garpenter SG., Goodhead DT., Ward JF. Radiobiology of ultrasoft x rays. Modification of cell inactivation by dimethylsulfoxide. *Rad* 1996; 145: 563-567.

Ramírez-Boscá A, Soler A, Gutiérrez MAC, Álvarez JL, Almagro EQ. Antioxidant curcuma extracts decrease the blood lipid peroxide levels of human subjects. *Age* 1995; 18: 167-169.

Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Adv Food Nutr Res* 2006; 51: 99-164.

Rao AV, Balachandran B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci* 2003; 5: 291-309.



Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237-56.

Reiter RJ, Tan DX, Erren TCI. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther* 2009; 8: 354-60.

Rouviere H, Delmas A. Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional. Vol. I. 11a ed. Barcelona: Masson; 2007.

Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Lucien C. Utility of melatonin in providing protection against ionizing radiation. *J of Pineal Research* 2011; 50: 350-8.

Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M, Robards K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J Agr Food Chem* 2003; 51: 2532-2538.

Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2070-95.

Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, Vicente V, Alvarez N, Lozano JA. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem. Toxicol* 2009; 47: 386-92.

Sandur S, Deorukhkar A, Pandey M, Pabon AM, Shentu S, Guha S, Aggarwal BB, Krishnan S. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF-KB activity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75 (2): 534-542.

Santos N, Figuerira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization on dimethyl sulfoxide: pharmacological, celular and molecular aspects. *Bio Pharma* 2003; 65: 1035-41.

Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res* 1992; 33: 627-633.

Sebastià-Fabregat N. Marcadores citogenéticos aplicados en biomedicina. [Tesis Doctoral]. Valencia: Universidad de València, Facultad de Medicina, 2003.

Seely D, Wu P, Fritz H, et al. Melatonin as Adjuvant Cancer Care With and Without Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis of



Randomized Trials. *Integr Cancer Ther* 2011; Oct 21 (Epub ahead of print). Doi:10.1177/1534735411425484.

Serin M, Gulbas H, Gurses I, Erkal HS, Yucel N. The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model. *Int J Radiat Biol* 2007; 83: 187–193.

Shaw LM, Bonner HS, Schuchter L. Pharmacokinetics of amifostine: effects of dose and method of administration. *J Clin Oncol* 1999; 26: 34-36.

Shi H-S, Gao X, Li D, Zhang QW, Wang YS, Zheng Y, Cai LL, Zhong RM, Rui A, Li ZY, Zheng H, Chen XC, Chen LJ. A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 2601-2611.

Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi_Khansari. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. *J Radiat Res* 2007; 48: 263-72.

Shirazi A, Hasan-Haddadi G, Asadi-Amoli F, Sakhaee S, Ghazi-Khansari M, Avand A. Radioprotective effect of melatonin in reducing oxidative stress in rat lenses. *Cell Journal* 2011; 13(2): 79-82.

Shirazi A, Mihandoost E, Ghobadi G, Mohseni M. Evaluation of Radioprotective effect on melatonin on whole body irradiation induce liver tissue damage. *Cell Journal* 2013; 14(4): 294-297.

Siler U, Herzog A, Spitzer V, Seifert N, Denelavas A, Hunziker PB, Barella L, unziker W, Lein M, Goralczyk R, Wertz K. Lycopene effects on rat normal prostate and prostate tumor tissue. *J Nutr* 2005; 135: 2050S-2052S.

Silvestre-Donat FJ, Plaza-Costa A, Serrano-Martínez MC. Prevención y tratamiento de las complicaciones derivadas de la radioterapia en pacientes con tumores de cabeza y cuello. *Med Oral* 1998; 3: 137-47.

Skov KA. The contribution of Hidroxyl radical to radiosensitization: a study of DNA damage. *Radiation research* 1984; 99: 502-510.

Soriano del Castillo J y Montoro Pastor A. Últimos avances en radioprotectores de origen natural Colección: Documentos I + D Consejo Seguridad Nuclear 2013.

Speight PM, Barrett AW: Salivary gland tumours. *Oral Dis* 2002; 8 (5): 229-40.



Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis* 2011; 17: 345-54.

Spiro RH, Huvos AG, Berk R, et al.: Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases. *Am J Surg* 1978; 136 (4): 461-8.

Sreejayan N, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 105-107.

Srimal RC, Dharvan BN. Pharmacology of curcumin. A non-steroidal and anti-inflamatori agents. *J Pharmacol* 1973; 25: 447-48.

Srimal RC, Dhawan BN. In «Development of unani drugs from herbal sources and the role of elements in their mechanism of action», RB Arora (De.), Hamdard National Foundation Monograph., Hamdard National Foundation New Delhi 1985; 131-142.

Srinivasan M, Devipriya N, Kalpana KB, Menon VP. Lycopene: an antioxidant and radioprotector against gamma radiation induced cell damage in cultured human lymphocytes. *Toxicology* 2009; 262: 43-49.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011; 5: 109-23.

Steel G. Basic clinical radiobiology. 1st ed. London: Arnold; 1993.

Steinbrecher UP, Zhang H, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Rad Biol Med* 1990; 9: 155-168.

Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH. Acute and late radiation injury in rhesus monkey parotid glands: evidence of interphase cell death. *American J Pathol* 1986; 124: 469-478.

Stone HB, Moulder JE, Coleman CN, Ang KK, Anscher MS, Barcellos-Hoff MH, Dynan WS, Fike JR, Grdina DJ, Greenberger JS, Hauer-Jensen M, Hill RP, Kolesnick RN, Macvittie TJ, Marks C, McBride WH, Metting N, Pellmar T, Purucker M, Robbins ME, Schiestl RH, Seed TM, Tomaszewski JE, Travis EL, Wallner PE, Wolpert M, Zaharevitz D. Models for evaluating agents intended for the prophylaxis, mitigation and treatment of radiation injuries. *Radiat Res* 2004; 162:711-28.

Suárez D, Díaz D, Puente R, Socorro W, Bello JL. Estudio preliminar del efecto radioprotector de diferentes propóleos cubanos. *Apiciencia* 2000; 2: 1-9.



Takahashi S, Nakamura S, Domon T, Yamamoto T, Wakita M. Active participation of apoptosis and mitosis in sublingual gland regeneration of the rat following release from duct ligation. *J Mol Histol* 2005; 36: 199-205.

Thresiamma KC, George J, Kuttan R. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 1998; 17: 431-434.

Tiku AB, Abraham SK, Kale RK. Eugenol as an in vivo radioprotective agent. *J. Radiat. Res* 2004; 45: 435-40.

Toniolo P, Gilberto E. Chéchile. "Melatonina y cáncer." (2012 www.melatonina.es/articulos/568-2012-04-27.html)

Tönnesen HH, Karlsen J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 1985; 180: 402-404.

Trotti A, Byhardt R, Stetz J, et al. Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47(1): 13-47.

Unnikrishnan MK, Rao MNA. Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. *Mol Cel Bioche* 1995; 146: 35-37.

Vacha P, Fehlaue F, Mahlmann B. Estudio fase III randomizado sobre quimioradioterapia postoperatoria con/sin amifostina en cáncer de cabeza y cuello. Hay evidencia de radioprotección? *Strahlenther Onkol* 2003; 179 (6): 385-9.

Valle E, Villanueva V. Masas Cervicales. En: Rodríguez F, editor. *Manual de Otorrinolaringología Práctica para Médicos de Atención Primaria*. Jaen: Formación Alcalá; 2008. p. 717-741.

Venkatesan N. Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity. *Life Sci* 2000; 66(2): 21-28.

Verma SP, Goldin BR, Lin PS. The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 807-812.

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Meltz ML. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat. Res* 1995; 346: 23-31.



Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan DX. Melatonin as a radioprotective agent; a review. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2004; 59: 639-53.

Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols, *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 60-64.

Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 797-799.

Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 199-212.

Vitale A, Bernatene E, Pomilio A. Carotenoides en quimioprevención: licopeno. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2010; 44: 195-238.

Waliszewski K, Blasco G. Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Pública Mex* 2010; 52: 254-265.

Wang YM, Jin BZ, Ai F. The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69(5): 1213-20.

Warleta F., Sánchez C., Campos M., Allouche Y., Beltran G., Gaforio JJ. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients* 2011; 3: 839-857.

Wasdell MB, Jan JE, Bomben MM, et al. A randomized placebo-controlled trial of controlled release melatonin treatment of delayed sleep phase syndrome and impaired sleep maintenance in children with neurodevelopmental disabilities. *J Pineal Res* 2008; 44: 57-64.

Waud WR, Rajagopalan KV. The mechanism of conversion of rat liver xanthine deshydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch Biochem Biophys* 1976; 172: 365-379.

Weiss JF, Landauer MR. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicol* 2003; 189: 1-20.

Wu Q, Manning M, Schmidt-Ullrich R, Mohan R. The potential for sparing of parotids and escalation of biologically effective dose with intensity-modulated radiation treatments of head and neck cancers: a treatment design study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 195-205.



Xiang B, Li YJ, Zhao XB, Zou Y, Yu ZG, Zhao YM. Mechanism of the protective effect of phenylephrine pretreatment against irradiation-induced damage in the submandibular gland. *Exper Ther Med* 2013; 5: 875–879.

Xu J, Yan X, Gao R, Mao L, Cotrim A, Zheng C. Effect of irradiation on microvascular endothelial cells of parotid glands in the miniature pig. *Int J Rad Onco Bio Physics* 2010; 78: 897–903.

Yamamoto H, Hanada K, Kawasaki K, Nishijima M. Inhibitory effect of curcumin on mammalian phospholipase D activity. *FEBS Lett* 1997; 417(2): 196-198.

Yasni S, Yoshiie K, Oda H, Sugano M, Imaizumi K. Dietary Curcuma xanthorrhiza Roxb increased mitogenic responses of splenic lymphocytes in rats, and alters population of the lymphocytes in mice. *J Nutri Sci Vitaminol* 1993; 39: 345-354.

Yilmaz G, Özkan E, Dulundu E, Topaloglu Ü, Özer A, Enis O, Ercan F, Sener G. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in an experimental sepsis model in rats. *Ulus Trauma Acil Cerr Derg* 2013; 19(6): 507-511.

Zhang F, Altorki NK, Mestre JR, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinog* 1999; 20: 445-451.



TESIS DOCTORAL

Efecto Radioprotector del Licopeno,
Curcumina, Hidroxitirosol y
Melatonina sobre Glándula Parótida
de Ratas

ANEXO: TRABAJOS EN RELACIÓN CON LA TESIS



8-. ANEXO: Trabajos en Relación con la Tesis.



1-. Comunicación presentada en IX Congreso Sociedad Valenciano-Murciana de Cirugía Oral y Maxilofacial. Murcia 14 y 15 Noviembre 2013.





2-. Artículo aceptado el 11 de enero de 2016 en el British Journal Oral Maxilofacial Surgery (BJOMS).

Available online at www.sciencedirect.com

 **SciVerse ScienceDirect** 

British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 54 (2016) 275–279

**BRITISH
Journal of
Oral and
Maxillofacial
Surgery**
www.bjoms.com

Radioprotective effects of lycopene and curcumin during local irradiation of parotid glands in Sprague Dawley rats

Pia Lopez-Jornet^{a,*}, Francisco Gómez-García^b, Nuria García Carrillo^b, Ezkai Valle-Rodríguez^a, Ana Xerafin^c, Vicente Vicente-Ortega^b

^a Oral Medicine University of Murcia, Murcia, Spain
^b Pathology, University of Murcia, Murcia, Spain
^c Animal Facility Alliance-Pare Científica de Barcelona, Baldià Reixac, 4-6, Torre R, 4^a planta, Barcelona, 08028, Spain

Accepted 11 January 2016
Available online 28 January 2016

Abstract

Radiotherapy effectively treats cancers of the head and neck. We investigated the possible protective effects of lycopene and curcumin on the parotid glands of 40 female Sprague Dawley rats during irradiation. The study followed European Union regulations 86/609/EEC, 2010/63/EU for animal experimentation. The animals were divided into 4 groups: those treated with curcumin and radiation, those treated with lycopene and radiation, those treated with dimethyl sulphoxide (DMSO) and radiation, and those treated with radiation alone. All compounds were given intraperitoneally the day before irradiation. The total dose of radiation was 20 Gy. Morphological and histopathological analyses showed less cell necrosis in the group treated with curcumin than in the other groups, but the difference was not significant. Analysis of structural damage to the parotid ducts and vacuolisation showed significant differences among all groups ($p=0.023$, $p<0.01$). Lycopene and curcumin given 24 hours before irradiation reduced the structural damage to the salivary glands. Further studies are needed to confirm these findings. © 2016 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. All rights reserved.

Keywords: Curcumin; Lycopene; Parotid; Radiation; Rats.

Introduction

An important secondary effect of radiotherapy to the head and neck is structural damage to the salivary glands, which can impair function.¹ As problems such as xerostomia, dysphagia, altered taste, risk of dental caries, and difficulty in swallowing and speaking can have a considerable impact on the quality of life,^{1,2} substances that might reduce the biological damage caused by ionising radiation are being investigated. They must be free from toxic effects and must potentially protect against the genotoxic damage of radiation.^{3–8}

A new field of research is looking at plant extracts and phytochemicals as modifiers of these effects.^{9,10} Antioxidants can take the form of nutrients or synthetic molecules, which act through oxidative modification.^{10–12} Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) is a phenolic compound of low molecular weight that belongs to the group of diarylheptanoids. It is one of the curcuminoids present in the root of the plant species *Curcuma*, and has antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and chemotherapeutic properties. These result mainly from the action of curcumin on a large number of molecular targets such as transcription factors, growth factors and their receptors, proteins, cytokines, enzymes, or on cell proliferation regulator genes, and apoptosis.^{13,14}

* Corresponding author at: Clínica Odontológica Universitaria, 2 planta, Hospital Morales Meseguer, Avda. Marqués de los Vélez s/n, Murcia 30008 Spain. Tel.: +34 968 398588; fax: +34 968 398576.
E-mail address: majornet@um.es (P. Lopez-Jornet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2016.01.013>
0266-4356/© 2016 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. All rights reserved.



Ionising radiation causes the generation of reactive oxygen species, which cause oxidative stress in target tissues. They produce an imbalance of the pro-oxidant and antioxidant in the cells, and they attack diverse cellular macromolecules such as DNA, lipids, and proteins, eventually inducing cell death.^{9,13–17}

Lycopene is the most abundant carotenoid found in the tomato (*Lycopersicon esculentum*), with concentrations ranging from 0.9 to 4.2 mg/100 g depending on the variety. Diverse studies have investigated the antioxidant capacity of lycopene and its role in the prevention and treatment of chronic conditions including cancers, neurodegenerative diseases, and cardiovascular and bone disorders, either alone or in combination with radiotherapy.^{18–25} When given before treatment, it protects cells against the damage caused by radiation, as it inhibits peroxidation of the membrane lipids and free radicals that result from the breakage of DNA strands.

We therefore aimed to investigate the possible protective effects of curcumin and lycopene during irradiation of the parotid glands in Sprague Dawley rats.

Material and methods

Animals

We treated 20 female Sprague Dawley rats weighing 200–250 g and aged about 5 months. All efforts were made to minimise the potential suffering of the animals, and the study followed European Union norms for animal experimentation (86/609/EEC; 2010/63/EU). The University of Murcia Bioethics Committee approved the study.

The animals were supplied by the University of Murcia (Spain) animal experiment facility (Research Support Services Animal Laboratory, license number REGAES 300305440012) and were housed in cages with free access to food and water. The room in which they were kept had a controlled 12/12 hour light/darkness cycle and a temperature of 22 °C (86/609/EEC).

Agents

We used concentrated extract of curcumin 94% high performance liquid chromatography (HPLC) purity (Sigma-Aldrich Química SL, Madrid, Spain) dissolved in 0.5% dimethyl sulphoxide (DMSO), and concentrated extract of lycopene more than 90% HPLC purity (Sigma-Aldrich Química SL, Madrid, Spain) dissolved in 0.5% DMSO. All experiments were done under subdued lighting.

Study design

The animals were divided into 4 groups of 10 (using a randomisation list generated with specific software (<http://www.randomization.com>) and treated with radiation. Before treatment, group I was given curcumin (50 mg/kg

body weight), group II lycopene (20 mg/kg body weight), and group III DMSO, all intraperitoneally. Group IV, the control group, was treated with radiation alone. All compounds were given 24 hours before irradiation.

Irradiation

The rats were anaesthetised with ketamine (Imalgene® 1000 Merial, Barcelona, Spain) and xylazine (Xylagesic® 2% (20 mg/ml) Laboratorios Calier SA, Barcelona, Spain). They were irradiated with a linear accelerator (Yxlon Smart, Krautkrümer Forster, Madrid, Spain) calibrated for the field size of interest using special small ionisation chambers and thermoluminescence dosimetry. Single radiation doses of 20 Gy were given to a depth of 3 cm and at a distance of 100 cm from the skin. An axial beam was directed toward the head of the rat extending from the retroauricular region into the tip of the nose to include all potential salivary gland tissue. The animals were killed in a carbon dioxide chamber 24 hours after irradiation, and the parotid glands were analysed.

Histopathological study

Biopsy specimens were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and cut into 5–7 µm sections along a plane perpendicular to the incision. A single investigator, blinded to the group assigned to each specimen, studied all the samples. Following the criteria of Lee et al.,²⁴ necrosis, loss of acinar structure, damage to the ducts, and vacuolisation of the salivary glands were evaluated, and changes scored from one to four (1 = none; 2 = mild; 3 = moderate; and 4 = severe).

Statistical analysis

Data were analysed with the help of SPSS statistical software package, version 15.0 (SPSS, Chicago, USA). Absolute and relative frequencies were used for qualitative variables, and the chi square test was used to evaluate the association between them. Probabilities of less than 0.05 were considered significant.

Results

A total of 40 parotid glands from 20 animals were analysed. Table 1 shows the histopathological changes. The scores for cell necrosis and loss of acinar structures were not significantly different among the groups ($p=0.39$; $p=0.16$), but the curcumin group showed less cell necrosis. Differences in ductal damage among groups were significant ($p=0.02$). Damage to the ducts and vacuolisation in the lycopene group were significantly different from those of the other 3. There were significant differences in vacuolisation among all the groups ($p<0.001$) (Figs. 1–3).

Table 1
Comparison of histological evaluation of damage to parotid gland among groups. Data are number (%).

	Curcumin (n=10)	Lycopene (n=10)	DMSO (n=10)	Control (n=10)	p value
Cell necrosis:					0.39
None	6	4	6	3	
Minimal	2	4	0	2	
Moderate	2	1	2	4	
Severe	0	1	2	1	
Loss of acinar structure:					0.16
None	4	5	6	0	
Minimal	2	2	0	2	
Moderate	3	2	2	7	
Severe	1	1	2	1	
Ductal damage:					0.02
None	3a	3a	6a	0	
Minimal	2a	4a	1a	0	
Moderate	4a	2b	3a	6a	
Severe	1a	1	0	4a	
Vacuolisation:					<0.001
None	3a	1a	5a	0	
Minimal	3a	2a	0	2a	
Moderate	2a	7b	5ab	1a	
Severe	2a	0	0	7b	

DMSO: dimethyl sulphoxide
a: different from each other and from all the others.
b: different from other groups.

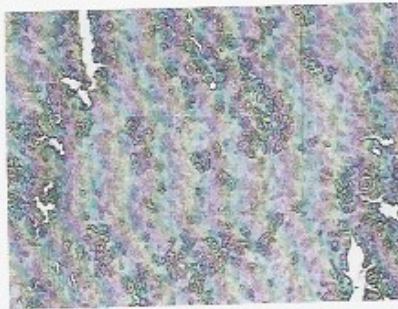


Fig. 1. Histopathological study of parotid glands control treated with radiation alone (haematoxylin and eosin, original magnification x 40).

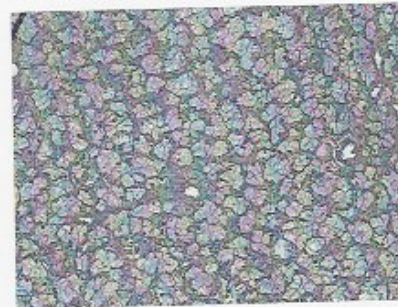


Fig. 2. Histopathological study of parotid glands treated with curcumin and radiation (haematoxylin and eosin, original magnification x 40).

Discussion

Radiotherapy to treat malignant tumours of the head and neck often affects the structure of the salivary glands,^{1,2} and in their reviews of the mechanisms whereby this occurs, Nagler¹⁰ and Vissink et al¹ suggested that the generation of free radicals makes serous cells liable to damage. When radiation is absorbed by a living cell, ionisation and excitation of the atoms cause primary damage that changes the cell structure, damages essential components, and results in a visible biological lesion.^{2,9} In our study, histopathological analysis showed that treatment with curcumin (50 mg/kg body weight) or lycopene (20 mg/kg body weight) 24 hours before irradiation resulted in less damage to the structure of the glands.

These compounds might therefore protect against the effects of radiation.

When ionising radiation penetrates living tissue, it generates numerous reactive free radicals, which can react with vitally important macromolecules such as DNA, proteins, or membrane components, causing cell damage, dysfunction, and death.^{2,4,7} Damage to DNA is the most important factor in cell death. The parotid gland is serous in type, and it is essential to protect acinar cells, which contribute most of the constituents of saliva (including water and digestive enzymes), during irradiation to prevent a reduction in salivary flow.^{2,3,7}

Grehn et al¹⁵ morphometrically analysed the long-term effects of fractionated radiation doses of 30–40 Gy on parotid

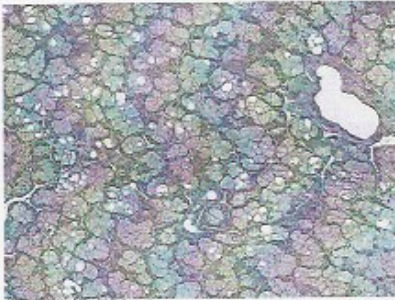


Fig. 3. Study of parotid glands treated with lycopene and radiation (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 40$).

acinar cells. After 180 days, they had considerably reduced in number after doses of 40 Gy. The authors described this as an ongoing degenerative process resulting in progressive loss of acinar cells, particularly serous cells.

The basic principal of radiotherapy is to damage cancerous cells sufficiently to bring about their death, and to damage healthy tissues as little as possible.⁷ Several controlled trials have shown that high doses of supplementary antioxidants during radiotherapy can reduce the local control of tumour, so it is uncertain as to what doses and which compounds are really safe.⁹ Before high doses are given, there must be clear evidence that the benefits outweigh the potential risks, and for this reason, assessment of the protective action of commonly used phytochemicals is essential before they can be used as a source of non-toxic radioprotection.^{5,9}

Jagetia¹¹ reported that curcumin protected against the unwanted effects of irradiation and facilitated the positive effects. Reported information suggests that the radioprotective effect might result mainly from its ability to reduce oxidative stress and to inhibit the transcription of genes related to oxidative stress and inflammatory responses, whereas the radiosensitive activity might result from the up-regulation of the genes responsible for cell death. Curcumin can therefore improve the inhibiting effect of radiation when given before treatment. It improves the antitumour effects of radiation both in vitro and in vivo by down-regulating PRP4K and by modulating the cellular redox status through suppression of the antioxidant enzyme system.^{12–14,18} We found that treatment with curcumin was associated with significantly less damage to the parotid gland, shown by less cell necrosis and a reduction in the loss of acinar cells, but there were no significant differences.

Histopathological analysis showed acinar atrophy associated with cytoplasmic vacuolisation in the control group. In some cases, vacuolisation had displaced the nucleus, which appeared polymorphic and condensed, from its original position. Some authors have observed that cytoplasmic vacuolisation in irradiated cells is caused by the expansion of

the endoplasmic reticulum, and is associated with the cellular status that precedes apoptosis.^{7,8,24} The cellular borders were diminished and it was not possible to delineate adjacent cells. Ductal damage was common, and in some areas there was necrotic tissue.

Thresiamma et al¹⁶ showed that curcumin protects against toxicity caused by radiation. Irradiation of the entire body of a rat (10 Gy in 5 fractions) produced pulmonary fibrosis after 2 months and an increase in hydroxyproline and collagen in the lungs.

Inano and Onoda¹⁵ investigated the radioprotective action of curcumin on the formation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), and on tumourigenesis and mortality induced by gamma-ray radiation. However, trials that monitored survival found that it was not effective when given 3 days before or after irradiation, and although it can inhibit acute and chronic effects, it does not have an impact on survival.

Lycopene is one of the most potent antioxidants among the dietary carotenoids. It exhibits the highest antioxidant activity and singlet oxygen quenching ability of all these pigments, and, as an antioxidant, prevents the cellular damage of lipid membranes and DNA. It also activates phase II detoxifying enzymes at the transcriptional level, modulates the cell cycle, and induces apoptosis in cancer cells.^{19–22} Our results correspond to data analysed by Meydan et al²³ who reported a significant reduction in histopathological changes in a group treated with lycopene and radiotherapy compared with those in a group treated by radiotherapy alone. They found that in hepatic tissue, lycopene significantly reduced the radiotherapy-induced oxidative injury to the liver.

The dose of lycopene used (20 mg/kg body weight) was proposed by Srinivasan et al¹⁹ who found that it restored the antioxidant status to near normal, and reduced levels of the lipid peroxidation index as well as damage to DNA. At present, drugs used to reduce the sensitivity of the salivary glands to radiation include radical scavengers (amifostine, tempol), sialogogues (pilocarpine), suppressants of apoptosis (insulin growth factor 1, keratinocyte growth factor), and agents that improve the survival and proliferation of progenitor cells and the expansion of ductal and acinar cells.^{1,2,7,25} However, to permit the development of effective radioprotective agents, further research on antioxidants is needed with adequate sample sizes and different animal models. Another important focus would be to apply the outcomes of studies on the irradiation of mice to clinical practice in combination with the different regimens used to treat cancer of the head and neck.⁷

Our study has some limitations as we did not evaluate glandular function or measure salivary flow, and we did not analyse the antioxidant profile of the compounds assayed.

However, we have shown that applications of lycopene and curcumin 24 hours before acute local irradiation had a protective effect on the structure of the parotid glands. The clinical use of radioprotective agents is a subject for further research, but the therapeutic effects of radiation must be retained.



Conflict of Interest

We have no conflicts of interest.

Ethics statement/confirmation of patient permission

All efforts were made to minimise the potential suffering of the animals, and the study followed EU norms for animal experimentation. The study was approved by the University Bioethics Committee.

References

1. Vissink A, Jansen JA, Spijkerker FK, et al. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:199–212.
2. Rodman RS. On approaches to the functional restoration of salivary glands damaged by radiation therapy for head and neck cancer, with a review of related aspects of salivary gland morphology and development. *Biotech Biochem* 2008;83:103–30.
3. Cotrim AP, Sowers A, Mitchell JB, et al. Prevention of irradiation-induced salivary hypofunction by microvessel protection in mouse salivary glands. *Mol Ther* 2007;15:2101–6.
4. Şimşek G, Gürocaç S, Karadağ N, et al. Protective effects of resveratrol on salivary gland damage induced by total body irradiation in rats. *Laryngoscope* 2012;122:2743–8.
5. Weiss JF, Landauer MR. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology* 2003;189:1–20.
6. Fung YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872–9.
7. Grundmann O, Mitchell GC, Limesand KH. Sensitivity of salivary glands to radiation: From animal models to therapies. *J Dent Res* 2009;88:894–903.
8. Ramos FM, Postual ML, de Almeida SM, et al. Evaluation of radioprotective effect of vitamin E in salivary dysfunction in irradiated rats. *Arch Oral Biol* 2006;51:96–101.
9. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003;23:363–98.
10. Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis* 2002;8:141–6.
11. Jageta GC. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:301–20.
12. Khalif A, Lev-Ari S, Vexler A, et al. Curcumin: a potential radio-enhancer in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2009;119:2019–26.
13. Srimprakash AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:511–45.
14. Shinnu RA, Euden SA, Platten SL, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004;10:6847–54.
15. Imano H, Onoda M, Imafuku N, et al. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 2000;21:1835–41.
16. Therasian KC, George J, Kuttan R. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17:431–4.
17. Khalif A, Hurst R, Kyker K, et al. Curcumin: a new radio-sensitizer of squamous cell carcinoma cells. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:317–21.
18. Camacho-Alonso F, López-Jarret P, Tudela-Mulero MR. Synergic effect of curcumin or lycopene with irradiation upon oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Dis* 2013;19:465–72.
19. Srinivasan M, Sudheer AR, Pillai KR, et al. Lycopene as a natural protector against gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770:659–65.
20. Srinivasan M, Devipriya N, Kalpana KB, et al. Lycopene: an antioxidant and radioprotector against gamma-radiation-induced cellular damages in cultured human lymphocytes. *Toxicology* 2009;262:43–9.
21. Breinhult V, Lauridsen ST, Dhaneshwar B, et al. Dose response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett* 2008;154:201–10.
22. Prayesh Islamian J, Mehrabi H. Lycopene as a carotenoid provides radioprotective and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: an overview. *Cell J* 2015;16:386–91.
23. Meydan D, Günsel B, Bilgili B, et al. Protective effect of lycopene against radiation-induced hepatic toxicity in rats. *J Int Med Res* 2011;39:1249–52.
24. Lee HJ, Lee YJ, Kwon HC, et al. Radioprotective effect of heat shock protein 25 on submandibular glands of rats. *Am J Pathol* 2006;169:1041–11.
25. Grehn AL, Gustafsson H, Frumén I, et al. Ultrastructural morphology of parotid acinar cells following fractionated irradiation. *Oral Oncol* 1997;330:23–8.