



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Efecto Paradójico de Algunas Sustancias
Radioprotectoras en la Radiosensibilización
de Células de Melanoma Metastásico B16F10**

D. Miguel Alcaraz Saura

2018



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Este trabajo de investigación comenzó gracias al disfrute del doctorando de una Beca de Colaboración del Ministerio de Educación y Universidades para alumnos de último curso de carrera en la Universidad de Murcia durante el curso académico 2010-2011, en el Departamento de Dermatología, Estomatología y Radiología y Medicina Física de la Universidad de Murcia.



Este proyecto se ha realizado gracias a una ayuda del Programa Nacional de I + D+ i dentro del Programa CENIT del Ministerio de Ciencia y Tecnología denominado “Investigación industrial de alimentos y dietas específicas para mayores” (Acrónimo: SENIFOOD).

**Facultad de Medicina y Odontología
Área de Radiología y Medicina Física**

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 88 3601 – www.um.es/webs.um.es/mab

Agradecimientos

Deseo expresar mi gratitud al **Profesor Miguel Alcaraz Baños**, Profesor de Radiología y Medicina Física por su ayuda y guía durante todo el período de mis estudios.

Un agradecimiento muy especial también para la **Profa. Amparo Olivares Rueda** por llevarme a través de los rudimentos y las realidades prácticas de los cultivos celulares y los estudios de citotoxicidad; así como por su incansable apoyo y estímulo sin el que no hubiera podido llegar al final de este trabajo.

Al **Prof. Manuel Canteras Jordana** Catedrático de Bioestadística en el Departamento de Ciencias Sociosanitarias de la Universidad de Murcia por su ayuda en la realización, análisis e interpretación de los resultados estadísticos obtenidos en este estudio.

Al **Dr. Julián Castillo Sánchez** y a **Nutrafur SA**, por su gran interés en mi trabajo y su asistencia en la extracción e identificación de los principios activos utilizados en este estudio, así como por las donaciones desinteresadas de algunas sustancias ensayadas.

También agradezco el gran interés, ayuda y esfuerzo del personal del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, particularmente a:

- **Dra. María Dolores Alcázar Fernández** y a **D. Régulo Ángel Cánovas Ciller** por su ayuda en la irradiación de mis modelos experimentales y durante las evaluaciones de las diferentes dosimetrías de radiación realizadas como paso previo necesario para la realización de este estudio.

- **Dra. Antonia Bernabeu Esclapez**, **Dr. José Muñoz Ramos** y **Dra. Juana M^a García Reverte** por su ayuda en el establecimiento de los cultivos celulares y su ayuda en la realización de los ensayos de micronúcleos.

- **Dra. Carmen Lagares Martínez** y el **Dr. Antonio Cano Gómez** por su asistencia en el mantenimiento de los animales en las instalaciones de la Universidad de Murcia.

- **La Dra. Fara Sáez Belmonte** y a **D. Antonio Espinosa Lozano** por su ayuda en la preparación de las muestras electrónicas escaneadas imprescindibles para realizar el análisis de imágenes y su estudio microscópico.

Lo importante es seguir adelante

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
RADIOPROTECTORES EN MEDICINA	3
CLASIFICACION DE LOS RADIOPROTECTORES	10
MECANISMOS DE PROTECCIÓN FRENTE A LAS RADIACIONES IONIZANTES	19
ENSAYOS DISPONIBLES EN DOSIMETRIA BIOLOGICA	24
FLAVONOIDES	35
RADIOPROTECTORES A BASE DE EXTRACTOS DE PLANTAS	49
II. OBJETIVOS	57
III. MATERIAL Y MÉTODOS	61
MATERIALES	63
MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y ANIMALES	63
EQUIPOS UTILIZADOS	66
EXTRACTOS Y REACTIVOS QUÍMICOS UTILIZADOS	72
MÉTODOS	85
ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT	85
ENSAYO DE MN EN LINFOCITOS HUMANOS CON BLOQUEO CON CYTOCH B	89
ENSAYO DE MN EN ERITOCITOS DE MEDULA OSEA	94
DETERMINACIÓN DEL GLUTATION INTRACELULAR	98
MÉTODO ESTADÍSTICO	101
IV. RESULTADOS	103
RESULTADOS MORFOLÓGICOS	105
ENSAYO DE MICRONUCLEOS EN MÉDULA ÓSEA DE RATÓN	111
ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS BLOQUEADOS CITOCINETICAMENTE	125
SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS PNT2	149
SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS TRAMPC1	173
SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁSICO	193
DETERMINACIÓN DEL GLUTATIÓN INTRACELULAR	215
V. DISCUSIÓN	225
VI. CONCLUSIONES	247
VII. RESUMEN	251
VIII. BIBLIOGRAFÍA	259
IX. ANEXO. Listado de Publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral.	289

I. Introducción.

I. INTRODUCCIÓN

RADIOPROTECTORES EN MEDICINA

La radiación ionizante (RI) constituye una herramienta terapéutica y de diagnóstico ineludible en la medicina actual y también en la industria moderna; sin embargo, sus grandes beneficios están restringidos debido al daño inducido por la radiación en los tejidos normales. Estos daños o lesiones reducen considerablemente las dosis terapéuticas que pueden administrarse a los tumores, disminuyendo así la ganancia o el beneficio terapéutico que se podría llegar a obtener. Por ello, el uso de la radiación ionizante en medicina siempre se ha racionalizado sobre la base del riesgo de su utilización versus el beneficio que le aporta al paciente. En la vida cotidiana, la exposición a radiación ionizante es habitual con el fondo radiactivo natural pero también puede ocurrir en otros entornos y aplicaciones tales como la obtención de una imagen radiográfica, una exploración de medicina nuclear, el tratamiento antitumoral en oncología radioterápica, la fabricación de equipos radiológicos, la obtención y producción de radionúclidos, la investigación biomédica, la utilización de reactores nucleares, o el uso de las radiaciones en el campo militar y los riesgos de accidentes y ataques terroristas. (ALCARAZ et al., 2011; SORIANO y MONTORO, 2013).

Dado que el uso de la RI se ha entrelazado ineludiblemente con las actividades humanas, la mejor opción posible consiste en desarrollar contramedidas frente a la RI que sean aceptables para reducir el daño que pueda ocasionar estas RI en sus diferentes aplicaciones. Los tres principios cardinales de la protección radiológica son: (a) la utilización de materiales de protección física (blindajes) de las áreas no expuestas directamente a la RI, especialmente los órganos radiosensibles como la médula ósea, las gónadas y la glándula tiroides; (b)

incrementar la distancia entre la fuente de radiación y los trabajadores profesionalmente expuestos o los pacientes tratados; y (c) la reducción del tiempo de exposición a la RI. Durante las últimas décadas, se ha adoptado la estrategia o criterio ALARA para reducir las preocupaciones cada vez mayores sobre la aparición de mutaciones somáticas y hereditarias inducidas por la RI (PRASAD et al., 2004; ALCARAZ et al., 2011).

A pesar de que estas medidas físicas de protección radiológica han servido y continúan siendo útiles, todavía quedan muchas limitaciones en el uso de las RI en sus diferentes aplicaciones. En primer lugar, el blindaje de plomo y otras medidas físicas de protección son medidas engorrosas e impracticables en numerosas situaciones, como por ejemplo durante la fluoroscopia en donde es imposible proteger todo el tracto gastrointestinal (uno de los órganos más radiosensibles del organismo humano) contra el daño inducido por RI. En segundo lugar, aumentar la distancia entre la fuente de RI y las personas expuestas puede no ser práctico o posible para muchos trabajadores, pacientes o incluso astronautas expuestos a radiación ionizante artificial o natural. Finalmente, reducir el tiempo de exposición tampoco es relevante o posible en numerosas circunstancias para la población, por ejemplo durante accidentes nucleares, exposiciones bélicas o ataques terroristas con armamento nuclear (PRASAD et al., 2004; ALCARAZ et al., 2011; SORIANO y MONTORO, 2013).

En estas ocasiones la mejor opción posible sería desarrollar contramedidas frente a la RI que sean aceptables para reducir el daño que puedan ocasionar estas RI durante su uso; lo cual conduce a la búsqueda de una **radioprotección química** que complemente la estrategia ALARA adoptada para las personas que trabajan directamente con RI y que consiga reducir las preocupaciones de las lesiones deterministas y no deterministas producidas por la RI (ALCARAZ et al., 2011).

El uso médico de las RI en el **radiodiagnóstico** conlleva beneficios médicos evidentes pero exponen a radiaciones ionizantes a pacientes y trabajadores profesionalmente expuestos cuyo riesgo de lesiones radioinducidas no suele ser bien percibido ni siquiera por los propios profesionales de la salud dada la falta de claridad en el lenguaje y de lo cotidiano de su utilización en clínica. Aunque tanto en el diagnóstico como en el tratamiento se preconiza la idea de que el beneficio del paciente debe ser netamente superior al riesgo al que se le expone, es un reto hoy día para la ciencia paliar estos efectos adversos que pueden desencadenar las RI tanto en pacientes como en los trabajadores profesionalmente expuestos (Alcaraz et al., 2009a,b , 2001; 2013).

La utilización de las RI en **oncología radioterápica** también es uno de los campos médicos en donde se experimentan efectos secundarios adversos inducidos por las RI; los tejidos sanos incluidos en los volúmenes irradiados sufren daños tanto deterministas (depilación, eritema, mucositis, alteraciones gastrointestinales) como no deterministas (cáncer y otras lesiones genéticas). Dado que a mayor dosis de RI administrada o absorbida en un tejido

tumoral mayor será la capacidad del control local de la enfermedad, es evidente la necesidad y la tendencia actual de aplicar cada vez dosis más altas a todos los tumores. Pero junto con ello, este incremento de la dosis de RI administrada al tumor va acompañado por los efectos que se producen sobre los tejidos sanos peritumorales. Estas lesiones peritumorales condicionan la dosis administrada y en muchos casos condicionan la dosis total administrada que, en ocasiones, imposibilita poder administrar la dosis de RI que se precisaría para alcanzar un mayor grado de curación tumoral. Por ello, en oncología radioterápica se intenta mejorar el índice terapéutico por diferentes vías para minimizar el daño inducido por la RI: por un lado, mediante avances tecnológicos con el desarrollo de nuevas técnicas de imagen; por otro, mediante la utilización de herramientas informáticas con fusión de imágenes para determinar más adecuadamente el volumen tumoral y las zonas de afectación tisular del tumor; y además con el desarrollo de técnicas de planificación tridimensional y de tratamientos con intensidad modulada. Pero junto con todo lo anterior, también resulta de gran interés el poder modificar la respuesta biológica de los tejidos a la RI que permita mejorar el índice terapéutico (SORIANO y MONTORO, 2013).

En este último punto, cobra especial interés la utilización de sustancias capaces de proteger a los tejidos sanos, de modo que disminuyan los efectos secundarios producidos por su inclusión en los volúmenes de tratamiento radioterápico. Teniendo en cuenta esta tendencia actual, se hace evidente la necesidad de desarrollar nuevas sustancias radioprotectoras efectivas; y, lo que en muchas ocasiones es más complicado, que siendo atóxicas puedan proteger potencialmente del daño citotóxico inducido por la RI de los efectos genotóxicos o teratogénicos disminuyendo la generación de radicales libres radioinducidos. Todo ello obviamente, sin afectar a la terapia antitumoral sobre el tejido neoplásico tratado (SORIANO y MONTORO, 2013). En este sentido, y en diferentes ocasiones, hemos descrito que estas sustancias radioprotectoras también pueden proteger a las células neoplásicas del efecto terapéutico lesivo de las RI, por lo que podría ser contraproducente su utilización sin conocer adecuadamente los mecanismos específicos o vías de actuación por los que cada sustancia radioprotectora pueda ejercer su efecto (ALCARAZ et al, 2009; 2011)

Es difícil encontrar un radioprotector ideal ya que se exige que debe tener una alta efectividad contra las RI pero también con una ausencia de toxicidad (MAURYA, 2004). En un intento de cambiar la tendencia farmacológica actual de sintetizar artificialmente un radioprotector ideal se esta ensayando durante los últimos años el desarrollo de agentes o sustancias procedentes de productos naturales. Dentro de los productos de origen natural, aquellos que proceden de plantas e hierbas han mostrado una gran efectividad como radiomoduladores y, hoy día, se consideran que tienen un futuro muy prometedor. Desde hace años, los compuestos herbales han sido utilizados en medicina para tratar diferentes enfermedades humanas. En la medicina moderna una gran plétora de plantas se utilizan para mitigar y tratar los radicales libres producidos por gran número de enfermedades como el cáncer, la diabetes y algunos desórdenes neurovegetativos. Si se tiene en cuenta esta

capacidad antioxidante o eliminadora de radicales libres, es fácil interpretar que estas sustancias también pueden reducir los daños producidos por las RI, al disminuir los efectos de los radicales libres inducidos por su interacción con los organismos vivos. Hoy día, la OMS estima que aproximadamente el 80% de la población mundial depende de la utilización de medicamentos a base de compuestos herbales, generalmente alternativos a los elevados costes de los utilizados en la medicina moderna (ACHEL et al., 2012),

Durante las últimas décadas se han producido algunas situaciones de **emergencias radiológicas** que han puesto de manifiesto también el interés de utilizar sustancias radioprotectoras. El incidente de Chernobyl en 1986, con la irradiación externa debido a la gran cantidad de material radiactivo depositado sobre el suelo (principalmente ^{137}Cs) y a la ingestión dietética de numerosos radionúclidos en productos alimentarios (^{121}I , ^{134}Cs y ^{137}Cs en leche y verduras) recomendaron la ingesta de yoduro potásico vía oral para minimizar la captación tiroideas de las sustancias radiactivas. Los liquidadores del reactor de Chernobyl fueron alimentados con una dieta especial (llamada biofactor antioxidante) que contenía rutina como el ingrediente principal persiguiendo disminuir significativamente los factores clastogénicos inducidos por la RI (EMERIT, 1995). Para los habitantes próximos a la central nuclear se consideró una estrategia viable el enriquecimiento de los alimentos con betacarotenos (WEISS y LANDAUER, 2000). También se ha descrito que el elevado consumo de frutas y verduras de hoja verde ofreció protección significativa frente a la incidencia de cáncer de vejiga en los supervivientes de la bomba atómica en Japón y frente a otros tipos de cáncer, supuestamente inducidos por la sobreexposición a la radiación o por su exposición de forma crónica (NAGANO, 2000). En estos casos de emergencias radiológicas, las sustancias radioprotectoras de interés son capaces de mitigar los efectos adversos de la RI una vez producida la exposición, ya que se han de administrar después de verse expuesto a la RI dado que es imposible predecir un desastre de estas características. En estos casos, se buscan agentes o sustancias capaces de reparar el daño celular radioinducido, estimular el sistema inmune e incluso secuestrar radionúclidos para propiciar un aclaramiento y una excreción rápida fuera del organismo (SORIANO y MONTORO, 2013).

La constatación de la falta de seguridad de algunas naciones que poseen fuentes de alta actividad radiológica descrita en sus informes por el Organismo Internacional de la Energía Atómica (OIEA o IAEA), junto con el asesinato en noviembre de 2006 de Alexander Litvinenko, un exagente de la KGB, son sólo dos ejemplos de cómo se podrían utilizar las radiaciones ionizantes como armas radiológicas **en ataques terroristas**. Según Kimery y Mayers (2003) la posibilidad de un ataque nuclear o radiológico no puede ser descartada en el escenario político actual. Si hubiese un accidente nuclear, el personal de primera fila que deberían actuar en la intervención serían los más afectados ya que las lesiones a nivel fisiológico que podrían sufrir darían lugar a un mal funcionamiento de su sistema inmunológico y, finalmente, incluso podrían presentar complicaciones infecciosas graves. Todo ello, además, sumándose a los efectos

lesivos inducidos como el calor desprendido a los posibles traumatismos mecánicos o de presión que añadirían lesiones a la población afectada. Numerosas lesiones subletales actuarían de forma sinérgica para llegar incluso a ser letales. En estimaciones de la OIEA hay unas 10.000 unidades de radioterapia y fuentes radiológicas industriales, así como unos 300 equipos grandes productores de RI en todo el mundo. Estas fuentes representan una seria amenaza puesto que los materiales radiactivos pueden ser robados y utilizarse como dispositivos de dispersión radiológica o dispositivos de exposición radiológica (SORIANO y MONTORO, 2013). Además, si se hicieran ataques de forma deliberada en los reactores nucleares, en las industrias radiológicas o en unidades militares, las consecuencias podrían ser devastadoras para la población. La RI que emana de las fuentes radiactivas podría afectar al ganado, a los depósitos de agua, flora y fauna regionales y por consiguiente a un gran número de productos alimentarios. Debido al temor de ataque terrorista radiológico numerosos países poseen reservas de IK, Ca-DPTA, DPTA-Zn o azul de Prusia, como reservas nacionales estratégicas para actuar ante este tipo de emergencias radiológicas. Algunos países almacenan agentes específicos (2,3-dimercaptopropano-1-sulfonato) o incluso productos extraídos de extractos herbáceos también para este tipo de situaciones (SORIANO y MONTORO, 2013).

Numerosos autores han puesto de manifiesto que las sustancias radioprotectoras son necesarias en el ámbito de las primeras actuaciones mitigar los efectos indeseables de las RI. En relación con la selección de estos agentes radioprotectores cabe mencionar que los de origen herbal tienen el potencial necesario para satisfacer una necesidad urgente en la lucha contra el terrorismo radiológico y por tanto para la protección del personal en casos de emergencia por desastres radiológicos (ARORA et al., 2008). Sin embargo, no existe, al día de hoy, una sustancia radioprotectora ideal para uso militar; solo una amplia lista de posibles agentes radioprotectores. SEED (2005) describió, teniendo en cuenta diferentes escenarios en los que actúan los cuerpos de intervención (bomberos, policías, militares), una lista de características deseables en un agente radioprotector entre las que destacarían su capacidad para:

- Reducir, preferentemente en un factor de 10, la dosis de radiación que produce ineficacia en el trabajo o en el combate.
- Ofrecer una protección duradera, al menos de varios días.
- No poseer efectos secundarios graves o toxicidad elevada.
- Ser altamente protector y eficaz en un entorno global, es decir, proteger todas las poblaciones en riesgo.
- Prestar protección contra los efectos agudos y crónicos de diferentes tipos de radiación.

Además, su efecto no debería decaer con el uso continuado (habitación); ni ser tóxico incluso a dosis repetidas; debería ser fácilmente administrable (tabletas, cápsulas, inhalador, parche cutáneo, hisopo); actuar en un amplio rango de tiempo para

ofrecer una protección duradera; poseer un efecto rápido tras su administración; ser eficaz incluso tras dosis repetidas; y, siendo químicamente estable, poseer una larga vida útil. Por último, también es muy importante que debe ser eficaz incluso cuando se administre después de la exposición a la RI puesto que es imposible predecir con certeza el momento en el que ocurrirá la exposición.

Por otra parte, las misiones tripuladas en el espacio suponen viajes largos fuera de la protección proporcionada por el campo atmosférico y magnético de la tierra e implica que los astronautas que participan en estas misiones están expuestos a una mayor radiación cósmica, despertando el interés científico de las aplicaciones de los **radioprotectores en el espacio**. Desde hace años se conoce que los astronautas que se exponen a la radiación cósmica natural en el espacio pueden sufrir efectos negativos en su salud a corto y largo plazo (CUCINOTTA, 2001; SEED, 2002). Una de las principales dianas de estos efectos agudos inducidos por la RI causados por los eventos de las partículas solares lo constituye el tejido hematopoyético (ESPOSITO, 2001). Aunque también, más específicamente, se ha relacionado con la aparición de cataratas, cáncer y una disminución de la esperanza de vida debido al aumento de exposición a la RI en estas situaciones. En un primer momento, la amifostina fue el primer radioprotector que tomaron los astronautas de USA en su primera visita a la Luna para protegerse de la RI producidas durante las posibles erupciones solares (ARORA et al, 2008). Este radioprotector provoca algunas reacciones adversas graves indeseables por sí mismo. También se ha descrito que el aceite de oliva mejora la eficacia de reparación del ADN en los astronautas expuestos. Incluso, un derivado de la soja, inhibidor de la serín-proteasa, ha demostrado actividad anticitotóxica en las células siendo eficaces en la radioprotección frente a los cambios asociados a la RI (KENNEDY et al., 1993; 2006). También extractos de frutas derivados del arándano y la fresa han demostrado proteger frente a la radiación cósmica. Se ha descrito que diferentes compuestos herbales y varios ingredientes dietéticos podrían proteger a los astronautas en una misión tripulada a Marte planeada por la NASA, donde la RI procedente del Sol y la existente en el resto del espacio sigue constituyendo hoy uno de los mayores obstáculos para la realización de dicho viaje (ARORA et al., 2008).

EFFECTO LESIVO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

La radiación ionizante induce daño en los tejidos vivos a través de una serie de eventos moleculares clásicos producidos a través de los efectos fotoeléctrico, Compton y formación de pares que dependen de la energía que transporta. Debido a que los tejidos humanos contienen un 80 % de agua, el mayor daño radioinducido se debe a la formación de radicales libres acuosos generados por la acción indirecta de la radiación sobre el agua. Los radicales libres más importantes resultantes de la radiolisis del agua son $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$, e_{aq}^- , HO_2 , H_3O^+ , etc.

(DRAGARIC y DRAGARIC, 1971; PRADHAN et al., 1973; SCHOLLES, 1983). Estos radicales libres reaccionan con macromoléculas celulares tales como el DNA, RNA, proteínas, membranas, etc., y causan disfunción y mortalidad celular. Estas reacciones no son selectivas ni específicas y tienen lugar tanto en las células tumorales como en las células normales cuando quedan expuestas a la RI.

El efecto lesivo en una célula inducido por la radiación ionizante puede ser potenciado o atenuado por diferentes factores tales como la presencia de oxígeno, de compuestos sulfhidrilos y de otras moléculas propias del entorno celular (BACQ et al., 1953; PRADHAN et al., 1973). En presencia de oxígeno, los e_{aq}^- y los átomos de hidrógeno reaccionan con el oxígeno molecular para producir radicales tales como $HO^\bullet$, $O_2^\bullet$ así como otros radicales libres acuosos (BARABOI et al., 1994; BIAKOV y STEPANOV, 1997). El aumento de la sensibilidad de las células a la radiación ionizante en presencia de oxígeno comparado con el mismo hecho pero en ausencia del oxígeno (denominado "efecto oxígeno") es conocido desde hace mucho tiempo. Esta relación entre la dosis de radiación requerida para obtener una supervivencia celular en ausencia de oxígeno y la dosis requerida para obtener el mismo efecto bajo condiciones oxigenadas es de 2,5-3 para radiación X y gamma. Este "efecto oxígeno" cambia con la presión parcial del mismo en los tejidos y es independiente de la dosis de RI administrada. El daño oxidativo en el material genético de la célula, por ejemplo del DNA, juega un papel importante en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis radioinducida. Los radicales libre del oxígeno altamente reactivos producidos por la RI causan lesiones en el DNA que pueden llevar a la muerte celular en una lesión "letal" o a las mutaciones en las lesiones denominadas "subletales". Enzimas como la superóxido-dismutasa, la glutatión-peroxidasa y la catalasa protegen a las células de los mamíferos del daño oxidativo radioinducido (FRIDOVICH, 1978; UTSUMI et al., 1998).

Durante el crecimiento tumoral, las células tumorales proliferan muy rápidamente por lo que generalmente necesitan un mayor aporte vascular, describiéndose 3 zonas diferenciadas en su crecimiento: una *externa*, con suficiente aporte sanguíneo y adecuada presión parcial de oxígeno; otra *intermedia*, con menor perfusión y mayor grado de hipoxia; y, una tercera *interna* constituida por el centro tumoral que está mal perfundida y con zonas de necrosis celular entre otras razones por ser zonas anóxicas y mal irrigadas por la vascularización local (NAIR et al., 2001). Esta situación conlleva una diferente sensibilidad celular a la radiación ionizante en cada una de esas zonas que se ha explicado en función de la diferente presión parcial de oxígeno en las mismas y de la diferente potenciación que se consigue con el "efecto oxígeno". Clásicamente, se ha considerado ésta la causa de los escasos resultados que se obtienen en el tratamiento radioterápico de algunos tumores. Para paliar este problema es necesario administrar dosis más elevadas de radiación para controlar el crecimiento tumoral. Sin embargo, esto clínicamente no es siempre posible, ya que los tejidos normales adyacentes al tumor están bien perfundidos, bien vascularizados y permanecen bien oxigenados y, por tanto, son más sensibles al daño radioinducido por lo que se necesita proteger a las células normales

adyacentes al tumor de la posible lesión radioinducida. En estos casos, la identificación de agentes radioprotectores es un objetivo importante de los oncólogos radioterápicos y de los radiobiólogos. Los estudios sobre agentes químicos radioprotectores comenzaron hace más de 50 años en USA con el principio del “*Proyecto Manhattan*”. (NAIR et al., 2001). Debido a que la literatura disponible es enorme, nuestra revisión se centra sólo en aquellos agentes que tienen relevancia clínica y presentan un mecanismo de protección radiológica conocido .

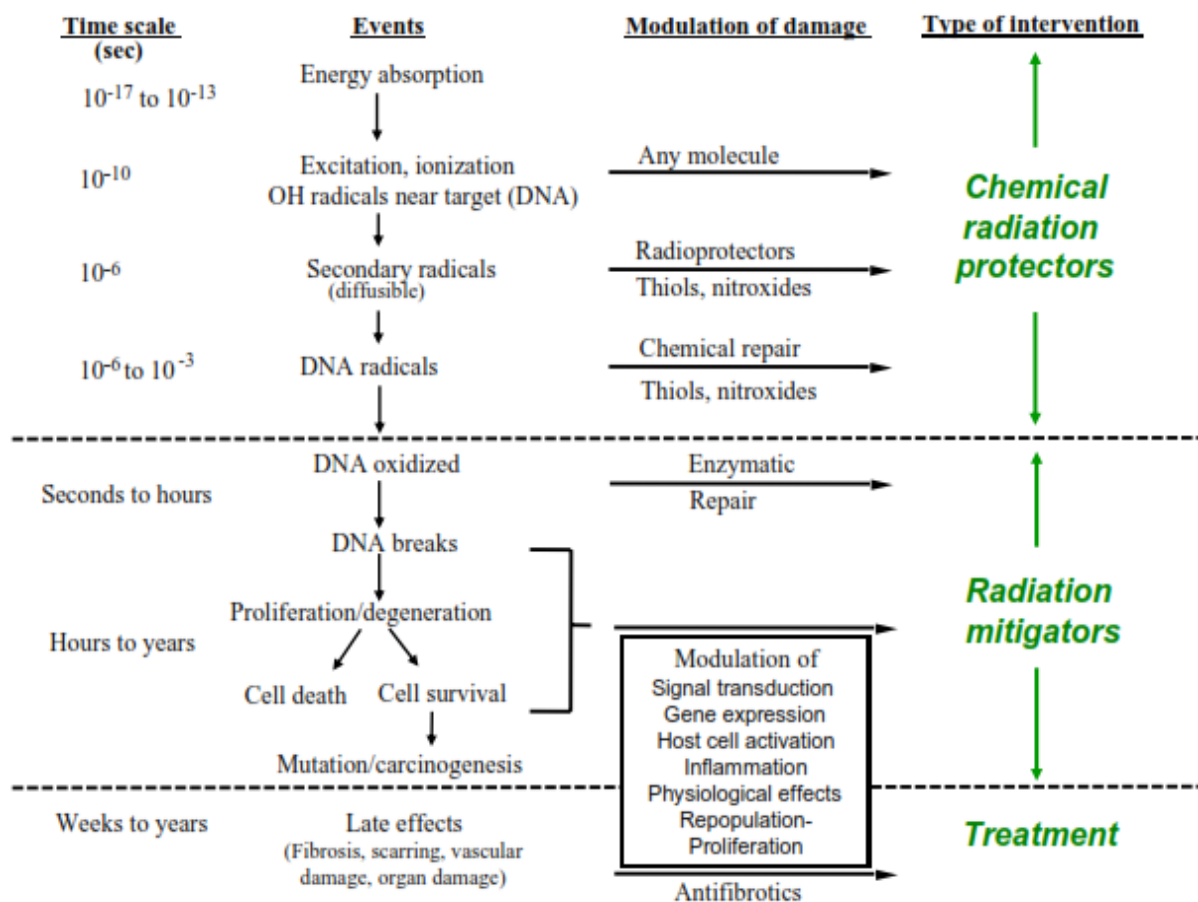


Figura A1. Secuencia de eventos después de la exposición a la radiación. El cuadro está dividido en tres partes por líneas discontinuas que sugieren eventos y reacciones que pueden ser modificados por los protectores de radiación (arriba), mitigadores de radiación y tratamiento (adaptado de CITRIN et al., 2010)

CLASIFICACIÓN DE LOS RADIOPROTECTORES

Los agentes radioprotectores pueden ser clasificados en 3 grupos:

1. Radioprotectores: son compuestos generalmente sulfhidrilos y otros antioxidantes (LIVESEY y REED, 1987). En estos se incluyen muchos agentes mieloprotectores, enteroprotectores y cerebroprotectores.

2. Adaptógenos: los adaptógenos actúan como estimuladores de la radiorresistencia. Estos son protectores naturales que ofrecen protección química frente a niveles bajos de radiación ionizante. Se obtienen generalmente de células vegetales y animales y tienen escasa toxicidad química. Suelen influir en el sistema regulador de los organismos expuestos, movilizándolo el origen endógeno de la radiorresistencia, la inmunidad e intensificando la resistencia global no específica de un organismo.

3. Absorbentes: los absorbentes protegen a los organismos de la radiación ionizante y de los agentes químicos a nivel interno. Suelen considerarse así las drogas que previenen la incorporación de radioiodo por la glándula tiroides y disminuyen la absorción de los radionucleidos (^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{239}Pu) en el medio biológico interno.

La bibliografía científica disponible sobre radioprotectores es extensa. Nuestra revisión está centrada en diferentes radioprotectores (en función de su estructura molecular, su actividad terapéutica o su actividad metabólica) frente al daño inducido por la radiación ionizante (Tabla A1).

RADIOPROTECTORES	MECANISMO DE ACCIÓN
COMPONENTES SULFHIDRILO: cisteína, cisteamina, glutatión, AET, WR-2721 y otros componentes WR.	“Captadores” de radicales libres, donantes de átomos de hidrógeno.
ANTIOXIDANTES: tempace, Hoechst 33342, vitaminas A, E y C, TMG, melatonina, etc.	“Captadores” de radicales libres.
INHIBIDORES ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (IECAs): captopril, elanopril, penicilamina, pentoxifilina, L-158, 809, etc.	Inhibición de proteasas (a través del sistema renina-angiotensina), antioxidación, inhibición de la síntesis de colágeno.
AGENTES CITOPROTECTORES: mesna, dexrazoxane, amifostina (WR-2721).	Toxicidad reducida de fármacos quimioterápicos, disminución de la toxicidad urotelial y nefrotóxica.
METALOELEMENTOS: cloruro de manganeso, sales de cadmio, subnitrito de bismuto, etc.	Inducción metalotionina.
INMUNOMODULADORES: interferón-gamma, polisacáridos AM5 y AM218, lactobacillus sensibles al calor, Broncho-Vaxom, trealosa de dicorinomicolato, AS101.	Estimulación inmune, incremento de la producción de citoquinas.
LIPOPOLISACÁRIDOS Y PROSTAGLANDINAS	Síntesis de prostaglandinas, niveles elevados de AMP c, reparación DNA.
EXTRACTOS DE PLANTAS Y COMPONENTES AISLADOS: curcumina, orientina, vicinina.	“Captadores” de radicales libres, antioxidación.

Tabla A1: Diferentes radioprotectores y su mecanismo de acción (NAIR et al., 2001)

1. Compuestos Sulfhidrilos

En un principio, los estudios se enfocaron hacia los compuestos sulfhidrilos. Los análogos de la cisteína y de la mercaptoetilamina constituyeron los compuestos pioneros ensayados en radioprotección. La síntesis de aminoetilisotiourea tuvo un importante desarrollo y la investigación sobre sus mecanismos radioprotectores ayudó a tener una mejor comprensión de las características estructurales de los compuestos sulfhidrilos que son fundamentales en radioprotección (LIVESEY y REED, 1987). Los compuestos más efectivos fueron aquellos que presentaban grupos sulfhidrilos en los 2 ó 3 últimos carbonos de un extremo de la cadena y un fuerte grupo amino básico en el otro. Un gran número (>4000 sustancias) de este tipo de compuestos se sintetizaron en el Centro de Investigación de la Armada de Walter Reed de Estados Unidos. La mayoría de ellos, casi todos, fueron tóxicos desde el principio a dosis muy pequeñas por lo que resultaron no aptos para uso humano; además, rápidamente se puso de manifiesto que debían estar dentro del organismo antes de la exposición a la RI para poder conseguir algún efecto radioprotector. La síntesis del WR-2721, amifostina o ácido etiofos [S-2-(3-aminopropilamino) etilfosforotioico] es el avance más

importante en el desarrollo de las diferentes drogas radioprotectoras como fueron: el WR-3689, WR-151327, WR-638, WR-77913 y WR-44923 y que constituyen otros importantes radioprotectores de este mismo tipo de sustancias (GLOWE et al., 1984; WEISS, 1997). Todos estos compuestos son solubles en agua, lo que facilita su administración; su estructura química difiere sólo en cuanto a la longitud del grupo aminoalquilo; y se caracterizan por la presencia o ausencia de un grupo metilo en el extremo terminal y/o un grupo hidroxilo en la cadena alquilo.

Entre los mejores radioprotectores de este tipo se encuentran los aminotioles, de tal forma que los aminotioles fosforilados fueron los más eficaces en cuanto a actividad radioprotectora, tolerancia y duración de su acción. Sin embargo, la mayoría tienen importantes efectos secundarios tales como náuseas, vómitos e hipotensión (MAISIN et al., 1993; 1998). Desde este momento, la búsqueda de radioprotectores no tóxicos e incluso inocuos ha constituido una línea prioritaria de investigación en radiobiología.

Entre la variedad de radioprotectores sulfhidrilos, el único que ha proporcionado un gran número de ensayos clínicos y que está actualmente en uso clínico como adyuvante en radioterapia clínica es el WR-2721 (WASSERMAN, 1994; TANNEHILL y MEHTA, 1996). La radioprotección selectiva de células normales conseguida por esta droga se ha relacionado con su diferente absorción según sea realizada por tejidos tumorales o normales y por los mecanismos de conversión en un compuesto sulfhidrilo activo (el WR-1065) en los tejidos normales por acción de la fosfatasa alcalina (TRAVIS, 1979; WASSERMAN, 1994; VALLES et al., 1995; TANNEHILL y MEHTA, 1996).

En este sentido, el tratamiento previo con esta sustancia de los pacientes que van a recibir radioterapia o quimioterapia reduce significativamente la toxicidad hematológica y renal al igual que disminuye la frecuencia de neuropatías y alteraciones en las mucosas inducidas por la RI. Esta sustancia permanece hoy en día como uno de los compuestos más prometedores en el presente de la radioterapia para proteger los tejidos normales debido a su relativamente inocua y útil administración en clínica. La dosis máxima tolerada del WR-2721 en una sola dosis es sólo de 740 mg/m² de superficie corporal cuando se administra en un periodo de 15 minutos antes de comenzar la exposición a la radiación ionizante. Esta droga proporciona una efectiva radioprotección sólo cuando es administrada inmediatamente antes de la exposición a la radiación porque tiene una vida media plasmática de menos de 10 minutos (TANNEHILL y MEHTA, 1996). Además, no se ha descrito toxicidad acumulada en pacientes que recibieron una cantidad total de 6,8 g/m² en radioterapia fraccionada durante 5 semanas consecutivas (WASSERMAN, 1994).

El WR-2721 se ha utilizado también para reducir la toxicidad del tratamiento con cisplatino en pacientes con cáncer de mama metastásico (RAMNATH et al., 1997) pero además, protege contra la toxicidad retardada de la radiación sobre órganos pélvicos sin interferir con el efecto beneficioso de la radioterapia, disminuyendo la toxicidad hematológica y

la inducción de lesiones sobre las mucosas irradiadas (CAPIZZI y OSTER, 1995). En pacientes bajo radioterapia o quimioterapia por cáncer de pulmón no resecable, el WR-2721 reduce la nefrotoxicidad relacionada con la administración de cisplatino y la esofagitis radioinducida (TANNEHILL et al., 1997).

2. Antioxidantes y “Captadores de radicales libres”

Se ha descrito que muchos alcoholes alifáticos (incluidos el etanol, el etilenglicol, el glicerol, etc.) son buenos “captadores” de radicales libres y podrían actuar como radioprotectores en clínica. Sin embargo, los resultados ponen de manifiesto que son sólo útiles a nivel experimental o académico pero no en clínica humana debido a la enorme toxicidad que presentan a las concentraciones útiles como sustancias radioprotectoras. Etodiewa et al. (1996) han descrito 2 compuestos (Tempace y Troxyl), derivados de 2, 2, 6, 6-tetrametil piperidine, que actúan como captadores del ión superóxido y como inhibidores de la utilización del hierro y, además, como productores de ascorbato en la Reacción de Fenton. Estos 2 compuestos podrían ser mejorados para considerarlos prometedores antioxidantes y radioprotectores en un entorno clínico; aunque todo ello está pendiente en estos momentos de un incremento en el número de ensayos y del análisis de sus aplicaciones farmacológicas (METODIEWA et al., 1996; NAIR et al., 2001).

Algunos estudios han puesto de manifiesto que muchos nitroxidos solubles en agua muestran capacidad de protección radiológica en animales cuando los compuestos se administran antes de la exposición a la radiación (HAHN et al., 1994; 1998). El Tempol, un nitroxido de bajo peso molecular, presenta una difusión libre a través de la membrana celular y actúa como un sinérgico o imitador de la superóxido-dismutasa (HAHN et al., 1999). También se han descrito que nitroxidos con 6 anillos de piperidina, incluido el tempol, presentan mayor capacidad reductora que aquellos nitroxidos con sólo 5 anillos. En todos los casos, se ha descrito que la “captación” de radicales libres y la inducción de hipotensión (disminución del flujo sanguíneo capilar) e hipoxia en la médula ósea serían los mecanismos que explicarían su capacidad radioprotectora (HAHN et al., 1994, 1998, 1999).

Algunos antioxidantes como las vitaminas A, C y E también presentan efectos de “radioprotección” porque el daño radioinducido induce el incremento del estrés oxidativo que se asocia con la toxicidad activa del oxígeno y puede ser reducida con la utilización de estas vitaminas (WILSON, 1983; KONOPACKA, 1996). Se ha demostrado que el selenio (como Na_2SeO_3) y la vitamina E actúan solos e, incluso de forma aditiva, como agentes radioprotectores y quimioprotectores (BOREK et al., 1986). El selenio confiere protección por inducir o activar sistemas celulares de captación de radicales libres y por aumentar la descomposición del peróxido de oxígeno; mientras que la vitamina E parece que ofrece protección por algún otro mecanismo complementario (BOREK et al., 1986). Las vitaminas liposolubles A, E y K, presentan una concentración local elevada en compartimentos celulares específicos y podrían ser suficientemente elevados como para poder ejercer un efecto

radioprotector, a diferencia de la mayoría de compuestos sulfhidrilos hidrosolubles tales como las cisteaminas (BOREK et al, 1986). Harapanhalli (1994) ha descrito que el aceite de soja da una significativa protección contra la ^{125}IdU y contra los efectos del Polonio radiactivo que se ha explicado en función de la presencia de vitamina A entre sus componentes. Un derivado hidrosoluble de la vitamina E, el tocoferol monoglucósido, se ha mostrado muy efectivo en la protección del DNA “*in vitro*” y también “*in vivo*” en ratones tras su administración, vía oral o intraperitoneal, frente a la radiación gamma (NAIR et al., 1999).

La Melatonina (N-acetil-5-metilotriptamina), una hormona de la glándula pineal involucrada en la regulación del eje neuroendocrino, es un “captador” de radicales libres altamente eficiente y considerado con una elevada capacidad antioxidante (PIERI et al., 1994; REITER, 1995; PIERREFICHE y LABORIT, 1995; VIJAYALAXMI et al., 1996). Cuando se administra a ratones antes de la exposición a la radiación, la melatonina ofrece una radioprotección significativa por la disminución de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las espermatogonias y espermatoцитos y por la reducción de la frecuencia de micronúcleos en las células de médula ósea (BADR et al., 1999).

Un derivado del etinilestradiol, denominado E-838, se ha descrito como un efectivo radioprotector para el sistema hematopoyético en estudios experimentales con ratones (YANG et al., 1998). Presenta un significativo efecto protector en las unidades formadoras de colonias del bazo y en las células nucleadas de la médula ósea de ratones irradiados, lo que se interpreta como una potencial aplicación clínica en la leucopenia inducida por radioterapia (YANG et al., 1998). Sin embargo, estos compuestos, si bien son altamente efectivos en estudios “*in vitro*”, pueden encontrar poco uso en su aplicación clínica porque no discriminan entre células normales y células tumorales (NAIR et al., 2001).

Gran número de extractos de plantas, preparaciones de hierbas y sustancias fitoquímicas también se han descrito por su acción radioprotectora en estudios tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (SHINODA, 1995; KUMAR et al., 1996; ZHANG et al., 1997; CHAUDHARY et al., 1999; HSU et al., 1999; UMA DEVI y GANASOUNDARI, 1999; UMA DEVI et al., 1999; KAMAT et al., 2000; CASTILLO et al., 2001; 2002; BENAVENTE-GARCÍA et al., 2002; ACEVEDO, 2005; DEL BAÑO et al., 2006; ALCARAZ et al., 2006; 2009; 2011; 2013; 2015). Sin embargo, hasta el momento, no han sido publicados ensayos clínicos para demostrar su eficacia en clínica humana. Su capacidad radioprotectora se ha atribuido generalmente a sus propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales libres.

3. Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECAs)

Los Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECAs) y los Antagonistas del Receptor tipo I de la Angiotensina II (ARA-2) también se han descrito como efectivos en la profilaxis de la lesión renal y pulmonar radioinducida en animales de experimentación irradiados (WARD et al., 1993; OIKAWA et al., 1997; MOULDER et al., 1998 a,b; MOLTENI et

al., 2000). La variedad de IECAs investigados como radioprotectores incluyen penicilamina, pentoxifilina, captopril, enalapril, etc. Los diferentes estudios han revelado que el bloqueo del receptor tipo I de la angiotensina II es suficiente para tratar la lesión renal y pulmonar radioinducida porque el sistema renina-angiotensina podría estar fundamentalmente involucrado en la patogénesis de estas lesiones (WARD et al., 1993; OIKAWA et al., 1997; MOULDER et al., 1998 a,b; MOLTENI et al., 2000). El captopril (D-3-mercapto-2-metilpropanoil-L-prolina) es ampliamente utilizado como fármaco antihipertensivo (GAURAS y GAURAS, 1987) y ha sido utilizado para eliminar la reacción precoz del pulmón inducida por la irradiación fraccionada del hemitórax en ratas (WARD et al., 1993). La acción terapéutica del captopril se ha adscrito parcialmente a la prevención del incremento radioinducido de la presión arterial pulmonar, consiguiendo un edema menos severo en el pulmón irradiado.

La lesión pulmonar radioinducida conlleva severas neumonitis, fibrosis intensa y se ha asociado con una disminución significativa de la enzima convertidora de angiotensina y de la función activadora del plasminógeno, así como con un marcado incremento de las prostaglandinas. Los IECAs eliminan o disminuyen estas reacciones. El captopril (IECA) y los ARA-2 parecen proteger el parénquima pulmonar de una respuesta inflamatoria intensa y posterior fibrosis pulmonar en animales irradiados. Aunque la penicilamina es un débil inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, es un fuerte agente antifibrótico y mostró unas propiedades antiinflamatorias moderadas (WARD et al., 1983). Los IECAs que contienen grupos sulfhidrilos son más efectivos que aquéllos que no los poseen. El efecto radioprotector del captopril podría estar relacionado con una inhibición del sistema de la angiotensina II y por sus propiedades farmacológicas combinadas tales como la antioxidación, la capacidad “eliminadora” de radicales libres y como inhibidor de proteasas (MOLTENI et al., 2000).

El uso de fármacos IECAs y ARA-2 abre nuevas posibilidades en radioterapia con altas dosis de radiación ya que permite un control de los efectos indeseables relacionados con la misma. Sin embargo, la acción de estos fármacos parece ser “específica de tejido”, porque se ha descrito que el captopril no ha proporcionado protección alguna en animales irradiados con lesión gastrointestinal radioinducida (MOULDER y FISH, 1997).

4. Agentes citoprotectores utilizados en Quimioterapia

Un número de agentes citoprotectores se han desarrollados para proteger las células normales, pero no a las tumorales, de la toxicidad y del daño asociado con la quimioterapia y la radioterapia del cáncer. El Mesna (ácido 2-mercaptoetanesulfónico), Desrazoxane y Amifostina son 3 de los agentes protectores aprobados ya por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos y poseen una potencial actividad quimioprotectora y radioprotectora en el tratamiento del cáncer (HENSELEY et al., 1999; LINKS y LEWIS, 1999; MORAIS et al., 1999; HIGHLY et al., 1999; KLETA, 1999; KHOJASTEH et al., 2000). El Mesna disminuye la incidencia de toxicidad urotelial inducida por la quimioterapia en el tratamiento del cáncer asociada con altas dosis de ifosfamida y ciclofosfamida (HENSELEY et al., 1999; MORAIS et

al., 1999; HIGHLY et al., 1999; KLETA, 1999; KHOJASTEH et al., 2000). El Dexrazoxane se ha descrito de utilidad como adyuvante en la quimioterapia de tumores basada en tratamientos con doxorrubicina (HENSELEY et al., 1999; LINKS y LEWIS, 1999; MORAIS et al., 1999) aunque la toxicidad cardíaca y la protección también de las células tumorales son algunas de las limitaciones de su empleo (HENSELEY et al., 1999). La Amifostina reduce la nefrotoxicidad en pacientes que reciben quimioterapia basada en cisplatino (HENSELEY et al., 1999; LINKS y LEWIS, 1999; MORAIS et al., 1999). Sin embargo, el uso clínico de estos radioprotectores en muchos ensayos clínicos con radioterapia muestra efectos muy variados y una eficacia clínica muy limitada (SHUENG et al., 1998; TAN et al., 1999).

5. Metaloelementos y Metalotionina

La metalotionina, proteína de bajo peso molecular de 60 aminoácidos (de los cuales una tercera parte es cisteína), ha mostrado un efecto protector contra la radiación ionizante en animales y en cultivos celulares ya que su administración provoca un incremento de la síntesis de esta proteína en varios tejidos (BAKKA et al., 1982; MATSUBARA et al., 1987; KAGI y SCHAFFER, 1988; RENAN y DOWMAW, 1989; SATOH et al., 1989; MURATA et al., 1995; MIKO et al., 1998). Está involucrada en la regulación del metabolismo de los metaloelementos ya que contribuye a la detoxificación del exceso de metaloelementos y a la captación de radicales libres (MATSUBARA et al., 1987). Por otro lado, la administración oral de nitrato de bismuto a ratones redujo los efectos letales y las lesiones en médula ósea inducidas por una irradiación corporal completa; esta protección se ha atribuido a una síntesis inducida de metalotionina en las propias células de la médula ósea inducida por la administración del bismuto (SATOH et al., 1989). Igualmente, el pretratamiento de los ratones con cloruro de manganeso y sales de cadmio incrementó el nivel de metalotionina en varios tejidos disminuyendo los efectos letales de una irradiación corporal total (MATSUBARA et al., 1987). Sin embargo, la inducción de metalotionina por los metaloelementos es también órgano/tejido específico, y el tratamiento con cloruro de manganeso no produce un incremento de los niveles de metalotionina en la piel o intestino delgado, por lo que no se observa ningún efecto beneficioso en estos tejidos cuando han sido expuestos a la radiación (MURATA et al., 1995). El wolframio, el vanadio y las sales de molibdeno tienen un efecto similar a la insulina ya que incrementan los niveles basales de fructosa-2,6-bifosfato contrarrestando los efectos del glucagón, de la fructosa-2,6-bifosfato y de la actividad de la 6-fosfofructo-2-kinasa, estimulando el flujo glucolítico (FILLAT et al., 1992). Todas estas sales descritas también estimulan la actividad adenilciclase (HWANG y RYAN, 1981) y han mostrado que estos compuestos a niveles bajos y no tóxicos protegen a los animales expuestos de los efectos letales inducidos en el sistema hematopoyético (ZAPOROWSKA y WASILEWSKI, 1992; SATO et al., 1999).

6. Citoquinas e Inmunomoduladores

Varios inmunomoduladores utilizados habitualmente en clínica junto con la radioterapia y/o quimioterapia para controlar el crecimiento tumoral tanto en animales de experimentación como en clínica humana presentan también un efecto radioprotector. El interferón gamma

induce una respuesta inmune en humanos mediante la activación de las células T, la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y del receptor para la porción Fc de la inmunoglobulina en los monocitos. En un estudio clínico randomizado se ha descrito que la administración de interferón gamma recombinante provoca una estimulación inmune en los pacientes que han conseguido la remisión completa de un cáncer de pulmón de células pequeñas tras la radioterapia y la quimioterapia (PUJOL et al., 1993; ACEVEDO, 2005).

Los polisacáridos asociados a proteínas, tales como AM5 y AM218, *Lactobacillus* destruidos mediante calor, extractos bacterianos y la trealosa dicorinomicolato sintética también tienen propiedades inmunomoduladoras. Estos compuestos, además, también han mostrado tener acción radioprotectora (REAL et al., 1992; FEDOROCKO et al., 1992; FEDOROCKO y MACKOVA, 1996; GUENECHEA et al., 1997; FURUSE et al., 1997; LANDAUER et al., 1997). El extracto bacteriano Broncho-Vaxom, cuando se administra en combinación con indometacina (un inhibidor de la producción de prostaglandina) en el ratón antes de una irradiación letal, presenta una sinergia en el efecto radioprotector esperado (LANDAUER et al., 1997).

El tricloro de amonio-(dioxietilén-0,0') telúrico (AS101) es un componente sintético que exhibe propiedades inmunomoduladoras y una mínima toxicidad en ensayos clínicos en pacientes con cáncer (KALECHMAN et al., 1995a,b). El AS101 presentó un efecto protector de la hematopoyesis en ratones irradiados y ratones tratados con diversas drogas quimioterápicas. Algunos estudios han descrito que la administración de AS101 aumentó los niveles de suero amiloide A (SAA) en el suero de los ratones tratados e incrementó los niveles de SAA, factor B y ceruloplasmina en el suero de pacientes tratados con AS101. Se demostró que la Interleukina-1 (IL-1), la Interleukina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son mediadores importantes en los cambios de las concentraciones del SAA inducido por AS101 (KALECHMAN et al., 1995a,b). Las citoquinas IL-1, IL-6, TNF- α y el factor de las células stems parece que intervienen de forma importante en la radioprotección conseguida por el AS101, ya que la administración de anticuerpos contra los receptores de éstos, parece la vía por la que el AS101 incrementa la supervivencia de los ratones irradiados con dosis letales (KALECHMAN et al., 1995a,b). Incluso, la administración intraperitoneal de IL-1 consiguió proteger a ratones de los efectos letales de la radiación gamma (NETA et al., 1986; 1988; ACEVEDO, 2005).

7. Lipopolisacáridos y Prostaglandinas

Se ha descrito que los lipopolisacáridos son agentes protectores frente a las lesiones radioinducidas en intestino y médula ósea de ratón provocadas por una exposición corporal total a la radiación (RIEHL et al., 2000). La administración parenteral de lipopolisacárido, 2-4 horas antes de la exposición a la radiación, produce un aumento del número de criptas que persisten a los 3,5 días tras una irradiación corporal total de 14 Gy de radiación gamma. Diversos estudios con inhibidores de la ciclooxigenasa en ratones mutantes con un gen ausente para la ciclooxigenasa-2 puso de manifiesto que el lipopolisacárido ofrecía protección a través

de una vía dependiente de la prostaglandina (RIEHL et al., 2000), determinándose que la prostaglandina y la OK-432 protegen a los animales contra estas lesiones radioinducidas (JOSHIMA et al., 1992; WALDEN y FARZANEH, 1995).

Las prostaglandinas son sintetizadas en casi todos los tejidos como respuesta a un amplio rango de estímulos tales como hormonas, traumatismos, inflamaciones y reacciones alérgicas; influenciando un número de funciones celulares asociadas con circunstancias normales y patológicas (NEEDLEMAN et al., 1986). Se ha descrito que las prostaglandinas ofrecen protección en muchos tejidos, incluidos el intestino, médula ósea, folículos pilosos y epitelio germinal masculino frente al daño inducido por la radiación (WALDEN et al., 1987; HANSON et al., 1988). Hanson et al., (1995) han descrito la acción radioprotectora del misoprostol (un análogo de la prostaglandina E1) que protege de forma selectiva a las células normales mientras que carece de efecto alguno en las células tumorales; en líneas celulares consigue la reparación de DNA de forma eficiente y en líneas celulares con escaso nivel de respuesta a este efecto se ha considerado dependiente del ciclo celular lo que explicaría este efecto ambivalente descrito (VAN BUUL et al., 1999).

8. Ligandos de unión al DNA

El papel del Hoechst 33342 se ha estudiado como radioprotector al detectarse un efecto de radioprotección mediado por el incremento en la transferencia de electrones y que, incluso puede ser aumentada por la adición de sustancias “donadoras” de electrones que sustituyan al ligando (MARTIN et al., 1996; MARTIN y ANDERSON, 1999). El Hoechst 33342 une el surco menor de DNA en lugares discretos caracterizados por 3-4 pares de base AT consecutivas (MARTIN y HOLMES, 1981; HARSHMAN y DERVAN, 1985). Algunos estudios han mostrado que, aunque la máxima protección es actuando contra las roturas radioinducidas de las cadenas en sus sitios de unión, hay también alguna protección adicional en la que interviene la reducción realizada por el ligando unido de forma transitoria y oxidando las moléculas de DNA (DENISON et al., 1992; MARTIN y ANDERSON, 1999).

MECANISMO DE PROTECCIÓN CONTRA LA RADIACIÓN IONIZANTE

Los agentes radioprotectores pueden realizar su acción a través de diferentes mecanismos de acción entre los que cabe destacar (NAIR et al., 2001):

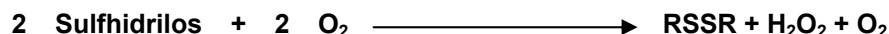
- 1) Supresión de la formación de especies reactivas (radicales libres).
- 2) Detoxificación de especies radioinducidas.
- 3) Estabilización de agentes tóxicos radioinducidos.
- 4) Aumento de los procesos de reparación y recuperación.

Como consecuencia del descubrimiento del “efecto oxígeno”, los primeros protectores se pensaron inicialmente para conseguir provocar un cambio radical (una inversión) de dicho “efecto del oxígeno”. Así, agentes farmacológicos, capaces de alterar la hemodinámica “*in vivo*” se consideraron radioprotectores por interferir en la distribución de oxígeno dentro de los

tejidos irradiados. La obstrucción mecánica de la perfusión sanguínea mediante microesferas en la embolización intestinal o renal y la perfusión con dextrano con hemoglobina desoxigenada, disminuía significativamente la sensibilidad de los tejidos irradiados (HOLT, 1975) al alterar la distribución del flujo sanguíneo y, de este modo, la presión parcial de oxígeno en los tejidos. Las aminas biogénicas tales como la histamina, serotonina, norepinefrina y epinefrina también muestran una acción radioprotectora al inducir una hipoxia localizada en las zonas irradiadas.

El consumo químico y bioquímico de oxígeno también puede provocar hipoxia en células y tejidos. Este podría ser uno de los mecanismos importantes mediante el que los clásicos compuestos sulfhidrilos manifiestan un efecto de radioprotección, ya que al reaccionar provocan una reacción de oxidación con disminución del oxígeno molecular.

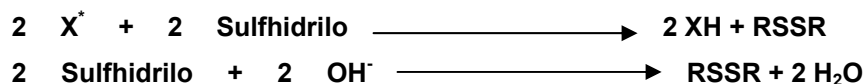
Incluso, los iones metálicos tales como el Fe^{+3} pueden catalizar esta reacción de oxidación mediante la siguiente reacción (HALLIWELL y GUTTERIDGE, 1999):



Posteriormente, el mecanismo de acción se ha dirigido buscando la hipoxia tiol-inducida, como sucede con el WR-2721, que ofrece una selectividad en la protección de las células normales respecto de las células tumorales (YUHAS, 1982) y que se ha explicado como consecuencia del diferencial de oxígeno disponible entre ellas.

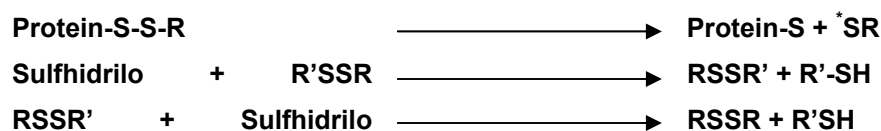
La “eliminación” de estas especies de “radicales libres” reactivas acuosas radioinducidas que tienen una vida media corta (en el rango de nano-segundos) debe disminuir significativamente el daño inducido por la radiación ionizante. Muchos “captadores” de radicales libres son conocidos por interaccionar con radicales libres acuosos y prevenir la lesión radioinducida en las células.

Pero además, los radioprotectores pueden también reaccionar con radicales del agua o radicales de biomoléculas (X) formados por mecanismos “en cascada” y que perduran más tiempo en el medio biológico y conseguir, a través de la cesión de átomos de hidrógeno, para reparar las especies radicales generadas por la radiación.



Las sustancias radioprotectoras pueden también interaccionar con blancos celulares, como el DNA, formando mezclas de disulfitos y prevenir el daño de la radiación por estabilizar esa sustancia, la diana. Muchos radioprotectores aminotioles tales como la cisteamina, el guanidoetildisulfido y el glutatión disulfido, se unen al DNA y a su cadena complementaria potenciando su capacidad radioprotectora; aunque no siempre que esto ocurre se demuestra este efecto, ya que algunas diaminas como la cadaverina y la pentametilén diguanidina unida al

DNA no presentan ningún efecto protector (KOLLMANN et al., 1973). La actividad radioprotectora de un buen número de compuestos tioles se ha correlacionado con la cantidad y distribución en las mezclas de disulfitos (ELDJARN y PHIL, 1958). La regeneración de proteínas nativas se alcanza por un intercambio del disulfito tior con el glutatión, posiblemente catalizado por una tior transferasa, y posterior acción del sistema redox del glutatión unida con la glutatión reductasa y el NADPH.



La hipótesis de la mezcla de disulfitos está limitada a la protección de enzimas y proteínas y falla para explicar la radioprotección de los ácidos nucleicos ya que el grupo SH está restringido sólo a proteínas (NAIR et al., 2001).

Procesos de reparación del DNA y recuperación celular

Los procesos de reparación o recuperación celular han constituido el objetivo de numerosos estudios que se han visto enormemente incrementados al utilizar agentes radioprotectores. La diana más importante que puede ser lesionada por la radiación ionizante es el DNA de la célula. Los tipos de lesión radioinducida en el DNA incluyen diferentes tipos de roturas de la cadena simple o doble del DNA tanto a nivel de la base nitrogenada como del propio azúcar. Las frecuencias de roturas de la cadena doble en el DNA es inversamente proporcional a la supervivencia celular (BRYANT, 1985; RADFORD, 1985); mientras que la lesión de la base nitrogenada y las roturas de la cadena simple del DNA pueden explicar también las lesiones subletales en las células (KOHN, 1979).

Cualquiera de las lesiones radioinducidas en el DNA podrían conducir a la muerte celular, al incremento del número de mutaciones radioinducidas o a numerosas alteraciones funcionales; aunque sin embargo, también podrían ser reparadas y las células podrían recuperarse totalmente de las lesiones inducidas por la RI (ORR, 1984; FRIEDBERG, 1985). Algunas sustancias radioprotectoras endógenas se han estudiado para establecer su influencia en la recuperación celular de las lesiones ocasionadas por la radiación o por otras sustancias químicas (BUMP et al., 1981; BUMP y YU, 1982; ROIZIN et al., 1984; BERTSCHE y SCHORN, 1986). Los tioles, tales como el glutatión, están involucrados en la reparación de las roturas de la cadena simple del DNA. Las células genéticamente deficientes en la síntesis de glutatión o células en las cuáles la deficiencia de glutatión está producida por dl-butionina-sulfoxima, por hipoxia o por misonidazol carecen de esta capacidad de reparación de la cadena simple del DNA (EDGREEN et al., 1981; EDGREEN, 1983; REVESZ y EDGREEN, 1984; CLARK et al., 1984; REVESZ, 1985). Las células genéticamente deficientes de glutatión sintasa presentan un incremento en la cantidad de gammaglutamil cisteína, cistina y otros tioles de bajo peso molecular pero aquéllos no pueden sustituir o compensar al glutatión en la reparación de la cadena simple de DNA. Muchos compuestos que “estresan” a las células inducen enzimas

reparadoras de DNA. Entre estas sustancias se incluye el H_2O_2 , el metil metano sulfonato, los compuestos del níquel y el dinitropireno. Se ha descrito que si las células se irradian e inmediatamente se tratan con inhibidores de la síntesis protéica o de la división celular, muestran un incremento de la resistencia a la radiación. Este fenómeno se ha denominado “*recuperación potencial del daño letal*” (NAIR et al., 2001). De igual forma, los cultivos celulares mantenidos en condiciones subóptimas para el crecimiento podrían también llevar a resultados similares a los descritos anteriormente (BELLI y SHELTON, 1969). Sin embargo, el mecanismo y las moléculas involucradas en los procesos de recuperación celular no son bien comprendidos hasta el momento.

Los mecanismos de defensa celular contra el “estrés” oxidativo provocado por la radiación o por diversas sustancias químicas obtienen una respuesta de “ayuda” precoz al daño radioinducido con una consiguiente “adaptación” al mismo. La respuesta de “ayuda” consiste en eliminar las lesiones del DNA y la respuesta de “adaptación” consiste en restaurar el metabolismo celular y el funcionamiento normal. En la protección de dianas u objetivos vitales, la reparación urgente tiene un papel importante, y comprende la activación o síntesis de muchas proteínas, en donde el DNA precursor sintetiza enzimas y precursores de DNA (PULATOVA et al., 1999). La ribonucleótido-reductasa en mamíferos es una enzima inducida por el DNA dañado y tiene un papel importante en la reparación de la escisión, ya que la concentración de deoxirribonucleótidos es importante para la síntesis de cualquier reparación (HURTA y WRIGHT, 1992; FILATOV et al., 1996; TANAKA et al., 2000). Las drogas y sustancias químicas que estimulan o incrementan la actividad de enzimas que sintetizan DNA precursor, tales como la ribonucleótido-reductasa, podrían funcionar también como buenos radioprotectores. La administración de los fármacos indralina e indometafeno, antes de la exposición a la radiación, en animales (ratones y perros) consiguió una supervivencia más elevada que los animales controles al ser sometidos a dosis letales de radiación gamma (PULATOVA et al., 1999). En muchos órganos de estos animales se produjo un incremento en la actividad de la enzima (ribonucleótido-reductasa) que se interpreta como resultado de la activación de DNA, y las enzimas que sintetizan precursores incrementan la extensión de la zona de DNA que son reparadas.

Además, los lugares celulares con mayor cantidad de precursores de DNA podrían “prevenir” la formación de nuevas lesiones. En este sentido, se ha descrito que la síntesis estimulada de deoxirribonucleótidos tanto como la síntesis de DNA y proteínas constituye el mecanismo de radioprotección de estas drogas en los animales irradiados “*in vivo*” (PULATOVA et al., 1999).

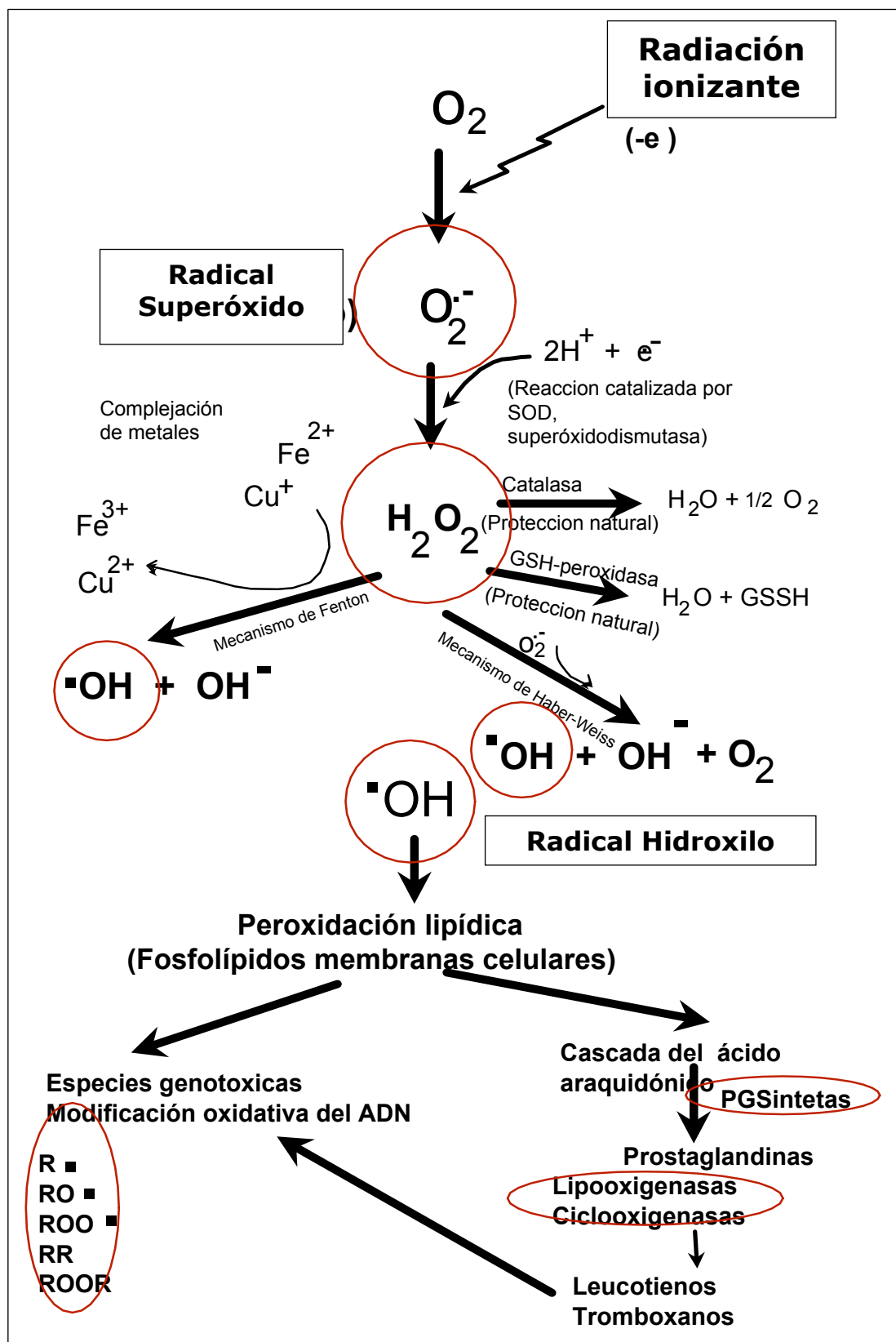


Figura A2. Mecanismos de acción de las sustancias radioprotectoras (Alcaraz et al., 2015)

ENSAYOS DISPONIBLES EN LA ACTUALIDAD Y POSIBLES DESARROLLOS FUTUROS

Para estudiar el efecto o capacidad radioprotectora se han utilizado diferentes tipos de observaciones y ensayos experimentales. Podemos destacar los siguientes:

1. Observaciones Clínicas

Difícilmente puede discutirse que los signos clínicos, los síntomas y las condiciones en su conjunto del paciente son muy importantes para el diagnóstico médico de la gravedad del **síndrome de radiación**. Los principales signos y manifestaciones, así como las enfermedades principales, están registrados en numerosos libros de texto. Siempre hay que tener en cuenta que la ausencia de síntomas no debe ser considerada como exposiciones insignificantes o nulas, a menos que se hayan confirmado mediante los respectivos test biológicos. Otra nota práctica es que, como no hay síntomas que sean provocados exclusivamente por las radiaciones ionizantes, resulta de suma importancia para el diagnóstico diferencial tener en cuenta los datos de la anamnesis del paciente o del trabajador irradiado (BACQ y ALEXANDER, 1964).

2. Indicadores Hematológicos

Durante años se han estudiado los cambios en el número de células sanguíneas como indicadores hematológicos en sangre periférica de la exposición a RI. La fase temprana tras el accidente con RI está caracterizada normalmente por un pico inicial y temporal de granulocitos y por la primera caída del número de linfocitos. Estos signos pueden aparecer entre 0,5 y 1 Gy de radiación de baja transferencia lineal de energía (LET). La mayor pendiente de caída del número de linfocitos y los valores por debajo del mínimo ocurren con una exposición más elevada. El número de plaquetas también disminuye al superar 1 Gy, aunque este proceso es más lento que la disminución del número de linfocitos. Estos sucesos solamente pueden seguirse obteniendo muestras de sangre frecuentes aunque las curvas dosis-efecto muestran grandes diferencias individuales (SZEPESI y FLIEDNER, 1994).

Los datos hematológicos, sin embargo, permiten juzgar la reactividad del individuo tanto en la fase aguda como en la fase de regeneración posterior. La principal ventaja del conteo de células sanguíneas es que da una impresión inmediata de la gravedad de un accidente, particularmente durante los dos primeros días, cuando no se pueden aplicar normalmente otras técnicas disponibles.

Debido a la elevada radiosensibilidad de los linfocitos, tras administrar grandes dosis de RI desaparecen pronto de la circulación sanguínea tal y como ocurrió en varias víctimas del accidente de Chernobyl. Ante esta situación, se dió un nuevo enfoque para calcular la dosis basado en la cinética de los granulocitos neutrófilos. La supresión aguda de la médula ósea podría ser cuantitativamente expresada por los parámetros temporales del conteo de los neutrófilos en sangre periférica; así, la también llamada curva de neutrófilos cruza el nivel de

500 neutrófilos/ml, “día de 500” o “d500”. El “d500” indica el comienzo, el grado y la duración de la pancitopenia que padecerá el paciente accidentado sirviendo como un buen factor pronóstico. Así el “d500” constituye un parámetro hematológico cuantitativo de la gravedad del síndrome de médula ósea inducido por la radiación aguda y que también se ha asociado con un elevado número de producción de cromosomas dicéntricos en linfocitos humanos (BARANOV et al., 1995).

Basado en un gran número (aproximadamente 600) de personas lesionadas en 22 accidentes nucleares, se han desarrollado varios métodos para la evaluación hematológica del estado de las personas en el diagnóstico precoz por el conteo de linfocitos periféricos a las 24-48 horas del accidente; y de granulocitos y plaquetas desde el 4º día después de la exposición. Una simulación en ordenador de la granulopoyesis ha permitido el cálculo de las células que pueden quedar intactas, lo que ayuda a planear la terapia y construir un pronóstico como un “ensayo predictivo” para los siguientes 60 días. Los procedimientos y cálculos están basados en la “*Hipótesis del Cuerpo Celular Lesionado*” descritos por Szepesi y Fliedner en 1994.

3. Ensayos Citogenéticos

A. Cromosomas de linfocitos en metafase

El análisis de las aberraciones cromosómicas en linfocitos realizados en sangre periférica humana está reconocido por los organismos internacionales para la determinación biológica de las dosis de RI. Es especialmente importante resaltar que, en dosis equivalentes menores de 1 Sv, el análisis de las aberraciones cromosómicas puede ser solamente un indicador biológico de exposición a la radiación. Este límite viene determinado fundamentalmente por el nivel de aberraciones en la población (frecuencia basal espontánea) y por el número de células que son analizadas en cada caso, y que son poco numerosas habitualmente. Dependiendo de la experiencia del laboratorio, la dosis estimada suficientemente fiable puede estar por encima de 0,10-0,15 Gy, para radiaciones de baja LET o de 0,01 Gy para neutrones procedentes de fisión. Una de las grandes desventajas de este método es que se necesita mucho tiempo para su determinación debido a la necesidad del cultivo de las células y al recuento manual, requiriendo alrededor de tres días de trabajo muy especializado para obtener el resultado de una sola muestra (BENDER et al., 1988).

En el desarrollo posterior de estos análisis de aberraciones cromosómicas, se han obtenido nuevos resultados espectaculares con la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (DURANTE et al., 1996). La técnica FISH ha llegado a ser una poderosa herramienta en citogenética desde que fue introducida en 1969. Su gran potencial surge de su capacidad única para combinar información citológica de los cromosomas con información molecular sobre la estructura y secuencia del DNA. La hibridación “*in situ*” permite la localización de una secuencia de DNA en particular cerca de los cromosomas en metafase. Si se tiñen solamente dos o tres cromosomas, puede encontrarse una relación dosis-efecto lineal-

cuadrática para las aberraciones cromosómicas en linfocitos circulantes irradiados “in vitro” con radiación gamma.

La principal ventaja de esta nueva técnica de tinción es que las aberraciones estables pueden ser detectadas mucho después de la irradiación. El rendimiento o eficacia tras una dosis dada se ha estimado entre 1,5-2 veces mayor que la técnica de las aberraciones cromosómicas dicéntricas. Sin embargo, ciertas limitaciones importantes de la técnica son que el valor base de la población es aproximadamente de un orden de magnitud mayor que para las aberraciones dicéntricas. La técnica resulta muy prometedora, aunque tienen que clarificarse varios aspectos en el futuro inmediato tales como la nomenclatura de las aberraciones simples y complejas observadas, las relaciones dosis-efecto proporcionales así como que su uso está limitado principalmente a dosis absorbidas por encima de 2 Gy. Cabe destacar las buenas correlaciones encontradas entre la traslocación y las anomalías dicéntricas que se producen en la población de supervivientes de la bomba-A.

B. Técnica de micronúcleos

Micronúcleos en médula ósea de ratón

Durante los últimos años se ha utilizado un test clásico de toxicología para poner de manifiesto el daño cromosómico inducido por la radiación ionizante: el **Test de Micronúcleos (MN) “in vivo” sobre eritroblastos/eritrocitos de médula ósea de roedores (ratón y rata)**. El test de micronúcleos en médula ósea desarrollado originariamente por Schmid en 1975, es probablemente el test “in vivo” más frecuentemente utilizado para poner de manifiesto el efecto genotóxico producido tanto por la radiación ionizante como por numerosas sustancias químicas. Los eritrocitos policromatófilos con micronúcleos en médula ósea, proporcionan un método fiable y relativamente sencillo para la detección del daño cromosómico producido por diferentes agentes físicos y químicos (HEDDLE y SALOMONE, 1981; ALMASSY et al., 1987; MAVOORNIN et al., 1990; KRISHNA et al., 1992; MAZUR, 1995a,b; CASTILLO et al., 2000; ALCARAZ et al., 2013).

Posteriormente, algunas modificaciones del test, entre las que también se incluye el recuento de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica con tinciones de acridina (HAYASHI et al., 1983; CASTILLO et al., 2010) e incluso el recuento automatizado mediante técnicas de citometría de flujo, han multiplicado las posibilidades iniciales del test. Las curvas dosis-efecto lineales descritas con el test de médula ósea le dotan de gran fiabilidad en la cuantificación del daño genético radioinducido. Muy recientemente, el análisis de reticulocitos en sangre humana por citometría de flujo se está convirtiendo en la última incorporación técnica que permite una determinación fiable de las dosis de radiación absorbidas (ACEVEDO, 2005).

Micronúcleos en linfocitos humanos irradiados

En los últimos años, se han ido acumulando un gran número de referencias que indican que el recuento de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados, constituye una fuente de información de los daños citogenéticos derivados de radiaciones ionizantes así como de numerosos tóxicos químicos.

Las relaciones dosis-efecto establecidas para radiación ionizante tienen una relación lineal o lineal-cuadrática en un rango de dosis entre 0,1 y 4 Gy (KORMOS y KOTELES, 1988). También se han acumulado los datos de los valores base de la población (frecuencia basal espontánea); como consecuencia, las dosis estimadas pueden ser actualmente más fiables. Esto último ha sido uno de los objetivos que se propuso el Proyecto HUMN (Micronúcleos Humanos) en 1997, dónde más de 35 laboratorios a nivel internacional se propusieron, entre otros objetivos, recopilar y comparar las frecuencias basales de micronúcleos en la población humana para establecer la frecuencia basal normal y determinar así las principales variables demográficas, medioambientales y metodológicas que afectan a este índice (FENECH et al., 2003), utilizando la ***técnica de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados y bloqueados citocinéticamente con Cytochalasina B en la primera división mitótica*** (FENECH y MORLEY, 1986).

La realización relativamente simple del test puede ayudar para la determinación de los efectos de tratamientos combinados y sirve de ayuda para estimar las radiosensibilidades individuales. Diferentes estudios han comparado la utilidad de esta técnica y la de la técnica del “cometa” en la evaluación del daño genotóxico producido por diferentes agentes físicos y químicos y las conclusiones han sido que la técnica “cometa” es más sensible que la técnica de micronúcleos en la monitorización de la población expuesta a radiación X aunque ambas pueden ser utilizadas para este fin (HE et al., 2000).

Las posibilidades de evaluar la frecuencia de aparición de micronúcleos a través de un análisis de imagen automatizado y computerizado proporcionaría a esta técnica un mayor rango de aplicación y que, todavía en estos momentos, no se ha hecho posible (FENECH y MORLEY 1985a, 1986; ALMASSY et al., 1987; HALL y WELLS, 1988; ALCARAZ et al., 2014). El estudio automatizado mediante la plataforma Metafer de cromosomas dicéntricos, micronúcleos y del test cometa produce resultados fiables y reproducibles que muestran la utilidad futura de esta técnica (FENECH et al., 2003; SCHUNCK et al., 2004).

Aunque en la actualidad se han descrito diferentes métodos, o variantes técnicas, para la realización del test de micronúcleos sobre linfocitos humanos irradiados empleando cultivos de linfocitos aislados, se ha recomendado que para el trabajo habitual de dosimetría biológica y de búsqueda o “screening” del efecto de sustancias radioprotectoras y radiosensibilizantes sea considerado el cultivo de linfocitos en sangre completa obtenida del donante directamente y

con bloqueo citocinético con cytochalasina B, como la técnica más adecuada para tal fin (IAEA, 2001; 2011).

C. Condensación prematura de cromosomas

Esta técnica se basa en la fusión de linfocitos aislados a partir de sangre periférica con células mitóticas de ovario de hámster utilizando polietilenglicol (PEG). El daño en sus cromosomas condensados prematuramente aparece como un buen indicador de la exposición a radiación ionizante. Los efectos de la radiación se manifiestan como “fragmentos”, es decir, material cromosómico que excede a las 46 cromátidas de los cromosomas; estos fragmentos son contados y se utilizan para estimar el daño citogenético. La condensación prematura de los cromosomas (PCC) se ha utilizado como un biodosímetro en linfocitos humanos no estimulados, evitando de esta forma complicaciones derivadas de retrasos en el ciclo celular y el efecto de células muertas en interfase a altas dosis de radiación. La técnica es más utilizada para detectar la proporción de células no dañadas por la radiación ionizante. Su umbral de sensibilidad parece mayor que la de otras técnicas citogenéticas y el daño inicial puede ser determinado inmediatamente después de la exposición. La relación dosis-efecto que se ha determinado es una relación lineal (GREINERT et al., 1995; BLAKELY et al., 1995).

Un paso adicional fue introducido con la coloración de los cromosomas mediante la combinación de la técnica FISH con la de PCC. La curva dosis-respuesta para la inducción de fragmentos es lineal dentro de las dos horas inmediatamente posteriores a la exposición. Más tarde, se ha descrito lineal y/o cuadrática. El método indica que la coloración de los cromosomas condensados prematuramente puede ser utilizado para la determinación de la dosis de radiación como dosímetro biológico (BLAKELY et al., 1995; IAEA, 2001; 2011).

D. Intercambio de cromátidas hermanas

Esta técnica no está considerada como una posibilidad práctica para indicar los daños de la RI. Puede ser un buen indicador del daño inducido por radiación ionizante pero no presenta una aceptable correlación con las dosis de radiación administradas o absorbidas. Algunos autores han descrito resultados sobre aumento de frecuencias en los trabajadores de Chernobyl y en ciertas poblaciones expuestas al radón (PRABHAVATHI et al., 1995; LAZUTKA, 1995; IAEA, 2011).

4. Indicadores Bioquímicos

Se han hecho considerables esfuerzos en las últimas tres décadas para encontrar indicadores bioquímicos del daño inducido por la radiación (como metabolitos o actividades enzimáticas) que, supuestamente, aparecerían o cambiarían sus actividades funcionales en fluidos corporales tales como la orina o la sangre debido fundamentalmente a procesos celulares degenerativos inducidos por la radiación ionizante. Algunos de estos indicadores bioquímicos son la deoxicitidina, timidina, pseudouridina, el ácido beta-aminoisobutírico, productos de degradación de los ácidos nucleicos, aminoácidos como la cisteína, taurina y

creatina, así como, productos del metabolismo proteico. Algunos autores coinciden en que estos parámetros dependen de una serie muy variable de condiciones fisiológicas o patológicas de cada individuo (edad, sexo, raza, desórdenes metabólicos) que dificultan extraordinariamente su empleo como dosímetro o indicador biológico de lesión radioinducida (LOHMAN et al., 1995).

El optimismo basado en los resultados obtenidos en animales de experimentación en diferentes ensayos, no se pueden conseguir en humanos. Los metabolitos de las aminas biogénicas, como el ácido 5-hidroxiindólico, dan normalmente una buena relación dosis-respuesta aunque a muy altas dosis. Entre estos indicadores bioquímicos se han descrito también cambios en la actividad de ciertos enzimas. Se han hecho pruebas con varios enzimas que normalmente aparecen en el suero sanguíneo tras serias lesiones en diversos tejidos como el músculo, hígado, piel y glándulas salivales, como son: la glutamato oxalacético transaminasa (GOT), la creatinfosfoquinasa (CPK) o la amilasa. Los datos procedentes de experimentos con animales y, ocasionalmente de experiencias humanas, muestran que la mayoría de estos tests no cumplen los requerimientos de indicadores biológicos en caso de accidente radiológico (LOHMAN et al., 1995).

5. Resonancia del Spin Electrónico

Entre los indicadores a nivel molecular se puede mencionar también la determinación de la resonancia del spin electrónico de los radicales libres inducidos por la radiación, conservados en tejidos de bajo contenido en agua como el esmalte de los dientes, las uñas o el pelo. La relación lineal dosis-respuesta se ha descrito entre 0,5 y varias decenas de Gy. La técnica se ha utilizado en los supervivientes de la bomba-A así como en las víctimas del accidente de Chernobyl. Sin embargo, varios puntos de la técnica han sido descritos como dependientes de diferentes parámetros: calidad de la radiación, efectos de la tasa de dosis, temperatura o naturaleza de la muestra biológica que se ha utilizado (KUDYNSKY et al., 1994), lo que suponen inconvenientes que no se han superado hasta estos momentos.

6. Indicadores en Exposiciones Internas

Aunque el interés principal de la dosimetría biológica radica en la aplicación de técnicas adecuadas para estimar las dosis absorbidas en casos de graves sobreexposiciones, principalmente de radiaciones ionizantes externas, los problemas de las exposiciones internas producidas mediante contaminación radiactiva también han de tenerse en cuenta. Actualmente hay dos circunstancias que tienen un especial interés: a) las exposiciones al radón y a sus descendientes y b) los radioyodos, generalmente utilizados en Medicina Nuclear.

Debido a que las exposiciones al radón se consideran en la actualidad preocupantes, se han hecho algunos acercamientos tanto en los mineros como en la población que vive bajo exposiciones más altas para medir su efecto biológico. Se han descrito frecuencias basales aumentadas de diferentes parámetros citogenéticos, pero todavía no se ha obtenido una

relación clara dosis-efecto. Una situación similar se ha descrito en trabajadores y soldados tras exposiciones al plutonio (LIVINGSTON et al., 2006).

La estimación de la dosis después de la terapia con radioyodo se ha demostrado dependiente de la condición fisiológica y patológica de la glándula tiroides, así como de la cantidad de radioisótopo concentrado en dicha glándula. En la enfermedad de Graves-Basedow la frecuencia de micronúcleos se ve incrementada pero en los adenomas tóxicos no se ha encontrado un aumento a pesar de las altas dosis aplicadas (KOTELES et al., 1993; KOTELES, 1996). La terapia con yodo radiactivo sí que ha supuesto un incremento de micronúcleos en los estudios con bloqueo citocinético en los pacientes tratados con yodo radiactivo en el tratamiento de carcinomas papilares de tiroides (NAVARRO et al., 2004a,b).

7. Indicadores para daños radioinducidos locales

Para zonas del cuerpo específicas, daños locales o irradiaciones parciales, que ocurren de forma más frecuente, el arsenal de diagnóstico es todavía más modesto y limitado. No se han descrito indicadores dosis-dependientes para la piel humana que puedan ser usados de forma rutinaria.

Tradicionalmente se han utilizado las observaciones clínicas que aparecen en la mayoría de los casos: eritema precoz, descamaciones secas y húmedas, daños vasculares, necrosis dérmicas y subcutáneas extensas. Con estos elementos cutáneos se puede establecer la localización, extensión y gravedad del daño radioinducido. Los diferentes métodos descritos deben ser también de valor diagnóstico y aconsejar la necesidad y condiciones de la terapia que pretende utilizarse así como diferenciar entre regiones cutáneas dañadas y no dañadas para estimar la utilidad de los injertos de piel en esas zonas. Los diferentes métodos incluyen en diferentes grados, el análisis de la capa basal de células y de los folículos pilosos y la estructura y el diámetro del pelo; en ocasiones, se ha utilizado la atrofia dérmica determinada mediante ultrasonidos para medir el grosor de la piel, la permeabilidad vascular, la capilaroscopia y la termografía relacionándolos con la dosis de radiación administrada.

La muerte celular radioinducida se ha demostrado dosis-dependiente en los folículos pilosos provocando el adelgazamiento del pelo. Se puede medir el porcentaje de pelo displásico, el número de aberraciones cromosómicas del epitelio del pelo arraigado, el número de células muertas (por apoptosis) en los folículos pilosos y el número de núcleos celulares en la médula del pelo. El pelo se puede obtener fácilmente de la mayoría de la superficie corporal. De esta forma, se pueden detectar exposiciones parciales del organismo permitiendo la localización de la exposición de la forma más exacta posible; incluso parece posible realizar un análisis automático del diámetro del pelo (HAMILTON y POTTEN, 1995).

Sin embargo, el sistema indicador más sensible (muerte de las células en el folículo piloso, 0'05-1 Gy) puede hacerse sólo utilizando métodos invasivos y su aplicación está

limitada en el tiempo (solamente en exposiciones cortas). El sistema que tiene más fácil accesibilidad (anchura del pelo, pelo displásico), es menos sensible (1-10 Gy y 2-10 Gy, respectivamente) y el efecto biológico necesita un mínimo de 2-3 días para su expresión, poniéndose de manifiesto que el tiempo óptimo de determinación está entre los 7 y 14 días postexposición. Hasta ahora la experiencia realizada en humanos es muy limitada, por lo que debería investigarse la variabilidad entre las diversas partes del cuerpo y la variabilidad existente entre individuos.

También se han descrito dos procedimientos de diagnóstico instrumental que pueden usarse en casos de sobreexposiciones locales para determinar su gravedad: los métodos térmicos y los radioisotópicos. Los dos métodos son más fiables cuando es posible comparar un área irradiada con la correspondiente zona simétrica no irradiada. En este sentido, varias formas de termografía pueden usarse, primero, para ver si hubo algún daño; y segundo, para valorar la extensión del mismo. Tanto la termografía de contacto como la teletermografía infrarroja parecen de utilidad parecida (quizás la última es mejor aunque más cara) para el diagnóstico de la irradiación parcial del cuerpo, principalmente de las extremidades (KOTELES et al., 1987; KOTELES y BENKO, 1994). El método radioisotópico detecta la circulación vascular en las regiones cuando se inyecta ^{99m}Tc -pertechnetato por vía intravenosa y su distribución se determina con cámara de centelleo. Su utilización permitiría objetivar lesiones vasculares radioinducidas que modifican el flujo sanguíneo de la zona corporal irradiada.

Estos dos métodos pueden utilizarse complementariamente. Sin embargo, no permiten determinar la dosis exacta de RI pero ayudan en la valoración de la severidad clínica del daño radioinducido. La termografía es una técnica sensible y frecuente para detectar daños locales de radiación y para determinar sus extensiones en las fases donde los síntomas clínicos no son evidentes, es decir, en los períodos más precoces y en los latentes (KOTELES y BENKO, 1994).

TENDENCIAS FUTURAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Se están estudiando algunas técnicas que se consideran de utilidad a corto plazo:

1. Mutaciones Genéticas

- Se han realizado estudios en los supervivientes de la Bomba-A y en algunas personas expuestas en el accidente de Chernobyl sobre las variaciones en la frecuencia de eritrocitos que han perdido el gen de expresión en el *locus* de la Glicoforina A (**ensayos GPA**) mediante la utilización de anticuerpos monoclonales con marcaje inmunológico. Por supuesto, el desarrollo sofisticado en la individualización de células y en la preparación de anticuerpos monoclonales con marcaje inmunológico, han hecho posible este tipo de aproximación. Un incremento de la frecuencia de células mutantes en los supervivientes de la Bomba-A se ha correlacionado con la dosis física estimada mayoritariamente para diferentes grupos de población y con más dificultad para individuos aislados. Respuestas similares se han descrito

en los eritrocitos de la población irradiada en Chernobyl, describiéndose la persistencia de las mutaciones durante años tras la exposición (ACEVEDO, 2005).

- El ensayo del gen del receptor de las células T (TCR) en linfocitos de sangre periférica parece aplicable después de la exposición a la radiación y presenta una frecuencia de células mutantes considerablemente elevada.
- El **ensayo de la hypoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT)** indica un incremento significativo en la frecuencia de células mutantes de manera dosis-dependiente. El test HPRT fue aplicado con éxito en las personas expuestas durante la contaminación ambiental en Goiania (Brasil) y se han descrito aumentos de las frecuencias de mutaciones durante años en las personas expuestas entre 1-7 Gy. En casos de pequeñas sobreexposiciones ocupacionales, el ensayo HPRT no ha mostrado suficiente sensibilidad (ACEVEDO, 2005).

2. Fenómenos Celulares

Se han ensayado diferentes tipos de alteraciones en la superficie celular como indicadores biológicos del daño radioinducido. Se han publicado algunos estudios para relacionar la dosis de radiación con movilidades electroforéticas de varias células incluyendo eritrocitos y linfocitos. También se han desarrollado pruebas de unión a la lectina. Sin embargo, los indicadores basados en las alteraciones de la membrana celular no tienen prácticamente importancia y persisten solamente por un tiempo relativamente corto tras la exposición a la radiación.

El **ensayo de células con electroforesis en gel (“cometa”)** es un método sensible para la detección de roturas en la cadena simple de DNA de células individuales. Actualmente se considera que debería llegar a ser una técnica habitual en la detección de dosis de radiación relativamente bajas. La contribución de este ensayo con otros ensayos citogenéticos similares permite evitar subestimaciones del daño radioinducido indicando tanto daños ligeros como graves en células individuales. Es obvio que el primer paso debe ser la realización de las curvas dosis-respuesta en cada laboratorio (SINGH et al., 1995a,b; PLAPPERT et al., 1995; IAEA, 2011).

El **indicador espermatogénico** es un caso especial para daños locales o regionales cuando las gónadas masculinas están situadas dentro del campo de radiación. Se han descrito cambios en la cantidad, movilidad y morfología de los espermatozoides tras la exposición a la radiación ionizante. Debido al tiempo de maduración del esperma adulto, la disminución de la cantidad de esperma puede no observarse hasta aproximadamente 45 días después de la exposición corporal a la radiación. El método tiene un gran número de inconvenientes, de manera que es bastante improbable que ocupe un papel importante en la dosimetría biológica. Puede usarse solamente con una parte de los varones de la población y solamente con

aquéllos, cuya espermatogénesis está intacta. Por otra parte, el método es invasivo y la mayoría de los datos publicados están limitados al ratón; no hay mucha información disponible en el hombre (ACEVEDO, 2005).

3. Indicadores Inmunológicos

El sistema inmune tiene una gran radiosensibilidad, por lo que parece muy útil para investigar técnicas de dosimetría biológica sobre todo para exposiciones a dosis bajas de radiación. Se han evaluado numerosas técnicas pero, actualmente, no existe un único indicador disponible para su uso rutinario en los ensayos previos de exposición a la radiación. Esto es debido, en parte, a la complejidad del sistema inmune y al hecho de que la información acerca de los factores celulares y plasmáticos implicados en el mecanismo de defensa inmune está en constante cambio y desarrollo (TUSCHL et al., 1995).

Los indicadores inmunológicos potencialmente útiles se pueden agrupar según el aspecto en el que están basados en: 1) Cuantificación del conjunto de linfocitos; 2) Valoración de la función que requiere la interacción de diferentes subpoblaciones de células blancas sanguíneas; 3) Producción de anticuerpos y 4) Respuestas mediadas por células como los test de hipersensibilidad cutánea y la capacidad para rechazar tejidos extraños u órganos trasplantados. Sin embargo, ninguno de ellos se emplea como dosímetro biológico en la actualidad (ACEVEDO, 2005).

A pesar de décadas de largas investigaciones e importantes adelantos, se han desarrollado solamente unos pocos indicadores biológicos y aún menos, dosímetros biológicos que sean realmente aplicables. Algunos son bastante prometedores; hoy en día, entre los más útiles y más ampliamente aceptados se encuentran los **Ensayos Citogenéticos** siendo la mayoría de ellos, de uso obligatorio en accidentes radiológicos y propuesto para medir el efecto de la radiación en las situaciones en las que grandes poblaciones se vean expuestas a RI.

En este sentido nuestro laboratorio utiliza un test citogenético clásico que expresa el daño cromosómico (genotóxico) inducido por la radiación ionizante: el test de micronúcleos del cuál, se han descrito dos variantes:

- a) La técnica de micronúcleos “in vivo” sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón.
- b) La técnica de micronúcleos “in vitro” en linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético.

En nuestro estudio utilizaremos ambos, teniendo en cuenta que el test de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético para poner de manifiesto el posible efecto protector de diferentes sustancias frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante es considerado hoy día como el test de dosimetría biológica más adecuado en estos momentos para el análisis citogenético de rutina (IAEA, 2001; 2011).

GRUPO	INDICADOR BIOLÓGICO	DOSÍMETRO
HEMATOLÓGICOS		
- Disminución de linfocitos, granulocitos, plaquetas y eritrocitos. - Disminución de células de la médula ósea.	+	-
CITOGENÉTICOS		
- Aberraciones cromosómicas en metafase (dicéntricas, anillos). - Aberraciones en interfase. - Micronúcleos “in vitro” e “in vivo”. - Condensación prematura de cromosomas. - Hibridación in situ con fluoresceína (FISH).	+	+
- Aberraciones numéricas. - Intercambio de cromátidas hermanas.	+	-
CITOLÓGICOS-MOLECULARES		
- Rotura de DNA por electroforesis en gel, “test del cometa”. - Alteraciones de unión (lectina, etc.). - Electroforesis de células.	+	+
Pérdida del gen de expresión en el locus de Glicoforina A en eritrocitos. - Función, morfología y densidad celular. - Capacidad reproductiva.	+	-
ESPERMATOGÉNICOS		
Cantidad, movilidad y morfología de esperma.	+	-
INMUNOLÓGICOS		
- Cambio en el recuento de los tipos de linfocitos. - Cambio en las funciones celulares. - Producción de anticuerpos. - Test de hipersensibilidad cutánea mediada por células.	+	-
RESONANCIA DEL SPIN-ELECTRONICO		
Pelo, dientes, uñas.	+	+
BIOQUÍMICOS		
- Productos metabólicos. - Actividades enzimáticas. - Capacidad reparativa.	+	-

Tabla A2. Principales indicadores y dosímetros biológicos utilizados para cuantificar el daño radioinducido

FLAVONOIDES

NATURALEZA Y BIOSÍNTESIS

Actualmente existe la tendencia al uso de sustancias de origen natural con efectos beneficiosos para la salud que sean componentes habituales de la dieta humana. En la dieta “mediterránea” se presentan con frecuencia compuestos con dicha potencialidad en este sentido. En el mundo vegetal, los flavonoides (del latín *flavus*, amarillo) o compuestos polifenólicos constituyen un importante grupo de sustancias orgánicas que han permitido desarrollar en los últimos años diversas líneas de investigación científica con interesantes aplicaciones. Constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales y le dan los colores (rojos, azules, amarillos) a las flores y a las hojas de otoño. La luz no es esencial para su formación, pero influye en su presencia cuantitativamente en la planta. Su color depende del pH, son incoloros o blancos a pH ácido y de color amarillo intenso a pH básico (CASTILLO et al., 2000).

Dentro de las plantas comestibles están presentes una amplia variedad de flavonoides. Se han identificado en total 61 tipos diferentes de los cuales nos interesan especialmente los flavonoides de la especie *Citrus* (HOROWITZ y GENTILI, 1977), dentro de la cual podemos distinguir cuatro tipos que son: *flavonas*, *flavononas*, *flavonoles* y *antocianinas*. En este trabajo hemos utilizado compuestos de diferentes familias de plantas, que se están consolidando como fuentes de sustancias polifenólicas naturales: **los cítricos, el romero, el olivo, la uva y el té** (BENAVENTE-GARCIA et al., 2007).

Los *cítricos* son la fuente más importante de flavonoides, siendo la base de productos farmacéuticos como la diosmina-hesperidina (daflón®, circovenil®, diosminil®, insuven®, venosmil®, etc.) y derivados esterificados de la rutina (venoruton®, duvaline®, venosan®, esberiven®, etc.). Entre los flavonoides presentes en “*citrus*” destaca el **eriodictiol**, que es una flavonona que se encuentra glicosilada en los frutos del limón y que presenta una estructura molecular congruente con una alta capacidad antioxidante

Asimismo, hemos estudiado la capacidad radioprotectora de otros flavonoides presentes en “*citrus*” como la **Diosmina**, la **Rutina** y el **Extracto Cítrico (CE-50)**. Por otra parte, hemos estudiado el efecto de determinadas vitaminas y precursores como son la **Vitamina C o Ácido Ascórbico** (presente en “*citrus*”), la **Vitamina E (δ-tocoferol)**. También hemos incluido la **Quercetina**, el polifenol-flavonoide probablemente más estudiado. La quercetina es el derivado aglicón de la rutina, cuya forma esterificada es una de las bases más utilizada en la síntesis de fármacos con propiedades vasoprotectoras periféricas y, en general, del sistema circulatorio.

El **romero** es, posiblemente, la planta labiada con mayor presencia de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante. Además de esta capacidad antioxidante el romero se

ha utilizado en medicina como agente antiinflamatorio y antimicrobiano. Dentro de los compuestos presentes en el romero destacan los pertenecientes a tres familias distintas de polifenoles: dos compuestos diterpénicos, el **Carnosol** y el **Ácido Carnósico**; y el **Ácido Rosmarínico**, un ácido polifenólico procedente de la condensación del ácido caféico con otras estructuras; y la hispidulina-7-O-glucósido, un flavonoide muy característico de esta planta. La actividad antioxidante de los extractos de romero depende de su riqueza en compuestos fenólicos, que puede ser determinada por varios métodos en medios acuosos y lipídicos. En medios lipídicos, los extractos con mayor contenido de diterpenos fenólicos son los más efectivos, mientras que en medio acuoso el ácido rosmarínico presenta la mayor capacidad antioxidante (ALCARAZ et al., 2013; 2014).

El *olivo* presenta una composición característica en compuestos polifenólicos que no presentan otras plantas mediterráneas, distribuidos principalmente en cinco grupos de sustancias: oleuropeósicos, flavonas (**Apigenina**, entre otras.), flavonoles (rutina), flavan-3-ols (catequina) y compuestos fenólicos (**Hidroxitirosol**, ácido cafeico, etc.). Algunos compuestos polifenólicos presentes en el olivo han demostrado capacidad antioxidante y se utilizan en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Los compuestos presentes en el aceite de oliva virgen, también presentes en las hojas de olivo, presentan propiedades antiinflamatorias agudas y crónicas en modelos realizados en ratas, siendo capaces de captar aniones superóxido (O_2^-) y disminuir su producción celular, lo cual puede explicar algunos de los efectos protectores observados en estudios epidemiológicos realizados sobre enfermedades cardiovasculares (CASTILLO et al., 2010).

Estudios recientes han mostrado específicamente las propiedades antioxidantes de los componentes principales de los **Extractos del Olivo**, la oleuropeina y el hidroxitirosol, que es precursor de la oleuropeina y un metabolito producido por el hombre cuando se administra la oleuropeina oralmente. Ambos presentan capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica “*in vivo*” en microsomas hepáticos de rata, e “*in vitro*” frente al estrés oxidativo del peróxido de hidrógeno o la xantina oxidasa, aumentan la resistencia del LDL a la oxidación, y reducen los niveles plasmáticos totales de colesterol libre y esterificado. Según estos estudios, el hidroxitirosol y la oleuropeina podrían mostrar efectos beneficiosos sobre la salud debido a sus propiedades antioxidantes (CASTILLO et al., 2010).

En este trabajo también se han estudiado una serie de sustancias procedentes de la *uva* como son las procianidinas (**P90**), el **Ácido Gálico** y un **Extracto Soluble de Semilla de Uva**. Estas sustancias presentan importantes propiedades antioxidantes y son, precisamente, las causantes de los efectos beneficiosos del vino tinto descritos en diferentes estudios.

De gran actualidad es el **Té Verde** por sus propiedades antineoplásicas y antioxidantes y, por ello, hemos decidido ensayarlo en este trabajo, ya que la luteína se ha descrito como un

elemento protector en diferentes test de micronúcleos sobre médula ósea de ratón (SINGH, 1996).

Además incluimos también en nuestro estudio el **Dimetilsulfóxido (DMSO)** por ser el principal disolvente de los compuestos liposolubles ensayados y, de esta forma, distinguir entre el efecto debido a la propia sustancia y/o el debido al disolvente de la misma.

Por último, también hemos incorporado al estudio la **Amifostina o Ethyol®**, único compuesto utilizado en clínica como elemento que presenta actividad radioprotectora y que es utilizado actualmente como tratamiento previo en pacientes que se van a someter a tratamientos de quimioterapia y/o radioterapia. Aunque no se ha ensayado como genoprotector previamente, al ser un compuesto basado en las características clásicas de protección a partir de puentes disulfuros, puede resultar un patrón de comparación de los posibles efectos protectores que se puedan encontrar.

La estructura química de los flavonoides surgió de forma indirecta durante la búsqueda de nuevos productos y se ha detectado su presencia en múltiples especies del reino vegetal. En un principio llamaron la atención de los investigadores y fueron clasificados como vitaminas naturales (vitamina P), pero rápidamente se desechó esta idea. La formación de flavonoides parece estar asociada con procesos de lignificación en hojas y leños y con procesos de luz ultravioleta por las flores (BATE-SMITH, 1962; THOMPSON et al., 1972) así como con los diversos tipos de estrés, sobre todo los sistemas inducidos a través de infecciones fúngicas y microbianas (LOSCHKE et al., 1983; SCHEMEELZER et al., 1984; GRAB et al., 1985; DIXON et al., 1986; EBEL 1986), considerándose actualmente los flavonoides como el sistema inmunológico de las plantas. Estos efectos se han atribuido a su influencia sobre el metabolismo del ácido araquidónico.

PRINCIPALES GRUPOS Y ESTRUCTURA

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, un anillo B y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B. Por eso se les conoce como $C_6-C_3-C_6$. La estructura puede conformar un heterociclo (gamma-pironas, que son las más abundantes) o una cadena abierta, las chalconas. Las polimerizaciones son frecuentes y ocurren principalmente por uniones C-C.

Todos los flavonoides se numeran en sentido horario, simplemente con números en los anillos A y C, y con números "prima" en el anillo B. La excepción son las auronas, donde la numeración se invierte. La estructura base puede presentar hidroxilos, metoxilos, estar O-glicosilada o C-glicosilada. En general, el anillo A presenta hidroxilos y el anillo B uno, dos o tres hidroxilos o metoxilos. Los azúcares forman O-glicósidos en las posiciones 3, 7, 3' y 4', siendo los diglicósidos más comunes en 3 y 7 o en 7 y 4'. La C-glicosidación se presenta sobre

C₆ y C₈. Los O-glicósidos dan hidrólisis en tratamiento con ácidos y los C-glicósidos, menos abundantes, no son hidrolizados por ácidos.

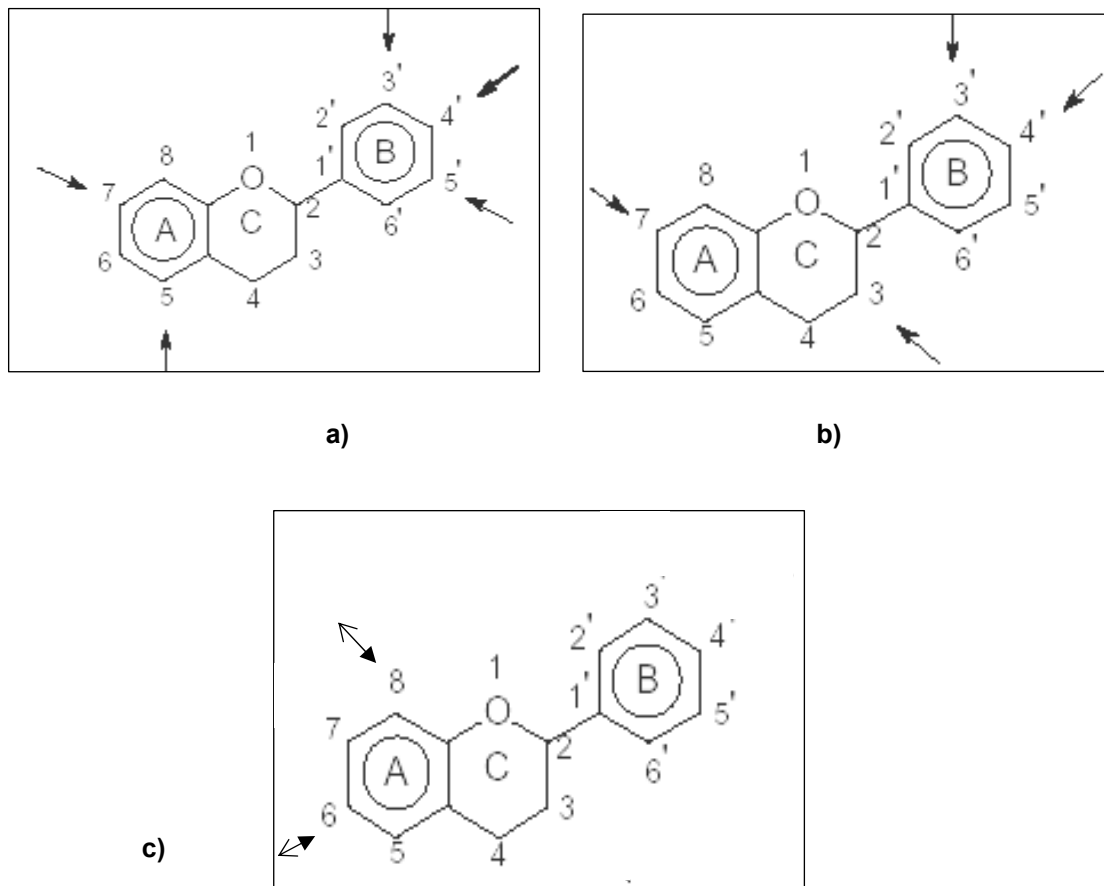


Figura A3. Estructura general de los flavonoides

a) Lugares de hidroxilación y metilación.

b) Lugares de O-glicosilación.

c) Lugares de C-glicosilación.

CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides se clasifican en:

- Antocianinas.
- Flavonas y flavonoles.
- Flavononas y flavononoles.
- Chalconas y auronas (no incluidas en este estudio).

a) Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua, responsables en gran parte de la coloración de las plantas (TIMBERLAKE y BRIDLE, 1975). Pertenecen a un grupo de compuestos glicosilados que se encuentran en las células de dichos vegetales. A la estructura libre de la parte azucarada se le denomina Antocianidinas.

La estructura común está constituida por el catión 2-fenil benzopirilium o catión flavilium (HAYASHI, 1962).

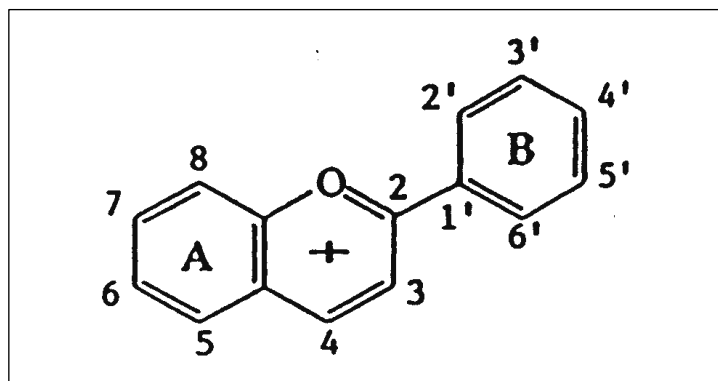


Figura A4. Flavilium

La hidroxilación de esta estructura básica originaría diversos compuestos, que vemos representados en las siguientes figuras:

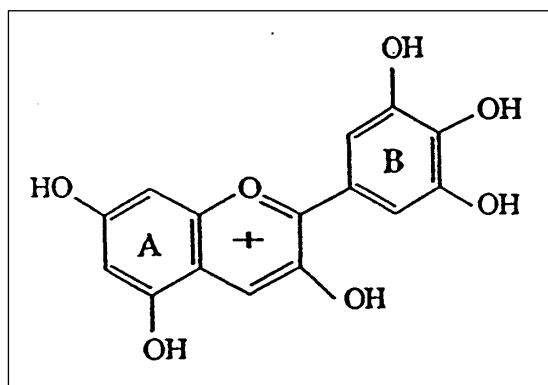


Figura A5. Pelargonidina

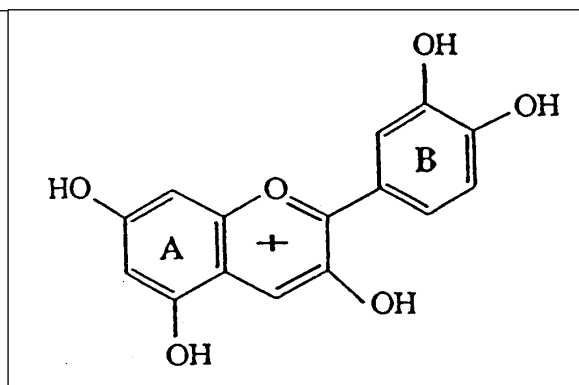


Figura A6. Cianidina

Estas estructuras se encuentran en la naturaleza en su forma glicosilada (antocianinas) conteniendo uno o más azúcares enlazados y radicales orgánicos de tipo ácido (HAYASHI, 1962). En la naturaleza se encuentran compuestos poliméricos similares: las protoantocianidinas que pueden convertirse en antocianinas mediante tratamiento ácido en caliente (HASLAM, 1975).

b) Flavonas y flavonoles

El término flavona se aplica al núcleo 2-fenilbenzopirona. Entre los derivados de esta estructura base destacan los hidroxiderivados y sus ésteres como los más abundantes; el término flavonol se utiliza para designar a las 3-hidroxi-flavonas. Esta simple diferencia estructural tiene gran importancia desde el punto de vista biosintético, fisiológico, filogenético y farmacológico. Dentro de estos grupos estructurales madre (flavonas, flavonoles), las oxisustituciones más frecuentes se producen en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4'; la C alquilación se

produce sobre todo en las posiciones 6 y 8 (GREENPERBERG, 1962) y las posiciones de glicosilación más frecuentes son el grupo hidroxilo, en posición 7 (en las flavonas) y en posición 7 y/o 3 para los flavonoles.

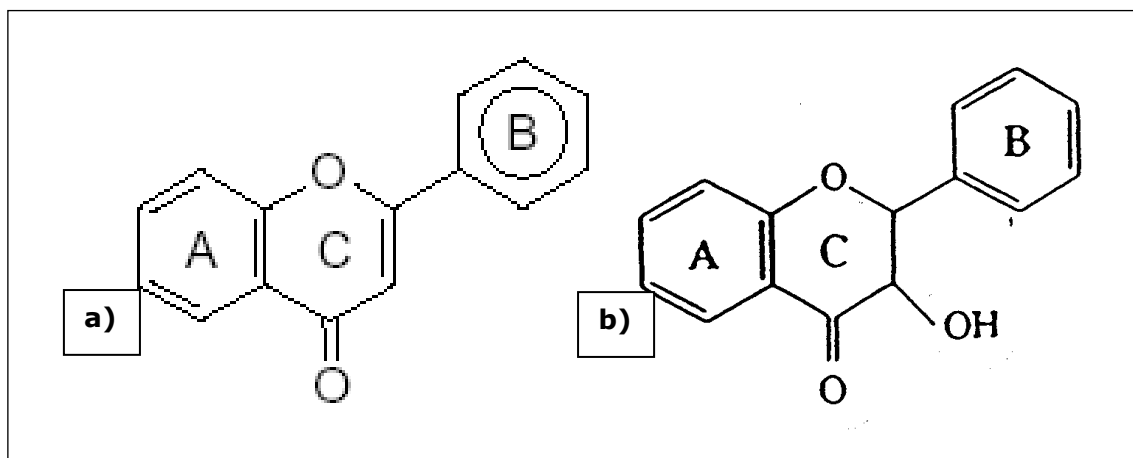


Figura A7. Flavanona (a) y Dihidroflavonol (b)

c) Flavononas y dihidroflavonoles

Las flavononas son las más abundantes en la naturaleza. No obstante, la alta metoxilación de las flavonas les confiere una mayor actividad biológica aunque se encuentren en bajas concentraciones. La estructura flavonona difiere químicamente de la flavona en la saturación del enlace entre los carbonos 2, 3 y también en la desaparición de la conjugación entre dicho doble enlace con el grupo carbonilo, conjugados a su vez con el grupo 2-fenilo – anillo B-, y con el anillo A. (SHIMOKORIYAM, 1975; BOHM, 1975). Los dihidroflavonoles se construyen bajo la misma base y su denominación es 3-hidroxiflavanonas. Las posiciones más comunes de oxisustitución, alquilación y glicosilación son similares a las de las flavonas.

Las flavononas y los dihidroflavonoles son compuestos enormemente interesantes desde el punto de vista estructural, puesto que son intermedios en las rutas generales de biosíntesis de flavonoides (BOHM, 1975).

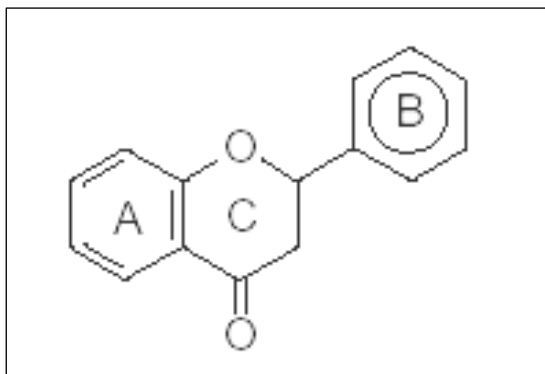


Figura A8. Flavanona

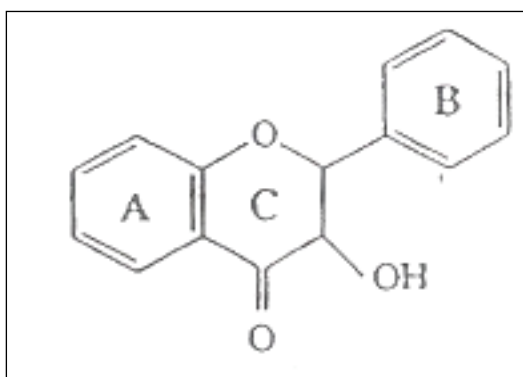


Figura A9. Dihidroflavonol

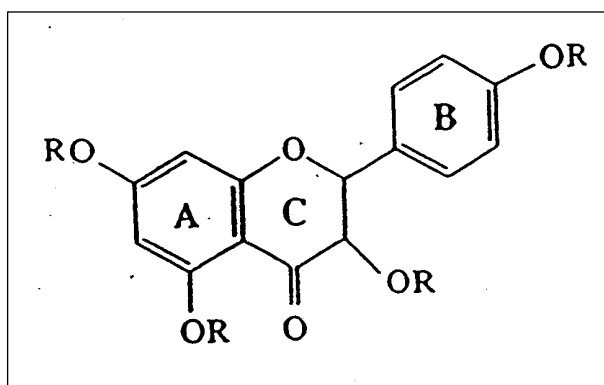


Figura A10. Flavonona/dihidroflavonol

Además de los flavonoides mencionados, se debe considerar la existencia de otros tipos de flavonoides: chalconas, dihidrochalconas, auronas, auronoles, isoflavonoides, neoflavonoides, bioflavonoides, glicosilflavonoides, así como otros flavonoides cuya estructura química es derivada de las ya expuestas.

PROPIEDADES Y USOS DE LOS FLAVONOIDES

Está ampliamente aceptado que la fruta fresca y los vegetales tienen muchas propiedades beneficiosas para la salud. Existe una considerable bibliografía y un heterogéneo conjunto de pruebas epidemiológicas que establecen una conexión entre aquéllos que consumen una dieta rica en fruta fresca y vegetales con una disminución de las enfermedades cardiovasculares (SALAH et al., 1.995). Se ha asumido también que los polifenoles, elementos activos constituyentes de la dieta que contribuye a estos efectos protectores, son nutrientes “antioxidantes” aunque en trabajos más recientes se han señalado como agentes que, a través de otros mecanismos diferentes, contribuyen a acciones anticancerígenas o cardioprotectoras (MARTÍNEZ, 2004). Según otros autores la vitamina B1 protege a los linfocitos humanos de los daños genéticos inducidos por la radiación X (KONOPACKA y ROGOLINSKI, 2004). Estos compuestos tienen incluso aplicación en la estabilización de los alimentos debido a su capacidad para protegerlos frente a procesos de peroxidación orgánica u oxigénica.

1. Actividad Antioxidante

La formación de radicales libres constituye un proceso asociado de forma natural al metabolismo normal de las células aeróbicas. El consumo de O_2 inherente al desarrollo celular, provoca la generación de una serie de radicales libres oxigénicos que son las especies más abundantes y características del fenómeno conocido como “estrés oxidativo”. De igual forma, la interacción de estas especies con moléculas de naturaleza lipídica provoca la aparición de nuevos radicales hidroperóxidos y peróxidos diversos.

Este conjunto de radicales (superóxido, hidroxilo y peróxidos lipoides) pueden actuar sobre los sistemas biológicos de forma claramente citotóxica. Estos compuestos interaccionan con moléculas esenciales para la vida, como ácidos nucleicos o proteínas, sobre las que

producen modificaciones oxidativas que conducen a alteraciones en la expresión génica, mutaciones y modificaciones en la función de recambio proteico, proceso fundamental cuya eficacia está supeditada a la actividad funcional de los potenciales sistemas de reparación (SÁEZ TORMO et al., 1994).

Resulta evidente la necesidad de incentivar la investigación de los mecanismos por los que estos radicales libres pueden ser bloqueados y/o captados. En este aspecto, los compuestos fenólicos y, concretamente los flavonoides, han demostrado una importante actividad antioxidante frente a estos radicales basada principalmente en sus características estructurales; características que permiten, además de la captación electrónica, una gran estabilidad en el radical flavonoide formado. Dicha estabilidad es conseguida a través de una deslocalización tautomérica impidiendo, de este modo, la cadena de reacciones de propagación de dichos radicales.

a) Relación entre estructura de los flavonoides y la actividad antirradicales libres

La capacidad antioxidante de un flavonoide, considerada en función de los estudios cinéticos de las reacciones de formación y descomposición del radical aroxil flavonoide, se encuentra estrechamente ligada a la particular estructura de estos polifenoles. En la Figura 12 se muestran los tres grupos estructurales más importantes para determinar esta capacidad. (BORS et al., 1990a,b; BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; REDONDO et al., 1999).

A: El O-dihidroxi (catecol), estructura en el anillo B que confiere una gran estabilidad al grupo aroxilo posiblemente, a través del enlace de hidrógeno que participa en la deslocalización del electrón captado.

B: El doble enlace 2=3 conjugado con la función 4-oxo que es responsable de la deslocalización del anillo B.

C: La presencia de grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 5. Desde el punto de vista cinético, los grupos hidroxilo 3 y 5 son equivalentes dado sus enlaces de hidrógeno con el grupo 4-ceto. A pesar de esta consideración general, la presencia o ausencia del grupo 5-hidroxilo puede tener una influencia decisiva en la estabilización de los flavonoides, introduciendo un componente esteroisomérico dentro de la capacidad de deslocalización electrónica y, por consiguiente, en la estabilidad del radical aroxilo del flavonoide.

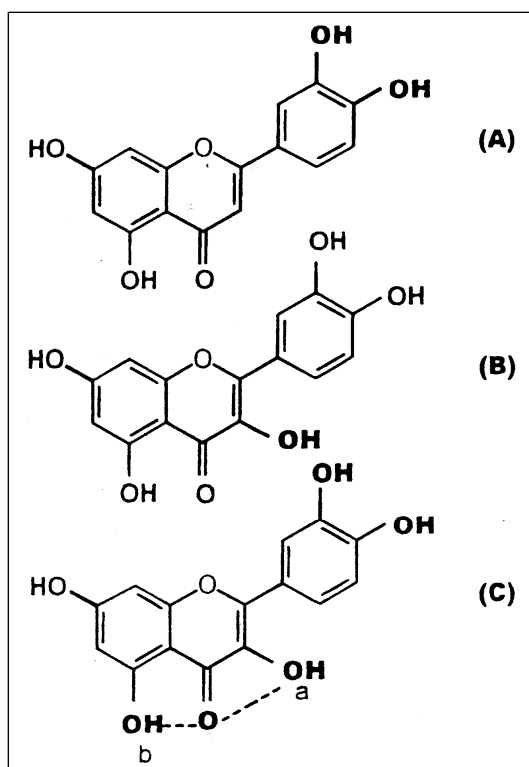


Figura A11. Grupos funcionales flavonoides con alta capacidad antioxidante

Obviamente, la capacidad antioxidante de cualquier flavonoide estará determinada por una combinación de estos elementos estructurales. Sin embargo, esta capacidad no será similar ni mostrará el mismo grado de efectividad en cada uno de los radicales mencionados anteriormente sino que dependerá de los diferentes mecanismos de acción que tienen lugar en cada caso concreto.

Estos mecanismos están influenciados por factores estructurales diferentes a los descritos, tales como: presencia o ausencia de radicales glicosilados en la estructura del flavonoide (glicósidos o aglicones), la posición del glicósido y el número y posición de los hidroxilos libres y esterificados (ACEVEDO, 2005).

b) Efectos y propiedades de los flavonoides con interés clínico y biológico

Muchas de las especies de citrus acumulan gran cantidad de flavonoides durante el desarrollo de sus diferentes órganos (CASTILLO et al., 1992, 1994; BENAVENTE-GARCÍA et al., 1993; 2007). Los flavonoides descritos en las especies del género citrus pueden clasificarse en tres grupos:

- FLAVONAS (FLO).
- FLAVONONAS (FLA).
- FLAVONOLES (FOL).

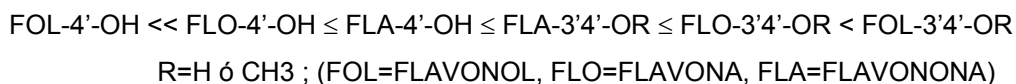
Estudios recientes acerca de la distribución cuantitativa de estos flavonoides en citrus han puesto de manifiesto que las 7-O-glicosil flavononas son los flavonoides más abundantes en todas las especies del género citrus.

Estos compuestos son intermediarios en la ruta biosintética (LEWINSOHN et al., 1989; BENAVENTE-GARCÍA et al., 1995) de Flavonas y Flavonoles y, aunque ambos se han encontrado en bajas concentraciones dentro de los tejidos de citrus, demuestran ser en conjunto poderosos agentes antioxidantes.

c) Propiedades antioxidantes de los flavonoides de origen cítrico

El elemento estructural fundamental que permite a los flavonoides de origen cítrico la captación o complejación del singlete oxígeno es la combinación entre la conjugación del anillo B (catecol) con la función 4-oxo y la presencia del doble enlace 2=3 así como, la presencia del grupo 3-hidroxilo.

Los flavonoides son excelentes captadores del radical hidroxilo. En función de las investigaciones realizadas por diversos autores (PINCEMAIL et al., 1985; DARMON et al., 1987; CILLARD y CILLARD, 1988; FENECH et al., 2005), parece definirse un orden de efectividad basado también en consideraciones estructurales y que, en orden creciente de actividad, sería:



Esta ordenación está basada en la capacidad de inhibición de la formación del radical hidroxilo, y muestra la importancia del modelo binario de sustitución en el anillo B, aún tratándose de hidroxilos esterificados con grupos metilo. Resulta significativa la actividad que puede ejercer el grupo hidroxilo en el anillo B en posición 3 en compuestos monosustituídos (Flavonoles).

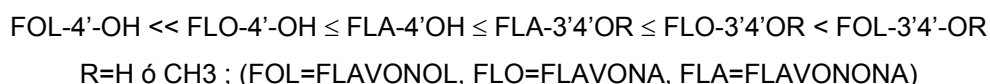
La actividad antioxidante de distintos flavonoides cítricos respecto a su potencial como captadores del radical superóxido ha sido estudiada utilizando diferentes métodos y con diferentes correlaciones estructurales. Estas actividades están influidas significativamente por la concentración de flavonoides en el medio, incrementando de "0" a la máxima actividad, o estando a punto de llegar a la autooxidación del flavonoide en el caso de algunos flavonoles (DARMON et al., 1.990).

De cualquier modo, el elemento estructural dominante es la configuración del anillo C, particularmente la presencia del grupo 3-hidroxilo activando el doble enlace 2=3. Sólo cuando la concentración de flavonoide es menor a 3 µM, la presencia de los grupos hidroxilo en el anillo B es significativa para determinar las propiedades antioxidantes de estos compuestos (SICHEL et al., 1991).

La presencia del doble enlace 2=3 (Flavonas) proporciona a la estructura del flavonoide una mayor reactividad, razón por la cual la apigenina (Flavona) es un moderado antioxidante

mientras que la naringina (Flavonona) no muestra prácticamente actividad frente al radical superóxido.

Diferentes autores han demostrado que los flavonoides son excelentes agentes captadores de radical hidroxilo (PINCEMAIL et al., 1985; CILLARD y CILLARD, 1988;). Del mismo modo que en los casos anteriores, parecen poseer un grado de efectividad que resulta en función de su estructura:



Una amplia serie de estudios muestran que los flavonoides son buenos antioxidantes de diversos radicales lipídicos (PINCEMAIL et al., 1985; TOREL et al., 1986; CILLARD y CILLARD, 1988; BORS et al., 1990a,b; DAS y PEREIRA, 1990; WANG y ZHENG, 1992; MOREL et al., 1993). La reactividad de cada flavonoide está en función de la naturaleza de los diferentes radicales libres que puedan formarse en el medio (BOMBARDELLI y MORAZZONI, 1993). Dicha actividad depende de una amplia serie de factores, entre ellos, la naturaleza del sustrato orgánico susceptible de oxidación, las condiciones operativas e incluso, el método utilizado en la evaluación de este potencial.

2. Propiedades Anticancerosas

Debido a su capacidad de absorción de luz ultravioleta, los flavonoides pueden proteger al DNA de este tipo de radiación. Estos efectos son una de las funciones fisiológicas atribuidas a los flavonoides en el reino vegetal (STAPLETON y WALBOT, 1994), aunque también puede generalizarse a las células animales, particularmente, de mamíferos. Experimentos recientes en plasma a temperatura ambiental sobre el DNA irradiado con UV-B demuestran los efectos protectores de la naringina y de la rutina (KOOSTSTRA, 1994). Paralelamente, los flavonoides son capaces de neutralizar los radicales libres que se generan alrededor del DNA celular y que pueden producir mutaciones. Esta capacidad de absorber los radicales libres, bien de una forma directa o bien a través de acciones moduladas por enzimas endógenos, es la responsable de los efectos protectores de los flavonoides en experiencias realizadas sobre ratones irradiados con radiación gamma (SHIMOI et al., 1994).

Además, los flavonoides también podrían proteger al DNA interaccionando directamente con los carcinógenos que escapan a los procesos de detoxificación, como ocurre en las aberraciones cromosómicas inducidas por Bleomicina (HEO et al., 1994).

Se ha demostrado en ensayos “*in vivo*” e “*in vitro*” que algunos flavonoides inhiben el desarrollo tumoral. Los mecanismos intracelulares por la que los flavonoides llevan a cabo estos procesos son poco conocidos pero se sabe que los flavonoides podrían actuar tanto a nivel de la membrana celular como a nivel de diferentes enzimas intracelulares; en este último caso, los flavonoides pueden afectar la actividad de varios enzimas implicados en la

transducción del mensaje genético (quinasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas) y que, a su vez, regulan otros enzimas importantes en el crecimiento y la proliferación celular (BENAVENTE-GARCIA et al., 2007).

Así pues, algunos de los procesos postulados en relación a la inhibición del desarrollo tumoral son: el proceso de glicolisis, la inhibición del transporte de ácido láctico o interacciones con diferentes ATP-ases de membrana.

Finalmente, se ha visto que los flavonoides pueden fortalecer los efectos de las terapias sobre el cáncer, por ejemplo: la quercitina aumenta en gran medida la actividad inhibidora del crecimiento de la adriamicina (SCAMBIA et al., 1994; CRITCHFIELD et al., 1994).

3. Propiedades Cardiovasculares. Efectos sobre la fragilidad capilar

Ciertos flavonoides han mostrado influencia sobre la pared de los vasos capilares y las funciones plaquetarias, leucocitaria, coagulante y antitrombótica, detectándose efectos beneficiosos sobre patologías coronarias.

Estos efectos fueron descritos por Szent-Gyorgyi (1938), quienes consideraron que los flavonoides tenían actividad “vitamínica”, denominándola vitamina P. Las lesiones estudiadas implicaban pérdida de plasma y sangre a través de los tejidos seguidas de reacción inflamatoria. El tratamiento actual de esta patología está basado en la utilización de medicamentos con flavonoides, sobre todo, derivados de hesperidina y rutina (más exactamente diosmina y metilchalconahesperidina) así como, hidroxietilrutósidos; todos ellos actúan primero sobre el endotelio microvascular disminuyendo la hiperpermeabilidad y el edema en pacientes con insuficiencia venosa crónica y/o diabetes. Los hidroxietilrutósidos mejoran la microcirculación y la perfusión microvascular disminuyendo la agregación eritrocítica. Este tratamiento también ha demostrado beneficios en pacientes diagnosticados de hemorroides severas (WALDWORTH y FAULDS, 1992).

Otras actividades farmacológicas son, en primer lugar, interferencia sobre el mecanismo de los edemas y; en segundo lugar, su interferencia con el fenómeno de hiperpermeabilidad inducida por la isquemia (LABRID, 1994). Algunos estudios han relacionado el incremento del tono muscular observado “in vivo” después del tratamiento con estas drogas, con la inhibición de los transportadores de aminas donde los flavonoides actúan como antagonistas de estos sobre la membrana plasmática (SHER et al., 1992). El mecanismo vasodilatador producido por los flavonoides se ha considerado una consecuencia de la inhibición de la proteinkinasa C (DUARTE et al., 1993).

4. Efectos sobre la agregación plaquetaria

En este aspecto, los flavonoides metiloxidados (nobiletina y tangeretina) son mucho más activos que los compuestos hidroxilados y su acción pueden ser similar a la del ácido

salicílico, el cual ha mostrado ser inhibidor de la agregación plaquetaria. Algunos estudios han demostrado que tanto la tangeretina como la nobiletina disminuyen la agregación plaquetaria en el rango de los 30 μM para agregación inducida por ADP y colágeno comparándolo favorablemente respecto a quercetina y fisetina; si bien, ni naringina ni hesperidina resultaron activas hasta 200 μM (BERET y CAZENAVE, 1988).

Otros autores han descrito que los flavonoides tienen diferentes efectos sobre la adhesión plaquetaria, la agregación plaquetaria y la secreción de serotonina; si bien, el grado de inhibición depende del tipo de inductor y de la estructura del flavonoide (MANACH et al., 1996). Sin embargo, otros flavonoides (quercetina, fisetina y myrecitina) muestran un efecto desigual frente a la agregación inducida por colágeno (TZENG et al., 1991). Estos diferentes efectos de los flavonoides sugieren que deben existir varios mecanismos de actuación implicados, así por ejemplo, el enzima fosfodiesterasa puede ser uno de los mecanismos a través del cual se produce el efecto sobre el AMPc y GMPc. Otros mecanismos serían la inhibición de la cicloxigenasa como consecuencia de la depresión de la síntesis del tromboxano A₂ (TZENG et al., 1991) y la inhibición de la movilización intracelular del calcio (OZAKI et al., 1993).

5. Efectos sobre la enfermedad coronaria

In vitro, los flavonoides inhiben la oxidación del LDL (lipoproteína de baja densidad) reduciendo las tendencias trombóticas que induce. El consumo de flavonoides muestra una relación inversa con la aparición de infartos de miocardio. Existen evidencias de que la oxidación por radicales libres de LDL juega un importante papel en la aterogénesis. Los flavonoides, como se ha mencionado antes, son “bloqueadores” de radicales libres como aniones superóxido y radicales peróxido y pueden, por tanto, interrumpir las reacciones inductoras de radicales libres. In vitro, algunos flavonoides (incluyendo los flavonoides obtenidos de citrus) inhiben la modificación oxidativa del LDL por macrófagos, fundamentalmente, inhibiendo la generación de hidroperóxidos y protegiendo el α -tocoferol presente en la oxidación lipoproteica. Esta disminución de la velocidad de oxidación de ciertos compuestos permite reducir las complicaciones ateroscleróticas (HERTOG et al., 1993).

Por otra parte, los cítricos flavonoides ejercen una aparente acción reguladora sobre la agregación y concentración eritrocitaria (acción sobre el hematocrito). Sus dos principales efectos se producen sobre la viscosidad de la sangre y sobre el flujo sanguíneo (ROBBINS, 1976). Los compuestos metiloxidados presentan una acción antiadhesiva altamente significativa sobre los eritrocitos e inhiben la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG) mientras que, los glicósidos hidroxilados aceleran la agregación y la VSG. El efecto antiagregante de los flavonoides ha sido interpretado como un mecanismo por el cual el eritrocito es eliminado por secuestro y sacado de la circulación. Tales acciones parecen ser selectivas y similares a las de la polilisina que, con preferencia, agrega eritrocitos “viejos” con menos carga que los eritrocitos jóvenes que tienen altas cargas negativas. Los perfiles

hematológicos en suero de los pacientes con enfermedades coronarias muestran valores significativamente altos de colesterol; en estos pacientes, el tratamiento con flavonoides metoxilados puede ser beneficioso, si bien, debe establecerse un control médico sobre el aumento de la viscosidad sanguínea.

6. Actividad antiinflamatoria, antialérgica y analgésica

La posible actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios y antialérgicos fue descrita por Gabor en 1986. Estudios más recientes (GALATI et al., 1994; TORDERA et al., 1994) muestran una relación dosis/actividad de hesperidina-diosmetina (y otros flavonoides) con una influencia sobre el metabolismo del ácido araquidónico y la secreción de histamina. Estos flavonoides inhiben significativamente la secreción de enzimas en los lisosomas (inhibición de lipooxigenasa, cicloxigenasa y fosfolipasa-A2). La inhibición del ácido araquidónico en las células inflamadas puede proporcionar menos sustrato “araquidónico” para los ciclos de la lipooxigenasa y cicloxigenasa, generando una menor cantidad de endoperóxidos, prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos así como, una menor cantidad de ácidos hidropoxi, ácido hidroxieicosatrienoico y leucotrienos. Tales efectos repercuten en la reducción del nivel de histamina que actúa en la primera fase de los procesos inflamatorios.

Otra actividad de los flavonoides relacionada con la disminución del nivel de histamina es su actividad antialérgica (MIDDLETON et al., 1981). Así, la quercetina (flavonol), ha demostrado un efecto inhibitorio dosis/dependiente y un efecto antagónico del calcio en la inhibición de secreción de histamina en la fiebre del heno. Otros flavonoides cítricos (hesperidina, tangeretina y nobiletina) tienen una moderada o baja actividad (MIDDLETON y DRZEWIWCKI, 1982) en este sentido aunque la hesperidina muestra una significativa actividad en el bloqueo de secreción de histamina en mastocitos de rata (MATSUDA, 1991).

7. Actividad antimicrobiana

Una de las propiedades de los flavonoides más relacionada con sus acciones fisiológicas en las plantas es su actividad antifúngica y antiviral. Se ha descrito una importante relación estructura/actividad frente a diferentes tipos de virus (KAUL et al., 1985). La quercetina y hesperidina inhiben de forma importante la actividad infecciosa y/o de replicación de diversos virus (Herpes simple, polio, parainfluenza, respiratorio sincitial).

Parece existir una dependencia directa entre la concentración de quercetina y la disminución de la velocidad infectiva de cada uno de los virus citados anteriormente, en función, de la formación de complejos flavonoides-virus que son los responsables de la disminución de la capacidad de infectar. En suma, la investigación dentro de la actividad antiviral de los flavonoides procedentes de plantas naturales está poco desarrollada y es posible que existan compuestos en la naturaleza que tengan una relación estructural correcta y propiedades farmacocinéticas adecuadas que hagan de los flavonoides, mejores agentes antivirales que las drogas sintéticas actualmente utilizadas.

RADIOPROTECTORES A BASE DE EXTRACTOS DE PLANTAS

Los radioprotectores se han utilizado en radiobiología para denominar a los agentes profilácticos que se deben administrar antes de la exposición a la radiación. Dado que la idea de probar productos químicos para agentes radioprotectores comenzó en la década de los años 1940, varios compuestos químicos y sus análogos se han sometido a pruebas para determinar y cuantificar su capacidad de radioprotección. A pesar de estos esfuerzos, el desarrollo de radioprotectores adecuados para la práctica clínica ha sido difícil y desalentador debido a razones de la toxicidad severa y otros efectos secundarios insoportables en la administración humana. Los estudios pioneros de Patt (1953) y Bacq et al., (1953) demostraron el efecto radioprotector de los aminotioles contra la radiación letal en un gran número de especies animales, demostrando por primera vez que estos compuestos podrían ser utilizados en humanos. Sin embargo, su utilidad clínica se ve reducida por su alta toxicidad a concentraciones fisiológicamente relevantes, su incapacidad para proporcionar protección posterior a la exposición a la RI obligando a estar dentro del organismo de forma previa o preventiva a la exposición, así como a la incapacidad para diferenciar entre células tumorales y células normales cuando ambos tipos se encuentran dentro del campo de radiación (JAGETIA, 2007). Los problemas de toxicidad de los aminotioles han obligado a la búsqueda de contramedidas o sustancias farmacológicas alternativas no tóxicas y altamente efectivas (GIAMBARRESI y WALKER 1991; JAGETIA, et al, 2003a; 2003b; UPADHYAY, et al, 2005; ARORA et al., 2008).

Los radioprotectores herbarios se definen como extractos, extractos fraccionados, constituyentes bioactivos aislados o moléculas moduladoras de la bioactividad derivadas de fuentes vegetales naturales (incluida toda la flora natural marina y terrestre) o genéticamente modificadas o sus combinaciones generadas artificialmente, que protegen contra los efectos nocivos de IR cuando se administra antes de la irradiación (GOEL et al., 2004; PRASAD et al., 2004; ARORA et al., 2005; 2008).

Muchos fitoquímicos tienen la ventaja de una baja toxicidad y son radioprotectores cuando se administran a dosis farmacológicas o de eficacia clínica. Además, los agentes naturales tienen claras ventajas prácticas con respecto a la disponibilidad, la idoneidad para la aplicación oral y la aprobación reglamentaria, entre otros como hemos puesto previamente de manifiesto (ACHEL et al., 2012).

Un enfoque racional de selección de posibles candidatos de plantas para la evaluación radioprotectora es primero auditar las propiedades auténticas existentes de las diversas partes o extractos de la planta. Las características críticas que pueden conducir a la elección de una planta para exploraciones radioprotectoras incluyen propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, de eliminación de radicales libres y antiestrés.

Estas propiedades pueden ofrecer pistas para agentes radioprotectores o radiosensibilizadores (CASTILLO et al., 2000; WEISS y LANDAUER, 2000; CASTILLO et al., 2001; BENAVENTE-GARCIA et al., 2002; DEL BANO et al., 2006; BENAVENTE- GARCIA et al., 2007; THOMAS et al., 2009; ALCARAZ et al., 2009; SANCHEZ-CAMPILLO et al., 2009; ACHEL et al., 2012).

De hecho, varios de estos compuestos naturales con promesa radioprotectora se han aislado y caracterizado a partir de muy diferentes tipos de plantas y de hierbas (ARORA et al., 2005, ALCARAZ, et al., 2009; ACHEL et al., 2012; SORIANO y MONTORO, 2013). La Tabla A3, mostrada a continuación, describe algunos de los principales hallazgos de plantas de uso medicinal con propiedades radioprotectoras prometedoras que hemos recopilado previamente en la literatura científica (ACHEL et al., 2012).

Tabla A3. Plantas y hierbas con diferentes efectos radioprotectores y genoprotectores (adaptado de ACHEL *et al.*, 2012).

Plant	Family	Test system	Route	observation	References
<i>Acanthopanax senticosus</i>	Araliaceae	Mice	i.p	Survival, recovery of spleen colony-forming units (CFU-S), protective effect on endogenous CFU-S and effect on self-renewal of CFU-S	(Miyanomae and E., 1988)
<i>Acorus calamus</i>		Mice	oral	damage in the genomic DNA of peripheral blood leucocytes, bone marrow cells and splenocytes	(Sandeep and Nair, 2010)
<i>Aegle marmelos</i>	Rutaceae	HPBLs, Mice	i.p, oral	radiation sickness, survival, micronuclei, free radical scavenging	(Jagetia and Venkatesh, 2005; Jagetia, 2007)
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae	Mice	i.p	Radiation sickness, GI and BM deaths, free radical scavenging	(Jagetia <i>et al.</i> , 2003)
<i>Allium cepa</i>	Alliaceae	Cell lines		DNA damage	(Chang <i>et al.</i> , 2012)
<i>Allium sativum</i>	Alliaceae	Cell lines		DNA damage	(Chang <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aloe arborescens</i>	Liliaceae	Mice		Free radical scavenging, and reducing alterations in enzyme activity (SOD and glutathione peroxidase activity)	(Arora <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aloe vera</i>	Liliaceae	Mice	i. p	Survival, testicular damage	(Pande <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ambrosia maritima</i>		Rats	p.o	Neurotransmitter disturbances	(Abdel-Hamid and Tarabanko, 2004)
<i>Amaranthus paniculatus</i>	Amaranthaceae	Mice	p.o, oral	Survival, CFU, spleen weight, lipid peroxidation, GSH	(Yadav, 2004,)
<i>Angelica sinensis</i>	Apiaceae	Mice	oral	peripheral leucocyte and lymphocyte counts, micronuclei frequency of PCE in bone marrow, transformation rates of peripheral lymphocyte, SOD and MDA of liver cells	(Sun <i>et al.</i> , 2007)
<i>Aphanamixis polystachya</i>	Meliaceae	Mice	i.p	Chromosomal aberrations, aberrant cells	(Jagetia and Venkatesha,

					2006;Jagetia, 2007)
<i>Aparagus racemosus</i>	Liliaceae	rat liver/brain mitochondria		lipid peroxidation, protein oxidation and depletion of thiols	(Kamat and Venkatachalam, 2004)
<i>Archangelica officinalis</i>	Umbelliferae	mice		survival rate	(Narimanov <i>et al.</i> , 1991)
<i>Centella asiatica</i>	Umbelliferae	Rats, Mice	p.o oral	Survival , weight loss	(Sharma and Sharma, 2002)
<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	Mice	i.p	Clastogenic effects, MnPCEs, MnNCEs	(Hosseinimehr <i>et al.</i> , 2003;Benavente-Garcia <i>et al.</i> , 2007)
<i>Crataegus microphylla</i>	Rosaceae	Mice, HPBLs	i.p	Micronuclei, MnPCEs	(Yamini and Gopal, 2010)
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rats	oral	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in urine. The lipid profile and antioxidant status, as well as levels of transaminases, interleukin-6 (IL-6), and tumour necrosis factor α (TNF α)	(Inano and Onoda, 2002;Nada <i>et al.</i> , 2012)
<i>Emblica officinalis</i>	Euphorbiaceae	Mice	p.o	Survival, weight loss	(Singh <i>et al.</i> , 2005)
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	Rat	i.v	Eye lens total (enzymatic plus non-enzymatic) superoxide scavenger activity (TSSA), non-enzymatic superoxide scavenger activity (NSSA), glutathione reductase (GRD), and glutathione-S-transferase (GST)	(Okumus <i>et al.</i> , 2011)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fabaceae	plasmid pBR322 DNA, HPBLs,	i.p	Chromosomal aberrations in in plasmid DNA, lymphocytes and BM, Radical scavenging	(Gandhi <i>et al.</i> , 2004;Arora <i>et al.</i> , 2005)

		Mice			
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Elaegnaceae	Rats, mice	i.p	Survival, ACTH, CFU, Micronuclei, spleen Colony forming units (CFU) and haematological parameters	(Goel <i>et al.</i> , 2002)
<i>Lycium chinense</i>	Solanaceae	Mice	i.p	bone marrow death, CFUs	(Hsu <i>et al.</i> , 1999)
<i>Mentha arvensis</i>	Lamiaceae	Mice	i.p	Radiation sickness, GI and BM deaths	(Baliga and Rao, 2010)
<i>Mentha piperita</i>		Mice	p.o	Radiosensitive organs; testis, gastrointestinal and hemopoetic system	(Baliga and Rao, 2010)
<i>Moringa olifera</i>	Moringaceae	Mice	i.p	Bone marrow protection by scoring aberrations in metaphase chromosomes and micronucleus induction in polychromatic erythrocytes and normochromatic erythrocytes	(Rao <i>et al.</i> , 2001)
<i>Myristica fragrans</i>	myristicaceaea	Mice	p.o	Survival hepatic GSH and testicular LPO	(Sharma and Kumar, 2007)
<i>Osmium sanctum</i>	Lamiaceae	Mice	i.p	Survival, CFU, lipid peroxidation, GSH, chromosomal damage	(Devi and Ganasoundari, 1995)
<i>Olea europaea</i>	Oleaceae	Mice	i.p	micronucleus test for anticlastogenic activity and Micronucleated polychromatic erythrocytes (MnPCEs) in bone marrow of mouse	(Castillo <i>et al.</i> , 2001; Benavente-Garcia <i>et al.</i> , 2002)
<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	Mice	i.p	Jejunal crypt survival, endogenous spleen colony formation and apoptosis in Jejunal crypt cells	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
<i>Phyllanthus amarus</i>	Euphorbiaceae	rat liver mitochondria and pBR322 plasmid DNA	i.p	lipid peroxidation and protein oxidation in mitochondria and DNA strand breaks in pBR322 plasmid DNA	(Londhe <i>et al.</i> , 2009)

<i>Podophyllum hexandrum</i>	Berberidaceae	Mice		Survival	(Goel <i>et al.</i> , 1998)
<i>Spinacia oleracea</i>	Amaranthaceae	Mice	oral	lipid peroxidation (LPO) product and tissue levels of glutathione	(Bhatia and Jain, 2004)
<i>Syzigium cumini</i>	Myrtaceae	Mice, HPBLs	i.p	Micronuclei, radiation sickness, GI and BM deaths	(Jagetia <i>et al.</i> , 2003)
<i>Rosemarinus officinalis</i>	Labiatae	Mice, HPBLs	oral	micronucleus test, cutaneous alterations caused	(Sanchez-Campillo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Rubia cordifolia</i>	Rubiaceae	Mice	i.p	Survival, hemopoietic cell protection and micronucleus assay, lipid peroxidation measured by the inhibition of TBARS.	(Tripathi and Singh, 2007)
<i>Terminalia chebula</i>	Combretaceae	pBR322 plasmid DNA, Mice, HPBLs	i.p	Chromosome/DNA aberration, peroxidation of membrane lipids	(Gandhi and Nair, 2005)
<i>Tinospora cordifolia</i>	Menispermaceae	Mice	i.p	whole body survival, spleen colony forming units (CFU), hematological parameters, cell cycle progression, and micronuclei induction	(Goel <i>et al.</i> , 2004)
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	HPBLs	<i>In vitro</i>	Micronucleus test for anticlastogenic activity with the cytokinesis-blocked.	(Castillo <i>et al.</i> , 2001)
<i>Zingiber officinalis</i>	Zingiberaceae	Mice	i.p	Radiation sickness, mortality, GSH, LPO	(Jagetia <i>et al.</i> , 2003)

GSH: glutathione; GST: glutathione-s-transferase; SOD: superoxide dismutase; GI: gastro intestinal; BM: bone marrow; Human peripheral blood lymphocytes; DPPH: diphenyl picryl hydrazyl radical; LPO: lipid peroxidation; MnPCEs: micronucleated polychromatic erythrocytes; MnNCEs: micronucleated normochromatic erythrocytes; i.p: interperitoneal; BM: bone marrow; CFU colony formig units; TBARS: thiobarbituric acid reactive substance

En este trabajo, pretendemos utilizar algunas sustancias extraídas directamente de diferentes plantas cuya estructura química les dota “a priori” de un gran poder antioxidante y, por tanto, con una gran capacidad “eliminadora” de radicales libres que les permitiría disminuir el efecto genotóxico y citotóxico inducido por la radiación ionizante; todo ello, con el objetivo de determinar la estructura química más protectora frente al daño inducido por dicha radiación, y en su caso, explicar las diferencias que pueden cuantificarse entre ellas con la pretensión de sugerir los mecanismos protectores que pudieran explicar las diferencias entre sus capacidades genoprotectoras y radioprotectoras.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

En este trabajo nos proponemos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Determinar la existencia de un posible **efecto protector antimutagénico** de diferentes sustancias antioxidantes frente al daño **genotóxico** inducido por los rayos X mediante dos técnicas de citogenética: el ensayo de micronúcleros "*in vitro*" sobre linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético y el ensayo de micronúcleos "*in vivo*" en eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón.
2. Determinar la existencia de un posible **efecto radioprotector** de diferentes sustancias antioxidantes frente al daño **citotóxico** inducido por la radiación ionizante mediante el ensayo del MTT en células normales y tumorales de próstata y en células de melanoma metastásico.
3. Describir un posible **efecto paradójico radiosensibilizante** del ácido carnósico y el ácido rosmarínico sobre las células de melanoma y su posible mecanismo de acción; lo que podría ofrecer una nueva estrategia de tratamiento en diferentes tipos de cáncer que son tradicionalmente considerados resistentes a la radioterapia.

III. Material y método.

III. MATERIAL Y MÉTODO.

MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre se han obtenido de voluntarios sin enfermedad conocida y por ello, considerados supuestamente sanos. Las muestras de sangre se recogieron en tubos cónicos estériles VENOSAFE™ (Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica) preparados al vacío que contenían heparina (Heparin sodium 5%; Lab Rovi, Madrid). Los donantes eran no fumadores, no padecían enfermedades conocidas y no presentaban antecedentes de exposición a agentes clastogénicos. Todo voluntario expresó su consentimiento informado para el uso de su muestra sanguínea en esta investigación. Los donantes comprometidos se corresponden con dos mujeres de 18 y 20 años. Las muestras de sangre fueron extraídas por la mañanas del día de la experimentación y utilizada inmediatamente para el ensayo de micronúcleos (MN) siguiendo el protocolo propuesto.

Figura M1. Obtención de las muestras sanguíneas.



ANIMALES

En este estudio hemos utilizado ratones Swiss machos entre 9 y 11 semanas de edad y aproximadamente 20-25 g de peso al inicio del estudio. Los animales se mantuvieron bajo idénticas condiciones ambientales de temperatura, luz y humedad en todo momento. Se les proporcionó alimento y agua “*ad libitum*”. Todos los animales se obtuvieron y cuidaron durante el estudio en el Servicio de Apoyo a la Experimentación (SAI) de la Universidad de Murcia (Licencia REGAES300305440012). En todo momento se han seguido las recomendaciones éticas internacionales sobre el uso y manipulación de animales de laboratorio para la investigación biomédica (*Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations*).



Figura M2. Animales experimentales utilizados.

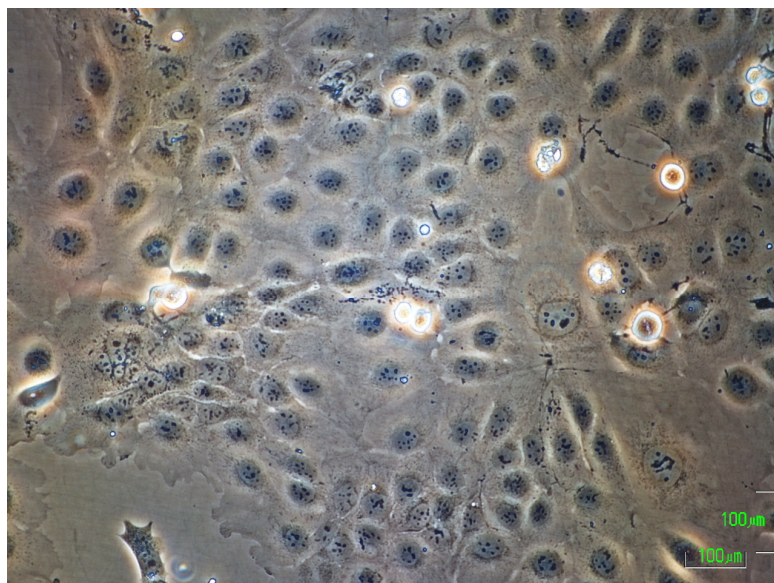
LÍNEAS CELULARES

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

1. -Línea de células epiteliales normales de próstata humana PNT2 (HPACC, Reino Unido).

Línea celular epitelial de próstata humana de células no tumorales establecida a partir del tejido de próstata de un hombre de 33 años, e inmortalizada mediante la transfección de un plásmido con el genoma del virus SV40 con un origen de replicación defectivo. La firma comercial suministradora es HPACC (Salisbury, Reino Unido). Para el cultivo de esta línea celular hemos utilizado el medio RPMI 1640, tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con SBF (10%), glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y una atmósfera con el 5% de CO₂.

Figura M3. Células de la línea PNT2 en cultivo (Contraste de fases, 100X)



-Línea celular de carcinoma de próstata de ratón transgénico TRAMPC1 (ATCC, EEUU)

Esta línea celular de carcinoma de próstata murino fue derivada en 1996 de un tumor primario desarrollado en la cepa transgénica TRAMP. Estos ratones procedentes de la cepa C57BL/6 fueron diseñados para dirigir la expresión específica en el epitelio prostático del antígeno T grande del virus SV40. Todos los machos TRAMP desarrollan, de forma espontánea y uniforme tras la pubertad, todo el espectro tumoral de la próstata, que asemeja completamente la patogénesis del cáncer de próstata en humanos. La firma comercial suministradora es ATCC (EEUU).

Para el cultivo de la línea celular TRAMPC1 hemos utilizado el medio de DMEM con 4,5 gr/l de glucosa, tamponado a pH de 7,2-7,4 y suplementado con suero bovino fetal (5%) y Nu-Serum (5%), glutamina (4 mM), deshidrosterona (10 nM), insulina (10 mgr/ml), penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 μg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37 °C, con una humedad relativa del 90-95% y una atmósfera con el 8% de CO₂.

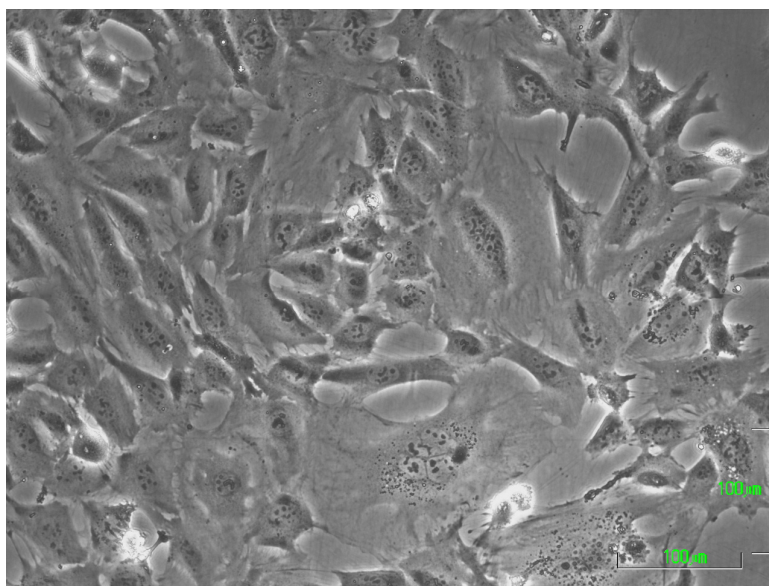


Figura M4. Células de la línea TRAMPC1 en cultivo (Contraste de fases, 100X)

-Línea celular de melanoma metastásico murino B16F10.

Es una variante metastásica de la línea original B16, establecida a partir del melanoma que surgió de forma espontánea en 1954 en la piel de la oreja de un ratón de la cepa no híbrida C57BL/6 en los laboratorios del National Institutes of Health (NIH) de los E.E.U.U. y proporcionada por el Dr. V. Hearning (NIH, Bethesda MD). Actualmente, la firma depositaria de esta línea celular es Naval Biosciences Laboratory, School of Public Health, University of California (Berkeley, California, E.E.U.U.). Se ha cultivado con medio de EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM) de Sigma-Aldrich (St. Louis: E.E.U.U.), con L-glutamina y 4,5 g/l de glucosa, sin bicarbonato sódico, tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con un 10% de SBF Sigma-Aldrich (St. Louis: E.E.U.U.), 4 mM de L-glutamina, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y una atmósfera con el 7,5% de CO₂. Adopta una morfología fusocelular con frecuentes prolongaciones dendríticas, que cambia a poligonal al aumentar la densidad del cultivo. Los medios de cultivo para el mantenimiento celular, se usaron con el marcador colorimétrico de pH (rojo fenol) y se han conservado en frascos de 75 cm², dentro de las estufas, con las condiciones de temperatura, humedad y concentración de CO₂ adecuados.

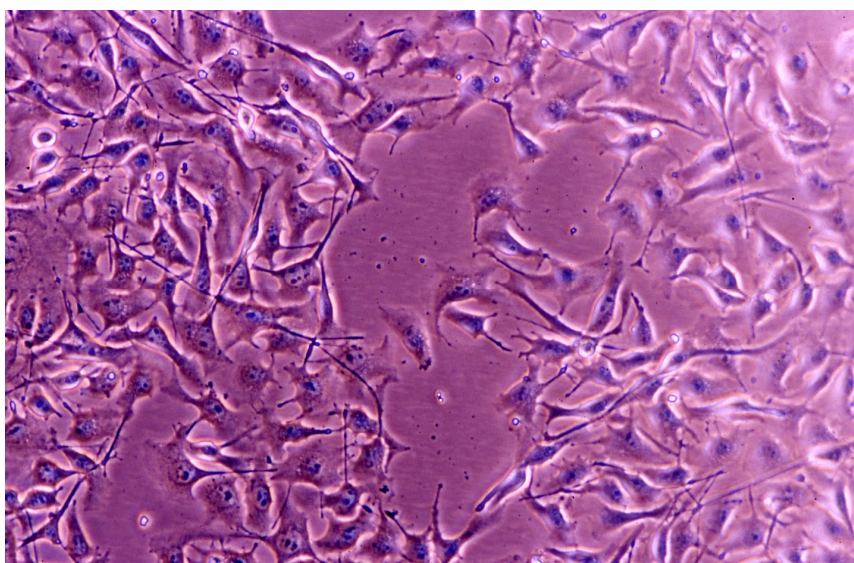


Figura M5. Aspecto morfológico de la células de la linea B16F10 cultivadas durante 72 horas (200X)

EQUIPOS UTILIZADOS**1. Cabina de flujo laminar de presión positiva**

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



Figura M6. Cabina de flujo laminar usada para la manipulación y cultivos de linfocitos de sangre.

2. Equipo Irradiador de Rayos X

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

Figura M7. Equipo de rayos X utilizado.



3. Electrómetro

Para la determinación de la dosis de radiación en tiempo real dentro de la cabina de irradiación, se ha utilizado un equipo UNIDOSE E equipado con una cámara sonda/ionización TW 30010-1 (PTW Freiburg, Alemania). Esta sonda ultra sensible posibilita la medición de dosis administradas en nuestras muestras dentro del irradiador de rayos X que se

confirmaron posteriormente con dosimetría de termoluminiscencia.



Figura M8. Electrómetro con sonda utilizado en este estudio.

4. Equipo de HPLC

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



Figura M9. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

5. Espectrofotómetro.

Modelo Multiskan MCC/340 (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia), que realiza medidas de absorbancia en placas múltiples de 96 pocillos de diferentes modos (absorbancia, longitudes de onda duales o múltiples, cinética o a intervalos de tiempo),

que dispone de los siguientes filtros: 340, 380, 405, 520, 550, 560 y 690 nm. Equipo situado en Servicio de Cultivo de Tejidos perteneciente al SAI, de la Universidad de Murcia.



Figura M10. Espectrofotómetro MULTISKAN MCC/340.

6. Microscopio óptico

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



Figura M11. Microscopio OLYMPUS BX40 (vistas lateral y frontal)



Figura M12. Análisis morfológico utilizando análisis de imágenes para la identificación de células binucleadas (BN) y binucleadas con micronucleados (MNB).

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



Link	Name	Type	Info
	ImageCollection_0000000908_2012-05-30 13_05_04.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000902_2012-05-30 12_59_43.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000903_2012-05-30 12_56_58.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000904_2012-05-30 12_56_25.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000905_2012-05-30 14_09_04.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000906_2012-05-30 14_08_49.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000907_2012-05-30 13_34_40.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000908_2012-05-30 13_34_47.scn	LeicaSCN	
	ImageCollection_0000000910_2012-05-30 14_31_24.scn	LeicaSCN	

Figura M13. Preparaciones de genotoxicidad para microscopio virtual - digital con base de datos on line.

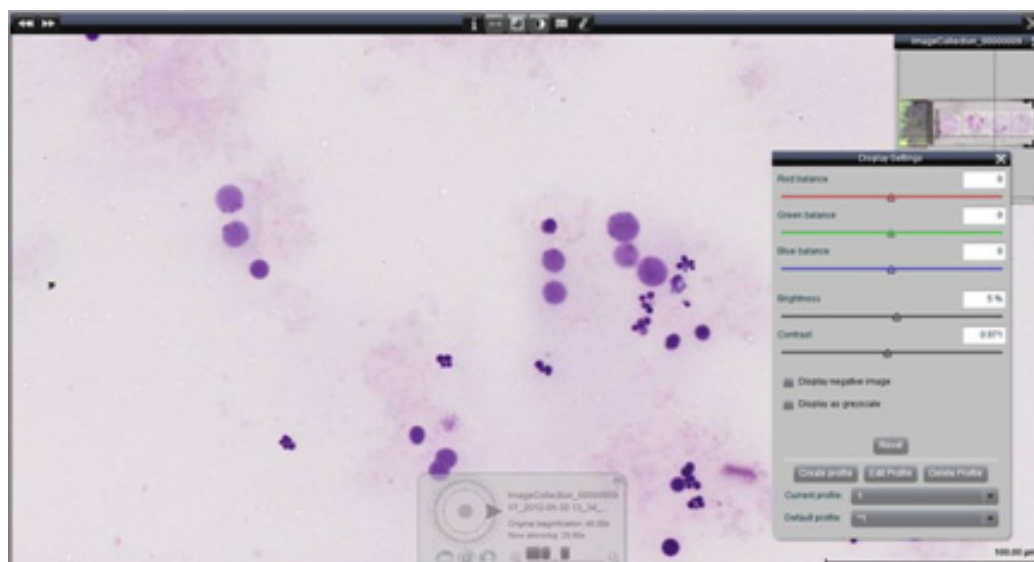


Figura M14. Vista aumentada de un campo en el microscopio virtual digital para su estudio genotóxico.

7. Dosímetros de Termoluminiscencia (TLDs)

La determinación de la dosis de radiación ionizante administrada a las muestras de sangre estudiadas es un paso fundamental para establecer el efecto biológico buscado en este estudio y además permite la realización de la curva dosis-respuesta. Los

dosímetros de termoluminiscencia se usaron para comprobar las dosis absorbidas administradas a las muestras estudiadas. Los TLDs han sido utilizados extensamente durante varias décadas y están aceptados como la técnica más apropiada para realizar mediciones de dosis de radiación ionizante. Los TLDs son cristales de Fluoruro de Litio sensibles a la radiación tratados con Mg, Cu, P (GR-200r, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China) fueron colocados por pares en bolsas de plástico transparentes de 8x16 mm que fueron selladas y protegidas térmicamente del exterior. Las bolsas fueron codificadas y etiquetadas con tinta indeleble. El pequeño tamaño de los dosímetros facilita su proximidad a las muestras de sangre en el equipo de irradiación. Los TLDs tienen forma redondeada (pastilla) de 4-5 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Un total de 50 dosímetros se colocaron por pares en 24 bolsas individuales. Una de estas bolsas contiene dosímetros que no fueron expuestos a radiación ionizante y se utilizaron como controles.



Figura M15. Dosímetros de termoluminiscencia

Los dosímetros fueron procesados en un lector automático Harshaw 5500 TDL con un sistema programable de calefacción mediante inyección de nitrógeno caliente, a través de una programación tiempo-temperatura adaptada al perfil de los diferentes materiales termoluminiscentes. Basado en la experiencia de CIEMAT, para los cristales (LiF: Mg, Cu, P) utilizados, fue definida una lectura cíclica de los distintos temas del detector a una velocidad lineal de calefacción de 15 °C/s desde 50 °C hasta 275 °C. La temperatura fue mantenida a esta temperatura durante 12,7 segundos para un total de periodo de lectura de 26,7 segundos. Este ciclo asegura la completa lectura del detector hasta dosis altas como 1 Gy asegurando su reutilización posterior. Los dosímetros de termoluminiscencia fueron proporcionados (CIEMAT) del Ministerio de Industria y Energía quien también monitorizó las lecturas de los TLDs para determinar la dosis de radiación en este trabajo. La evaluación de las dosis está basada en los análisis simples de curvas emitidas en los programas de ordenador desarrolladas por el CIEMAT. Unas dosis de 50 Gy y 2 Gy se establecieron como las apropiadas para los procedimientos experimentales ensayados.

REACTIVOS QUÍMICOS Y EXTRACTOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

El ácido zoledrónico (Z) (Zometa®) se ha obtenido de Novartis pharmaceuticals (Barcelona, Spain) y se han administrado en concentraciones de 5 y 100%. Los medios RPMI 1640 y Ham's F10, así como la Phytohemagglutinin A (PHA), cytochalasina B, estreptomycina, penicillina, solución salina fosfato-buffer (PBS), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide (MTT), Vitamina E (δ-tocopherol), suero de albúmina bovina (BSA fraction V), 6-n-propyl-2-thiouracilo (PTU) y Vitamina C (Ascorbic Acid) se obtuvieron de Sigma-Aldrich chemicals SA (Madrid, Spain). El suero bovino fetal (FBS) se obtuvo de Gibco (USA); el ácido acético glacial y el etanol de Scharlab SL (Madrid, Spain). El Methanol and cloruro potásico se obtuvieron de Panreac (Madrid, Spain); la heparina sódica al 5 % de Rovi Pharmaceutical Laboratories (Madrid, Spain). El ácido Rosmarínico (95% AR), Rutina y Quercetina se han obtenido de Extrasynthese (Extrasynthèse S.A., Genay, France). El Dimethyl sulfoxide (DMSO) de Laboratorios Merck (Merck, Darmstadt, Germany). La Amifostina (WR-2721) o Ethyol® de Schering (Schering-Plough S.A., Madrid). El Extracto de Té (TE), el Carnosol (COL), ácido Carnosico (CARN), Extracto Cítrico soluble (CE) Apigenina y P90 se han obtenido de Furfural Español S.A. (Nutrafur®, Alcantarilla, Murcia).

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

MTT

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

Dimetilsulfóxido (DMSO)

DMSO (MW 78, 99.5% pureza) se mantuvo a temperatura ambiente. El dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, USA) es una sustancia de amplio uso en cultivos celulares y que se ha utilizado como disolvente de numerosos flavonoides. Por haberse utilizado como disolvente y por sus características estructurales y antioxidantes ha debido de considerarse como un grupo de animales independientes. Su estructura química es la siguiente: C₂H₆OS.

El DMSO se ha utilizado al 5 %: 50 g de DMSO se han disuelto en 1000 ml de H₂O destilada y ha sido almacenado a 4 °C hasta su utilización. Su inclusión dentro de los grupos estudiados es doble: por un lado, es necesario conocer los posibles efectos sobre el procedimiento utilizado ya que se ha incorporado como agente indispensable para la solubilización de algunos flavonoides; por otro lado, su estructura presenta puentes disulfuro que clásicamente se aceptan como protectores frente a la radiación ionizante. Además, es un agente antioxidante que obliga a la discriminación de sus posibles efectos, ya que pueden solaparse con el de los flavonoides que vehiculiza.

Albúmina Bovina.

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

Ácido Carnósico.

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

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

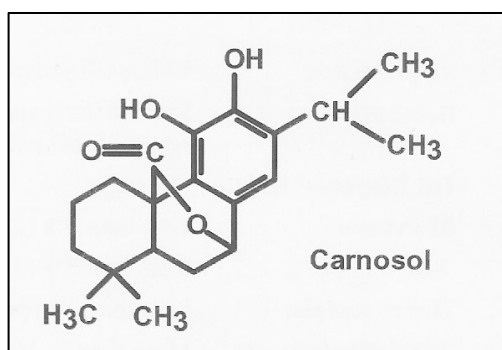


Figura M16. Carnosol.

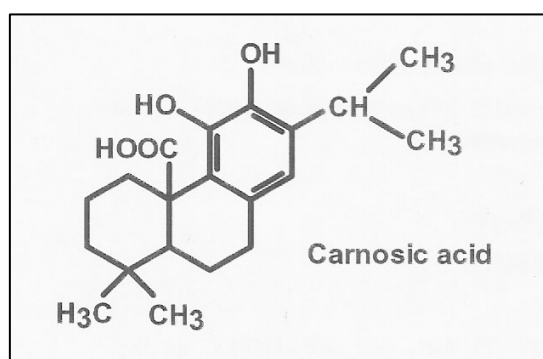


Figura M17: Ácido carnósico

Ácido Rosmarínico (AR)

Ácido Rosmarínico (C₁₈H₁₆O₈, peso molecular: 360.31 g/mol) es un ester del ácido caféico y 3, 4-dihydroxyphenyl ácido láctico. Está presente en diferentes especies de la familia Boraginaceae, especialmente en *R. officinalis* L. Es un polifenol con conocidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias con la capacidad de neutralizar los aniones superóxidos e inhibir la actividad de la peroxidación lipídica. Su actividad sobre la inhibición de la oxidación de diferentes sustancias similares al ácido linoleico sugiere que su liposolubilidad es mayor a la del ácido ascórbico, frecuentemente utilizado como un antioxidante soluble en agua (ALCARAZ et al., 2009). En nuestro estudio, el AR se ha disuelto en DMSO a una concentración de 1 mg/ml.

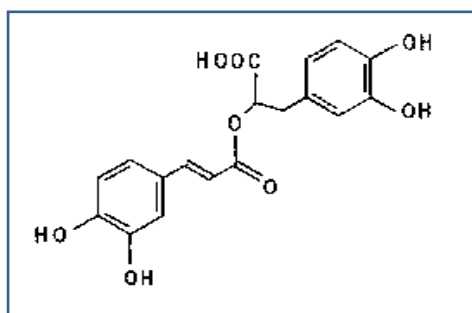


Figura M18. Ácido Rosmarínico.

Preparación del ácido Rosmarínico para su administración a los cultivos celulares

Una solución básica de 2 mM AR se prepare disolviendo 0,01 g de AR en 13,88 ml de medio precalentado sin rojo fenol ni factores de crecimiento suplementado que se esterilizó mediante filtración con una membrana de 0,22 micras. Así, 27 ml medio suplementado con factores de crecimiento y fenol se mezclaron con 620 μ l de medium con el mismo volumen de un stock de 2mM para obtener una solución 50 μ M solution (1/50 dilution). Una dilución doble de esta solución se preparó asépticamente mezclando volúmenes iguales de medio de crecimiento suplementado con rojo sin fenol y solución 50 μ M para producir una solución final de AR 25 μ M. El volumen de cada dilución se preparó en relación con el volumen total requerido para ejecutar todo el experimento.

Para la actividad anti-mutagénica in vitro, el AR también se disolvió en solución salina fisiológica para obtener una concentración final de 25 μ M en 2 ml de sangre humana completa. El experimento de control solo recibió la solución 25 μ M de AR. Para los cultivos celulares se utilizaron 25 y 50 μ M administradas antes de la exposición a radiación ionizante e incubación de las células. se incubaron.

Apigenina (API)

La apigenina (Furfural Español S.A., Alcantarilla, Murcia) fue ensayada disuelta en DMSO a razón de 0,5 mg/ml debido a su propiedad de ser insoluble en agua pero también se ha determinado que esta sustancia, perteneciente a la familia de las flavonas, se obtiene a partir de un extracto de pomelo al que se le puede realizar una modificación sintética que consiste en la adición de potasio constituyendo así lo que, actualmente, conocemos como apigenina potásica, cuya estructura química es de $C_{15}H_9O_5K$ y esta adición de potasio le confiere propiedades de hidrosolubilidad permitiéndonos ensayarla también añadiéndola a los medios de cultivo pero, en este caso, disuelta en agua en una proporción de 0,5 mg de apigenina potásica por cada ml de agua.

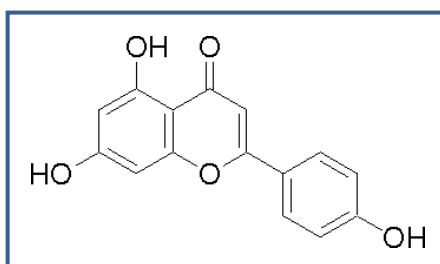


Figura M19. Apigenina

Preparación de apigenina para la adición a cultivos celulares

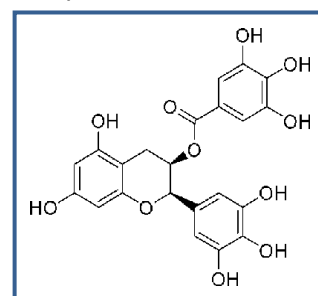
Para la adición a cultivos celulares, se preparó una solución madre de apigenina 2 mM disolviendo 0,01 g de apigenina en 13,88 ml de medio de crecimiento suplementado exento de rojo de fenol precalentado y se pasó a través de membranas de filtro para esterilizar. Debido a problemas de obstrucción de poros, se emplearon dos filtros; primero se pasó a través de un filtro de membrana de 0,45 micras y posteriormente a través de un filtro de 0,22 micras. Filtrar directamente con el filtro de 0,22 μm no fue posible. Se introdujeron 27 ml de medio de crecimiento suplementado sin rojo fenol en un matraz estéril bajo condiciones asépticas, 620 μl de este medio se reemplazaron con un volumen igual de la solución madre 2 mM, produciendo una solución 50 μM de apigenina. Se preparó una dilución 1/2 de esta solución 50 μM mezclando 9 ml con 9 ml de medio de crecimiento suplementado sin rojo fenol en un matraz estéril que produce 18 ml de una solución de apigenina 25 μM . Por lo tanto, se prepararon soluciones de trabajo de apigenina de 25 y 50 μM .

Para estudios en animales, la API se administró disuelta en agua potable a una concentración del 0,2% durante 5 días antes de la irradiación en el grupo de animales tratados previamente a la irradiación. Esto implica una ingesta aproximada de 25 mg / animal. Después de 5 días de comenzar el tratamiento con API, los animales de este grupo se expusieron a 500 mGy de rayos X. Los grupos de animales tratados después de la irradiación se expusieron a un total de 500 mGy de rayos X antes de administrarlos con API 6 horas después de recibir la radiación. Así, 180 mg de la sustancia se administró mediante una inyección de dosis única de 0,6 ml de una solución de API de 300 mg / ml directamente en la luz gástrica de cada animal 6 horas después de la exposición a la irradiación X con el animal anestesiado ligeramente con éter etílico.

Extracto de té verde (TE)

El extracto de té verde contiene catequinas, una clase de polifenoles de bajo peso molecular que consisten principalmente en monómeros de flavan-3-ol, conocidos por sus propiedades fisiológicas y farmacológicas. Las catequinas están presentes principalmente como catequina, galato de epigallocatequina, galato de epicatequina y galato de galocatequina. El extracto utilizado para este estudio consistió en un 80% de galocatequinas, siendo el principal activo el epigallocatequina-3-O-gallato, cuya estructura química es $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$; el extracto también contiene 0,3% de cafeína, entre otras sustancias. Para uso en cultivo celular, el extracto se disolvió en agua a 0,5 mg/ml de agua y se esterilizó por filtración a través de una membrana de nailon de 0,45 μm .

Figure M20. Extracto de té verde



Para estudios en animales, el TE se administró disuelto en agua potable a una concentración del 0,2% durante 5 días antes de la irradiación en el grupo de animales tratados previamente a la irradiación. Esto implica una ingesta aproximada de 25 mg / animal. Después de 5 días de comenzar el tratamiento con TE, los animales de este grupo se expusieron a 500 mGy de rayos X. Los grupos de animales tratados después de la irradiación se expusieron con rayos X se les administraron el TE 6 horas después de recibir la radiación. A estos animales se les administró 180 mg de la sustancia mediante una inyección de dosis única de 0,6 ml de 300 mg / ml de solución de TE directamente en la luz gástrica de cada animal 6 h después de la exposición a irradiación X con el animal anestesiado ligeramente con éter etílico.

Amifostina o Ethyol®

La amifostina, Ethyol® o WR-2721 (Schering-Plough S.A., Madrid), es un agente citoprotector de tiofosfato orgánico por su función contra la radiación ionizante cuando se administra antes de la radioterapia en el tratamiento de diversas formas de cáncer. Es un análogo de la-mercaptoetilamina (MEA); la amifostina se conoce químicamente como S-2 - [(3-aminopropil) amino] etanotiol dihidrogenofosfato (éster). Es un polvo cristalino blanco soluble en agua. Tiene una fórmula empírica de $C_5H_{15}N_2O_3PS$, con un peso molecular de 214,2. El compuesto se usó según las recomendaciones del fabricante, es decir, se disolvieron 375 mg en 7,3 ml de NaCl al 0,9%. Para fines de cultivo celular, la solución resultante se esterilizó pasando a través de una membrana de nylon de 0,45 micras. Para uso en protocolos de hemocultivo, se añadieron 50 μ l de la solución esterilizada de 2 ml de sangre humana cultivada para obtener una concentración final de 1 mg / ml del compuesto en medio de cultivo. Las muestras de sangre de control no recibieron irradiación. Otra cohorte de muestras de sangre que recibieron el tratamiento se expusieron a 2 Gy de rayos X y constituyeron el grupo de tratamiento previo a la irradiación. Finalmente, otro lote de muestras de sangre se expuso a los 2 Gys de rayos X y la muestra de amifostina se añadió dentro de los 15 minutos después de la exposición a la radiación ionizante y se mezcló completamente antes de la incubación celular.

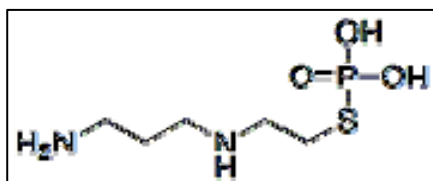


Figura M21. Amifostina

Ácido Zoledrónico

El ácido Zoledronico (Zometa® Novartis Farmacéutica, Barcelona, España) pertenece al grupo de bisfosfonatos de tercera generación y actúa específicamente en el hueso. Es un inhibidor de la resorción ósea osteoclástica. Se compone de un vial en polvo y una ampolla disolvente. La dosis recomendada en hipercalcemia es de 4 mg de ácido Zoledrónico solución para perfusión, reconstituido y posteriormente diluido (diluido con 50 ml de cloruro sódico al 0,9 % p/V o solución de glucosa al 5 % p/V), administrados como perfusión intravenosa única durante 15 minutos).

Propiltiouracilo (PTU)

El 6n-2n-propiltiouracilo (PTU) (Sigma, Madrid) se ha utilizado tras disolver 20 mg de PTU/ml de disolución 0,15 N de NaOH, ajustando su pH a 8,5-9 mediante ClH 1N. De la disolución resultante, se extraen 25 ml que se diluyen en 225 ml de agua y se complementa con sacarosa al 1%. Esta solución se prepara a diario durante la realización de este grupo de trabajo. El PTU se ha administrado disuelto en el agua de bebida a una concentración del 0,2% durante 5 días previos a la irradiación en el grupo de animales tratados preirradiación. En el grupo de animales tratados postirradiados, estos van a ser sometidos a irradiación e, inmediatamente después de la irradiación, se les va a administrar la sustancia "ad libitum".

Procianidina (P90)

Los extractos de semilla de uva, ricos en procianidinas (polímeros de la estructura flavan-3-ol), se han obtenido a partir de semillas de 4 diferentes variedades (cultivares) de *Vitis vinifera*, seleccionadas todas ellas de diferentes zonas de la Comunidad de Murcia: "Macabeo" y "Airén" como variedades de uva blanca; además de "Tempranillo" y "Monastrel" como variedades de uva tinta. Las uvas fueron recolectadas en su estado óptimo de maduración enológica. Las semillas fueron separadas manualmente hasta obtener un peso aproximado de 1 kg de semillas de cada cultivar. Estas semillas se secaron en una estufa de aire forzado a unos 35 °C durante 24-48 horas y se almacenaron a -30 °C hasta su uso y análisis.

Extracción y purificación de compuestos tipo flavan-3-ol (procianidinas) a partir de semillas de uva:

Los compuestos polifenólicos fueron extraídos de las semillas de uva molidas mediante una mezcla agua-metanol (25:75, v/v) en una proporción del 10 % peso/volumen, en atmósfera de nitrógeno durante una hora y a temperatura ambiente. El medio de extracción se filtró a través de un soporte filtrante de polipropileno y la solución de extracción se evaporó en un rotavapor a vacío a una temperatura máxima de 40 °C hasta sequedad, obteniendo un sólido de color marrón-rojizo. El sólido obtenido puede considerarse un extracto crudo de polifenoles y se denominó P55. El sólido llamado P55 se lavó inicialmente con n-hexano con objeto de eliminar todas las sustancias liposolubles de naturaleza no polifenólica características de este material vegetal. El sólido lavado se secó a vacío hasta la completa eliminación del disolvente utilizado. Este sólido lavado se suspendió en agua con objeto de separar los compuestos polifenólicos de mayor peso molecular insolubles en agua. La suspensión se realizó al 5 % peso/volumen, a temperatura ambiente y durante 6 horas, filtrándose a continuación el material insoluble. Este material se filtró y seco a vacío a una temperatura máxima de 40 °C. El sólido seco obtenido, pulverulento y de color rojo, se denominó P120. La solución acuosa conteniendo los compuestos polifenólicos de menor peso molecular se pasó a través de una columna de Amberlita XAD 2, con objeto de retener dichos compuestos, separándolos del resto de componentes hidrosolubles no polifenólicos del extracto. Se utilizó metanol para la desorción de los polifenoles. El metanol se eliminó por destilación a vacío en

un rotavapor a una temperatura máxima de calefacción de 40 °C, obteniéndose finalmente un sólido seco cristalino de color anaranjado oscuro, al que se denominó P90 y que, se guardó para la realización de los correspondientes ensayos de radioprotección.

Análisis cromatográfico (HPLC) de los extractos de semilla de uva

Los sólidos de los diferentes extractos obtenidos: P55, P120 y P90, se disolvieron en metanol, en una concentración analítica de 3 mg/ml. Las disoluciones fueron filtradas a través de una membrana de nylon de 0,45 micras. El equipo de HPLC utilizado fue un modelo Hewlett-Packard, serie HP 1100, equipado con un detector de diodos. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm) con un tamaño promedio de partícula de 5 micras. La temperatura fue de 30 °C, el flujo de 1 ml/min y la longitud de onda empleada de 280 nm. De los tres que se han obtenido, en este estudio sólo se utiliza el P90.

Se emplearon como fases móviles: (A) ácido acético: agua (10:90) (B) metanol y (C) acetonitrilo. Se utilizó un método de gradiente lineal:

Tiempo (min)	% (A)	% (B)	% (C)
30	90	10	0
45	30	70	0
60	22	78	0
70	0	100	0
75	0	0	100
85	0	0	100
95	90	10	0

Tabla M1. Resultados del análisis cromatográfico del extracto de uva.

El esquema de la página siguiente muestra un cromatograma HPLC característico de un extracto de semillas de uva, correspondiendo concretamente al extracto denominado P90. La distribución relativa (valores cuantificados por normalización de área) de los principales compuestos (numerados del 1 al 11) del extracto.

En el extracto P90, los polímeros $\geq C_4$ (90,92 %) presentan una mayor concentración que en P55. Sin embargo, los monómeros se encuentran en menor proporción, siendo la (+)-catequina (2,11 %) más abundante que la (–)-epicatequina (1,06 %). La distribución de las demás procianidinas mostró ligeras diferencias respecto del extracto P55, siendo los principales los dímeros B4 (0,96 %), B3 (0,71 %), B1 (0,52 %), B2 (0,48 %) y el derivado esterificado con ácido gálico en posición 3 del dímero B1 (0,52 %).

<i>Pico</i>	<i>t_R</i>	<i>Flavan-3-ols</i>	<i>% Valor Relativo P90</i>
G	9,7	Ácido gálico	0,83
1	34,3	B3 (dímero)	0,71
2	37,6	(+)-catequina	2,11
3	40,6	B1 (dímero)	0,52
4	45,4	T2 (trímero)	0,11
5	49,9	B4 (dímero)	0,96
6	54,0	B2 (dímero)	0,48
7	59,1	B2-3'-O-gallato	0,16
8	62,9	(-)-epicatequina	1,06
9	64,4	B1-3-O-gallato	0,52
10	67,4	C1 (trímero)	0,20
11	74,4	Polímeros C ₄ unidades	90,92
Otros	--	Otros dímeros/trímeros flavan-3-ols	

Tabla M2. Tiempo de retención y contenido absoluto por HPLC de los principales flavonoides presentes en el extracto de semillas de uva P90 (ver HPLC adjunto).

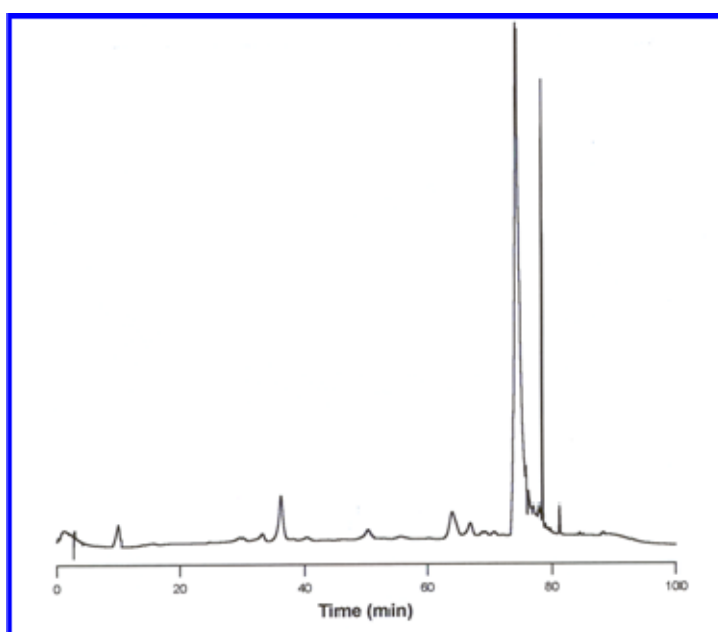


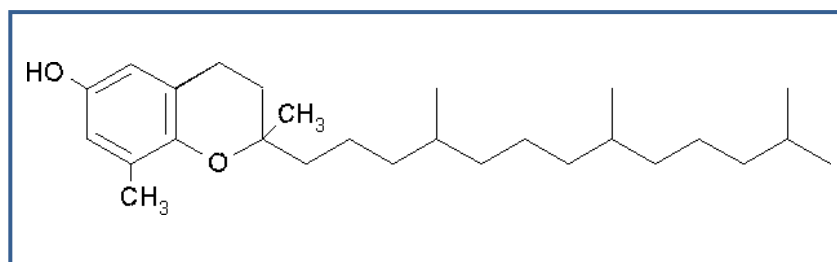
Figura M22. HPLC del extracto de Procianidina

El flavonoide P90 es insoluble en agua, por lo que, se ha disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Madrid) en una relación de 30 mg de flavonoide/0,1 ml de DMSO. De la disolución resultante se obtienen 0,6 ml (180 mg de flavonoide/0,6 ml de DMSO) que es la dosis total administrada a cada uno de los animales. La administración de esta sustancia se ha realizado “ad libitum”. De esta forma, se ha procedido tanto en el grupo de animales tratados preirradiación como en el grupo de animales tratados postirradiación

Vitamina E o δ -tocoferol

La vitamina E o δ -tocoferol (Sigma-Aldrich, Madrid) es una vitamina liposoluble que es almacenada en el tejido graso del organismo y que posee un importante papel antioxidante. Se conocen ocho formas diferentes de vitamina E y cada una posee su propia actividad biológica que es medida por la potencia o uso funcional en el organismo. La forma molecular que hemos utilizado en nuestro estudio y que posee gran actividad antioxidante es la δ -tocoferol cuya estructura química es $C_{27}H_{46}O_2$. Para su estudio, se ha preparado una disolución en DMSO/etanol al 50 % en una proporción de 0,5 mg de δ -tocoferol por cada ml de DMSO/etanol.

Figura M23: Vitamina E o δ -tocoferol



Rutina.

La rutina (Merck, Madrid) es otro flavonoide puro, concretamente un flavonol; la muestra utilizada contiene un mínimo del 90% absoluto del flavonoide específico por HPLC. Su estructura química es $C_{27}H_{30}O_{16}$. Hicimos una disolución de la rutina en DMSO añadiendo 0,5 mg de este compuesto por mililitro de DMSO. Se obtiene por extracción hidroalcohólica de plantas como *saphora japonica*, *dimorfranda* o el vulgarmente conocido como *trigo sarraceno*. La rutina es uno de los flavonoides más utilizados en todo tipo de estudios “in vitro” e “in vivo”, por lo que se considera un patrón de referencia en el estudio de la actividad de los compuestos polifenólicos.

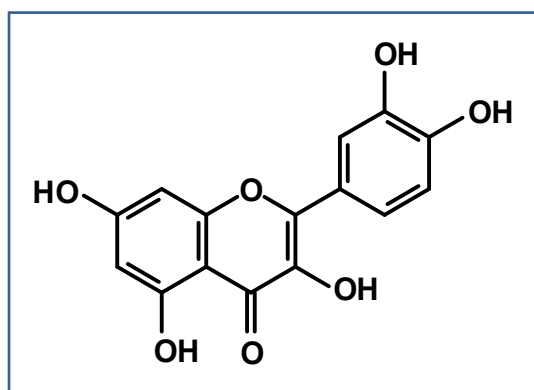


Figura M24. Rutina

Quercetina

La quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-[1-benzopiran]-4-ona o 3',4',3,5,7-pentahidroxi-flavona) es un flavonoide pentahidroxilado tipo flavonol presente en la cebolla y perteneciente a la familia de los flavonoles por poseer un hidroxilo característico en la posición 3 del esqueleto flavonoide. Carece de azúcares en su estructura, por lo que es un

flavonoide “aglicón”. La quercetina se obtiene por hidrólisis ácida con ácido sulfúrico 1N en medio hidroalcohólico del flavonoide anterior, la rutina, que es su derivado glicosilado, concretamente en la posición 3 antes mencionada; es decir, la rutina es el ramnoglucósido de la quercetina.

Para su utilización en este estudio realizamos una disolución de la quercetina en DMSO (1mg/ml).

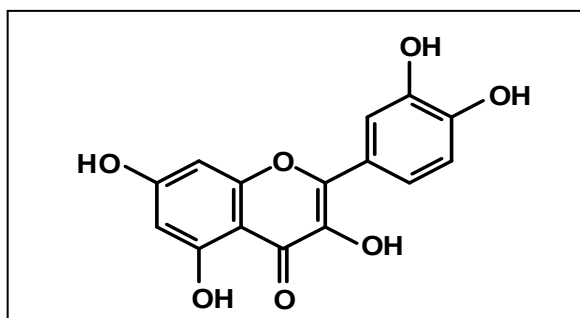


Figura M25. Quercetina

Extracto cítrico soluble (CE)

El extracto cítrico soluble (CE), caracterizado por su elevada concentración de flavononas y flavonas, fue obtenido a partir de frutos inmaduros de varios cultivares característicos de tres especies del género *Citrus* de la Comunidad de Murcia: *Citrus limonia* (limón), *Citrus sinensis* (naranja dulce) y *Citrus aurantium* (naranja amarga). Los frutos inmaduros fueron recolectados directamente de los árboles tras su abscisión natural, durante la fase inicial del desarrollo del fruto. Los frutos recolectados fueron inmediatamente secados a 50 °C hasta una humedad (pérdida por secado) inferior al 8 %, siendo almacenados a temperatura ambiente hasta su uso y análisis.

Extracción y cristalización de compuestos tipo flavonona y flavona a partir de frutos inmaduros de especies cítricas:

Los frutos inmaduros secos de las especies cítricas mencionadas, se molieron para su extracción. La extracción se realizó en una proporción del 5 % peso/volumen, a temperatura ambiente y durante tres horas, empleando como solvente de extracción agua-metanol (20:80, v/v). La suspensión se filtró a través de un filtro con soporte filtrante de polipropileno. La solución polifenólica hidro-alcohólica obtenida se concentró en un rotavapor a vacío, a una temperatura máxima de 55 °C, hasta la eliminación del metanol. La solución acuosa concentrada se enfrió en agitación durante unas 24 horas, produciéndose la cristalización de los compuestos flavonoides extraídos. La suspensión se filtró y el sólido obtenido fue lavado con agua y secado en una estufa de vacío a una temperatura máxima de 55 °C. Se obtuvo un sólido final pulverulento de color beige al que se denominó extracto cítrico y que, se guardó para la realización de los correspondientes ensayos de radioprotección.

Análisis cromatográfico (HPLC) del extracto cítrico:

El extracto cítrico (CE) obtenido, se disolvió en DMSO, en una concentración analítica de 2 mg/ml. La disolución fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0,45 micras. El equipo de HPLC utilizado fue un modelo Hewlett-Packard, serie HP 1100, equipado con un detector de array de diodos. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm) con un tamaño promedio de partícula de 5 micras. La temperatura fue de 30°C, el flujo de 1 ml/min y la longitud de onda empleada de 280 nm para las flavononas y 340 nm para las flavonas. Se emplearon como fases móviles: (A) ácido acético:agua (1:99), (B) metanol y (C) acetonitrilo. Se utilizó un método compuesto de etapas isocráticas y de gradiente lineal:

Ti	% (A)	% (B)	% (C)
0	70	23	7
40	70	23	7
55	55	25	20
65	55	25	20
75	70	23	7

Tabla M3. Resultados del análisis cromatográfico del CE.

El contenido absoluto de cada uno de los principales flavonoides presentes en el CE se detalla en la tabla siguiente. Las flavononas naringina, hesperidina y neohesperidina, son los flavonoides más abundantes; no obstante, la presencia de otras flavononas como la eriocitrina y neoeriocitrina y de ciertas concentraciones de flavonas, resulta muy significativa en referencia a su potencial actividad biológica. Resulta importante resaltar la presencia del glicósido de la flavona luteolina, los dos de la flavona diosmetina (diosmina y neodiosmin), así como del neohesperidósido de la flavona apigenina, la rhoifolin.

Polifenoles	Tiempo de retención (min.)	%Ab.
Eriocitrina	8,24	1,72
Neoeriocitrina	10,12	1,25
Luteolina-7-O-rutinósido	11,56	0,60
Luteolina-7-O-neohesperidósido	12,42	0,41
Isonaringina	15,23	1,10
Naringina	16,89	10,76
Hesperidina	19,96	6,68
Neohesperidina	22,35	7,65
Rhoifolina	25,31	1,62
Diosmina	30,21	0,87
Neodiosmina	36,52	0,56
Didimina	52,23	0,25

Tabla M4. Tiempo de retención y contenido absoluto por HPLC de los principales flavonoides presentes en el extracto de frutos de Citrus sp. (CE) (ver HPLC adjunto).

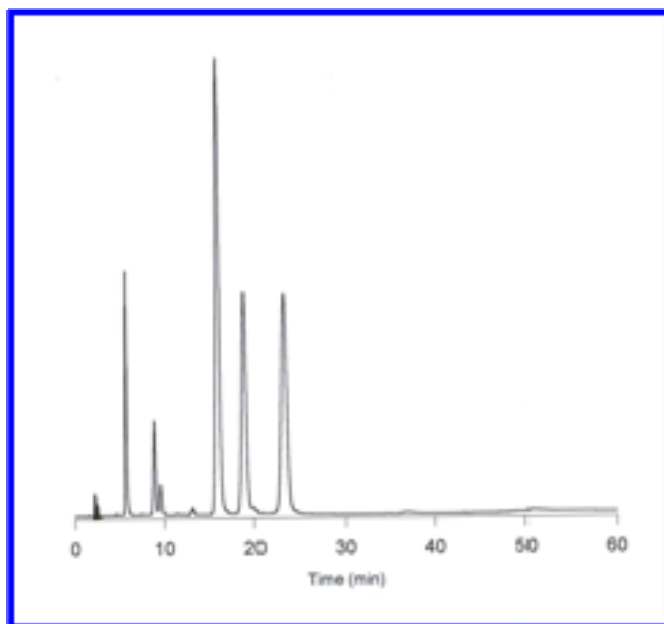


Figura M26. Análisis cromatográfico de los componentes del Extracto Cítrico Soluble (CE)

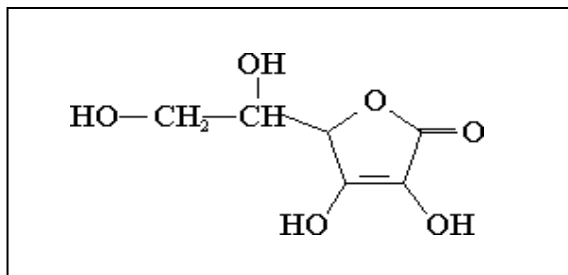
Es un extracto cítrico soluble en agua y, por ello, se ha administrado disuelto en el agua de bebida a una concentración del 0,2 % a los 7 días de haber comenzado el tratamiento con CE, este grupo de 6 animales se va a someter a una exposición de rayos X con una dosis de 50 cGy junto al resto de animales irradiados. En el grupo de animales tratados postirradiados, estos van a ser sometidos a irradiación e inmediatamente después a la irradiación, se les va a administrar la sustancia “ad libitum”.

Vitamina C.

La vitamina C es una vitamina hidrosoluble, que no se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo y se elimina en pequeñas cantidades a través de la orina. Por este motivo, es importante su administración diaria, ya que es más fácil que se agoten sus reservas que las de otras vitaminas. Es una sustancia de color blanco, estable en su forma seca, pero que en solución se oxida con facilidad, más aún si se expone al calor. Su estructura química recuerda a la de la glucosa (en muchos mamíferos y plantas, esta vitamina se sintetiza a partir de la glucosa y galactosa). Se llama con el nombre de vitamina C a todos los compuestos que poseen la actividad biológica del ácido ascórbico.

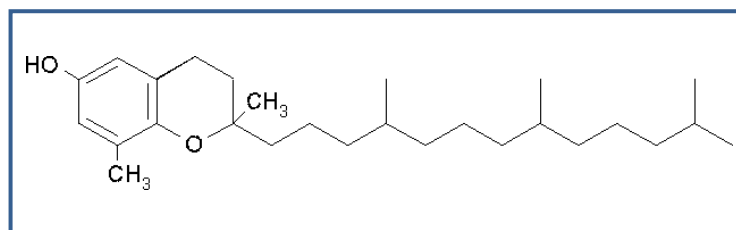
La vitamina C se obtiene principalmente de frutas cítricas, como el limón, la naranja, la fresa, la mora o la piña, y de verduras, como el tomate, las espinacas, el perejil, la coliflor, el brócoli o la lechuga. Su estructura química es $C_6H_8O_6$. En este estudio hemos realizado una disolución del ácido ascórbico en DMSO añadiendo 2,5 mg del compuesto por cada mililitro de disolución.

Figura M27. Ácido ascórbico.

**Vitamin E (δ-tocopherol)**

La vitamina E (delta-tocoferol) (Sigma-Aldrich, Madrid) es una vitamina soluble en grasa que se almacena en el tejido graso del cuerpo y tiene un importante papel antioxidante. Se conocen ocho formas diferentes de vitamina E y cada una tiene su propia actividad biológica que se mide por su potencia o uso funcional en el cuerpo. El delta-tocoferol ($C_{27}H_{46}O_2$), que tiene una actividad antioxidante muy alta, es la forma de vitamina E que se usó en este estudio. Se preparó una solución de 2,5 mg / ml en un disolvente de DMSO / etanol al 50% (v / v) y se esterilizó por filtración.

Figura M28. Vitamin E (δ-tocopherol)



El efecto de las diferentes concentraciones de vitamina E antes de la exposición a la radiación también se evaluó mediante la adición de 25 µl de la solución de prueba a 2 ml de sangre no irradiada antes, una cohorte de estas muestras de sangre no se expuso a la radiación y actuó como control de la sustancia grupo mientras que la otra cohorte estuvo expuesta a 2 Gys de rayos X (muestras tratadas con vitamina E antes de la irradiación). Al tercer grupo de muestras de sangre de 2 ml previamente irradiadas con 2 Gy de radiación X (muestras tratadas con vitamina E después de la irradiación), se añadieron 25 µl de la solución de vitamina E de prueba dentro de los 15 minutos posteriores a la irradiación.

MÉTODOS

ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT

MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS

Las tres líneas utilizadas se mantuvieron por medio de cultivo masivo y fueron conservadas por criocongelación.

El cultivo masivo lo realizamos en frascos de 75 cm², con el medio adecuado para cada línea. Todas las operaciones fueron realizadas en cabinas de flujo laminar vertical, con el instrumental adecuadamente esterilizado. El crecimiento celular fue controlado por la observación directa de los frascos con un microscopio invertido de contraste de fases, cambiando el medio aproximadamente cada dos días, o cuando el indicador de pH señala agotamiento. Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia formando una monocapa. En esta fase tratamos los cultivos con 2 ml de tripsina (0,1 mg/ml) y EDTA (0.2 mg/ml) durante 5 minutos en estufa a 37°C y agitándolos hasta que las células se despegan. Seguidamente, añadimos 4 ml de medio frío suplementado con SBF y centrifugamos a 214 g durante 10 minutos a 22°C para eliminar completamente la enzima. Resuspendemos el sedimento en 2 ml de medio fresco y procederemos al recuento del número de células vivas en cámara hemocitométrica mediante un ensayo de exclusión de colorante (azul tripán) y calculáremos el inóculo necesario para nuevos frascos donde propagar el cultivo. De los frascos de cultivo, tomamos regularmente muestras de las dos líneas con el fin de comprobar la ausencia de contaminación por *Mycoplasma* spp, mediante fluorescencia directa con el colorante específico para el ADN (H33233, Hoecht, Alemania).

Realizamos la criocongelación cuando los cultivos están próximos a la confluencia. Para esta línea celular, procedemos a la tripsinización y centrifugación. Resuspendemos el sedimento en medio fresco suplementado con SBF hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 células/ml y se distribuían en ampollas de criocongelación con un 10% (v/v) de DMSO como agente crioprotector. En todos los casos, la criocongelación fue realizada primero en alcohol isopropílico que provoca una bajada de temperatura de 1°C/minuto, hasta alcanzar los -80°C y seguidamente, colocamos las ampollas en nitrógeno líquido para bajar la temperatura hasta -196°C para su almacenamiento.

Para restablecer los cultivos a partir de los viales congelados, introducimos el vial en un baño a 37°C para su rápida descongelación. Seguidamente, en la cabina de flujo laminar, vertemos el contenido en un tubo de centrifuga adicionando 10 ml de medio de cultivo para diluir el DMSO que contiene el medio de congelación. Tras centrifugar 10 minutos a 214 g, desechamos el sobrenadante y resuspendemos las células en 1-2 ml de medio de cultivo para realizar el recuento celular en cámara hemocitométrica utilizando como colorante el azul tripán y estimular la viabilidad celular tras la congelación. Después de ajustar la concentración, realizamos la siembra en un frasco de cultivo para reiniciar el cultivo celular, cambiando el

medio de cultivo a las 24 horas y suplementándolo con mayor proporción de SBF para las células con peor recuperación.

Optimización de números de células.

La viabilidad celular y los ensayos proliferativos se realizaron a las 24 y 48 horas después del tratamiento con la sustancia problema con y sin exposición a la radiación X. Los cultivos celulares se realizaron en placas de fondo óptico de 96 pocillos Nunc® MicroWell de capacidad de 300 µl / pocillo. Se incluyeron controles positivos para cada tratamiento y línea celular y se sometieron a las mismas condiciones que las células experimentales. Las células en la fase de crecimiento exponencial se usaron para los ensayos y las condiciones de cultivo en los pocillos fueron las mismas que las de los matraces de cultivo tisular. Los tratamientos se incubaron durante 24 horas después de la siembra celular en ambos tipos de ensayos para obtener células adaptadas a las condiciones de cultivo y para adherirse al fondo de los pocillos. Para determinar la concentración óptima de siembra celular, se sembró el número apropiado de células en cada pocillo para evitar el sobrecrecimiento celular durante los tratamientos a partir de los cuales se construyeron las curvas de crecimiento. Después de analizar la curva de crecimiento de cada línea celular, resultó que el número más conveniente para sembrar por pocillo era 3.200 células para células PNT2 y TRAMPC1 y 2.500 para células de melanoma BF16F10.

CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR. TEST CON MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Utilizamos la técnica descrita por Carmichael *et al.* (1987a; 1987b) y por Alley *et al.* (1988), adaptada a nuestras condiciones de cultivo (VICENTE *et al.*, 1997), para cuantificar la viabilidad celular.

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

- 1.- Centrifugar las placas a 1000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar el medio de los pocillos.
- 2.- Reemplazar con 200 µl de medio fresco con SBF por pocillo.
- 3.- Añadir 50 µl de MTT (8mg/ml) a cada pocillo.
- 4.- Incubar durante 4 horas en la estufa a 37° C y 5% de CO₂.
- 5.- Centrifugar de nuevo a 1000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar el medio y el MTT no metabolizado.
- 6.- Añadir 100µl de DMSO para solubilizar el MTT formazán producido por las células.
- 7.- Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

8.- Realizamos la lectura en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340P utilizando un sistema de doble longitud de onda (560 y 690 nm).

El efecto de las diferentes sustancias ensayadas para determinar la viabilidad o supervivencia celular de las células PNT2, TRAMPC1 y B10F16 se determinó usando el ensayo MTT (3-4, 5-dimetiltiazol-Z-il-2, 5-difeniltetrazolio bromuro). Las células PNT2, TRAMPC1 y B10F16 se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 3200, 3200 y 2500 células/ml, respectivamente. Veinticuatro horas después de comenzar la incubación, las células se trataron con dos concentraciones diferentes de cada una de las siguientes sustancias ya sea antes o después de la irradiación y se trataron con las sustancias y mezclas ensayadas (Ácido carnósico, apigenina, ácido rosmarínico y DMSO). Las preparaciones de las soluciones y sus respectivos volúmenes y concentraciones administradas a las células se han descrito anteriormente.

Para los tratamientos previos a la irradiación, tras 15 minutos de la adición de las sustancias ensayadas a los cultivos celulares, las placas se irradiaron con diferentes dosis de rayos X (0, 4, 6, 8 y 10 Gy). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 24 o 48 horas para finalmente evaluar sus capacidades radioprotectoras/citoprotectoras mediante el ensayo de viabilidad de MTT. Para los experimentos posteriores a la irradiación, las células cultivadas se expusieron primero a la radiación y posteriormente se realizó la adición de las cantidades pertinentes de cada sustancia ensayada para continuar con la incubación durante otras 24 o 48 horas para evaluar finalmente la viabilidad celular y determinar las capacidades radioprotectoras de las sustancias de prueba.

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

Viabilidad celular = (absorbancia del cultivo de células tratadas / de absorbancia) x 100

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

Efecto citoprotector del tratamiento combinado de sustancias de prueba: ensayo de combinación de dos fármacos

Para determinar las propiedades sinérgicas de radioprotección se evaluaron también tratamientos combinados de las diferentes sustancias ensayadas. Se evaluaron cantidades equimolares de ácido carnósico y apigenina para la citoprotección en dos concentraciones diferentes, es decir, volúmenes iguales (10 μ L de cada sustancia) de dos concentraciones diferentes (15 μ M y 25 μ M) que se adicionaron a los micropocillos que contenían las células, se expusieron a la radiación ionizante y se incubaron durante 24 y 48 horas. De manera similar,

otros pares sustancias se han realizado: Apigenina y ácido rosmarínico (API + AR) y Apigenina y ácido carnósico (API + CARN). La preparación de las soluciones y las cantidades respectivas administradas a los cultivos celulares se detallan en las secciones anteriores. Como es habitual, la actividad citoprotectora del tratamiento anterior se evaluó mediante la viabilidad celular y la supervivencia de las células PNT2 mediante un ensayo de MTT para 24, o 48 como se describió previamente (CARMICHAEL et al., 1987a,b; ALLEY et al., 1988; MOSSMAN, 1983).

ACTIVIDAD GENOPROTECTORA

Ensayo “in vitro” de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados bloqueados citocinéticamente con Citochalasina B (CBMN)

Sangre periférica, muestras de linfocitos

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

Construcción de curvas de respuesta a la dosis

Los donantes de sangre se dividieron en 2 grupos:

Grupo 1: catorce crioviales que contenían 2 ml de sangre del donante se usaron para la construcción de una curva dosis-respuesta. De estos, 2 viales que contenían sangre no se irradiaron y se consideraron muestras controles o como viales de control (frecuencia micronucleos basal) mientras que las 12 muestras de sangre restantes se expusieron a diferentes dosis de rayos X (2, 4, 6, 8 y 10 Gy respectivamente).

Grupo 2: actividad genoprotectora *in vitro* de las sustancias ensayadas. Este segundo grupo consistió en tubos con partes alícuotas de sangre de 2 ml en crioviales, que se usaron para evaluar el efecto antimutagénico de las diferentes sustancias ensayadas (pre y post irradiación). Las sustancias de prueba utilizadas incluyeron AR, P90, CARN, API en DMSO, Vit E, VIT C, COL, CE, AMFI TE, Rutina, DMSO, Quercetina y Ácido zoledrónico.

Dos de estas muestras de sangre se usaron como controles experimentales (frecuencia de micronúcleos inicial o control no irradiado), control irradiado. Se reservó una muestra de sangre para cada sustancia de prueba utilizada, y esto sirvió como control de la sustancia de prueba. Estas muestras solo recibieron la sustancia de prueba pero no estuvieron expuestas a la radiación. Algunas muestras de sangre se trataron con las sustancias de prueba antes de la exposición a la irradiación y se denominaron grupo de prerradiación, el resto se irradió antes de la adición de las sustancias de prueba y, en consecuencia, se denominó grupo de posradiación.

TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS

Este ensayo se basa en la utilización de la técnica de micronúcleos en cultivos de linfocitos obtenidos de sangre periférica humana y bloqueados citocinéticamente en su primera división mitótica, descrito por Fenech (1986, 1990, 2000) y considerado como el procedimiento

más adecuado para el análisis citogenético del daño genotóxico inducido por radiación ionizante de forma sistemática (IAEA, 2001; 2011). La técnica utilizada es la siguiente:

I. Preparación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado está compuesto por:

- Medio HAM F10: 85%
- Suero Bovino Fetal (SBF) (Sigma-Aldrich, Madrid): 15%
- Fitohemaglutinina (PHA)(Sigma-Aldrich, Madrid): 16 µg/ml
- Glutamina: 1 µg/ml
- Antibióticos (Sigma-Aldrich, Madrid):
- Penicilina sódica: 100 UI/ml
- Estreptomina: 100 µg/ml

Para realizar la técnica de micronúcleos, vamos a cultivar 1 ml de cada muestra de sangre heparinizada (irradiada o no y/o tratada o no) en frascos de cultivo de 25 ml en una estufa a 37 °C y ambiente enriquecido con CO₂ al 5 % durante 72-76 horas junto con 9 ml de medio de cultivo preparado como se ha comentado anteriormente. Esto es realizado en cabina de flujo laminar. Transcurridas 44 horas de cultivo añadimos 150 µl de la disolución de Cytochalasina B (Cyt B) a cada cultivo. Estos 150 µl de disolución, contienen 30 µg de Cyt B (3 µg/ml).

Posteriormente, continuamos el cultivo durante otras 28-32 horas, siendo el tiempo total de cultivo de hasta 72-76 horas. Transcurrido este tiempo trasvasamos el contenido de los frascos de cultivo a tubos cónicos de 15 ml y lo centrifugamos durante 5 minutos a 1000 rpm (Heraeus, Minifuge T, Madrid).

A continuación, extraemos el sobrenadante y agregamos 8 ml de solución hipotónica de CIK. De esta forma, obtenemos una mezcla que incubamos nuevamente en estufa durante 3 minutos, en las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

Posteriormente, centrifugamos el cultivo a 800 rpm durante 8 minutos, decantamos el sobrenadante y lo resuspendemos en 8 ml de fijador (Alcohol metílico: Ácido Acético Glacial, 3:1) que volvemos a centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Este último paso es necesario (fijación y centrifugación) 3 ó 4 veces, hasta obtener un sobrenadante transparente.

De este modo, aislamos los linfocitos que resuspendemos en un volumen apropiado de fijador (0,5 ml) y realizamos las preparaciones microscópicas colocando la suspensión celular gota a gota sobre portaobjetos enfriados previamente y que, posteriormente, se van a secar en corriente de aire suave.

A las 24 horas, podemos proceder a la tinción de las preparaciones por inmersión:

1º) En una solución de May-Grünwald puro (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 3 minutos.

2º) Seguidamente, las pasamos durante 2 minutos por solución de May-Grünwald al 50 % (50 % May-Grünwald y 50 % agua destilada (Braun, Melsungen, Alemania)).

3º) Posteriormente y sin lavarlas, las pasamos a solución Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 2 minutos más.

4º) Finalmente, lavamos las preparaciones sumergiéndolas individualmente en tampón fosfato 100 mM pH 6,2 y las secamos al aire.

5º) Para terminar, las preparaciones microscópicas se montan con cubreobjetos quedando definitivamente preparadas para su estudio a microscopía óptica.

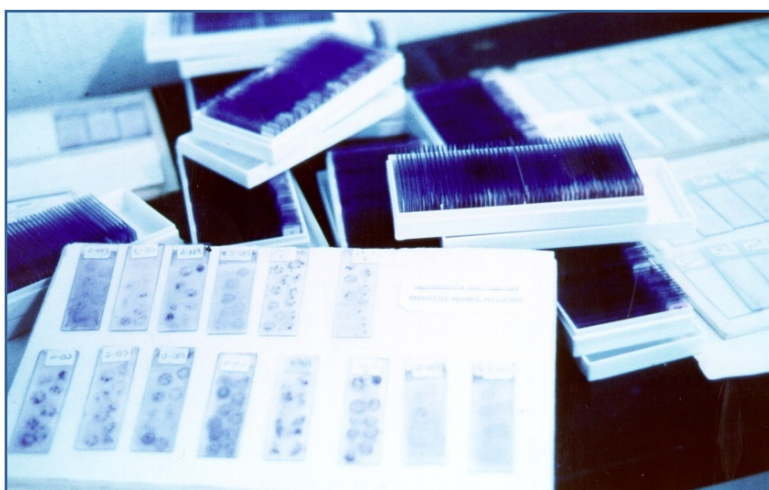


Figura M29.
Preparaciones
microscópicas tras la
tinción con May-Grünwald
y Giemsa

II. Preparación de las sustancias añadidas al medio de cultivo

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

a) Preparación de la Fitohemaglutinina

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

b) Preparación de la Cytochalasina B

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

c) Preparación de la Solución Hipotónica de Cloruro Potásico

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

d) Preparación del Tampón Fosfato

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

NaH₂PO₄ 2 H₂O -----1,560 g/l

Na₂HPO₄ 7 H₂O -----2,340 g/l

e) Preparación de la Solución Fijadora

La solución fijadora utilizada se prepara mezclando 3 partes de Alcohol Metílico con 1 parte de Ácido Acético Glacial. Esta disolución debe ser preparada en el momento de ser utilizada.

III. Criterios de recuento de micronúcleos

Las preparaciones microscópicas obtenidas de los cultivos de las muestras de sangre fueron analizadas microscópicamente por 2 observadores diferentes. Para el recuento y análisis de las células hemos utilizado sistemáticamente 400 aumentos y, en los casos de comprobación, una magnificación de 1000 aumentos con aceite de inmersión.

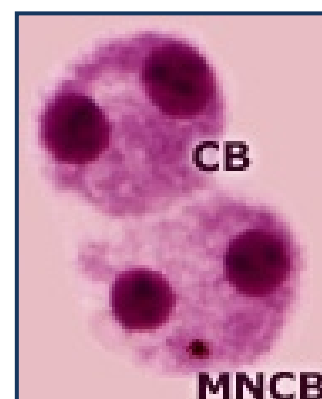
El recuento de micronúcleos en las preparaciones microscópicas de linfocitos humanos lo hemos realizado sobre 500 células binucleadas (CB) en cada una de las 6 preparaciones

que hemos obtenido de los 2 cultivos realizados por cada muestra de sangre (1 muestra de sangre, 2 cultivos celulares y 6 preparaciones microscópicas). Por lo que, aunque las cifras de micronúcleos las hemos presentado por 500 células bloqueadas (MN/500 CB), el estudio corresponde al análisis de 3000 CB para cada uno de los valores mostrados, obtenidos por 2 observadores independientemente.

El recuento fue realizado a doble ciego, desconociendo las características de la preparación observada, obteniéndose un único valor para cada punto que corresponde a la media de las 6 lecturas diferentes para cada una de las muestras. Hemos seguido los criterios para el recuento de micronúcleos establecidos por Almassy en 1987. Dichos criterios sobre el recuento de micronúcleos son los siguientes:

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

Figura M30. Imagen de dos linfocitos o células binucleadas con el citoplasma conservado (CB) en dónde una de ellas presenta un micronúcleo en el citoplasma (MNCB) (MG-G. 400x)



TEST DE MICRONÚCLEOS IN VIVO SOBRE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

La evaluación de los dos experimentos realizados se ha llevado a cabo mediante la utilización del test de micronúcleos *"in vivo"* sobre médula ósea de ratón, un test ampliamente utilizado para la determinación *"in vivo"* del efecto genotóxico y mutagénico de diferentes agentes químicos y físicos y que fue descrito originalmente por Schmid en 1975.

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

- 1.-Los animales se sacrifican por dislocación cervical e, inmediatamente, se disecan los fémures, limpiándolos de todo resto de músculos y tendones.
- 2.-Se cortan las epífisis de los fémures y mediante una jeringa de insulina (24G), se hace fluir suero bovino fetal (Sigma, Madrid) por la diáfisis femoral de forma que arrastre la médula ósea que contiene, la cual se recoge en tubos cónicos de 15 ml de capacidad.
- 3.-Usando una pipeta Pasteur con bulbo de goma, se pipetea enérgicamente el contenido del tubo hasta obtener una suspensión celular sin grumos.
- 4.-Se deja reposar durante 5 minutos y se centrifuga, posteriormente, a 1000 rpm durante 5 minutos, en centrífuga Centromix 549 (Selecta, Madrid).
- 5.-Según el volumen de sedimento obtenido, se extrae el sobrenadante con una pipeta Pasteur hasta dejar aproximadamente 0,2 ml; posteriormente, se agita bien hasta obtener una suspensión homogénea.
- 6.-Se hace una extensión dejando caer a unos 2-3 cm una gota del líquido obtenido a modo de frotis sanguíneo.
- 7.-Se dejan secar al aire durante 24 horas.
- 8.-Se tiñen con May-Grünwald puro (Analema, Vorquímica S.L, Vigo) durante 3 minutos.
- 9.-Se retira el 50% del colorante y se reemplaza por agua destilada, dejándolo en esta solución durante 2 minutos.
- 10.-Sin lavar, se tiñen con una solución de Giemsa (Probus, Madrid) diluido 1:6 en tampón fosfato 100M, pH 6,2 y, se mantiene durante 2 minutos más.
- 11.-Se lavan los preparados sumergiéndolos uno por uno en agua destilada.
- 12.-Se limpia la parte inferior del portaobjetos con Xilol (Probus, Madrid) y las preparaciones se dejan secar al aire.
- 13.-Se montan con cubreobjetos, quedando dispuestas para su estudio microscópico.

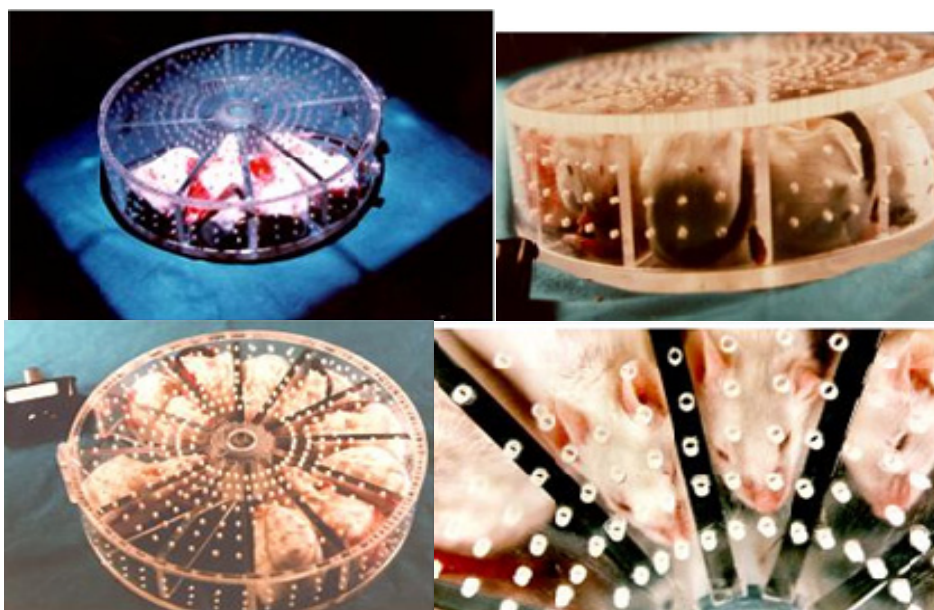


Figura M31. Detalles de la exposición de los ratones a campos magnéticos.



Figura M32. Técnica de disección de ambos fémures para la obtención de su médula ósea.

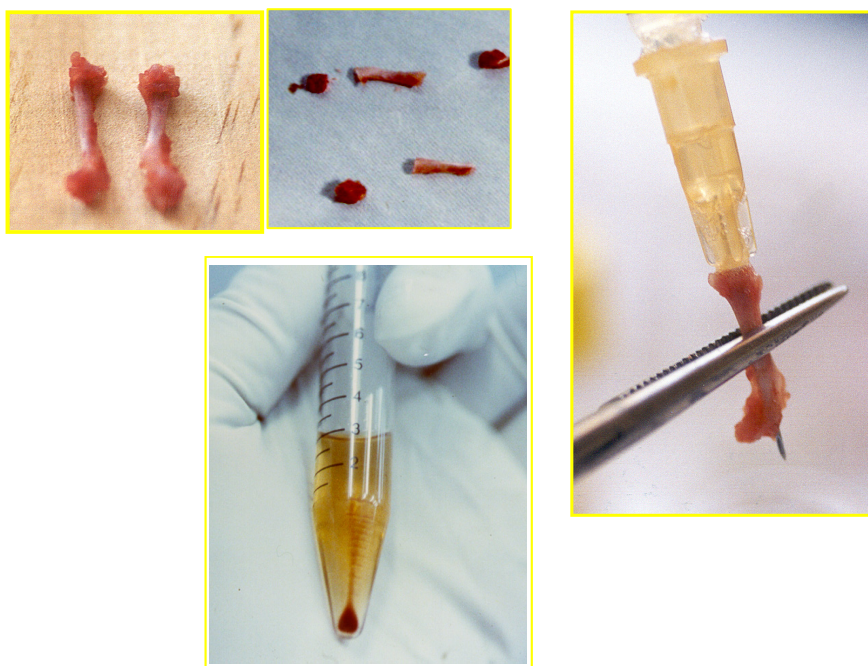


Figura M33. Detalle de los fémures disecados y tras la extracción de su médula ósea.

Determinación de la frecuencia de micronúcleos.

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

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

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

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

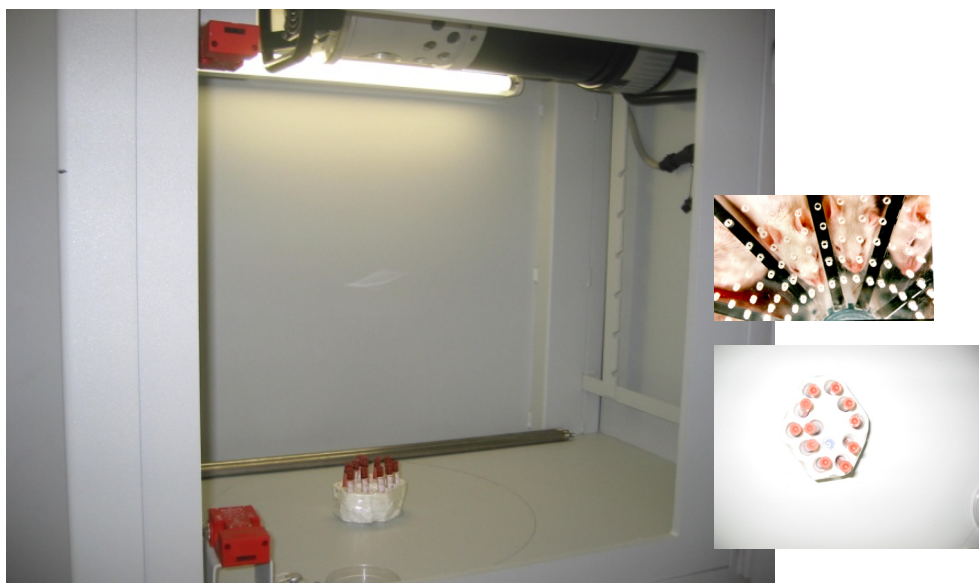


Figura M34. Detalle de la cabina en el interior del equipo de rayos X. Obsérvese la colocación de los animales inmovilizados y conscientes para una irradiación corporal total; y, la colocación de las muestras sanguíneas durante la exposición a rayos X.

DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH Y GSSG)

El glutatión (GSH) es un importante antioxidante tiol tripeptídico (γ -glutamylcysteinylglycine) en las células que existe en dos formas: reducido como GSH y oxidado como glutatión disulfuro (GSSG) (MEISTER y ANDERSON, 1983). El GSH esta significativamente mas elevado que el GSSG en condiciones fisiológicas. Sin embargo, se ha descrito que condiciones patológicas que causan estrés oxidativo provocan una disminución de la relación GSH / GSSG (NOCTOR et al., 2002). Por lo tanto, la evaluación de los niveles de GSSG en condiciones de inducción de estrés puede proporcionar información valiosa sobre el estrés oxidativo que está experimentando un sistema biológico (ASENSI et al., 1999; KLEINMAN y MAYOSE, 2000; HERNANDEZ et al, 2000).

Los niveles totales de glutatión se determinaron utilizando el **Ensayo de GSH / GSSG-Glo**, un sistema basado en luminiscencia para la detección y cuantificación de glutatión total (GSH + GSSG) y de los ratios de GSSG y GSH/GSSG en cultivos celulares. Las variaciones en los niveles de GSH son importante en la evaluación de las respuestas toxicológicas y es un indicador de estrés oxidativo, que puede indicar la aparición de apoptosis o muerte celular. El ensayo proporciona de forma sencilla y rapida, señales luminiscentes estables que se correlacionan con el GSH total, o con la concentración de GSSG de una muestra en el cultivo. Tanto el glutatión total como las determinaciones de GSSG se basan en la reacción de conversión de GSH-dependiente de una sonda de GSH (luciferina-NT a luciferina) por una enzima glutatión-S-transferasa que se acopla a una reacción de luciferasa. La luz de la luciferasa depende de la cantidad de luciferina formada, que es a su vez dependiente de la cantidad de GSH presente. Esto hace que la señal luminiscente es proporcional a la cantidad de GSH. La determinación del glutatión total y GSSG se llevan a cabo en reacciones paralelas. En una primera reaccion, los reactivos del ensayo miden glutatión total usando un agente reductor que convierte todo el glutatión (GSH y GSSG) en un lisado celular a la forma reducida, GSH. En una segunda reacción, los reactivos de ensayo se utilizan para medir solamente la forma oxidada (GSSG). En este caso, se añade un reactivo que bloquea todo el GSH, dejando intacto el GSSG. Esta etapa de bloqueo es seguida por una etapa de reducción que convierte la GSSG a GSH para la cuantificación de la reacción luminiscente. Debido a que los ensayos se realizan directamente sobre las células en los pocillos, la pérdida de GSH o GSSG se reduce al mínimo y con ello la variabilidad.

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

1. Las células en una placa de múltiples pocillos se tratan con compuestos de ensayo o vehículo: unos pocillos para la medición del glutatión total y otros para la medición del GSSG.
2. Los tratamientos se retiran y se sustituyen con un reactivo de lisis, diferente para el total de glutatión para la medición del GSSG.
3. El reactivo Generación luciferina se añade a todos los pocillos, y los ensayos se mezclan y se incuban durante 30 minutos.

4. El reactivo de detección de luciferina se añade a todos los pocillos, se mezclan y tras una incubación de 15 minutos, se mide la luminiscencia.
5. Los ratios de GSH / GSSG se calculan directamente a partir de mediciones de luminiscencia (en unidades relativas de luz, RLU) para la interpolación de las concentraciones de glutatión a partir de su comparación con su curva estándar.

La técnica permite:

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

B. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

El ensayo para la determinación de proteínas está basado en el método de Bradford (1976) y consiste en la cuantificación de la concentración de proteínas solubles. El método se basa en la adición de un colorante ácido a la solución de proteínas problema y la posterior medición a 595 nm con el espectrofotómetro. La comparación de los resultados respecto a la curva estándar obtenida permite una medición relativa de la concentración de proteínas.

La absorbancia máxima para una solución ácida del colorante de Coomassie cambia de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión en proteínas. El colorante de Coomassie se une principalmente a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente la arginina.

En definitiva, el método Bradford se basa en la utilización de un colorante hidrofóbico (Coomassie blue G-250) cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico proporcionan un color pardo que al entrar en contacto con la parte hidrofóbica del interior de una proteína se fija a ella. Las proteínas se unen a la sustancia azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. La determinación del contenido proteico de una muestra requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con los que se construye una curva de calibración: a mayor cantidad de proteínas, mayor color desarrollado y por lo tanto, mayor absorbancia; es por ello que se considera un cromóforo exógeno. Es un método que depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es sensible a la presencia de contaminantes tales como los restos de detergentes y líquidos orgánicos, a que las proteínas pueden perder su estabilidad y perder su forma nativa, lo que provocaría la pérdida de la unión entre el cromóforo y la zona hidrofóbica de las proteínas. Para determinar la concentración total de proteína se realiza una curva de calibración empleando una proteína patrón que generalmente es la seroalbumina bovina. Se preparan tubos testigos con distintas cantidades de proteína y otra disolución llamada "blanco" que sólo contiene agua y reactivo

Bradford, mientras que en los tubos testigos se les mantiene constante el reactivo Bradford siendo los volúmenes de todos los tubos iguales. Una vez preparados los tubos se mide la absorbancia a cada uno de ellos con una longitud de onda de 595 nm, es calibrado el equipo con el tubo blanco (no contiene proteínas), de esta manera se construye la gráfica de absorbancia vs concentración

Este ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos, siguiendo los pasos:

1. Mezclamos suavemente el reactivo Bradford en la botella a temperatura ambiente.
2. Preparamos estándares de proteína en tampón que van desde 0,1-1,4 mg / ml usando un patrón de BSA

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

3. Cogemos 5 μl de cada uno y añadir 250 μl de reactivo de Bradford. A los pocillos de blanco, añadir 5 ml de tampón.

4. Preparamos la muestra desconocida(s) con un concentración aproximada entre 0,1 a 1,4 mg / ml.

5. A cada pocillo, añadimos 250 μl de la Bradford Reactivo y mezclamos en un agitador durante unos 30 segundos.

6. Dejamos que las muestras se incuben a temperatura ambiente durante 5-45 minutos. A continuación, medimos la absorbancia a 595 nm. El complejo proteína-colorante es estable hasta 60 minutos. La absorbancia de las muestras deberán ser registrados antes del límite de tiempo de 60 minuto y dentro de los 10 minutos de diferencia.

7. Trazamos la absorbancia neta vs. la proteína concentración de cada estándar.

8. Determinamos la concentración de proteína de la muestra desconocida (s) mediante la comparación de la A595 Net valores en contra de la curva estándar.

9. Preparamos las diluciones de las muestras de acuerdo con la siguiente tabla.

MÉTODO ESTADÍSTICO

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

Además, hemos determinado el Factor de Protección (FP) o capacidad de protección de una sustancia radioprotectora, expresada como porcentaje de protección, descrito por Sarma y Kesavan (1993), expresada mediante la fórmula:

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

En donde:

FP es la magnitud de protección expresada en %,

F_{control} es la frecuencia de micronúcleos en las muestras controles irradiadas, y

F_{tratados} es la frecuencia de micronúcleos en las muestras irradiadas y tratadas.

El Factor de Protección ha sido determinado para cada una de las sustancias ensayadas tanto preirradiación como postirradiación.

En los ensayos de **radioprotección** o supervivencia celular se ha realizado un análisis de la varianza de medidas repetidas para comparar los porcentajes de supervivencia celular en los cultivos con diferentes concentraciones de los compuestos y complementando con contraste de igualdad de pares con el método de la mínima diferencia significativa (M.D.S.). Los análisis fueron realizados transformando logarítmicamente los datos para ajustarse a las condiciones del ANOVA.

IV. Resultados

IV.1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS

IV.1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS

ENSAYO DE MICRONUCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS IRRADIADOS CON BLOQUEO CITOCINÉTICO MEDIANTE CITOCALASINA B

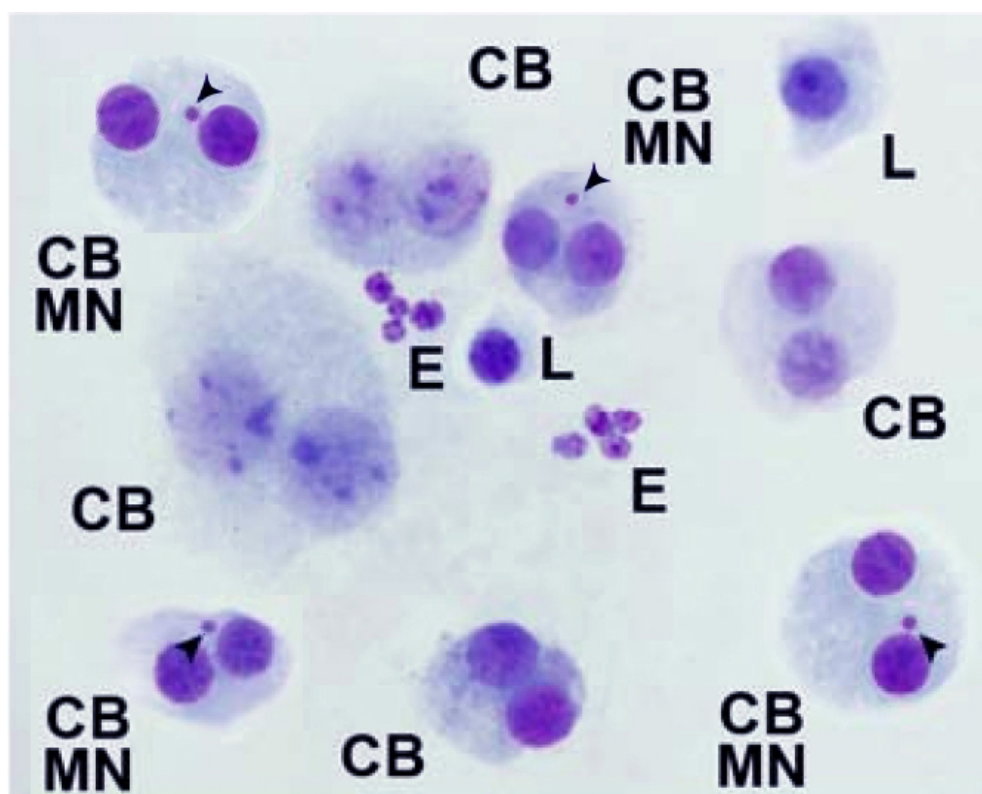
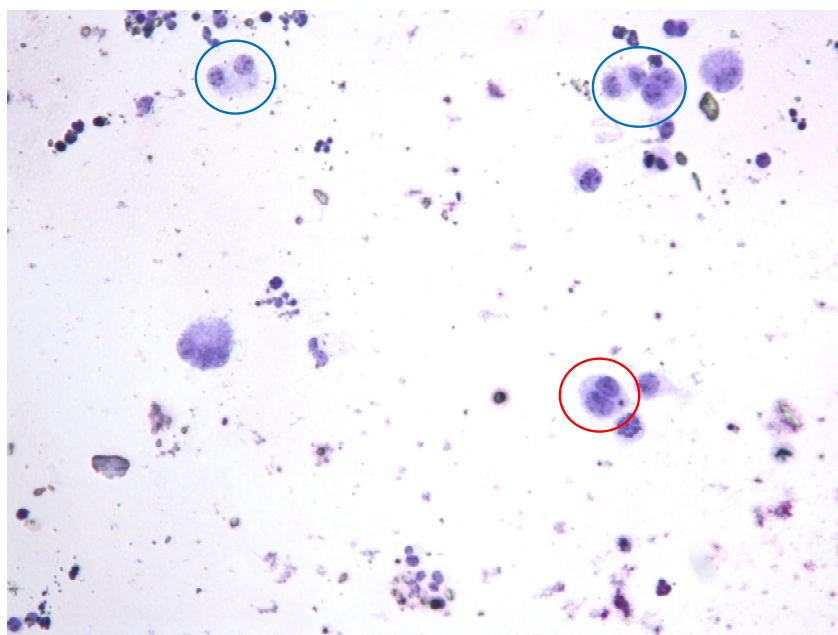


Figura MOR1. Fotomicrografía de un cultivo de linfocitos humanos utilizando la técnica de bloqueo de citocinético y teñido con May-Grünwald-Giemsa (400X) (L: linfocitos, CB: células binucleadas bloqueadas por citocinesis; CBMN: células binucleadas bloqueadas por citocinesis con micronúcleo en citoplasma (flecha), E: restos de eritrocitos hemolizados).

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN MÉDULA ÓSEA DEL RATÓN

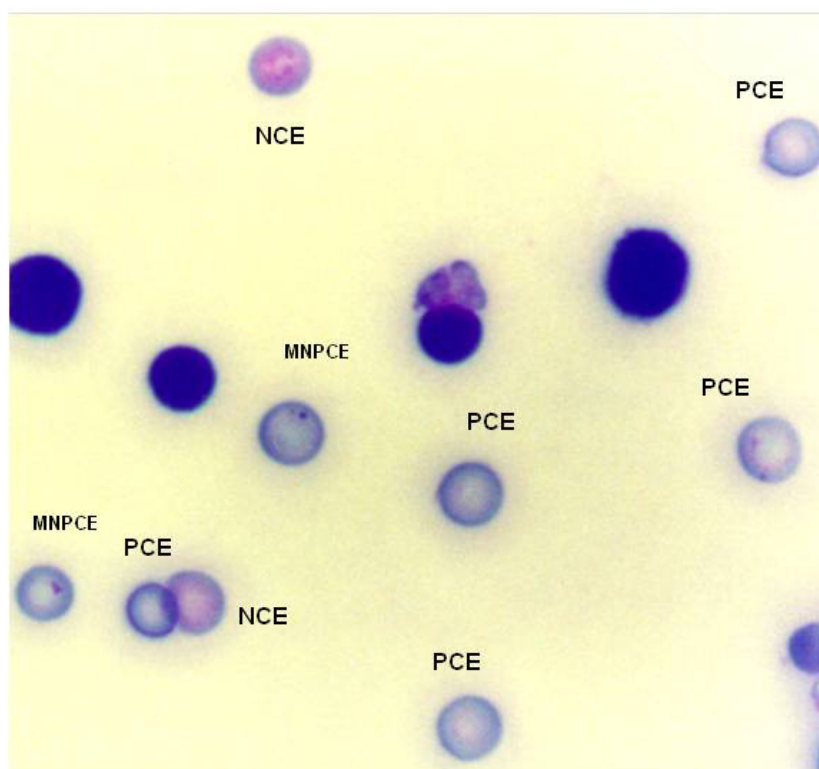
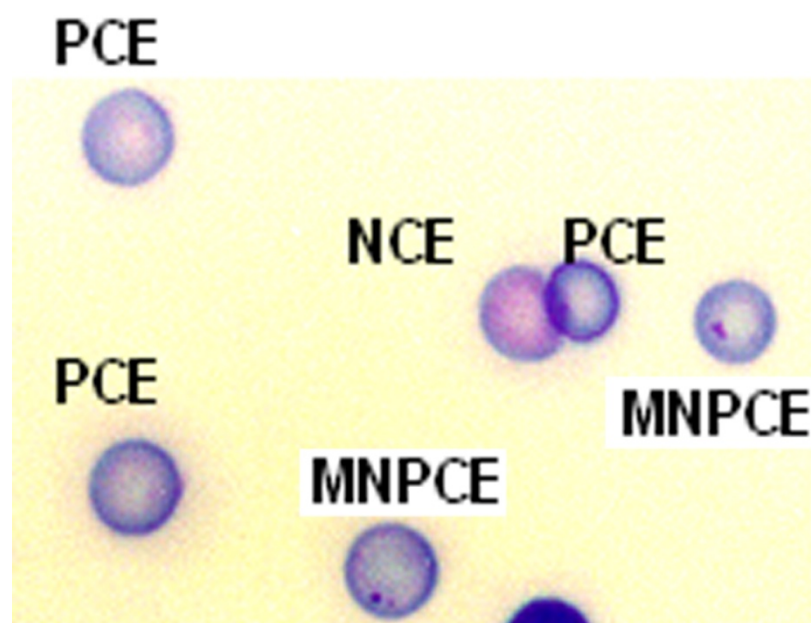


Figura MOR2. Fotomicrografía de células de médula ósea de ratón teñidas con May-Grünwald-Giemsa (1000X) (PCE: eritrocitos policromáticos, MNPCE: eritrocitos policromáticos con micronúcleo, NCE: eritrocitos normocromáticos).

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE CITOPROTECCIÓN O SUPERVIVENCIA CELULAR (MTT ASSAY).

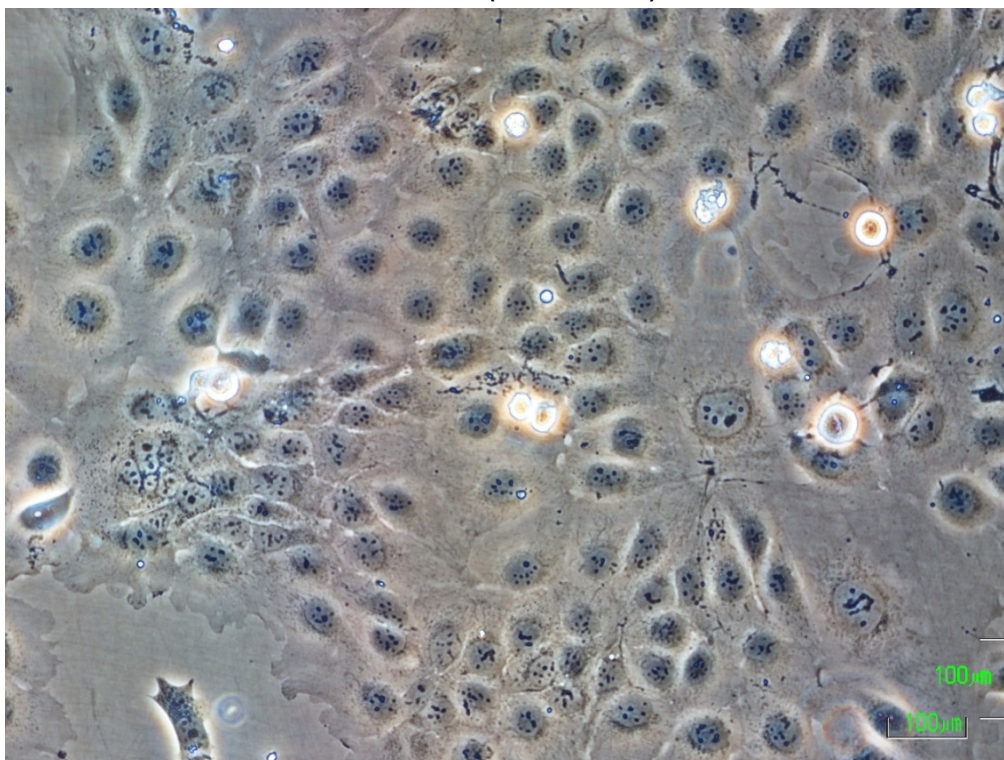


Figura MOR3. Aspecto morfológico de las células PNT2 de epitelio prostático observado usando un microscopio de contraste de fase (cultivos celulares de control tras 24 horas de incubación 200X).

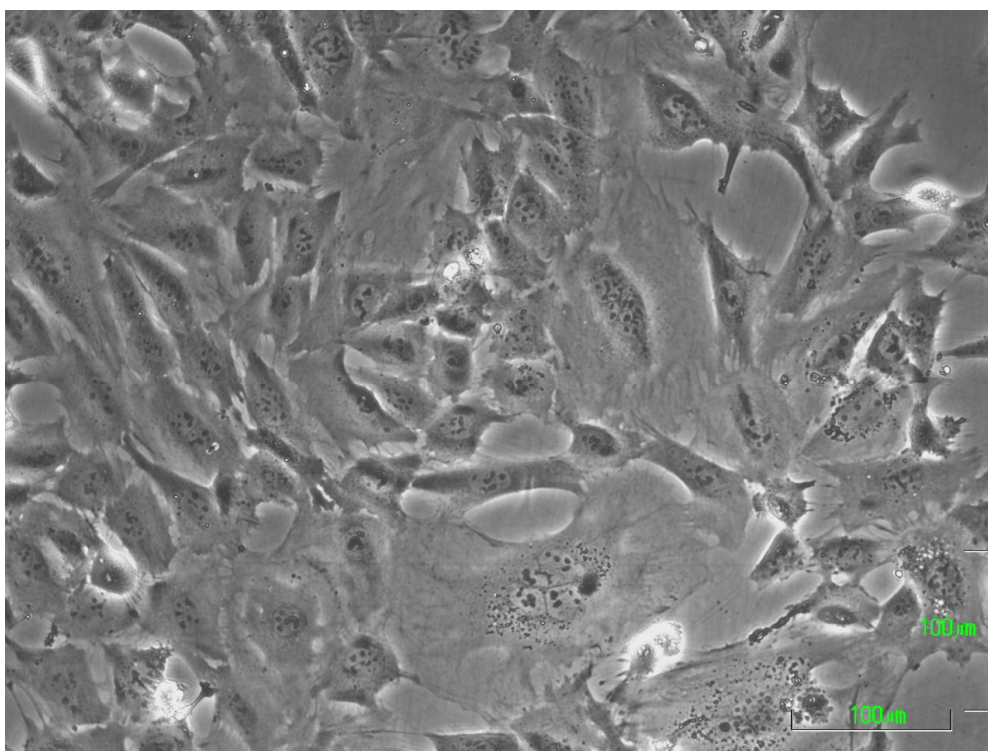


Figura MOR4. Células de la línea TRAMP-C1 observado al microscopio de contraste de fase (cultivos celulares de control tras 24 horas de incubación. (Contraste de fases, 100X)

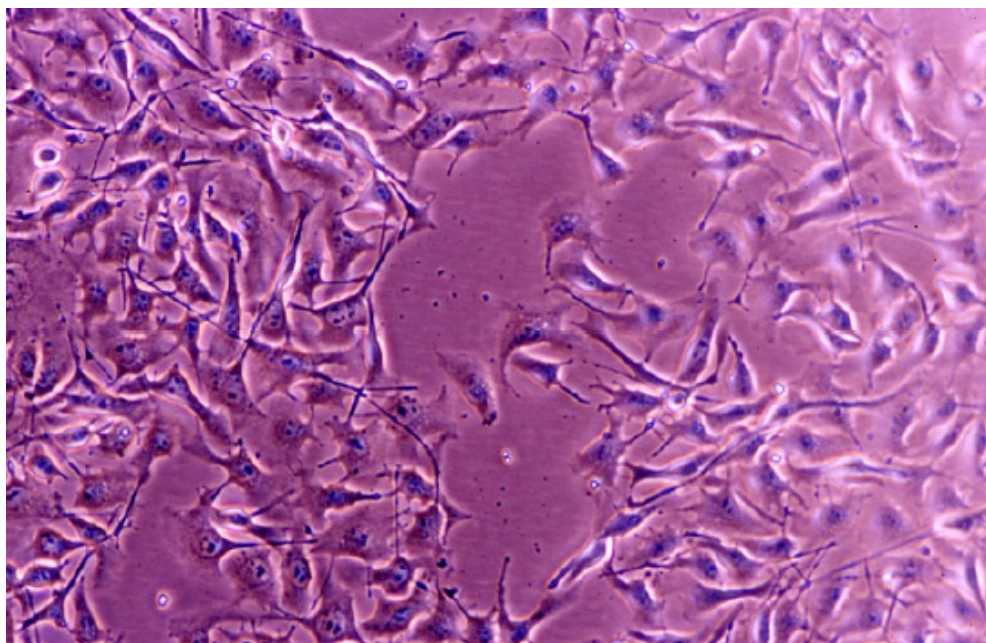


Figura MOR5. Aspecto morfológico de las células de melanoma B16F10 al microscopio de contraste de fase (cultivos de células de control tras 48 horas de cultivo 200X).

IV.2.Resultados

**ENSAYO DE MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS POLICROMATÓFILOS DE MÉDULA
ÓSEA DE RATÓN (MNPCEs)**

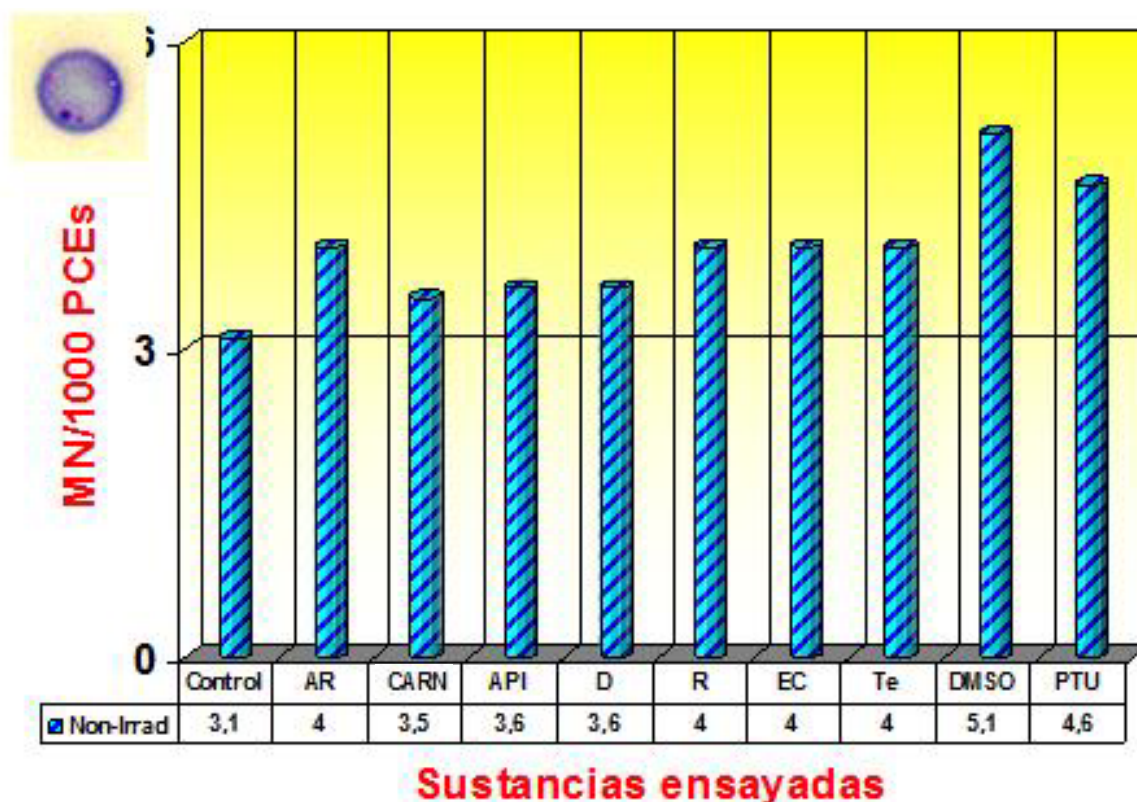
IV.2.RESULTADOS

ENSAYO DE MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS POLICROMATÓFILOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN (MNPCEs)

Los resultados obtenidos en la frecuencia de aparición de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos (MNPCE) de médula ósea obtenidos en los diferentes grupos de animales controles y tratados con las diferentes sustancias ensayadas se presentan a continuación.

GRUPO CONTROL

Los resultados obtenidos en los animales del grupo control no irradiado muestran una frecuencia de micronúcleos que oscila entre un mínimo de 1 y un máximo de 5 MN/1000 PCEs, con una frecuencia media de 3,1 MN/1000 PCEs. Este valor, por tanto, corresponde a la frecuencia basal o frecuencia espontánea de MN en los animales controles estudiados. Los resultados obtenidos en los grupos de animales que fueron tratados con las diferentes sustancias ensayadas pero no expuestos a radiación (lotes de animales no irradiados) no muestra diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aparición de MN/1000 PCEs respecto al grupo control no irradiado; lo que expresa que ninguna de las sustancias ensayadas en el estudio tiene efecto genotóxico sobre las células estudiadas (Gráfica A1).



Gráfica A1. Frecuencia de MNPCEs en células de médula ósea de ratón expuesto a las diferentes sustancias ensayadas en los lotes de animales no irradiados (control de sustancias).

Los animales controles irradiados con 50 cGy muestran un aumento en la frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 17 y 24 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una frecuencia promedio de micronúcleos de 18,7 MN/1000 PCEs.

El análisis estadístico ha determinado diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aparición de MNPCEs entre lotes de animales irradiados y los lotes de animales no irradiados, mostrando que la exposición a rayos X induce el incremento significativo de MN en los PCEs en los animales irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa el daño genotóxico o cromosómico inducido por la radiación ionizante (Gráfica A2 y Gráfica A4).

Grupo tratado con ácido rosmarínico (AR)

El grupo de animales tratados con AR pero no expuestos a rayos X presenta una frecuencia de micronúcleos que varía entre 3 y 6 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una frecuencia media de 4 MN/1000 PCEs. Sin embargo, el lote de animales tratados con AR y posteriormente expuestos a una dosis de radiación de 50 cGy de rayos X presenta una frecuencia entre 6 y 10 MN/1000 PCEs, con una frecuencia media de MN en el grupo irradiado pretratado con AR de 7 MN/1000 PCEs (Gráfica A2). El grupo de animales irradiados (50 cGy de rayos X) y tratados después de la irradiación con AR presenta una frecuencia de MN que oscila entre 14 y 18 MN/1000 PCEs, con una frecuencia media de micronúcleos de 16 MN/1000 PCEs (Gráfica A4).

El análisis estadístico ha determinado **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCes entre lotes de animales tratados con AR antes de la exposición a la irradiación con los animales controles irradiados e incluso con los animales irradiados e inmediatamente después tratados con AR, mostrando que la administración del AR antes de la exposición a radiación ionizante produce una disminución estadísticamente significativa en la aparición de micronúcleos en comparación con animales controles irradiados y en los animales tratados con AR después de la irradiación ($p < 0,001$); lo que expresa que la administración del AR solo muestra capacidad genoprotectora cuando se administra antes de la exposición a la radiación (Gráfica A6).

Se ha obtenido un **factor de protección** del 62% cuando se administra el AR antes de la exposición a la radiación y sólo del 14% cuando si se administra inmediatamente después de la exposición a los rayos X (Gráficas A3, A5 y A7).

Grupo tratado con ácido carnósico (CAR)

El grupo de animales no irradiados tratados con CAR muestra una frecuencia de micronúcleos que varía entre 3 y 5 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una frecuencia promedio de 3,5 MN/1000 PCEs. El grupo de animales irradiados (50 cGy) tratado previamente con CAR muestra frecuencias de MN que oscilan entre 7 y 10 MN/1000 PCEs con una frecuencia media de micronúcleos de 9 MN / 1000 PCEs (Gráfica A1). El grupo de animales expuestos a 50 cGy de rayos X antes de recibir el tratamiento CAR presenta una frecuencia de MN entre 9 y 13MN/1000 PCEs y una frecuencia media de micronúcleos de 11 MN/1000 PCEs (Gráfica A4).

Los resultados estadísticos han determinado **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCes entre el grupo de animales tratados con CAR (tratados antes y después de la irradiación) y el grupo control de animales irradiados, mostrando que la administración de CAR antes y/o después de la exposición a radiación ionizante provoca una disminución significativa en la aparición de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos respecto de los animales controles irradiados ($p < 0,001$); lo expresa que la administración del CAR tiene capacidad genoprotectora, ya sea administrado antes o después de la exposición a la radiación frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Gráficas A2, A4 y A6).

Se ha determinado una capacidad o factor de protección del 52% cuando el CAR se administra antes de la exposición a la radiación y del 46% cuando se administra inmediatamente después de la exposición a los rayos X (Gráficas A3, A5 y A7).

Grupo tratado con Apigenina (API)

Los animales no irradiados tratados con API mostraron una frecuencia de micronúcleos que varía entre 3 y 5 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, presentando una frecuencia promedio de 3,6 MN/1000 PCEs. El grupo de animales tratados con API antes de la exposición a 50 cGy de rayos X muestra una frecuencia de MN entre 9 y 13/1000 PCEs, con una frecuencia media de MN de 11 MN/1000 PCEs (Gráfica A2). El grupo de animales irradiados con 50 cGy antes de ser tratados con API expresan una frecuencia de MN que varía entre 10 y 14 MN/1000 PCEs y una frecuencia media de 12 MN / 1000 PCEs (Gráfica A4).

El análisis estadístico ha determinado **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCes entre los grupos de animales tratados con API y el lote control irradiado, mostrando que la administración de API antes y/o después de la exposición a rayos X produce una disminución significativa en la aparición de micronúcleos en comparación con los animales controles irradiados ($p<0,01$); lo que expresa que la administración de API tiene capacidad genoprotectora, ya sea administrada antes o después de la exposición a la radiación, frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Gráfica A6).

Se ha determinado una magnitud o factor de protección del 41% cuando la API se administra antes de la exposición a la radiación y del 36% cuando ésta se administra inmediatamente después de la exposición a los rayos X (Gráficas A3, A5 y A7).

Grupo tratado con Diosmina

Los animales no irradiados tratados con Diosmina mostraron una frecuencia de micronúcleos que variaba entre 3 y 5 MN / 1000 PCEs y una frecuencia media de 3,6 MN por 1000 PCEs. El grupo de animales tratados con Diosmina antes de la exposición a 50cGy de irradiación de rayos X mostro una frecuencia de MN entre 10 y 15/1000 PCEs con un valor medio de MN de 13 MN/1000 PCEs (Gráfica A2). El grupo de animales irradiados con 50 cGy antes de recibir Diosmina muestra una frecuencia de MN que varía entre 11 y 14 MN/1000 PCEs y una media de 13 MN/1000 PCEs (Gráfica A4).

El análisis estadístico ha determinado **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCes entre los grupos de animales tratados con Diosmina y el grupo control de animales irradiados, mostrando que la administración de Diosmina, tanto antes como después de la exposición a radiación ionizante, produce una disminución significativa en la aparición de micronúcleos en comparación con animales controles irradiados ($p<0,01$); lo que expresa que la administración de Diosmina tiene una capacidad de genoprotección, ya sea administrada antes o después de la exposición a la radiación, frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (Gráfica A6).

Se ha determinado una magnitud de protección del 30% para la Diosmina cuando se administra antes de la exposición a la radiación y del 20% cuando se administra inmediatamente después de la exposición a los rayos X (Gráficas A3, A5 y A7).

Grupo tratado con Extracto Cítrico soluble (EC)

Los animales no irradiados tratados con EC mostraron una frecuencia de micronúcleos que varía entre 3 y 5 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente y una frecuencia promedio de 4 MN/1000 PCEs. El grupo de animales tratados con EC antes de la exposición de 50 cGy de rayos X muestra una frecuencia de MN entre 7 y 10/1000 PCEs y una frecuencia media de MN de 8 MN/1000 PCEs (Gráfica A2). El grupo de animales irradiados con 50 cGy y posteriormente tratado con EC muestra una frecuencia MN que varía entre 8 y 12 MN/1000 PCEs y una frecuencia media de 10 MN/1000 PCEs (Gráfica A4).

El análisis estadístico ha determinado **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCes entre los grupos de animales tratados con EC y el grupo control de animales irradiados, mostrando que cuando la administración de EC, antes y/o después de la exposición a radiación ionizante, produce una disminución significativa en la aparición de micronúcleos en los eritrocitos policromatófilos en comparación con los animales controles irradiados ($p<0,001$); lo que expresa que la administración de EC posee capacidad genoprotectora, ya sea administrado antes o después de la exposición a la radiación, frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Gráfica A6).

Se ha determinado una magnitud de protección del 57% cuando el EC se administra antes de la exposición a la radiación y el 46,5% cuando el EC se administra inmediatamente después de la exposición a los rayos X (Gráficas A3, A5 y A7).

Grupo tratado con extractos de té verde (TE)

Los animales no irradiados tratados con TE muestran una frecuencia de micronúcleos que varía entre 3 y 5 MN/1000 PCEs con una frecuencia media de 4 MN/1000 PCEs (Gráfica A1). El grupo de animales tratados con TE antes de la exposición a 50 cGy de rayos X muestra una frecuencia de MN entre 12 y 15/1000 PCEs y una frecuencia media de MN de 14 MN/1000 PCEs (Gráfica A2). El grupo de animales irradiados con 50 cGy y posteriormente tratados con TE muestra una frecuencia de MN que varía entre 12 y 16 MN/1000 PCEs y una frecuencia media de micronúcleos de 15 MN/1000 PCEs (Gráfica A4).

El análisis estadístico ha determinado **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCes entre el grupo de animales tratados con TE y el grupo control de animales irradiados, mostrando que la administración de TE, antes y/o después de la exposición a radiación ionizante, provoca la disminución significativa en la aparición de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos en comparación con los animales controles irradiados ($p<0,01$); lo que expresa que la administración de TE tiene capacidad genoprotectora, ya sea que

se administre antes o después de la exposición a la radiación, frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Gráfica A6).

Se ha determinado una magnitud de protección del 25% cuando el TE se administra antes de la exposición a la radiación y del 20% cuando se administra inmediatamente después de la exposición a los rayos X (Gráficas A3, A5 y A7).

Grupo tratado con Propiltiouracilo (PTU).

Los animales no irradiados tratados con PTU expresan una frecuencia de micronúcleos que varía entre 3 y 5 MN/1000 PCEs y una frecuencia promedio de 4,6 MN/1000 PCEs (Gráfica A1). El grupo de animales tratados con PTU antes de la exposición a 50 cGy de rayos X muestra una frecuencia de MN entre 12 y 15/1000 PCEs como valores mínimos y máximo respectivamente y una frecuencia media de MN de 13 MN/1000 PCE (Gráfica A2). El grupo de animales irradiados con 50 cGy e inmediatamente después tratados con PTU muestra una frecuencia MN que oscila entre 18 y 22 MN/1000 PCEs con una media de 20 MN / 1000 PCEs (Gráfica A4).

El análisis estadístico determina **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCE entre el grupo de animales tratados con PTU antes y después de la exposición a la irradiación respecto al grupo control irradiado, mostrando que la administración de PTU antes de la exposición a radiación ionizante provoca una disminución significativa en la aparición de micronúcleos en comparación con los animales controles irradiados y con los animales tratados con PTU después de la irradiación ($p < 0,01$); lo que expresa que la administración de PTU muestra capacidad genoprotectora frente al daño inducido por la radiación ionizante solo cuando se administra antes de la exposición a la radiación n (Gráfica A6).

Se ha obtenido una magnitud de factor de protección del 30% cuando se administra el PTU antes de la exposición a la radiación, pero ausencia de capacidad protectora cuando se administra inmediatamente después de la exposición a rayos X (Gráficas A3, A5 y A7).

Grupo tratado con Dimetilsulfóxido (DMSO).

Los animales no irradiados tratados con DMSO muestran una frecuencia de micronúcleos que varía entre 4 y 6 MN/1000 PCEs y una frecuencia media de 5,1 MN/1000 PCEs observada (Gráfica A1). El grupo de animales tratados con DMSO antes de la exposición a 50 cGy de rayos X expresa una frecuencia de MN entre 12 y 15/1000 PCEs con una frecuencia media de MN de 14 MN/1000 PCEs (Gráfica A2). El grupo de animales irradiados con 50 cGy e inmediatamente después tratados con DMSO muestra una frecuencia de MN que oscila entre 19 y 22 MN/1000 PCEs, presentando una media de 22 MN/1000 PCEs (Gráfica A4).

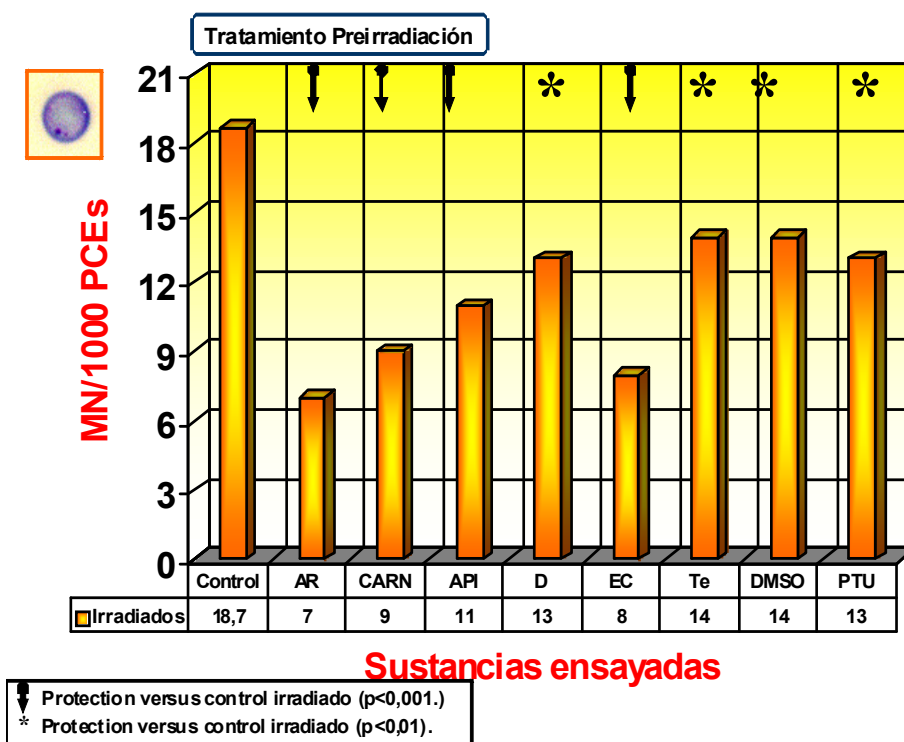
El estudio estadístico determina **diferencias estadísticamente significativas** en la frecuencia de aparición de MNPCEs entre grupo de animales tratados con DMSO antes y después

de la exposición a la irradiación respecto al grupo control irradiado, mostrando que la administración de DMSO antes de la exposición a radiación ionizante produce una disminución significativa de la aparición de micronúcleos en comparación con los animales controles irradiados y los animales tratados con DMSO y posteriormente a la irradiación ($p < 0,01$); lo que expresa que la administración de DMSO tiene capacidad genoprotectora solo cuando se administra antes de la exposición a la radiación frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Gráfica A6).

Se ha determinado una magnitud o factor de protección del 25% cuando se administra el DMSO a los animales antes de la exposición a la irradiación, pero también la ausencia de capacidad genoprotectora cuando el DMSO se administra después de la exposición a la irradiación (Gráficas A3, A5 y A7).

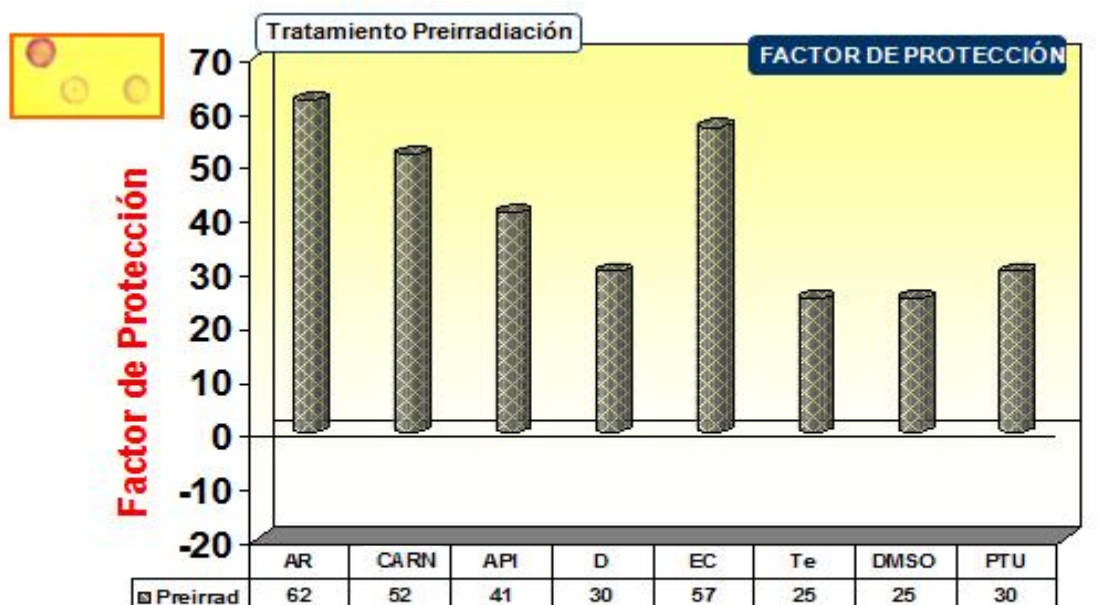
Resultados del análisis estadístico de eritrocitos policromatófilos micronucleados.

1. Los animales controles irradiados muestran un **aumento significativo** de MN respecto a los animales controles no irradiados ($p < 0,001$), mostrando que la exposición a radiación ionizante provoca un aumento significativo en la frecuencia de MN; lo que expresa el daño genotóxico y cromosómico inducido por la radiación ionizante (Gráficas A2, A4 y A6).
2. Entre los animales controles no irradiados y los animales tratados con las sustancias ensayadas y no irradiados **no se aprecian diferencias estadísticamente significativas**; lo que expresa la carencia de efecto genotóxico producido por la administración de las sustancias ensayadas (Gráfica A6).
3. Los grupos de animales tratados con AR, **CAR, API y EC** antes de la irradiación muestran una **disminución significativa** en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos en comparación con el grupo control irradiado ($p < 0,001$) (Gráfica A2). Los grupos tratados con **Diosmina, TE, DMSO y PTU** lo producen también aunque en menor grado ($p < 0,01$) (Gráfica A2). En ambos casos las sustancias administradas provocan la disminución de la frecuencia de aparición de MN expresando la capacidad genoprotectora de cada sustancia frente al daño genotóxico y cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figura A6).



Gráfica A2. Frecuencia de eritrocitos policromatófilos micronucleados (MnPCE) en células de médula ósea de ratón tratadas previamente con sustancias a ensayar antes de la exposición a dosis bajas de rayos X (↓: ($p < 0,001$) frente al grupo de control irradiado; (*) ($p < 0,01$) versus el grupo de control irradiado)

4. Los grupos de animales tratados con **AR, CAR, API y EC** inmediatamente después de la irradiación muestran una **disminución significativa** en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos respecto al grupo control irradiado ($p < 0,001$) (Gráfica A4), así como los grupos de animales tratados con **Diosmina, TE**, lo producen en menor grado ($p < 0,01$) e incluso ninguno en algunas sustancias ensayadas como el **DMSO y PTU** (NS) (Gráfica A4); mostrando que la administración de dichas sustancias producen una disminución en la frecuencia esperada de aparición de MN PCEs en los animales irradiados con diferente intensidad. Lo que expresa la capacidad genoprotectora de cada una de ellas frente al daño genotóxico o cromosómico inducido por la radiación ionizante (Gráfica A6).



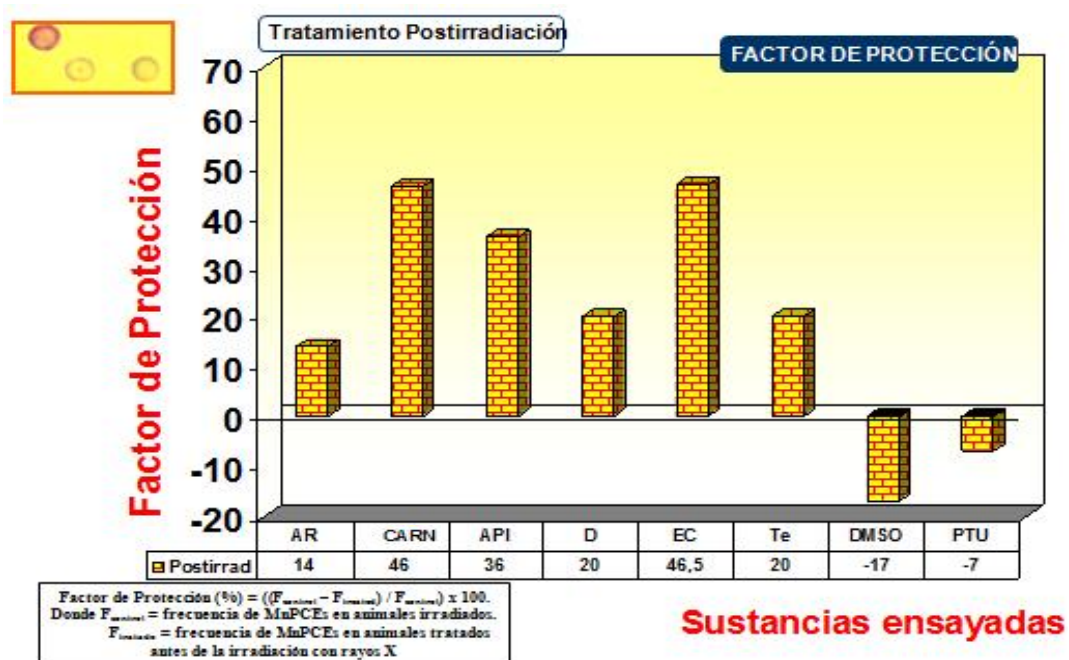
Factor de Protección (%) = $(F_{\text{preirrad}} - F_{\text{irradiado}}) / F_{\text{irradiado}} \times 100$.
 Donde F_{preirrad} = frecuencia de MnPCEs en animales irradiados.
 $F_{\text{irradiado}}$ = frecuencia de MnPCEs en animales tratados antes de la irradiación con rayos X.

Sustancias

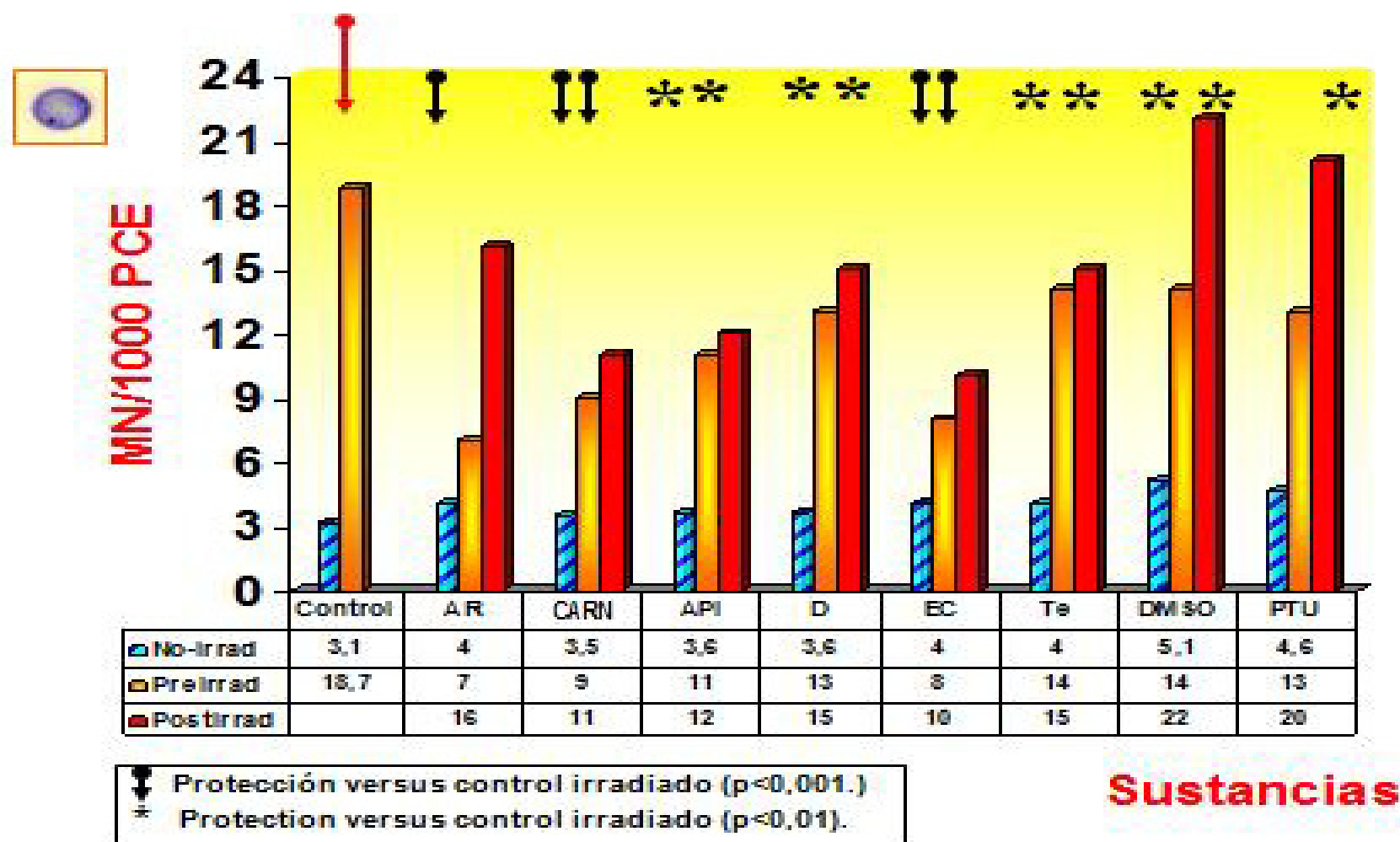
Gráfica A3. Magnitud de la protección (FP) de las diferentes sustancias administradas antes de la exposición a dosis bajas de rayos X.



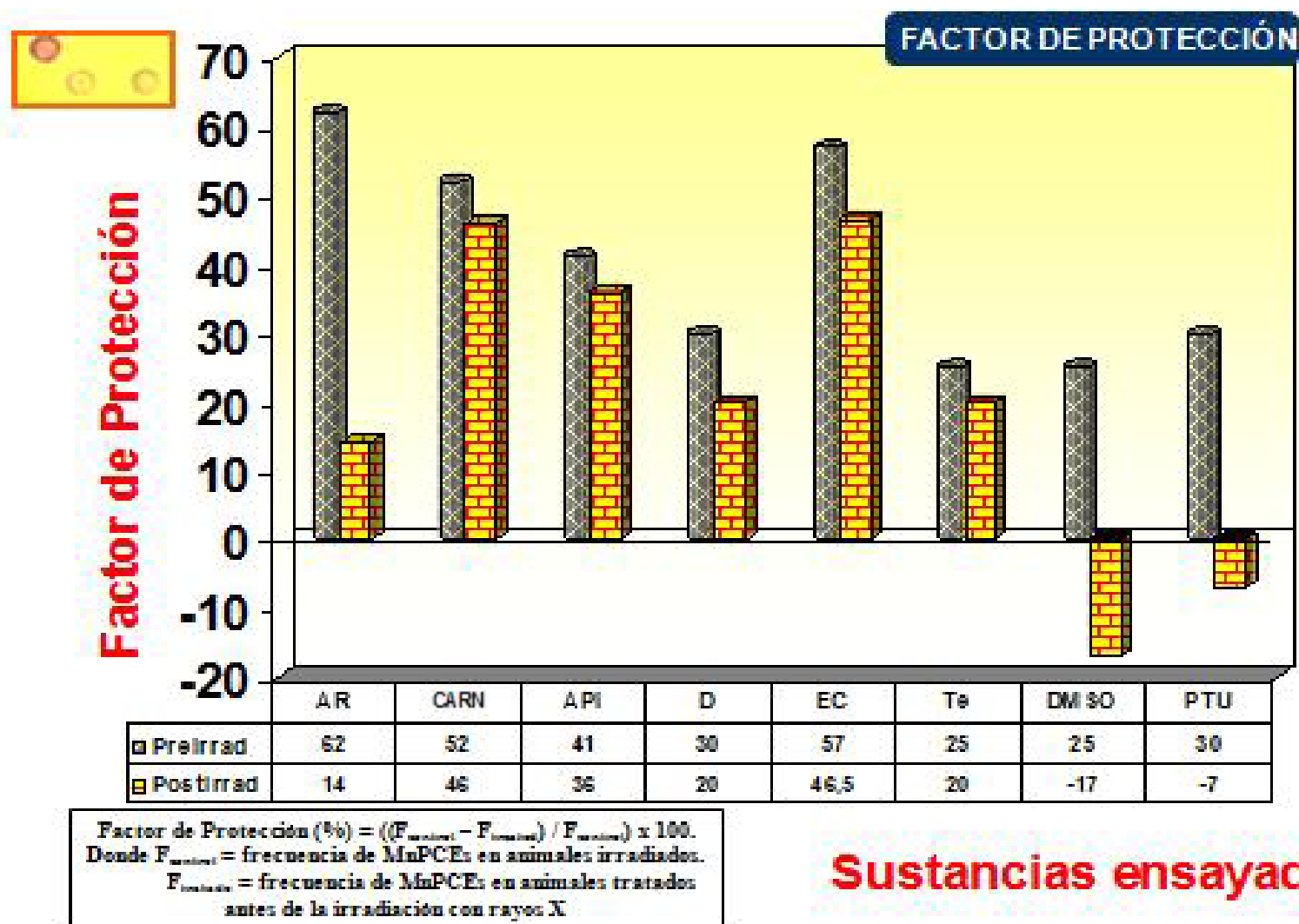
Gráfica A4. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos (MNPCEs) de médula ósea de ratón. Sustancias administradas inmediatamente después de la exposición a dosis bajas de rayos X (↓): ($p < 0,001$) frente al grupo de control irradiado; (*): ($p < 0,01$) frente al grupo control irradiado).



Gráfica A5. Magnitud de la protección (FP) de las sustancias ensayadas administradas inmediatamente tras la exposición a rayos X.



Gráfica A6. Frecuencia de Micronúcleos en los tratamientos pre y post irradiación de las diferentes sustancias ensayadas (MNPCE)
 (↓: ($p < 0,001$) versus el grupo de control irradiado; (*): $p < 0,01$ versus el grupo de control irradiado)



Gráfica A7. Magnitudes de protección (FP) de los tratamientos pre y post irradiación obtenidas en ratones machos adultos tratados con diferentes sustancias e irradiados con 50 cGy de rayos X.

IV. 3. Resultados.

**ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS IRRADIADOS BLOQUEADOS
CITOCINETICAMENTE (CBMN)**

IV. 3. RESULTADOS

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS IRRADIADOS BLOQUEADOS CITOCINETICAMENTE (CBMN)

MUESTRAS CONTROLES

La frecuencia de micronúcleos determinada en las muestras controles oscila entre 5 y 15 MN/500 CB con una frecuencia media de 10 MN/500 CB. Este valor, por tanto, corresponde a la frecuencia basal o espontánea de micronúcleos en las muestras controles no irradiadas de nuestro estudio. En las muestras controles irradiadas la frecuencia de aparición de MN ha oscilado entre 24 y 29 MN/500 CB con una frecuencia media de 26 MN/500CB tras la exposición a la dosis de rayos X administrada en el estudio (Figuras CB1 y CB2).

Se han examinado diferentes sustancia antioxidantes para determinar su capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante en linfocitos de sangre periférica humana cuando se administran antes y después de la exposición a la radiación (tratamiento de pre-irradiación y tratamiento de post irradiación). Los resultados de estos ensayos se presentan a continuación:

- TRATAMIENTO CON ACIDO ROSMARINICO (AR)

En las muestras tratadas con **ácido rosmarínico** se ha determinado una frecuencia de MN que variaba de 9 a 15 MN/500 CB con un promedio de 12 MN/500 CB, no determinándose diferencias estadísticamente significativas con los resultados obtenidos en las muestras controles no irradiadas cuya frecuencia de aparición de MN promedio fue de 10 MN/500 CB; lo que expresaría ausencia de genotoxicidad del AR a las dosis ensayadas. En las muestras tratadas con **ácido rosmarínico** antes de la exposición a la radiación ionizante se ha

determinado una frecuencia de MN que varía entre 10 y 14 MN/500 CB con un promedio de 11 MN/500 CB, lo que permite determinar diferencias estadísticamente significativas respecto a las muestras controles irradiadas (26 MN / 500 CB); lo que expresa una capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico o cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figura CB1). En las muestras tratadas con **ácido rosmarínico** después de la exposición a la radiación, se determina una frecuencia MN que oscila entre 20 y 29 MN/500 CB con una frecuencia promedio de aparición de 24 MN/500 CB, lo que representa un aumento significativo ($p < 0.001$) en la frecuencia promedio de aparición de MN respecto a las muestras de control tratadas preirradiación con la misma sustancia (12 MN/500 CB) y no presenta diferencias con las muestras controles irradiadas; lo que expresa una ausencia de capacidad genoprotectora cuando el AR se administra inmediatamente tras la exposición a los rayos X (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en muestras pretratadas con ácido rosmarínico antes de la exposición a la irradiación en comparación con las muestras de control irradiadas (26 MN/500 BC) muestra diferencias significativas ($p < 0.001$), mostrando una disminución significativa en la aparición de MN; lo que expresa la capacidad genoprotectora del AR cuando se administra preirradiación. Sin embargo el análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras tratadas con ácido rosmarínico después de la irradiación muestra que no hay diferencias significativas en la frecuencia de aparición de MN respecto a las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB, pero sí las hay con las muestras tratadas con AR antes de la exposición a rayos X; lo que expresa una ausencia de capacidad genoprotectora del AR post irradiación frente al daño genotóxico inducido por los rayos X y establece sus diferencias con el momento de administración del AR, ya que esta capacidad protectora existe sólo cuando se administra antes de la exposición a la radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **factor de protección (PF)** de las muestras tratadas con **ácido rosmarínico** antes de la exposición a la irradiación es de 57,7%, mientras que el PF de las muestras tratadas después de la exposición a la radiación es del 7,7% (Tabla CB1 y Figura CB4, Figura CB5 y Figura CB6).

- TRATAMIENTO CON PROCIANIDINAS (P90)

En las muestras tratadas con **P90** se ha determinado una frecuencia de aparición de MN que varía de 6 y 12 MN/500 CB con un promedio de 9 MN/500 CB; por lo que no se encuentran diferencias significativas con la frecuencia de las muestras de control no irradiadas, expresando ausencia de genotoxicidad del P90 sobre las células estudiadas. En las muestras tratadas con **P90** antes de la exposición a la radiación, se ha determinado una frecuencia de MN que oscila entre 7 y 25 MN/500 CB con una frecuencia promedio de aparición de 12 MN/500 CB; mostrando una disminución significativa de la frecuencia de MN respecto a las muestras controles irradiadas (26 MN/500CB). En las muestras tratadas con **P90** después de la

exposición a la radiación se ha obtenido una frecuencia de aparición de MN que oscila entre 10 y 22 MN/500 CB y una frecuencia promedio de 16 MN/500 CB (Figuras CB1; CB2 y CB3)

El análisis estadístico determina diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de MN de las muestras irradiadas tratadas previamente con P90 en comparación con muestras de control irradiadas (26 MN/500 CB), mostrando una reducción significativa de MN ($p < 0.001$); expresando que el tratamiento con P90 antes de la exposición a radiación presenta capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico inducido por los rayos X (Figura CB1). De igual forma, el análisis estadístico muestras irradiadas antes del tratamiento con P90 refleja una diferencia significativa ($p < 0.001$) en comparación con las muestras de control irradiadas (26 MN/500 CB); expresando una capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **factor de protección (PF)** obtenido para las muestras tratadas con **P90** preirradiación es del 53,8%, mientras que las muestras tratadas con P90 después de la exposición a la radiación muestran un PF del 38,5% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

- TRATAMIENTO CON ÁCIDO CARNÓSIDO (CAR)

Las muestras tratadas con **ácido carnósido** muestran una frecuencia de MN que oscila entre 9 y 11 MN/500 CB y un promedio de 10 MN/500 CB. No muestra diferencias significativas con las muestras controles no irradiadas, expresando ausencia de capacidad genotóxica propia. En las muestras tratadas con **ácido carnósido** antes de la exposición a la radiación, se determina una frecuencia de MN que oscila entre 10 y 15 MN/500 CB y una frecuencia promedio de 13 MN por 500 CB. En las muestras tratadas con **ácido carnósido** después de la exposición a la radiación hemos determinado una frecuencia de MN que oscila entre 12 y 17 MN/500 CB y una frecuencia promedio de 15 MN/500 CB (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con ácido carnósido antes de la irradiación muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) con las muestras controles irradiados (26 MN/500 CB); mostrando una reducción significativa de MN en las muestras tratadas con P90; expresando la capacidad genoprotectora del P90 frente al daño cromosómico inducido por los rayos X. De igual forma el análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras inicialmente irradiadas antes del tratamiento posterior con ácido carnósido refleja una diferencia significativa ($p < 0.001$) respecto a las muestras control irradiadas (26 MN/500 CB); expresando, de igual manera, una capacidad genoprotectora del P90 frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **Factor de Protección (PF)** que hemos determinado en las muestras tratadas con ácido carnósido previo a la irradiación es del 50%, y un PF si se administra después de la exposición a los rayos X es del 42,3% (Tabla CB1 y Figura CB4; CB5 y CB6).

- **APIGENINA (API) DISUELTA EN DMSO**

En las muestras tratadas con **Apigenina disuelta en DMSO** la frecuencia de MN varia entre 7 y 11 MN/500 CB y una media de 9 MN/500 CB. No se determinan diferencias significativas con las muestras controles no irradiadas, por lo que no se aprecia capacidad genotóxica en la administración de Apigenina/DMSO administrada. En las muestras pretratadas con **Apigenina disuelta en DMSO** antes de la exposición a la radiación se establece una frecuencia promedio de 13 MN/500 CB; mostrando una reducción significativa de MN respecto a las muestras controles irradiadas. En las muestras tratadas con **Apigenina disuelta en DMSO** después de la exposición a la radiación hemos determinado una frecuencia promedio de 16 MN/500 CB, mostrando también una reducción significativa de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con Apigenin disuelta en DMSO muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB); mostrando una reducción significativa en la aparición de MN; lo que expresa una capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante. El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pre-irradiadas antes del tratamiento con Apigenina disuelta en DMSO también muestra diferencias significativas ($p < 0.001$) en la frecuencia de MN en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN / 500 CB); mostrando una reducción significativa en la aparición de MN; lo que expresa, también, la capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El factor de protección (PF) de las muestras tratadas con **Apigenina disuelta en DMSO** antes de la irradiación es del 50%, pero las muestras tratadas con Apigenina disuelta en DMSO después de la exposición a la radiación expresaron sólo un PF de 38,46% (Tabla CB1 y Figura CB4; CB5 y CB6).

- **TRATAMIENTO CON VITAMINA E (E)**

En las muestras tratadas con **Vitamina E**, la frecuencia de aparición de MN varia entre 7 y 13 MN/500 CB con un promedio de 10 MN/500 CB, no determinándose diferencias significativas en la frecuencia de aparición de MN con las muestras controles no irradiadas cuya frecuencia promedio de ocurrencia de MN fue 10 MN/500 CB; expresando ausencia de capacidad genotóxica de la vitamina E sobre las células estudiadas.

En las muestras tratadas con **Vitamina E** antes de la exposición a la radiación se observa una frecuencia promedio de 13 MN/500 CB, lo que muestra una reducción significativa en la frecuencia de aparición de MN entre este grupo y las muestras de control irradiadas. En las muestras tratadas con **Vitamina E** después de la exposición a la radiación observamos una frecuencia promedio de MN de 17 MN/500 CB que también es significativamente menor que la frecuencia de las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con Vitamina E antes de la exposición a la irradiación muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN / 500 CB), mostrando una reducción significativa de la frecuencia de aparición de MN y expresando, con ello, la capacidad genoprotectora de la vitamina E frente al daño genotóxico inducido por los rayos X. De igual forma, el análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras tratadas con vitamina E después de la irradiación refleja una diferencia significativa ($p < 0.001$) respecto a las muestras controles irradiadas (26 MN / 500 CB), mostrando una reducción también del número de MN y expresando, de igual forma, la capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **Factor de protección (PF)** de las muestras tratadas con **Vitamina E** antes de la irradiación es del 50%, mientras que las muestras tratadas con vitamina E después de la exposición a la radiación consiguen un PF del 34,6% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

- **TRATAMIENTO CON CARNOSOL (COL)**

En las muestras tratadas con **Carnosol**, la frecuencia de aparición de MN varía entre 8 y 12 MN/500 CB y una media de 10 MN/500 CB, no determinándose diferencias estadísticamente significativas con las muestras controles no irradiadas; expresando con ello la ausencia de genotoxicidad del carnosol sobre las células estudiadas. Las muestras tratadas con **Carnosol** antes de la exposición a la radiación presentan una frecuencia de MN que oscila entre 13 y 17 MN/500 CB y una frecuencia media de 14 MN/500 CB. En muestras tratadas con **Carnosol** después de la irradiación, la frecuencia de aparición de MN varía entre 13 y 16 MN/500 CB con una frecuencia media de 14 MN/500 CB, mostrando una reducción significativa de MN respecto a las muestras controles irradiadas. Las muestras tratadas con **Carnosol** antes de la exposición a la radiación expresaron una frecuencia de MN promedio de 14 micronúcleos/500 CB, mostrando también una reducción significativa de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con Carnosol antes de la irradiación presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB), mostrando que el tratamiento con Carnosol antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia esperada de aparición de MN y, por lo tanto, expresa una capacidad de genoprotección contra el daño genotóxico y cromosómico inducido por los rayos X. De igual forma, el análisis estadístico realizado sobre la frecuencia de aparición de MN en las muestras irradiadas que fueron posteriormente tratadas con Carnosol muestra diferencias significativas ($p < 0.001$) en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB), mostrando una reducción similar a la anterior en la frecuencia de aparición de MN en las muestras controles irradiadas;

expresando la existencia de una capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico inducida por la radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **Factor de protección (PF)** de las muestras tratadas con **Carnosol** antes de la exposición a la irradiación ha sido del 46,1% (Tabla CB1 y Figura CB5 y CB6).

- TRATAMIENTO CON EXTRACTO CITRICO SOLUBLE (CE)

Las muestras tratadas con **CE** presentan una frecuencia de MN que oscila entre 8 y 12 MN/500 CB con una media de 10 MN/500 CB, no determinándose diferencias significativas en la frecuencia de aparición de MN entre este grupo y las muestras de control no irradiadas, lo que muestra la ausencia de capacidad genotóxica de la sustancia ensayada. En las muestras tratadas con **CE** antes de la exposición a la radiación, la frecuencia de MN determinada varia entre 13 y 20 MN/500 CB con una frecuencia promedio de 16 MN/500 CB, mostrando una reducción ($p < 0.001$) en la frecuencia de aparición de MN en comparación con las muestras controles irradiadas (Figura CB2). En las muestras tratadas con **CE** después de la exposición a la radiación, la frecuencia MN varia entre 16 y 22 MN/500 CB con una frecuencia promedio de aparición de 19 MN/500 CB, lo que también representa una reducción de MN en comparación con las muestras controles irradiadas. En las muestras tratadas con **CE** después de la exposición a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de 16 MN/500 CB, lo que también representa una reducción de MN respecto a la esperada en las muestras controles irradiadas sin tratamiento farmacológico alguno (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con CE antes de la exposición a la irradiación muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) respecto a las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB); mostrando una reducción significativa de la frecuencia de MN esperados; lo que expresa que el tratamiento con CE antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia de aparición de MN y, por lo tanto, ofrece una capacidad genoprotectora frente al daño inducido por los rayos X. En las muestras tratadas con **CE** después de la exposición a la radiación, también se determinan diferencias significativas ($p < 0.05$) en la frecuencia de MN en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB), mostrando una reducción de la frecuencia de MN esperados y expresando, con ello, una capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **Factor de Protección (PF)** que se ha obtenido de las muestras tratadas con **CE** antes de la irradiación es del 38,5%, mientras que el PF para las muestras tratadas CE después de la exposición a la radiación alcanzó el 26,9% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

- TRATAMIENTO CON VITAMINA C (C)

Las muestras tratadas con **Vitamina C** presentan una frecuencia MN que oscila entre 6 y 12 MN/500 CB con un promedio de 9 MN/500 CB, no determinándose diferencias significativas

con las muestras controles no irradiadas, expresando la ausencia de capacidad genotóxica de la sustancia ensayada. En las muestras tratadas con **Vitamina C** antes de la exposición a la radiación, la distribución de la frecuencia MN varía entre 12 y 21 MN/500 CB con una frecuencia promedio de 16 MN/500 CB que representa una reducción significativa respecto a la frecuencia de MN determinada en las muestras controles irradiadas (Figura CB1). En las muestras tratadas con **Vitamina C** después de la irradiación se ha determinado una frecuencia MN que oscila entre 18 y 23 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de 21 MN/500 CB, que también es menor a la presentada por las muestras controles irradiadas (Figura CB2). En las muestras tratadas con **Vitamina C** antes de la exposición a la radiación se ha determinado una frecuencia media de 16 MN/500 CB, que también representa una reducción significativa de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con vitamina C antes de la exposición a la irradiación muestra una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en comparación con las muestras de control irradiadas (26 MN/500 CB), lo que expresa que el tratamiento con vitamina C antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia esperada de MN y, por lo tanto, presenta una capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico inducido por la radiación ionizante. En las muestras tratadas con **Vitamina C** después de la irradiación también se ha determinado una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB); expresando que el tratamiento posterior a la irradiación con vitamina C disminuye la frecuencia esperada de aparición de MN y, por lo tanto, ofrece algún grado de genoprotección contra el daño cromosómico inducido por la radiación (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **Factor de protección (PF)** determinado en las muestras tratadas con **Vitamina C** antes de la exposición a la irradiación es del 38,5%, mientras que en las muestras tratadas con vitamina C después de la exposición a la radiación presentan un PF del 19,2% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

- **TRATAMIENTO CON AMIFOSTINA (WR-2721 O ETIOL®) (AMIF)**

Las muestras tratadas con **amifostina** presentan una frecuencia de MN que oscila entre 8 y 14 MN/ 00 CB con un promedio de 11 MN/500 CB, no determinándose diferencias significativa entre estos resultados y los que presentan las muestras controles no irradiadas, lo que expresa la ausencia de capacidad genotóxica de la amifostina. En las muestras tratadas con **amifostina** antes de la exposición a la radiación, la frecuencia promedio de ocurrencia de MN establecida es de 18 MN/500 CB, determinándose una reducción significativa en la frecuencia de MN respecto a las muestras controles irradiadas. En las muestras tratadas con **amifostina** después de la exposición a la radiación se determinó una frecuencia promedio de 27 MN/500 CB lo que representa un ligero aumento de MN comparado con las muestras de controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con amifostina antes de la exposición a la irradiación refleja una disminución significativa ($p < 0.001$) en comparación con las muestras irradiadas de control (26 MN/500 CB), expresando que el tratamiento con amifostina antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia esperada de MN y, por lo tanto, presenta una capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por los rayos X. En las muestras tratadas con **amifostina**, el análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras irradiadas antes del tratamiento con amifostina no presenta diferencias significativas con respecto a las muestras de control irradiadas (26 MN/500 CB), lo que expresa por tanto que el tratamiento posterior a la irradiación con amifostina no disminuye la frecuencia esperada de MN y, por lo tanto, no ofrece ningún nivel de protección contra el daño inducido por la radiación (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **factor de protección (PF)** de las muestras tratadas con **amifostina** antes de la irradiación es del 38,5%; sin embargo, en las muestras tratadas con amifostina después de la exposición a la radiación muestran un valor de PF negativo de -3,85% (Figura CB4, CB5 y CB6).

- **TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE TÉ VERDE (TE)**

Las muestras tratadas con **TE** presentan una frecuencia de distribución de MN entre 9 y 11 MN/500 CB con un promedio de 10 MN/500 CB, no determinándose diferencias significativas en comparación con las muestras controles no irradiadas cuya frecuencia promedio de ocurrencia de MN fue 10 MN / 500 CB; expresando la ausencia de capacidad genotóxica del extracto de TE ensayado. En las muestras tratadas con **TE** antes de la exposición a la radiación, la distribución de frecuencias media de MN establecida es 20 MN/500 CB, representando reducción de la frecuencia de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figura CB1). En las muestras tratadas con **TE** después de la exposición a la radiación, la frecuencia media de aparición de MN determinada es de 24 MN/500 CB, mostrando una reducción en la frecuencia MN sobre las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en muestras irradiadas pretratadas con TE determina una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de MN ($p < 0.05$) en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB); lo que expresa que el tratamiento con TE antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia esperada de aparición de MN y, por lo tanto, ofrece capacidad genoprotectora frente al daño inducido por la radiación ionizante (Figura CB1). En las muestras tratadas con **TE** después de la exposición, el análisis realizado sobre la frecuencia de MN en las muestras irradiadas antes del tratamiento con TE no refleja diferencias significativas con las muestras de control irradiadas (26 MN/500 CB), lo que expresa que el tratamiento posterior a la irradiación con TE no disminuye la frecuencia esperada de ocurrencia de MN y, por lo tanto, no ofrece protección contra el daño inducido por radiación ionizante (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **Factor de protección (PF)** de las muestras tratadas con **TE** antes de la irradiación es del 23%; mientras que las muestras tratadas con **TE** después de la exposición a la radiación presentan un PF de 7,69% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

- TRATAMIENTO CON RUTINA (RUT)

La frecuencia de aparición de MN en las muestras tratadas con **Rutina** varia entre 8 y 10 MN/500 CB con un promedio de 9 MN/500 CB, lo que no presenta diferencias significativas con las muestras de control no irradiadas cuya frecuencia media de aparición de MN fue 10 MN/500 CB y expresa la ausencia de capacidad genotóxica del extracto ensayado. En muestras tratadas con **Rutina** antes de la exposición a la radiación la frecuencia MN oscila entre 15 y 29 MN/500 CB con una frecuencia promedio de aparición de 20 MN/500 CB, lo que representa una reducción en la frecuencia de la aparición de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figura CB1). Las muestras tratadas con **Rutina** después de la exposición a la radiación expresaron una frecuencia MN que oscila entre 23 y 25 MN/500 CB con una frecuencia promedio de aparición de 24 MN/500 CB, que representa una pequeña reducción en la frecuencia de MN sobre las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3)

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras irradiadas pretratadas con Rutina muestra una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB), lo que expresa que el tratamiento con rutina antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia esperada de aparición de MN y, por lo tanto, expresa una capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación (Figura CB1). En las muestras tratadas con **Rutina** después de la exposición a la radiación, el análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras irradiadas antes del tratamiento posterior con Rutina no presenta diferencias estadísticamente significativas con las muestras controles irradiadas (26 MN / 500 CB); lo que expresa que el tratamiento posterior a la irradiación con Rutina no conduce a una disminución en la frecuencia esperada de MN, por lo que el tratamiento posterior a la irradiación con Rutina no ofrece protección contra el daño genotóxico inducido por los rayos X (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **factor de protección (PF)** obtenido para las muestras tratadas con **Rutina** antes de la irradiación alcanza el 15,4%; mientras que en las muestras tratadas con Rutina después de la irradiación sólo presentan un FP de 7,7% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

- TRATAMIENTO DIMETILSULFOXIDO (DMSO)

Las muestras tratadas con **DMSO** expresan una frecuencia de aparición de MN que varia entre 10 y 12 MN/500 CB con un promedio de 11 MN/500 CB, no determinándose diferencias estadísticamente significativas con las muestras control no irradiadas (10 MN / 500 CB); lo que expresa una ausencia de genotoxicidad del DMSO sobre la células estudiadas. En las muestras tratadas con **DMSO** antes de la exposición a la radiación se ha determinado una

frecuencia de MN que oscila entre 12 y 34 MN/500 CB con una frecuencia promedio de aparición de 20 MN/500 CB, lo que representa una reducción en la frecuencia de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figura CB1). En las muestras tratadas con **DMSO** después de la exposición a la radiación, la frecuencia de distribución de MN varía entre 11 y 32 MN/500 CB con una frecuencia promedio de 25 MN/500 CB mostrando una ligera reducción en la frecuencia de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con DMSO antes de la exposición a la irradiación muestra diferencias estadísticamente significativas en la aparición de MN en comparación con las muestras controles irradiados (26 MN/500 CB)($p < 0,05$); lo que expresa que el tratamiento de las muestras con DMSO antes de la exposición a la irradiación disminuye la frecuencia esperada de aparición de MN respecto a las muestras controles irradiadas y, por lo tanto, ofrece una capacidad de genoprotección frente al daño cromosómico inducido por los rayos X (Figura CB1) En las muestras tratadas con **DMSO** después de la exposición a la radiación no muestra en estudio estadístico realizado sobre la frecuencia de aparición de MN diferencias significativas en comparación con las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB); lo que expresa que el tratamiento posterior a la irradiación con DMSO no disminuye la frecuencia esperada de aparición de MN y, por lo tanto, no ofrece protección contra el daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figura CB2).

El **Factor de Protección (PF)** de las muestras tratadas con DMSO antes de la exposición a la irradiación es del 23%, mientras que el PF cuando el DMSO se administra tras la exposición a la radiación alcanza el 3,8% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

- **TRATAMIENTO CON QUERCETINA (Q)**

Las muestras tratadas con **quercetina (Q)** expresan una frecuencia de MN que varía entre 9 y 11 MN/500 CB con un promedio de 10 MN/500 CB, no determinándose diferencias estadísticamente significativas con la frecuencia de MN presentada por las muestras controles no irradiadas (cuya frecuencia media de aparición de MN fue 10 MN/500 CB; lo que expresa que en las concentraciones utilizadas no presentan efecto genotóxico alguno sobre las células estudiadas. Las muestras tratadas con **quercetina** antes de la exposición a la radiación expresan una frecuencia de MN que varía entre 25 y 38 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de 31 MN/500 CB, lo que representa un aumento significativo en la frecuencia de aparición de MN sobre las muestras controles irradiadas (Figura CB1). Las muestras tratadas con **quercetina** después de la exposición a la radiación expresaron una frecuencia de MN de entre 30 y 36 MN / 500 CB con una frecuencia promedio de aparición de 33 MN / 500 CB, lo que también representa un aumento en la frecuencia de MN respecto a las muestras controles (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras pretratadas con quercetina antes de la exposición a la irradiación ha determinado que hay diferencias estadísticamente significativas respecto a las muestras controles irradiadas (26 MN/500 CB); lo que muestra que el tratamiento previo a la irradiación con quercetina aumenta la frecuencia esperada de aparición de MN y, por lo tanto, aumenta la capacidad genotóxica de la radiación ionizante no presentando capacidad genoprotectora alguna frente al daño inducido por radiación ionizante ADN (Figura CB1). De similar forma, el análisis estadístico de la frecuencia de MN en las muestras irradiadas antes del tratamiento con quercetina también determina diferencias estadísticamente significativas respecto a las muestras controles irradiadas; lo que expresa que el tratamiento posterior a la irradiación con quercetina aumenta la frecuencia esperada de aparición de MN y, por lo tanto, no ofrece genoprotección contra el daño inducido por radiación ya que éste daño cromosómico se incrementa la administrar la quercetina (Figuras CB1; CB2 y CB3).

El **factor de protección (PF)** de las muestras tratadas con **quercetina** antes de la irradiación es del -34,61%; mientras que las muestras tratadas con quercetina después de la exposición a la radiación presentan un PF de -26,92% (Tabla CB1 y Figuras CB4, CB5 y CB6).

-TRATAMIENTO CON ÁCIDO ZOLEDRÓNICO (Z).

En las muestras tratadas con **Z** se ha determinado una frecuencia de MN que varia entre 28 y 31 MN/500 CB con un promedio de 19 MN/500 CB; lo que muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) respecto a las muestras controles no irradiadas (cuya frecuencia media de aparición es de MN fue 10 MN / 500 CB) y expresa que Z tiene capacidad genotóxica cuando se administra en las concentraciones utilizadas en el estudio. En las muestras tratadas con **Z** antes de la exposición a la radiación se ha determinado una frecuencia promedio de MN de 35 MN/500 CB, lo representa un aumento significativo de MN respecto a las muestras controles irradiadas (Figura CB1). Las muestras tratadas con **Z** después de la exposición a la radiación expresaron una frecuencia promedio MN de 33 MN/500 CB, lo que es significativamente mayor que la determinada en las muestras controles irradiadas (Figuras CB1; CB2 y CB3).

En el estudio estadístico, la administración de **Z** puro (100%) antes de la irradiación produce un aumento significativo en la frecuencia de MN ($p < 0.01$) respecto a las muestras controles irradiadas, lo que expresa un efecto genotóxico inducido por Z (Figura CB2). La administración de Z inmediatamente después de la irradiación también produce un aumento significativo en la frecuencia de MN ($p < 0.01$) respecto a las muestras controles irradiadas, lo que expresa también una capacidad genotóxica mayor de la esperada e inducida por Z (Figuras CB1; CB2 y CB3).

No se puede determinar ningún Factor de Protección; sin embargo, con la modificación de la fórmula podríamos determinar un **factor de sensibilización (FS)** producido durante un

tratamiento combinado de IR + Z que alcanzaría un valor inmediatamente después de la irradiación del 35% (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6). -

FACTORES DE PROTECCIÓN (PFs)

1. Administración de sustancias antes de la irradiación: factores de protección

Los valores más altos del factor de protección (PF) para las muestras tratadas antes de la irradiación se obtuvieron en el grupo tratado con ácido rosmarínico con una mayor capacidad genoprotectora del 57,7%; seguido del grupo tratado con P90 con un PF del 53,8%, siguiendo las muestras tratadas con ácido carnósico, la apigenina disuelta en DMSO y vitamina E, que presentaron todos un PF aproximado del 50%. Siguiendo en eficacia o capacidad genoprotectora están las muestras tratadas con Carnosol (46,1)%, con CE, Vitamina C y Amifostina (todas con un PF aproximado de 38%). Finalmente seguirían el Extracto de Té Verde (23%,) y Rutina (15,3%).

En las muestras tratadas con Quercetina y ácido zoledrónico se obtuvieron valores del factor de protección negativos ya que el tratamiento con esta sustancia aumentó significativamente la frecuencia de micronúcleos con respecto a las frecuencias MN en las muestras controles irradiadas (Figuras CB4, CB5 y CB6; Tabla CB1).

2. Administración de sustancias después de irradiación: factores de protección.

Cuando las muestras fueron tratadas con las sustancias a ensayar inmediatamente después de la exposición a la irradiación, el Carnosol muestra el PF más alto (46,1%) seguido por ácido carnósico (42,3%) seguido por la Apigenina disuelta en DMSO y el P90 (ambos 38,4%). Con menor eficacia genoprotectora están Vitamina E (34,6%), el EC (26,9%), la Vitamina C (19,2%), finalizando con la Rutina, ácido rosmarínico y TE (que expresan un PF aproximadamente del 7%). Las muestras tratadas con DMSO muestran un ligero efecto genoprotector (3,8%); mientras las muestras tratadas con Amifostina, Quercetina mostraron valores negativos de PF (-3,8 y -26,9% respectivamente). El ácido zoledrónico presenta la frecuencia más alta de aparición de MN y muestra una falta completa de capacidad genoprotectora y que podría considerarse como un agente radiosensibilizante (Tabla CB1 y Figura CB4, CB5 y CB6).

Tabla CB1. Factores de protección obtenidos cuando se trataron muestras de sangre periférica humana con las diversas sustancias de prueba.

TEST-SUBSTANCIA	PF (%)	
	Pre-irradiación	Post- irradiación
Acido Rosmarinico	57,69	7,69
P90	53,85	38,46
Acido Carnosico	50	42,31
Apigenina-DMSO	50	38,46
Vitamina E	50	34,61
Carnosol	46,15	46,15
CE	38,46	26,92
Vitamina C	38,46	19,23
Amifostina	38,46	-3,85
Te verde. (TE)	23,08	7,69
Rutin	15,38	7,69
DMSO	0	3,85
Quercetina	-34,61	-26,92
Acido Zoledronico	0	-35,7

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN EL ENSAYO MNCB

1. Muestras controles y sustancias ensayadas

1. El análisis estadístico ha establecido una relación positiva entre la dosis de radiación y la frecuencia de aparición de micronúcleos a través de la relación lineal ($y = \alpha + \beta D$) con un coeficiente de correlación lineal $r^2 = 0,9974$.

2. Las muestras de sangre consideradas como controles irradiadas mostraron un aumento significativo ($p < 0.001$) en el número de micronúcleos en relación con las muestras controles no irradiados. Esto expresa que la exposición a radiación ionizante aumenta significativamente la frecuencia de micronúcleos (Figura CB1 y CB2).

3. Las muestras de sangre no irradiadas tratadas con **ácido rosmarínico, P90, ácido carnósico, apigenina disuelta en DMSO, vitamina E, carnosol, CE, vitamina C, amifostina, extracto de té verde, Rutina, DMSO y quercetina** no presentan diferencias significativas en la frecuencia de aparición de MN respecto a las muestras controles no irradiadas, lo que expresa que la administración de estas sustancias no causa daño genotóxico/cromosómico en comparación con las muestras controles.

2 Administración de sustancias antes de la irradiación.

1. Las muestras de sangre tratadas con **ácido rosmarínico, P90, ácido carnósico, apigenina disuelta en DMSO, vitamina E, P90, carnosol, CE-50, vitamina C y amifostina**, antes de la exposición a la irradiación consiguen una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas; lo que expresa que los tratamientos realizados disminuyen la frecuencia esperada de aparición de micronúcleos como resultado de la irradiación y, por lo tanto, expresan capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1 y CB3).

2. Las muestras de sangre tratadas con extracto de **té verde y Rutina** antes de la irradiación producen también una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la frecuencia de micronúcleos en comparación con las muestras controles irradiadas; lo que expresa también que la administración de estas sustancias antes de la exposición a la radiación ionizante disminuyen la frecuencia esperada de aparición de micronúcleos como resultado de la irradiación y, por lo tanto, expresan una capacidad genoprotectora contra el daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1 y CB3).

3. Las muestras de sangre tratadas con **quercetina y ácido zoledrónico** antes de la irradiación muestran un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas ($p < 0,01$); lo que expresa no sólo la ausencia de cualquier grado de capacidad genoprotectora sino que pueden actuar como sustancias radiosensibilizantes, aumentando el daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB1 y CB3).

3 Administración de las sustancias inmediatamente después de la irradiación.

1. Las muestras de sangre tratadas con **P90, ácido carnósico, apigenina disuelta en DMSO, vitamina E y carnosol** administradas de la exposición a la radiación ionizante muestran una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de la frecuencia de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas; lo que muestra que los tratamientos administrados disminuyen la frecuencia de aparición de micronúcleos inducidos por la irradiación y, por lo tanto, expresan una capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante . (Figuras CB2 y CB3).

2. Las muestras de sangre tratadas con **EC y vitamina C inmediatamente** después de la exposición a la radiación muestran una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas; lo que significa que los tratamientos administrados disminuyen la frecuencia de aparición de micronúcleos esperados como resultado de la irradiación y, por lo

tanto, expresan capacidad genoprotectora frente al daño genotóxico/cromosómico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB2 y CB3)..

3. Las muestras de sangre tratadas con **ácido rosmarínico, amifostina, extracto de té verde, Rutina, DMSO, quercetina y ácido zoledrónico** después de la exposición a la radiación no mostraron una disminución significativa en la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas. Esto determina que el tratamiento con estas sustancias 5 minutos después de la irradiación de las muestras no produce una disminución significativa de las frecuencias aparición de micronúcleos como resultado de la irradiación y, por lo tanto, expresan ausencia de capacidad genoprotectora alguna. Incluso, quercetina y ácido zoledrónico muestran un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas ($p < 0,01$); lo que expresa no sólo la ausencia de cualquier grado de capacidad genoprotectora sino que pueden actuar como sustancias radiosensibilizantes, aumentando el daño genotóxico inducido por la radiación ionizante (Figuras CB2 y CB3).

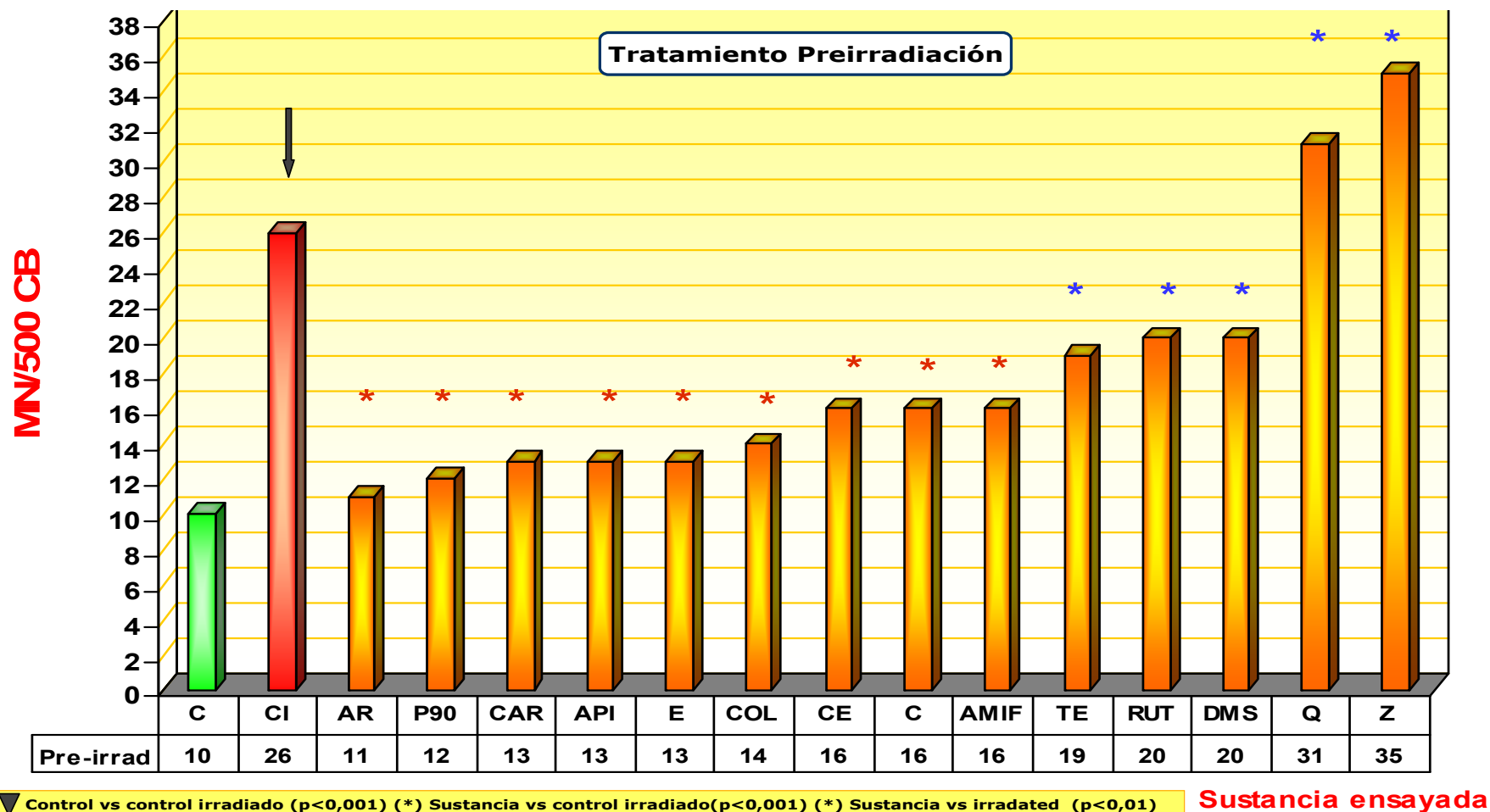


Figura CB1. Frecuencia de Micronúcleos (CBMN) en linfocitos humanos irradiados tratados con las sustancias ensayadas administradas antes de la exposición a radiación ionizante (tratamiento pre-irradiación) ((*): ($p < 0,001$) versus muestras controles irradiadas; (**): ($p < 0,01$) versus muestras controles irradiadas).

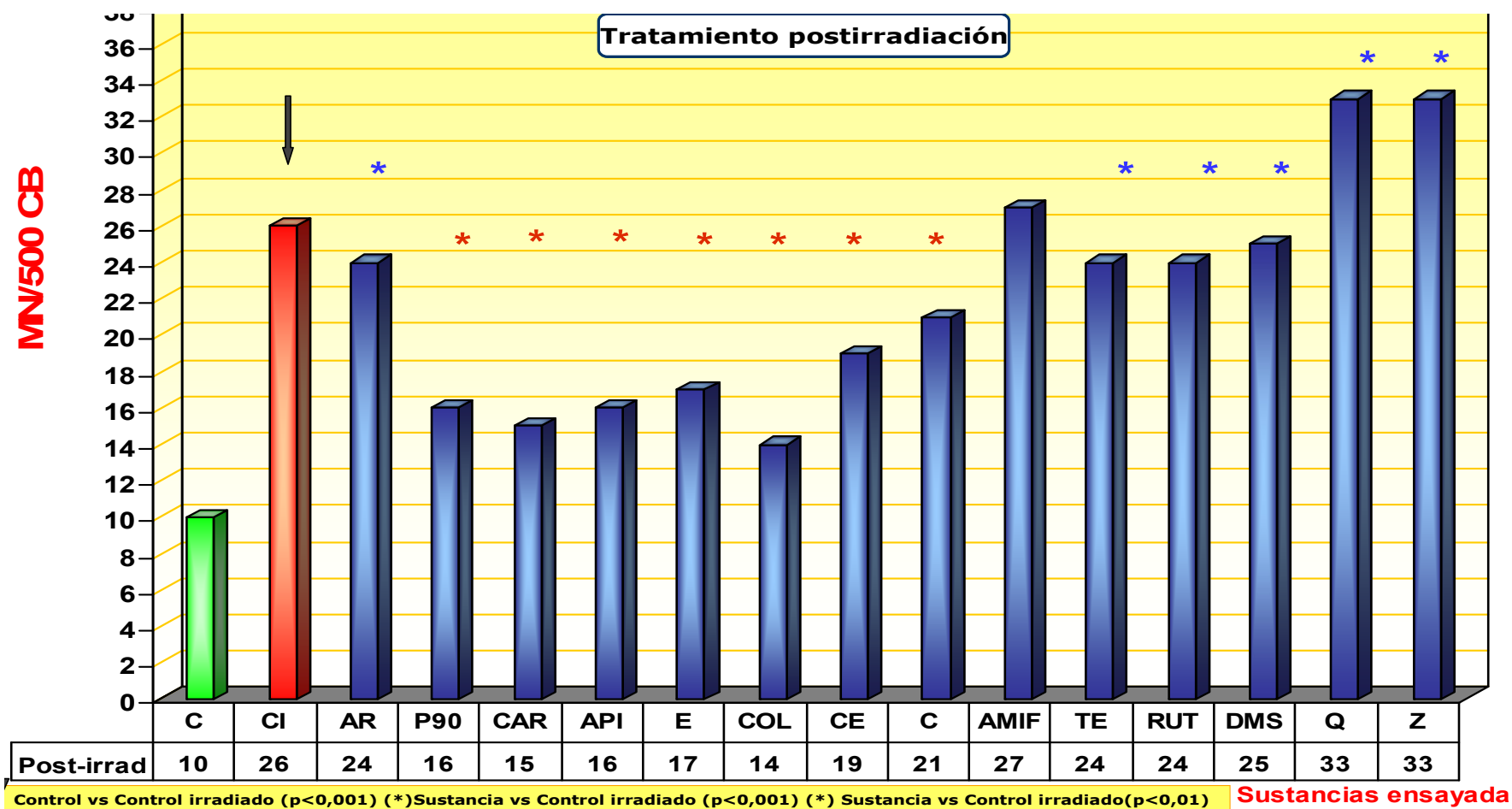
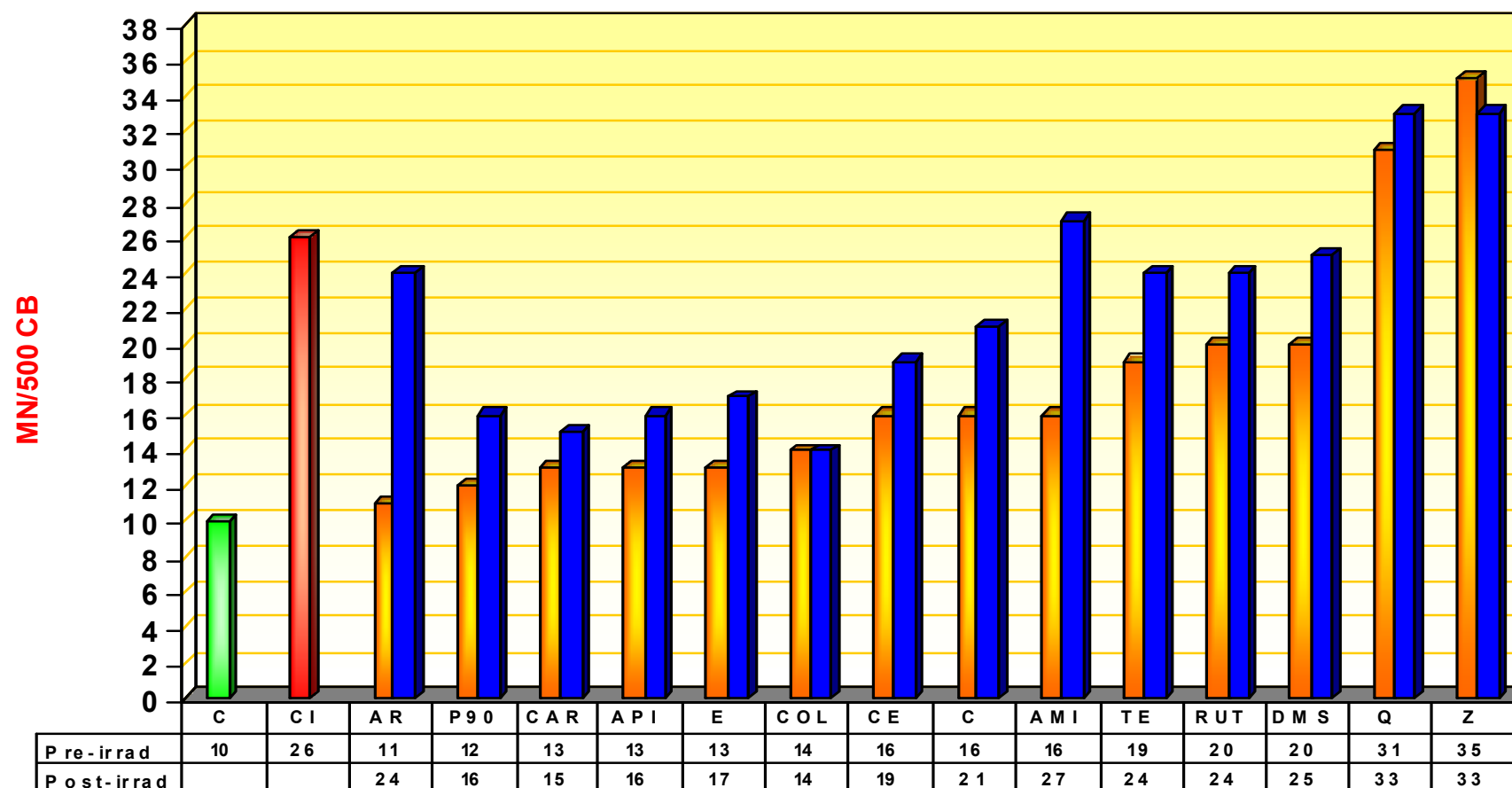


Figura CB2. Frecuencia de Micronúcleos (CBMN) en linfocitos humanos irradiados tratados con las sustancias ensayadas administradas después de la exposición a radiación ionizante (tratamiento post-irradiación) ((*): ($p < 0,001$) versus muestras controles irradiadas; ((*): ($p < 0,01$) versus muestras controles irradiadas).



Sustancias ensayadas

Figure CB3. Frecuencia de Micronúcleos (CBMN) en linfocitos humanos irradiados tratados con las sustancias ensayadas administradas antes y después de la exposición a radiación ionizante .

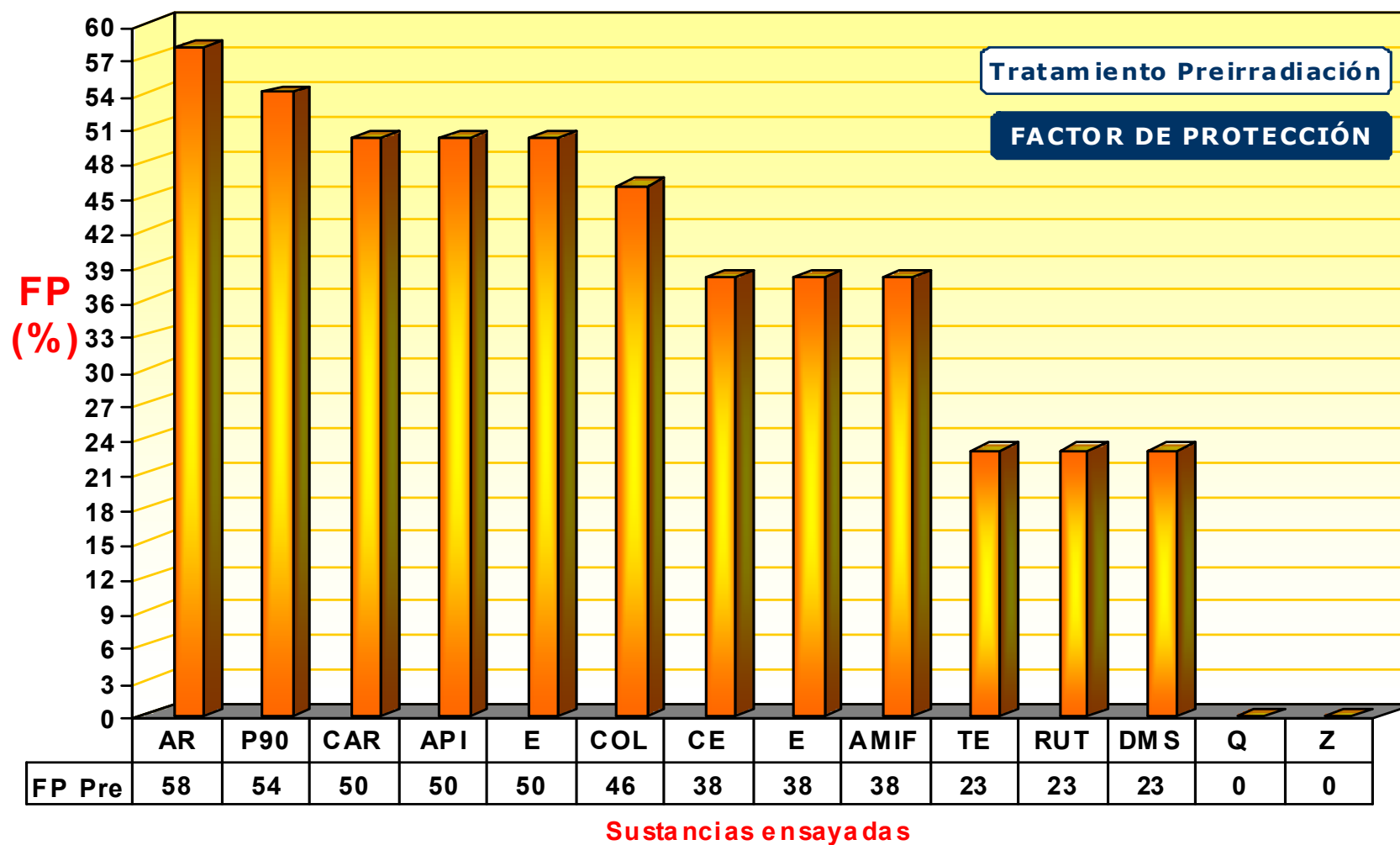


Figura CB4. Factor o Magnitud de Protección en linfocitos humanos irradiados tratados con las sustancias ensayadas administradas antes de la exposición a radiación ionizante.

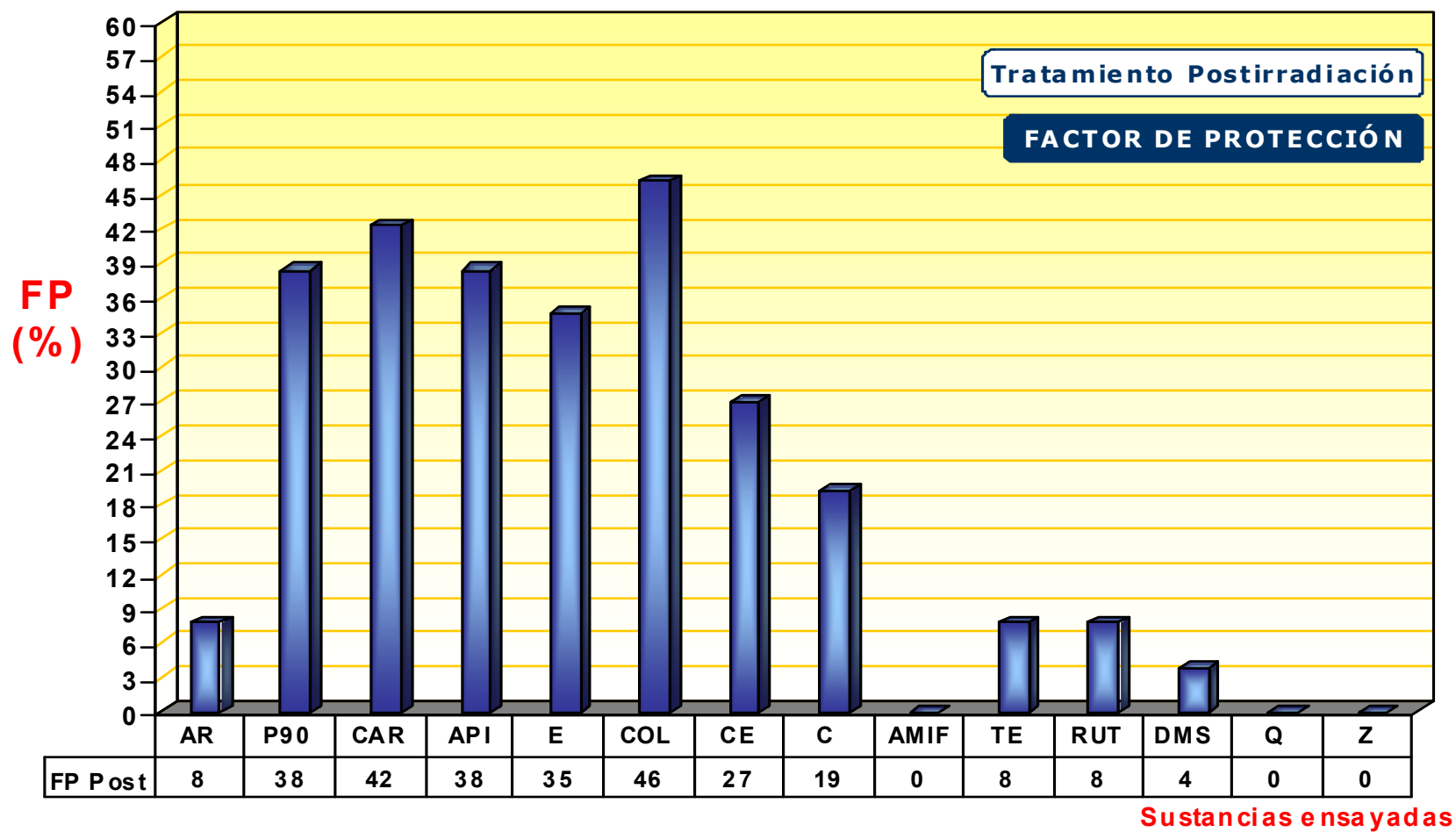


Figura CB5. Factor o Magnitud de Protección en linfocitos humanos irradiados tratados con las sustancias ensayadas administradas después de la exposición a radiación ionizante.

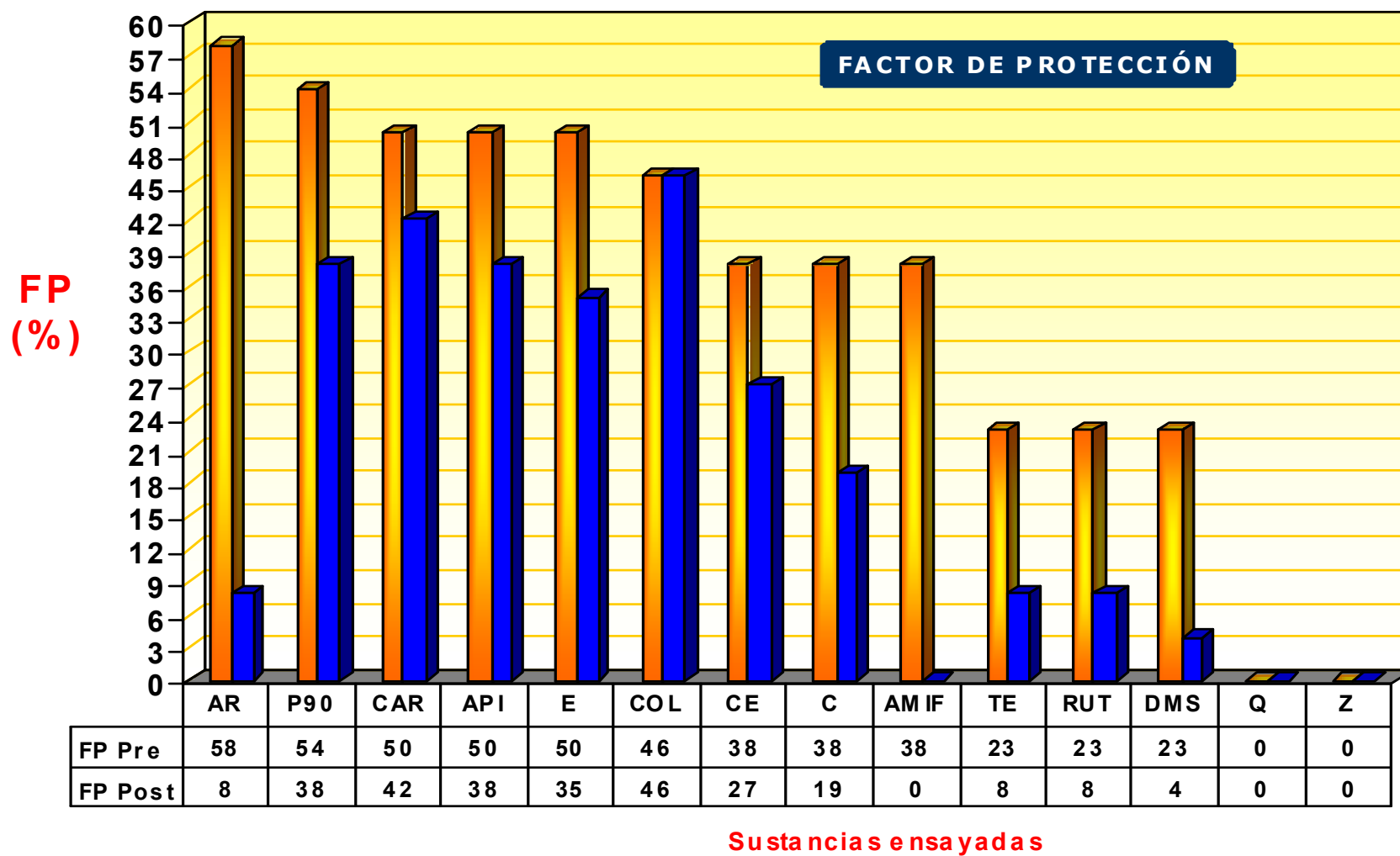


Figura 6. Factor o Magnitud de Protección en linfocitos humanos irradiados tratados con las sustancias ensayadas administradas antes y después de la exposición a radiación ionizante (tratamientos pre y post irradiación, respectivamente).

IV. Resultados.

RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS PNT2 (CÉLULAS EPITELIALES DE PRÓSTATA HUMANAS)

IV. RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS PNT2 (CÉLULAS EPITELIALES DE PRÓSTATA HUMANAS)

- **Porcentaje de supervivencia celular en los cultivos controles tras la exposición a rayos X**

Los resultados de la supervivencia celular de las células PNT2 que no fueron tratadas con ninguna sustancia pero que estuvieron expuestas a dosis de rayos X de 0 Gy hasta 22 Gy se muestran a continuación en la figura C1a; la supervivencia celular obtenida en la exposición a rayos X de 0 Gy hasta 10 Gy se expone en la figura C1b. Se observa una progresiva disminución en el número de células vivas que es inversamente proporcional a la dosis de radiación administrada y al período de incubación tras la irradiación utilizado, de tal forma que cuanto mayor es la dosis de radiación y cuanto mayor es el período de incubación posterior a la irradiación, menor es la supervivencia celular de las células PNT2. Tras la exposición a 10 Gy de rayos X, la proporción de células supervivientes se redujo aproximadamente en un 30% y en un 40% cuando se examinaron a las 24 y 48 horas tras la radiación respectivamente ($p < 0,001$); lo que expresa el daño citotóxico inducido por la exposición a los rayos X (Tabla C1; Fig. C1b).

Tabla C1. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares controles de epitelio de próstata humano normal PNT2

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

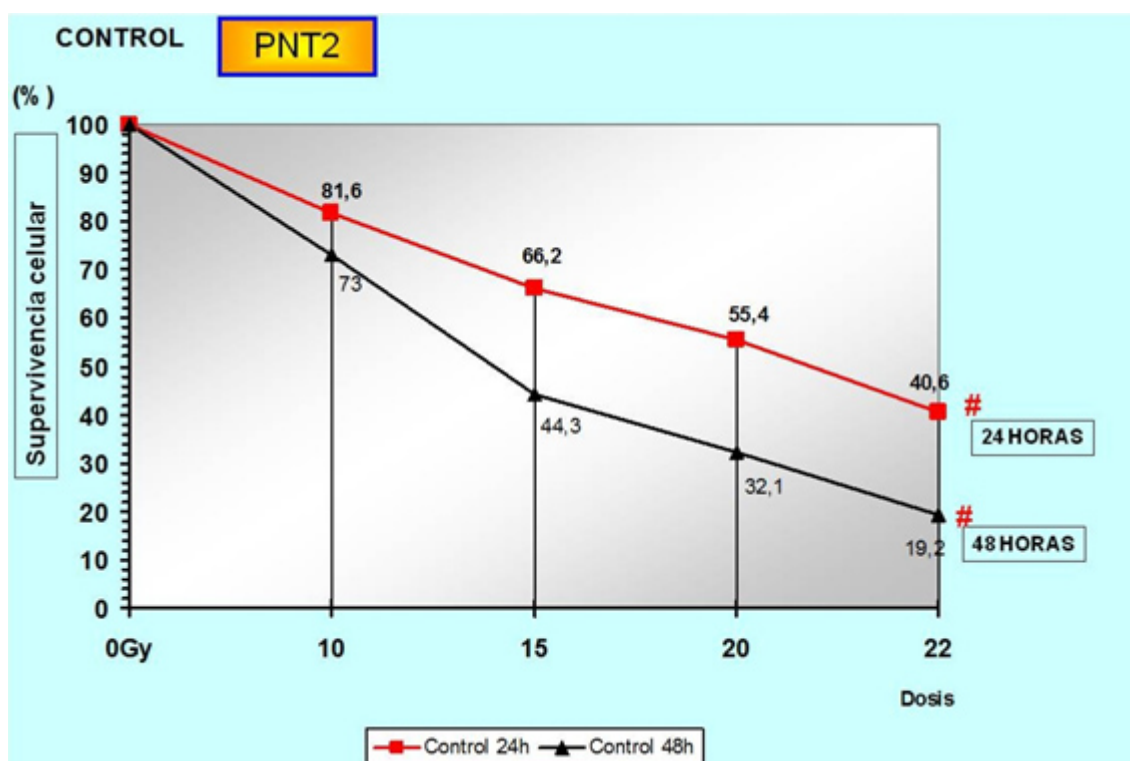


Figura C1a. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares controles de epitelio de próstata humano normal PNT2 irradiados hasta 22 Gy ((#): ($p < 0,001$) versus células controles irradiadas).

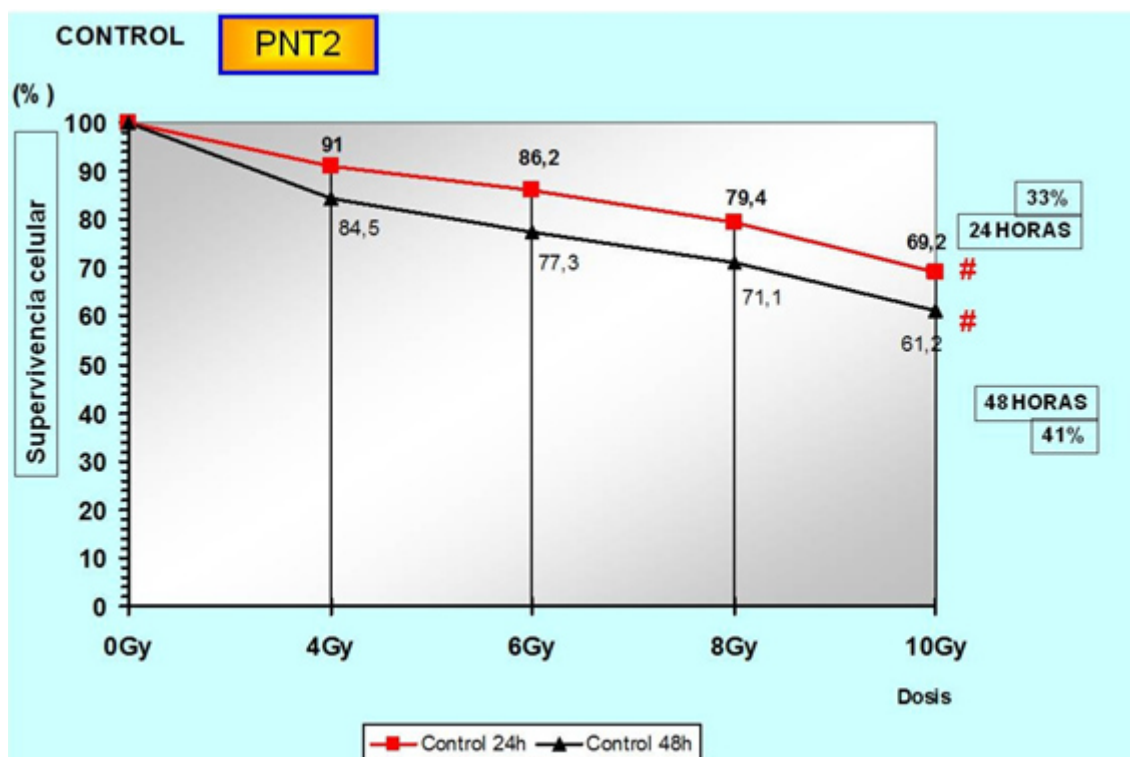


Figura C1b. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares controles de epitelio de próstata humano normal PNT2 irradiados hasta 10 Gy ((#): ($p < 0,001$) versus células controles irradiadas).

- SUSTANCIAS ENSAYADAS

La Figura C2 muestra el efecto de la administración de diferentes sustancias y mezclas sobre células epiteliales de próstata humanas normales PNT2. En esta búsqueda de diferentes sustancias con capacidad de radioprotección celular, utilizaron concentraciones de sustancias y mezclas (25 μ M y 50 μ M). Los resultados obtenidos después de tratar cultivos de células PNT2 con estas sustancias e incubar los cultivos celulares durante 24h se resumen en la Figura C2.

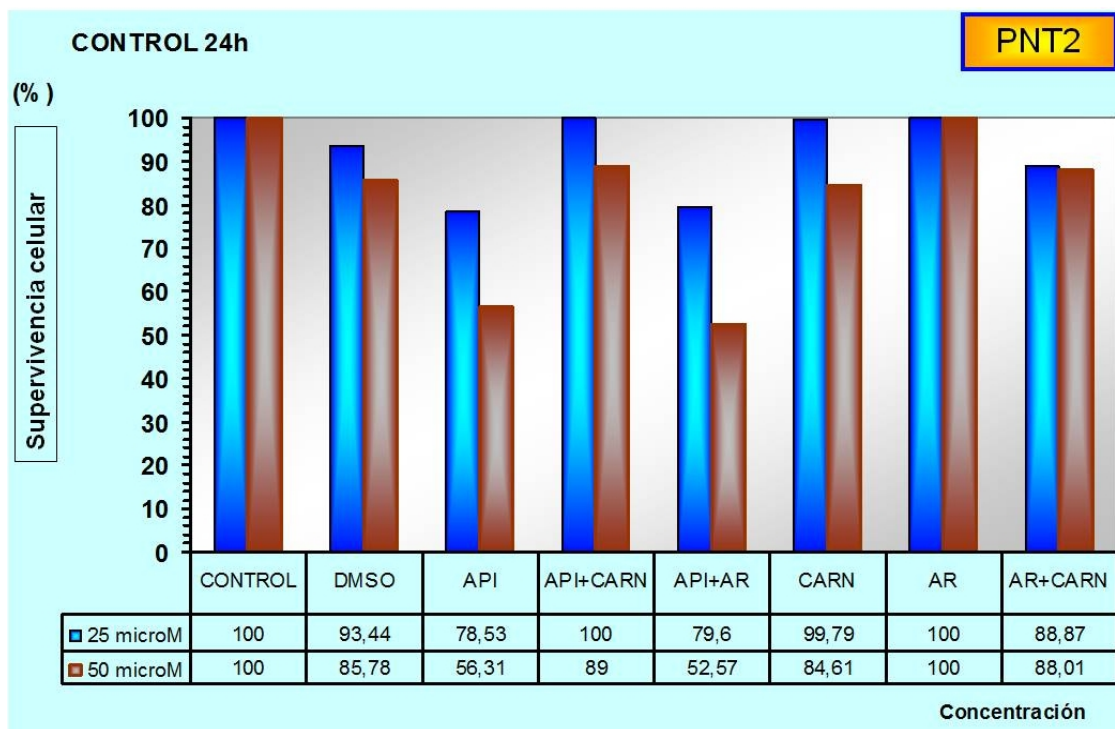


Figura C2. Porcentaje de supervivencia celular de los cultivos de células controles tras la administración de las diferentes sustancias estudiadas en células PNT2 después de un período de incubación de 24 horas (DMSO: Dimethylsulfoxido; API: Apigenina; CARN: ácido carnósico; AR: ácido rosmarínico).

La Figura C3 muestra el efecto de la administración de diferentes sustancias y mezclas sobre las células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 a las diferentes concentraciones de sustancias y mezclas (25 μ M y 50 μ M) estudiadas para evaluar su capacidad de radioprotección celular obtenidos después de tratar cultivos de células PNT2 e incubar los cultivos celulares durante 48h.

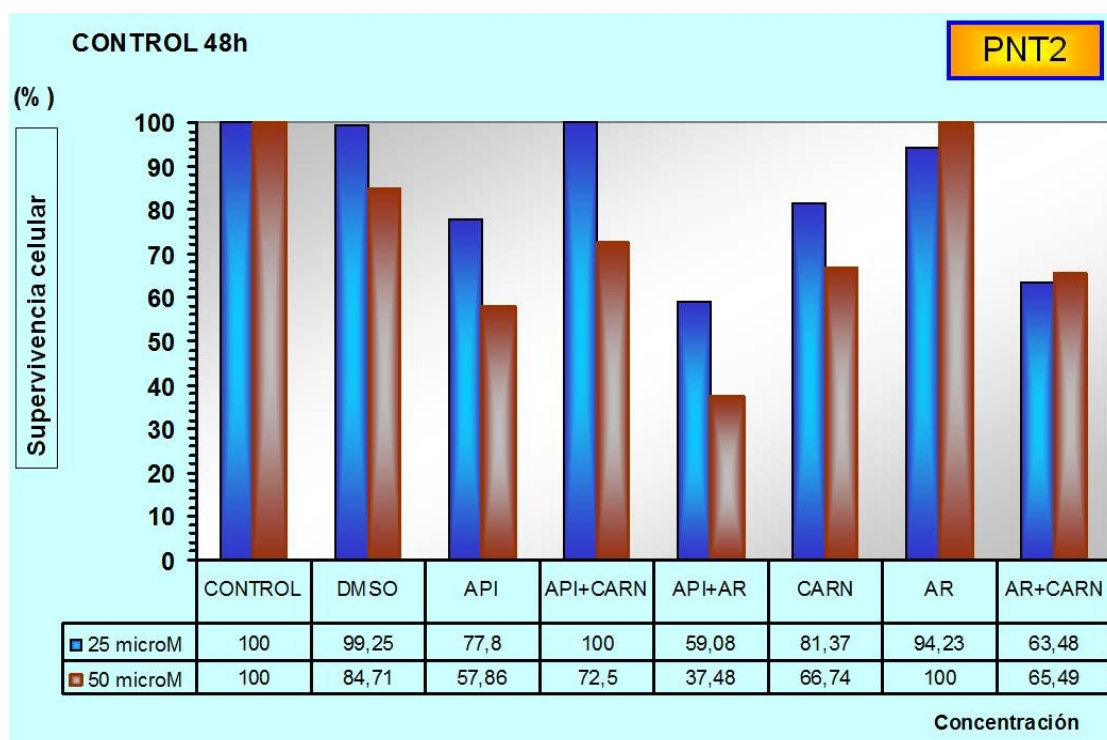


Figura C3. Porcentaje de supervivencia celular de los cultivos de células controles después de la administración de las diferentes sustancias estudiadas en células PNT2 tras un período de incubación de 48 horas (DMSO: Dimethylsulfoxido; API: Apigenina; CARN: ácido carnósico; AR: ácido rosmarínico).

- **APIGENINA (API)**

Para evaluar la capacidad radioprotectora de la apigenina, las células se trataron con dos concentraciones diferentes de apigenina añadiéndose 20 μ l de cada una de las soluciones de 25 μ M y 50 μ M de apigenina, 30 minutos antes de ser expuestas a 10 Gy en fracciones de 2 Gy de rayos X. Se evaluó la citotoxicidad después de 24 h de incubación de los cultivos celulares; los cultivos celulares controles se trataron con las dos concentraciones de apigenina pero no se irradiaron (muestras controles no irradiadas).

En los cultivos celulares no irradiados de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2, la administración de apigenina a 25 μ M y 50 μ M produjo una reducción de la supervivencia celular del 21,47% y 43,69% respectivamente en comparación con los cultivos controles no tratados (figura C4).

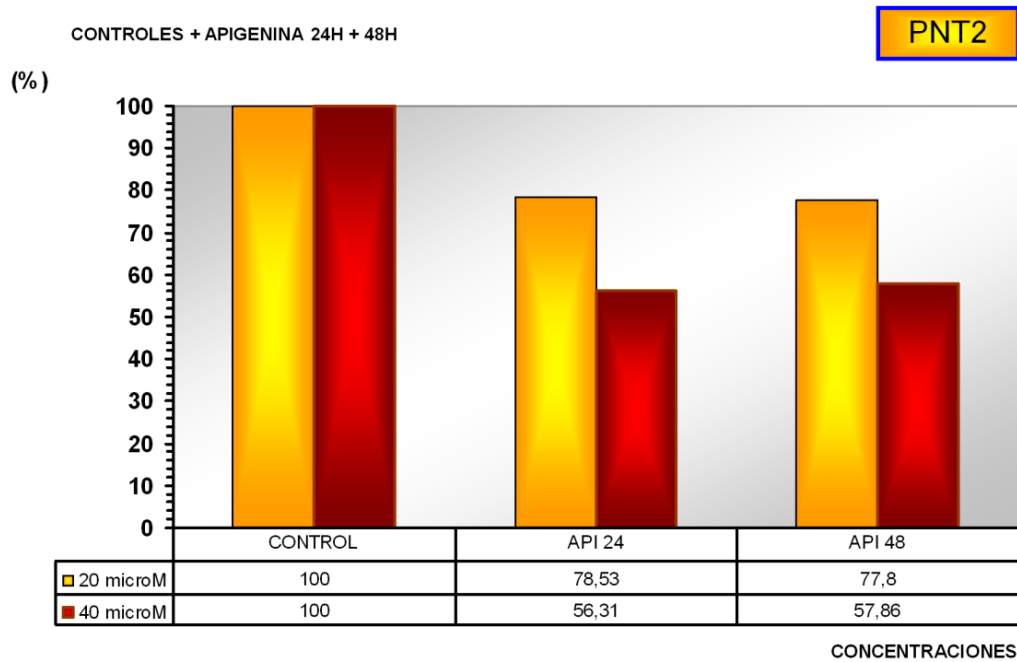


Figura C4. Efecto de la administración de API sobre los cultivos de células PNT2 a diferentes concentraciones, 25 μ M y 50 μ M evaluadas después de 24 h y 48 h incubación.

Después de 24 horas de tratamiento con 20 microlitos de 25 μ M y 50 μ M de apigenina y exposición a diferentes dosis de irradiación, se determinó una mayor supervivencia celular en comparación con el grupo control irradiado. La exposición a 10 Gy en el grupo control irradiado puso de manifiesto una reducción de la supervivencia celular del 30,8%. En los cultivos tratados con Apigenina y en ambas concentraciones, se observa un aumento significativo de la supervivencia celular en las células PNT2 en comparación con los controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citotóxico inducido por la radiación (Tabla C2; Figura C5).

Tabla C2. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2, tratadas con Apigenina 25 μ M y 50 μ M y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	90,0 $\pm$ 7,1	85,5 $\pm$ 7,2	79,1 $\pm$ 5,4	68,1 $\pm$ 5,1
Apigenina 25 μ M	100,0 $\pm$ 6,7	94,4 $\pm$ 7,1	85,4 $\pm$ 7,9	85,6 $\pm$ 7,6	89,8 $\pm$ 8,1*
Apigenina 50 μ M	100,0 $\pm$ 7,3	94,4 $\pm$ 8,0	100,0 $\pm$ 5,4	100,0 $\pm$ 7,4	100,0 $\pm$ 7,6*

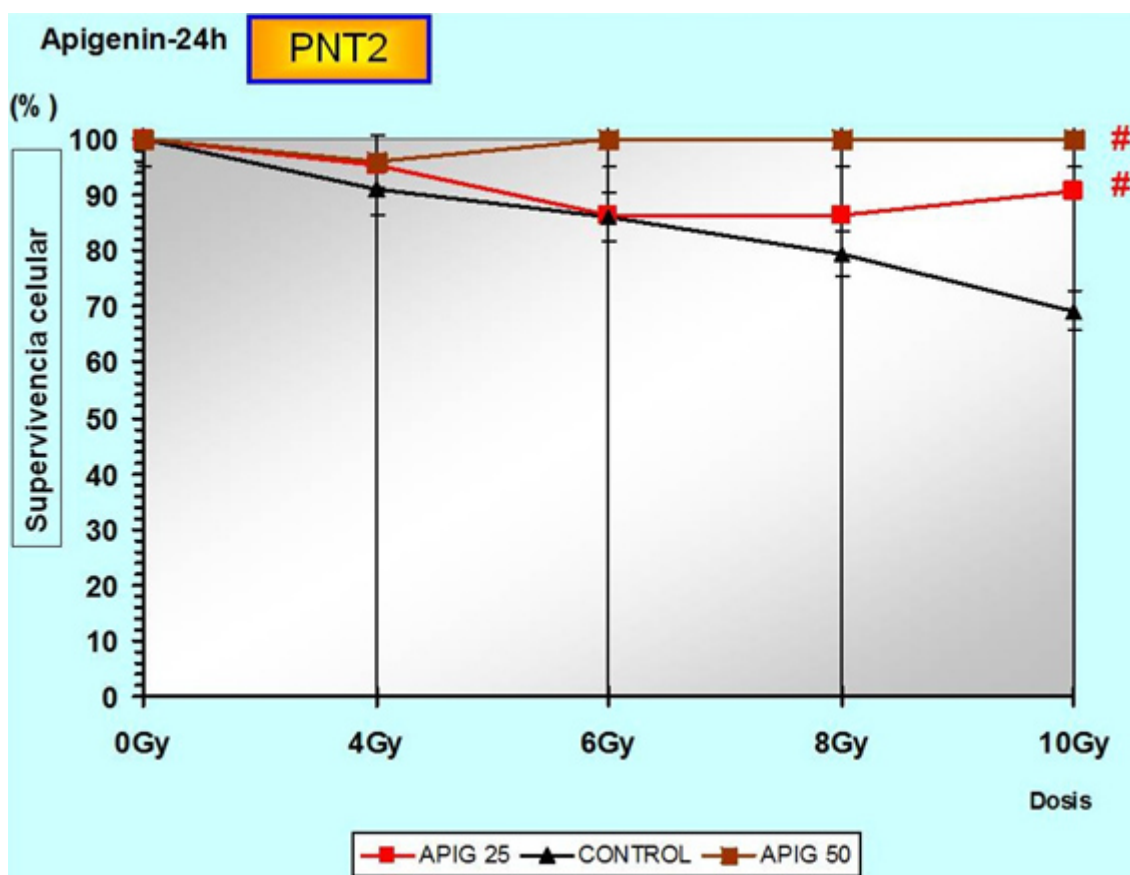


Figura C5. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con apigenina 25 μM y 50 μM e irradiadas con diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El factor de protección (FP) se obtuvo en los cultivos tratados con apigenina e incubados durante 24 h y con la dosis de radiación más alta administrada (10 Gy) ha sido con apigenina 25 μM del 70%; mientras que las células tratadas con apigenina al 50 μM expresó un FP del 100%.

Tras de 48 horas de incubación, las células PNT2 tratadas con las dos concentraciones de apigenina (25 y 50 μM) mostraron mayor supervivencia celular que los cultivos controles irradiados, alcanzando un incremento casi del 22,8% de la supervivencia celular para las dos concentraciones a la dosis más alta de radiación utilizada. En estas concentraciones, se observó un aumento significativo en la supervivencia celular en comparación con las células controles irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora de la apigenina frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla C3; Figura C6).

Tabla C3. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con 25 μ M y 50 μ M de Apigenina y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	83,4 $\pm$ 8,2	76,5 $\pm$ 7,4	70,1 $\pm$ 5,6	60,7 $\pm$ 5,2
Apigenina 25 μ M	100,0 $\pm$ 6,5	100,0 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 8,8	100,0 $\pm$ 7,6	84,7 $\pm$ 5,6*
Apigenina 45 μ M	100,0 $\pm$ 6,6	100,0 $\pm$ 7,1	86,0 $\pm$ 8,3	86,6 $\pm$ 7,1	83,0 $\pm$ 6,3*

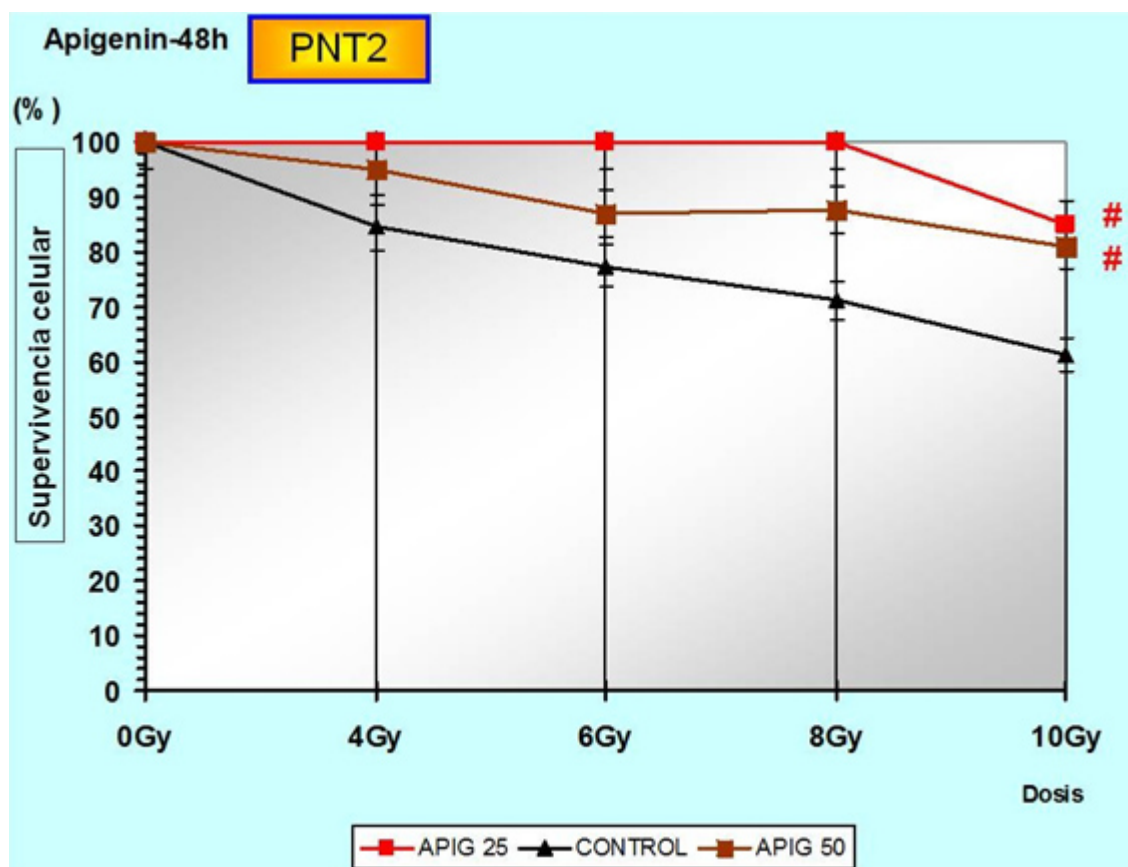


Figura C6. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con Apigenina 25 μ M y 50 μ M y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación (#): (p < 0,001) versus control irradiado).

El **Factor de protección (FP)** obtenido para las células PNT2 tratadas con 25 μ M de apigenina y expuestas a 10 Gy tras de un período de incubación de 48 horas fue del 58,7%; mientras que para el tratamiento de 50 μ M se obtuvo un valor del 61,3%.

- DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

La administración de DMSO al 0,1% y 0,2% a los cultivos de células PNT2 produjo una disminución de la supervivencia celular del 6,56% y 14,22% respectivamente tras 24 horas de incubación respecto a los controles no tratados; esto produjo un efecto inhibitorio del crecimiento celular no significativo provocado por el DMSO sobre la supervivencia celular de las células PNT2 (Figura C7). Tras 48 horas de incubación, el tratamiento con DMSO

(0,1% y 0,2%) muestra una disminución respectiva del 0,75% y 15,29% en la supervivencia celular en comparación con los cultivos controles no tratados de la misma línea celular (Figura C7). En ambos casos la modificación del crecimiento celular no muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a las muestras controles no tratadas.

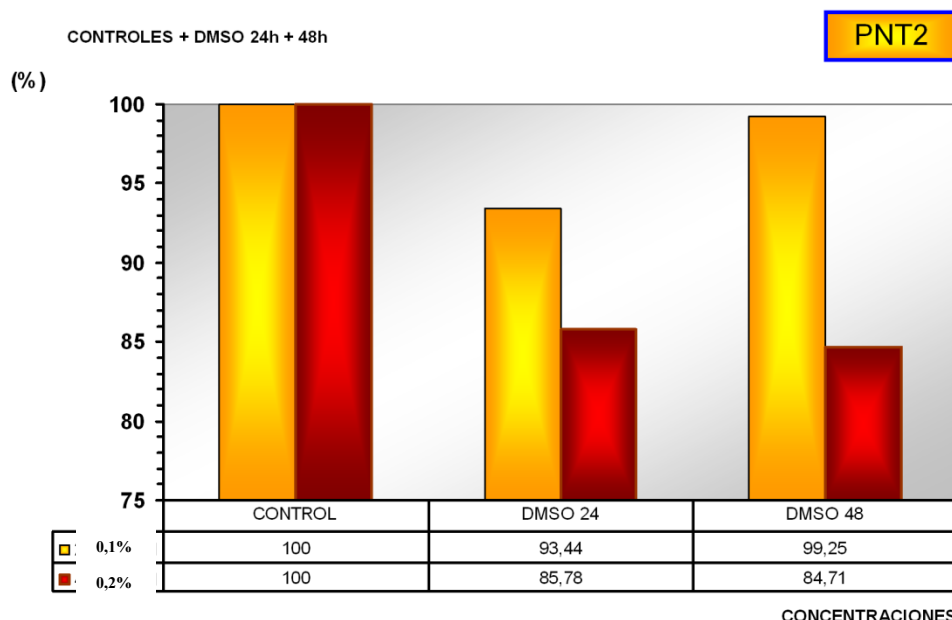


Figura C7. Efecto de la administración de DMSO al 0,1% y al 0,2% en células PNT2 después de 24 h y 48 h de incubación.

A las 24 horas de incubación, los resultados obtenidos en los cultivos de células PNT2 irradiados mostraron una reducción del 30,8% en la supervivencia celular respecto a los cultivos controles irradiados a la dosis más alta empleada (10 Gy). La administración de las dos concentraciones de DMSO estudiadas (0,1% y 0,2%) mostraron una mayor supervivencia celular que las células controles irradiadas. Se determinó un incremento del 30,8% en la supervivencia celular respecto a los cultivos controles irradiados a la dosis más alta empleada (10 Gy) y un incremento del 17,3% en la supervivencia celular cuando las células se trataron con DMSO al 0,2%. Así pues, cuando las células se trataron con DMSO al 0,1% y se irradiaron con 10 Gy, no se observó reducción alguna en la supervivencia celular inducida por los rayos X. En ambas concentraciones de DMSO estudiadas, se determinó un aumento de la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares control irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla C4; Figura C8).

Tabla C4. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 ± 5,8	91,0 ± 7,1	86,2 ± 7,2	79,4 ± 5,4	69,2 ± 5,1
DMSO 0,1%	100,0 ± 7,0	100,0 ± 6,3	100,0 ± 5,4	100,0 ± 5,9	100,0 ± 3,4*
DMSO 0,2%	100,0 ± 6,5	100,0 ± 7,0	100,0 ± 6,2	95,1 ± 5,4	83,7 ± 6,3*

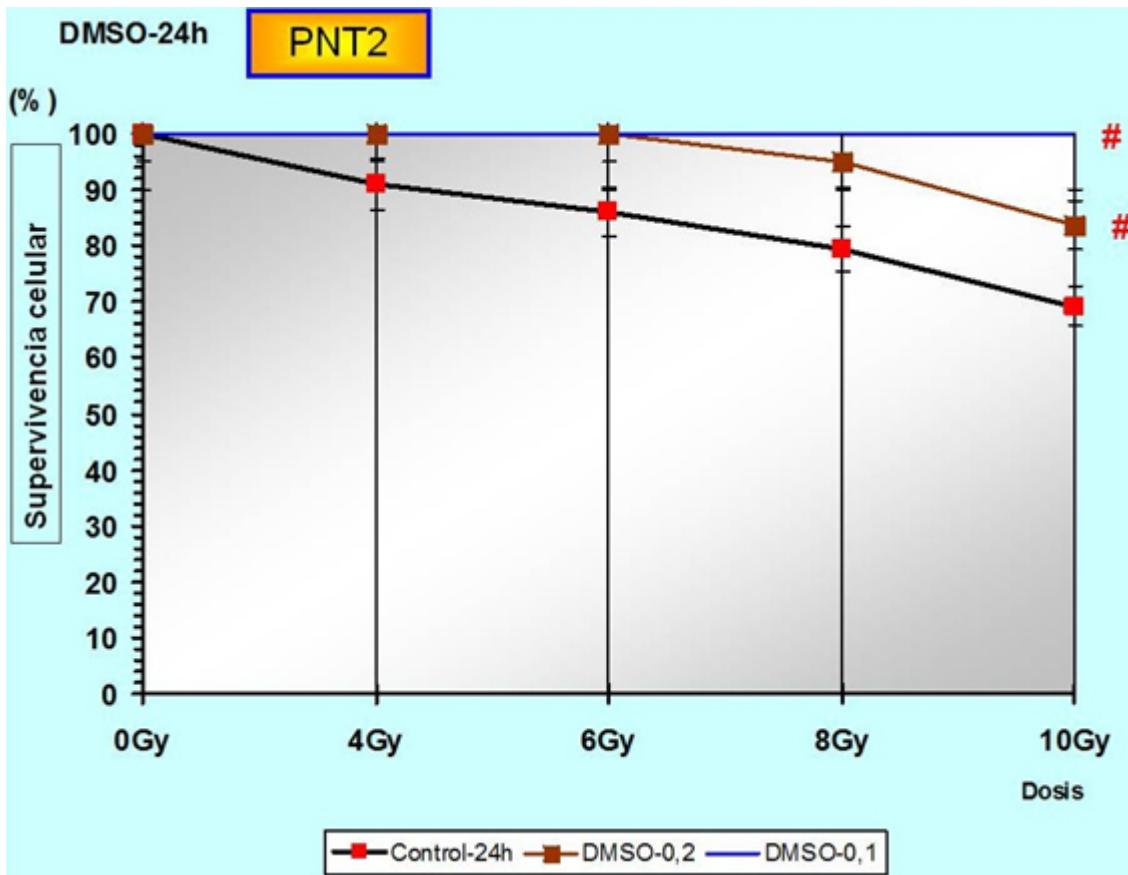


Figura C8. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humana normal PNT2 tratadas con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de protección (FP)** determinado para cultivos tratados con DMSO al 0,1% después de una incubación de 24 horas y exposición a la dosis de irradiación más alta (10 Gy) fue del 100% y del 47% cuando se usó una solución al 0,2% de DMSO y la misma dosis de radiación.

Tras 48 horas de incubación, los resultados de supervivencia celular obtenidos para los cultivos celulares PNT2 tratados con las dos concentraciones de DMSO (0,1% y 0,2%) fueron superiores a las del grupo de control irradiado. Ambas concentraciones aumentaron el 38,8% la supervivencia celular en comparación con los controles irradiados. En ambas concentraciones de DMSO estudiadas, se determinó un aumento de la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares control irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla C5; Figura C9).

Tabla C5. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 ± 4,5	84,5 ± 8,2	77,3 ± 7,4	71,1 ± 5,6	61,2 ± 5,2
0,1% DMSO	100,0 ± 7,0	100,0 ± 5,4	100,0 ± 7,4	100,0 ± 5,7	100,0±6,2*
0,2% DMSO	100,0 ± 6,1	100,0 ± 7,2	100,0 ± 6,2	100,0 ± 8,2	100,0±9,4*

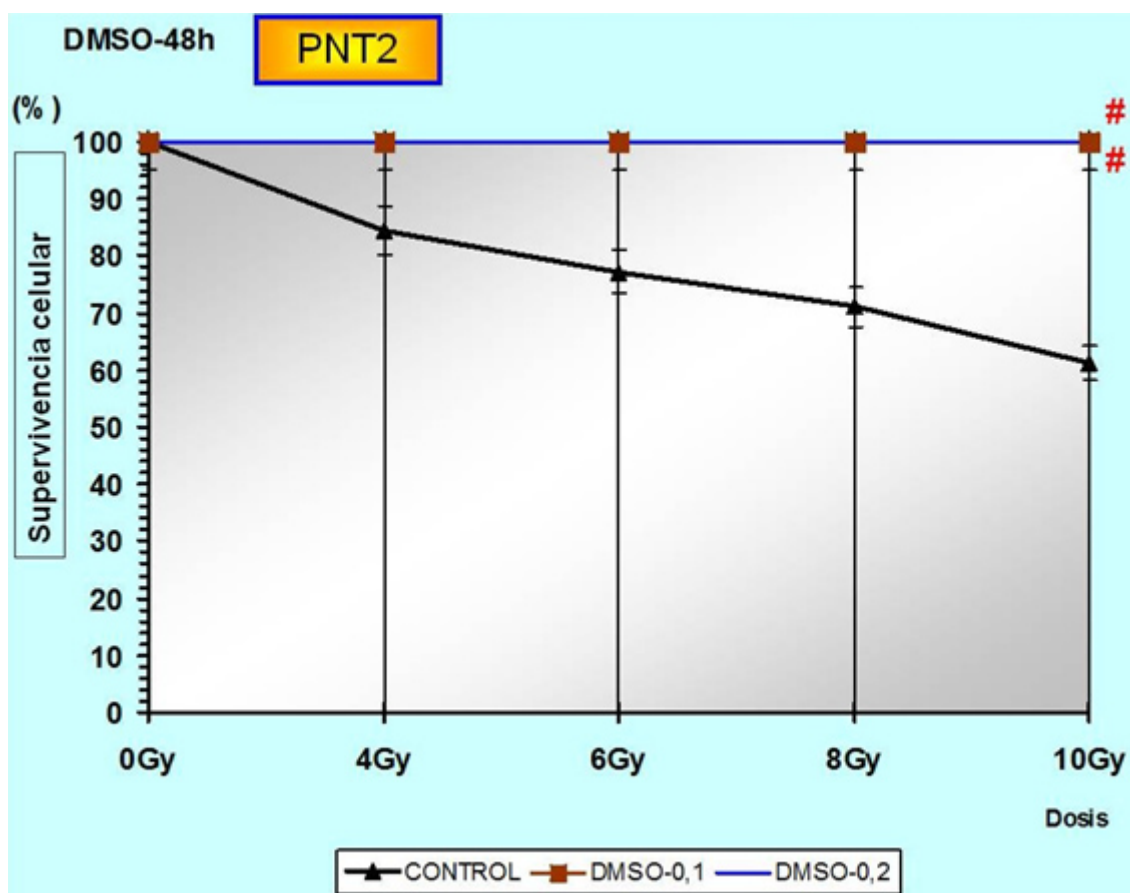


Figura C9. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): (p < 0,001) versus control irradiado).

El **FP** obtenido en los cultivos celulares tratados con las dos concentraciones de DMSO e irradiados con la dosis más alta (10 Gy) tras 48 horas de incubación fue del 100% para ambas concentraciones estudiadas (0,1% y el 0,2% de DMSO).

- ACIDO CARNOSICO

La administración de 20 µl de ácido carnósico al 25 µM y 50 µM después de 24 horas de incubación de las células PNT2 provocó una disminución del 0,21% y del 15,39% en la viabilidad de las células PNT2 respectivamente, respecto a la de los cultivos controles no

tratados. Tras 48 horas de incubación y a las mismas concentraciones (25 μM y 50 μM), la disminución en la supervivencia celular fue del 18,63% y 33,26% respectivamente (Figura 10C)

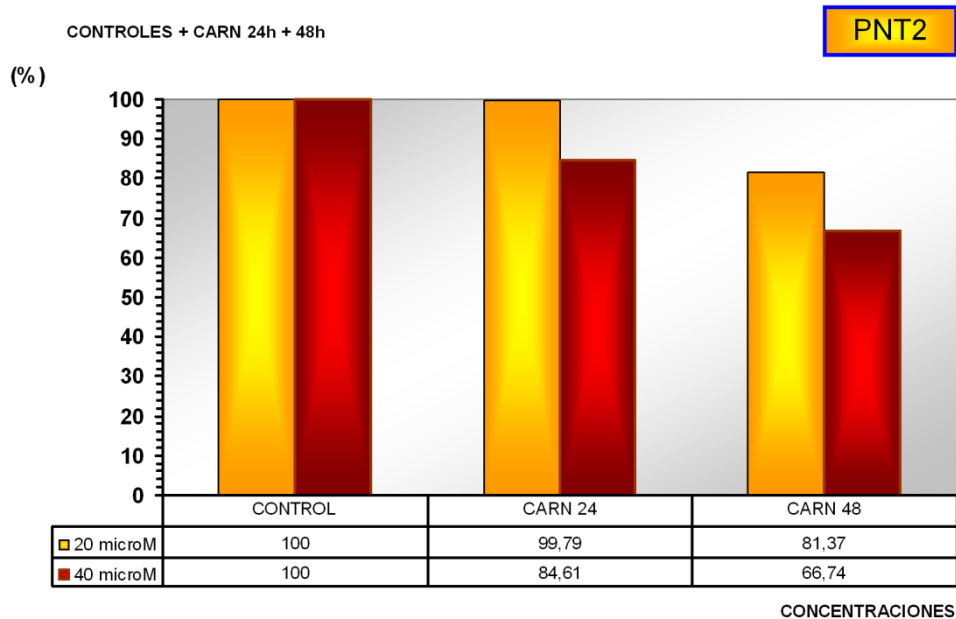


Figura C10. Efecto de la administración de CARN al 25 μM y 50 μM en células PNT2 después de 24 h y 48 h de incubación.

En los cultivos celulares PNT2 tratados con 25 μM y 50 μM de CARN que se irradiaron y se incubaron durante 48 horas, se obtuvo una significativa mayor supervivencia celular en comparación con el control irradiado. A la dosis de radiación más alta (10 Gy) utilizada en este estudio, la supervivencia celular en los cultivos control irradiados disminuyó un 30,8% en comparación con los cultivos celulares tratadas con ambas concentraciones de ácido carnósico, se demostró así, un aumento significativo en la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$) (tabla C6; Figura11).

Tabla C6. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con CARN (25 μM y 50 μM) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	91,0 $\pm$ 7,1	86,2 $\pm$ 7,2	79,4 $\pm$ 5,4	69,2 $\pm$ 5,1
25 μM Ácido Carnósico	100,0 $\pm$ 8,2	100,0 $\pm$ 7,6	100,0 $\pm$ 6,9	100,0 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 9,2*
50 μM Ácido Carnósico	100,0 $\pm$ 7,9	100,0 $\pm$ 8,3	100,0 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 9,0	100,0 $\pm$ 10,2*

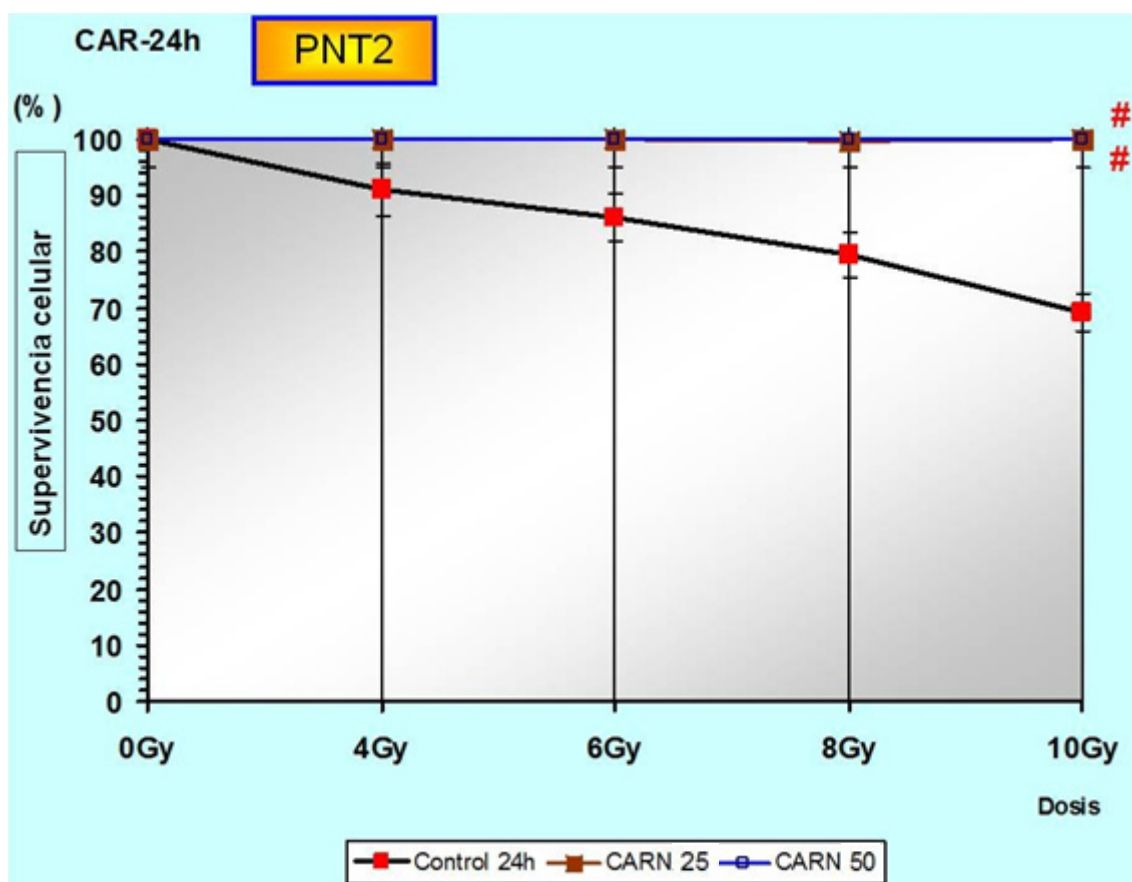


Figura C11. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con CARN (25 µM y 50 µM) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor De Protección (FP)** obtenido de los cultivos celulares tratados con las dos concentraciones de DMSO e irradiados con la dosis más alta (10 Gy) tras 24 horas de incubación fue del 100% para ambas concentraciones estudiadas (25 µM y 50 µM de ácido carnósico).

Tras 48 horas de incubación de los cultivos de células PNT2 tratadas con 25 y 50 µM de ácido carnósico e irradiados con la dosis de radiación más alta (10 Gy) se observó una mayor supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares controles irradiados. Tras los dos períodos de incubación (24 h y 48 h), la supervivencia celular fue igual, obteniéndose un 38,8% mayor de supervivencia celular en comparación con los cultivos controles irradiados. En ambas concentraciones utilizadas, se ha determinado un aumento significativo de la supervivencia de las células PNT2 respecto a los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora del ácido carnósico frente al daño citológico inducido por la radiación ionizante (Tabla C7; Figura C12).

Tabla C7. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con CARN (15 μ M and 25 μ M) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

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

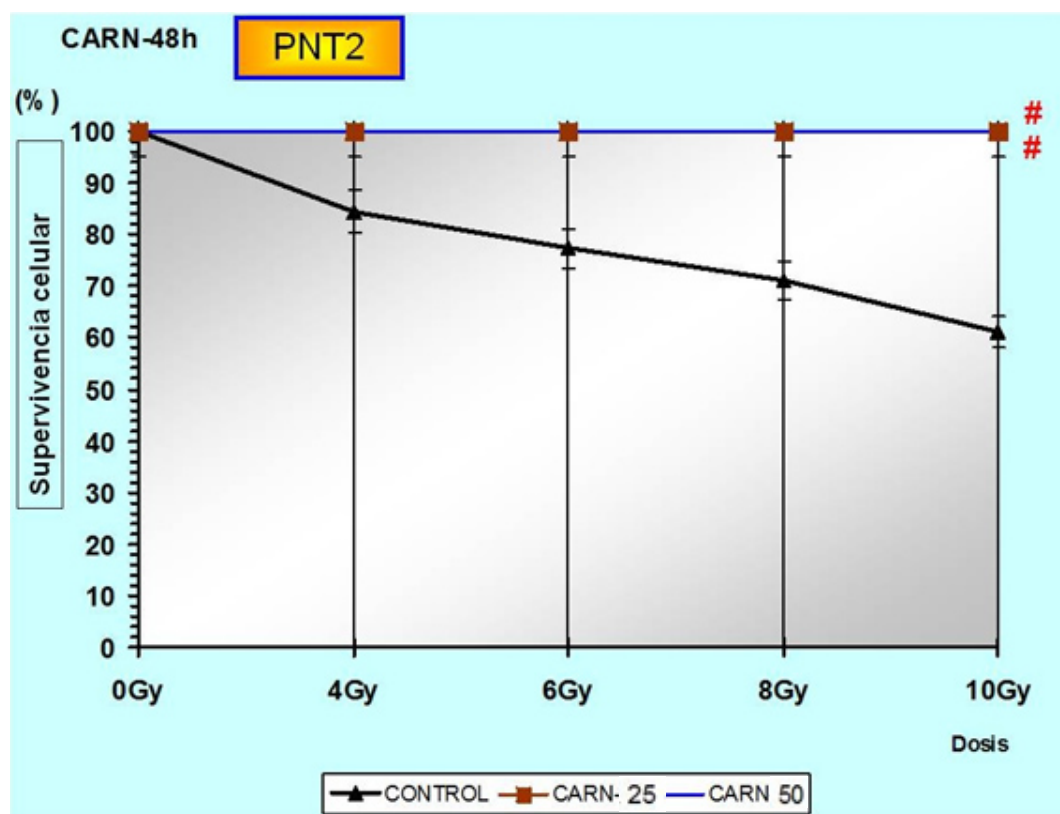


Figura C12. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con CARN (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección (FP)** obtenido de los cultivos tratados con 25 μ M y 50 μ M de ácido carnósico tras 48 horas y la irradiación con la dosis de más alta (10 Gy) fue del 100% para ambas concentraciones de ácido carnósico.

- **ACIDO ROSMARINICO (AR)**

La administración de 20 μ l de soluciones de AR 25 μ M y 50 μ M a los cultivos de células PNT2 e incubados durante 24 horas no produjo una disminución en el porcentaje de supervivencia celular con respecto a los cultivos controles no tratados. Sin embargo, cuando las células se incubaron durante 48 horas, a las mismas concentraciones de AR (25 μ M y 50 μ M), se observó una disminución del 5,77% en supervivencia celular de los cultivos tratados a

la concentración de 25 μM , mientras que a la concentración de 50 μM no se observó ninguna disminución en la supervivencia celular respecto a los cultivos controles (Figura C13).

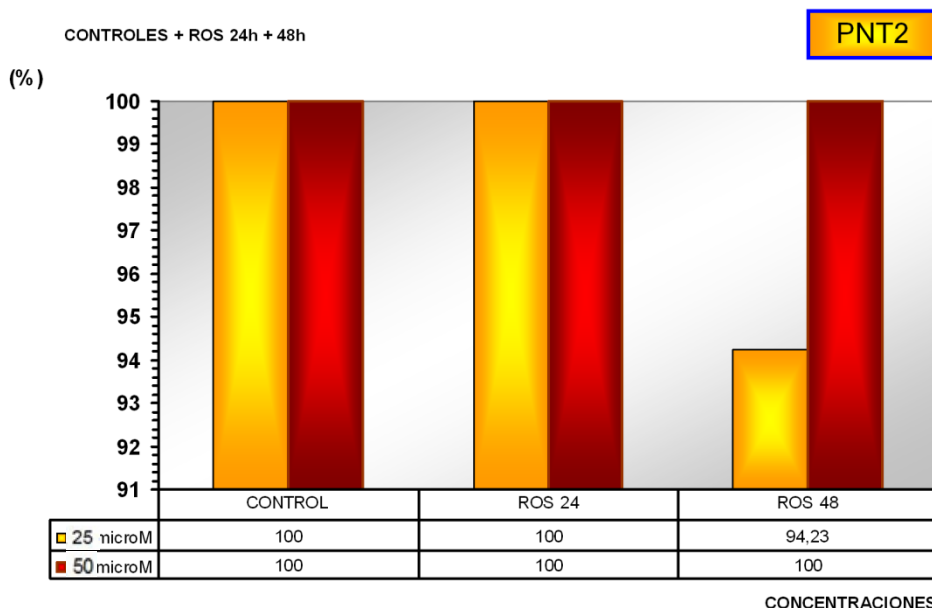


Figura C13. Efecto de la administración de AR sobre los cultivos de células PNT2 a diferentes concentraciones, 25 μM y 50 μM evaluadas después de 24 h y 48 h incubación.

Tras la irradiación y 24 horas de incubación, los resultados obtenidos de los cultivos de células PNT2 tratados con las dos concentraciones de AR (25 μM y 50 μM) mostraron una mayor supervivencia celular que los cultivos controles no tratados. A la dosis de radiación más alta (10 Gy) y a la concentración más elevada utilizada en este estudio (50 μM), se observó un aumento de la supervivencia celular del 21,7% respecto a las células controles irradiadas. A ambas concentraciones estudiadas, se determinó un aumento significativo en la supervivencia celular en comparación con las células controles irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla C8; Figura C140).

Tabla C8. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con AR (25 μM y 50 μM) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	91,0 $\pm$ 7,1	86,2 $\pm$ 7,2	79,4 $\pm$ 5,4	69,2 $\pm$ 5,1
Ácido Rosmarínico 25 μM	100,0 $\pm$ 6,0	94,6 $\pm$ 6,3	85,4 $\pm$ 5,0	89,2 $\pm$ 7,1	86,5 $\pm$ 7*
Ácido Rosmarínico 50 μM	100,0 $\pm$ 9,2	90,3 $\pm$ 7,1	83,7 $\pm$ 4,8	94,7 $\pm$ 9,4	91,3 $\pm$ 6*

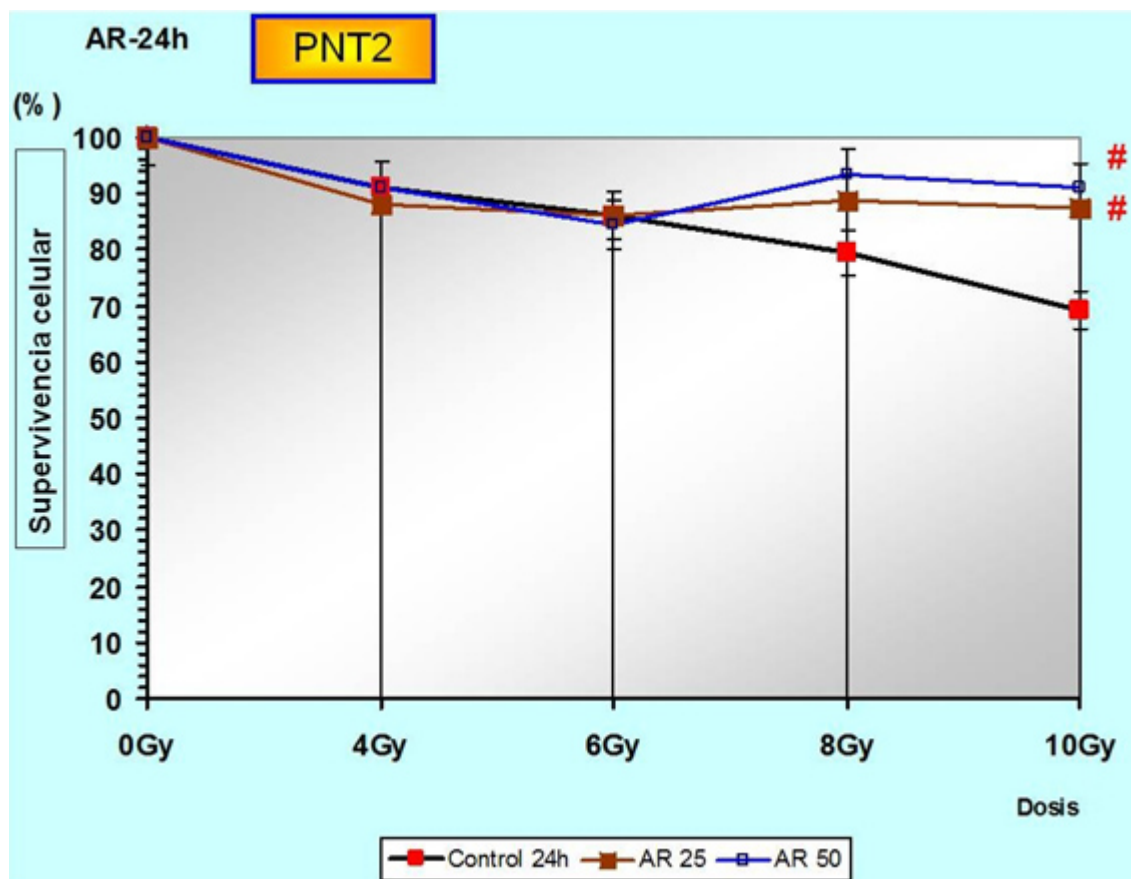


Figura C14. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humana normales PNT2 tratadas con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección** (FP) obtenido en las muestras tratadas con ácido rosmarínico a las 48 horas e irradiadas con la dosis más alta (10 Gy) fue del 59,4% para las células tratadas con ácido rosmarínico al 25 μ M y del 30,5% con el tratamiento de ácido rosmarínico al 50 μ M.

Tras 48 horas de incubación, los resultados obtenidos para los cultivos de células PNT2 tratados a las dos concentraciones de AR (25 y 50 μ M) mostraron una mayor supervivencia celular respecto a los cultivos celulares controles irradiados. A la mayor dosis de radiación y a la mayor concentración utilizada en este estudio, la supervivencia celular fue del 29,1% mayor que la de los cultivos celulares controles irradiados. A ambas concentraciones, se determinó un aumento significativo de la supervivencia celular en comparación con las células controles irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla C9; Figura C15).

Tabla C9. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	84,5 $\pm$ 8,2	77,3 $\pm$ 7,4	71,1 $\pm$ 5,6	61,2 $\pm$ 5,2
Ácido Rosmarínico 25 μ M	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 9,1	94,7 $\pm$ 7,4	87,1 $\pm$ 9,4	88,7 $\pm$ 8*
Ácido Rosmarínico 50 μ M	100,0 $\pm$ 9,3	90,8 $\pm$ 8,9	86,4 $\pm$ 8,5	88,0 $\pm$ 7,5	99,3 $\pm$ 5,*

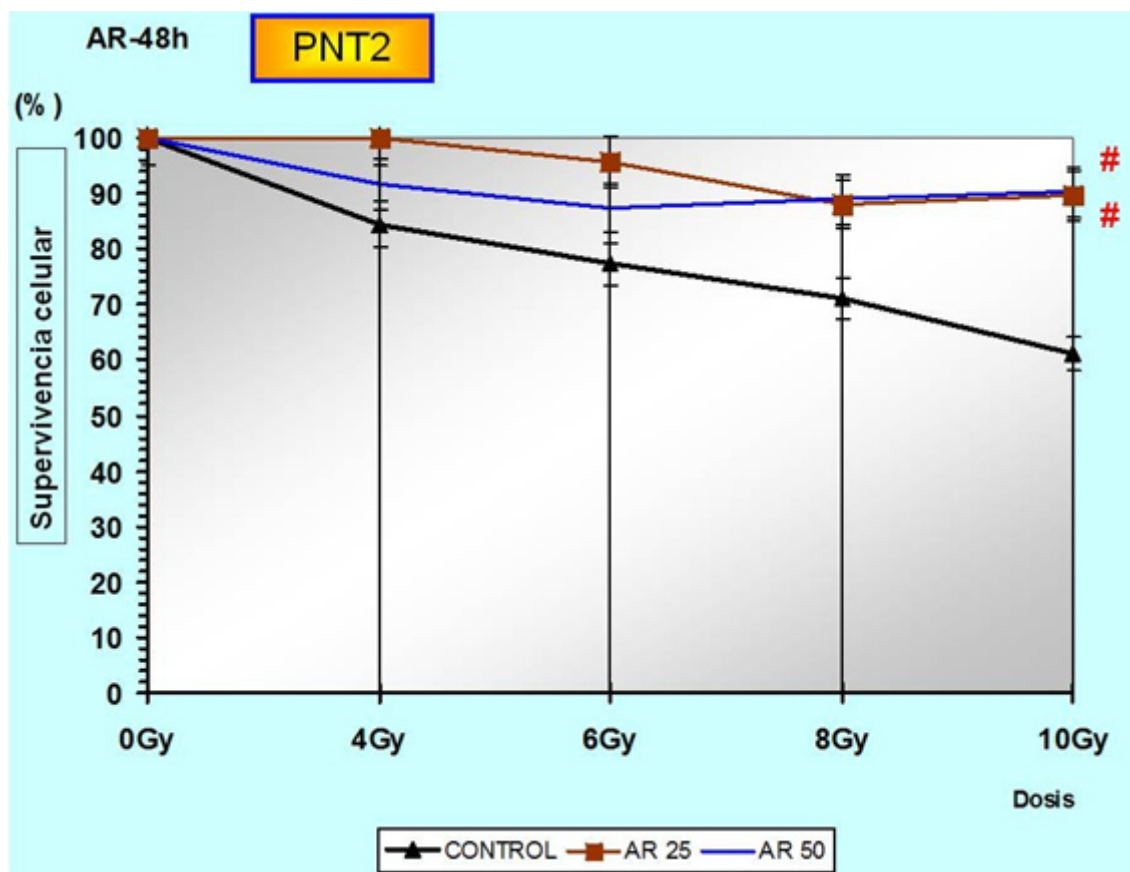


Figura C15. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Cuando las células se irradiaron con la dosis más alta de 10 Gy y se incubaron durante 48 horas, se obtuvo un **FP** del 73,4%, y del 75% cuando las células se trataron con las concentraciones de ácido rosmarínico de 25 μ M y 50 μ M, respectivamente.

- MEZCLAS DE APIGENINA Y ÁCIDO CARNÓSICO (API + CARN)

La administración simultánea de cantidades de igual concentración (equimolar) de Apigenina y CARN 20 μ l de 15 μ M 25 μ M se ha utilizado también para valorar la supervivencia celular de las células PNT2. Tras 24 horas de incubación, la mezcla equimolar 15 μ M no provocó una disminución de la supervivencia celular; sin embargo, la mezcla equimolar 25 μ M produjo una reducción del 11% de la supervivencia celular respecto a las células controles no tratadas. Tras 48 horas de incubación, no se observó una disminución en la supervivencia celular a la concentración más baja (15 μ M), pero sí se observó una disminución del 27,5% en

la supervivencia celular con la mezcla 25 μ M en comparación con los cultivos controles no tratados (Figura C16).

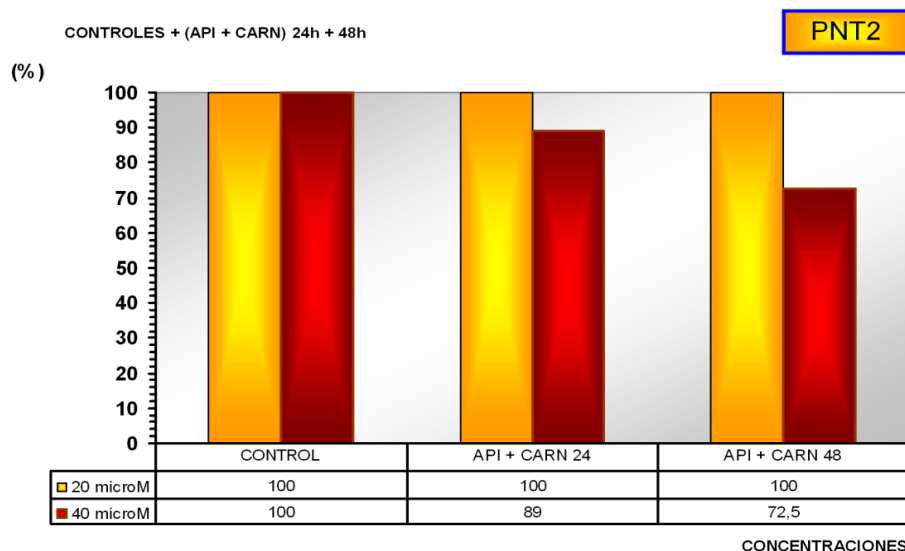


Figura C16. Efecto de la administración de diferentes mezclas de API + CARN sobre los cultivos de células PNT2 evaluadas después de 24 h y 48 h incubación.

Después de la irradiación de las células con la dosis más alta de 10 Gy y la incubación durante 24 horas, los resultados obtenidos en los cultivos celulares PNT2 tratados conjuntamente con las dos sustancias en ambas concentraciones e irradiados mostraron una mayor supervivencia celular que alcanzó hasta el 27,3% en comparación con las células controles irradiadas y no tratadas. A ambas concentraciones, se ha determinado un aumento significativo en la supervivencia celular en comparación con los cultivos controles irradiados ($p < 0,001$) lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citológico inducido por los rayos X (Tabla C10; Figura C17).

Tabla C10. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	91,0 $\pm$ 7,1	86,2 $\pm$ 7,2	79,4 $\pm$ 5,4	69,2 $\pm$ 5,1
15 μ M (API + CARN)	100,0 $\pm$ 7,8	91,3 $\pm$ 9,2	88,2 $\pm$ 9,8	89,2 $\pm$ 7,6	95,4 $\pm$ 7,8*
25 μ M (API + CARN)	100,0 $\pm$ 8,1	95,0 $\pm$ 7,1	85,2 $\pm$ 5,3	96,7 $\pm$ 6,8	93,5 $\pm$ 8,4*

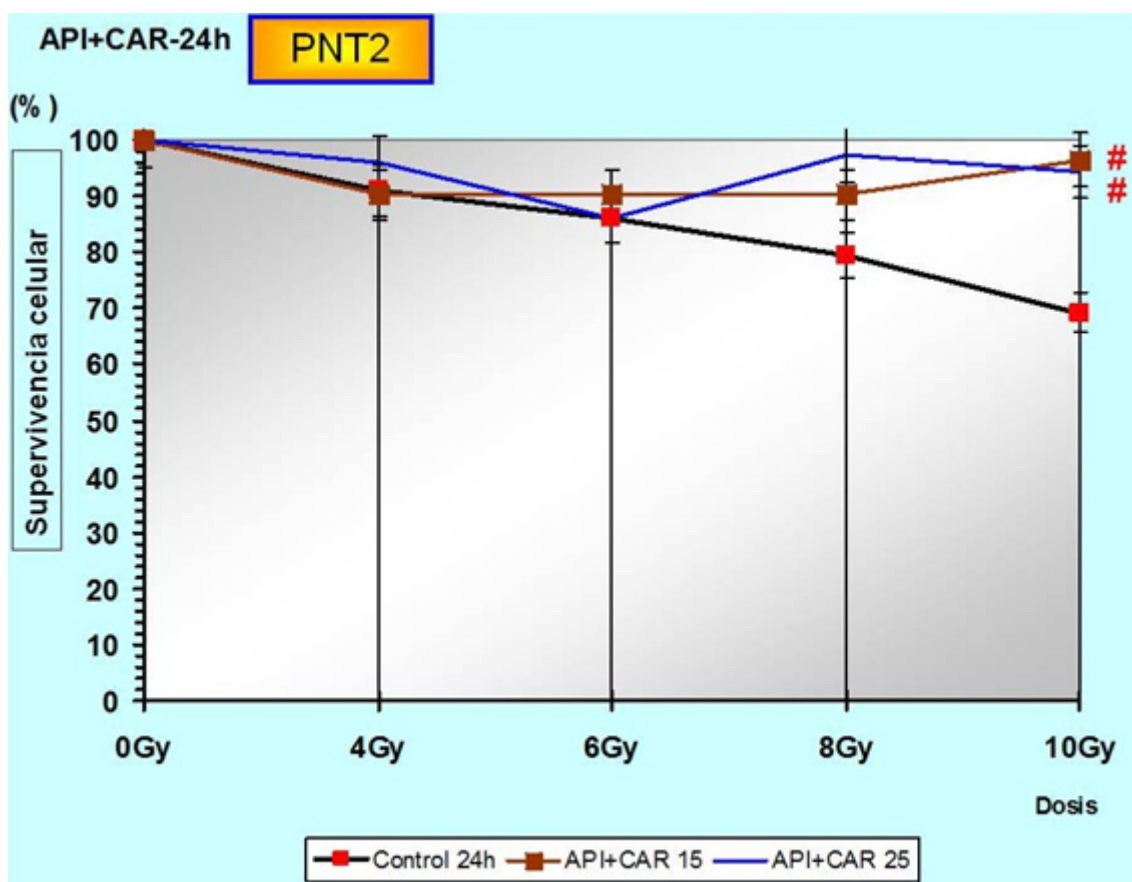


Figura C17. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Después de de la irradiación de las células con la dosis más alta de 10 y la incubación durante 24 horas, el **FP** obtenido de los cultivos celulares tratados con la mezcla de apigenina y CARN fue del 88,6% a una concentración equimolar de 15 μ M y del 81,8% para las mezcla a 25 μ M.

Cuando se irradiaron con la dosis de radiación más alta de 10 Gy y se determinó a las 48 horas de incubación, los cultivos celulares PNT2 tratados con las mezclas 15 μ M y 25 μ M mostraron un aumento de la supervivencia celular del 38,8% para la mezclas equimolares en relación con los controles irradiados. A ambas concentraciones, se ha determinado un aumento significativo de la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citológico inducido por la radiación ionizante (tabla C11; Figura C18).

Tabla C11. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	84,5 $\pm$ 8,2	77,3 $\pm$ 7,4	71,1 $\pm$ 5,6	61,2 $\pm$ 5,2
15 μ M (AP + CARN)	100,0 $\pm$ 8,2	70,5 $\pm$ 7,4	70,2 $\pm$ 9,1	70,8 $\pm$ 7,5	73,2 $\pm$ 8,9
25 μ M (AP + CARN)	100,0 $\pm$ 7,7	88,5 $\pm$ 7,3	92,1 $\pm$ 6,5	86,1 $\pm$ 2,7	100,0 $\pm$ 10,4*

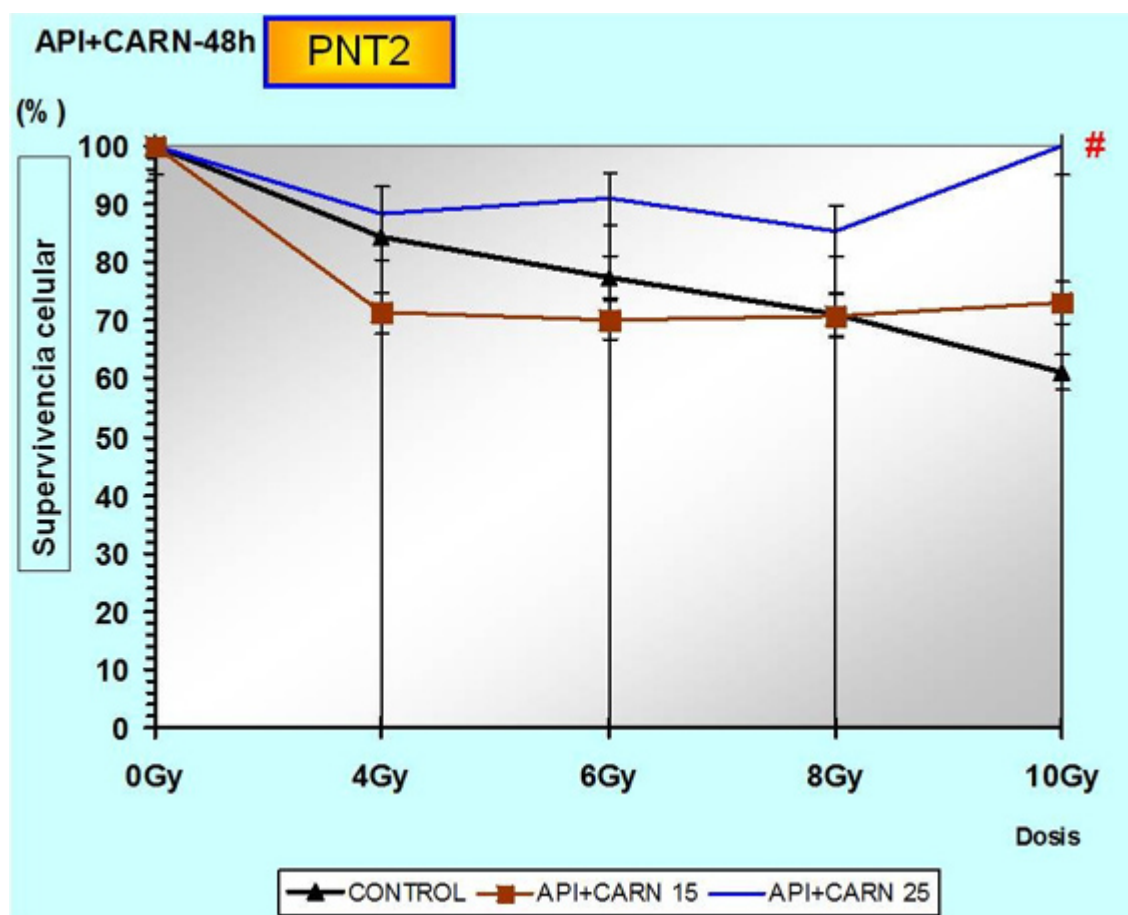


Figura C18. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Cuando los cultivos celulares se irradiaron con la dosis de radiación más alta (10 Gy) y se incubaron durante 48 horas, el **FP** obtenido de las células tratadas con apigenina y ácido carnósico fue 30,9% para la mezcla 15 μ M y 100% cuando se utilizó la mezcla 25 μ M.

- MEZCLAS DE APIGENINA Y ACIDO ROSMARINICO (API + AR)

Cuando la apigenina y el ácido rosmarínico se coadministraron en concentraciones equimolares de 20 μ l de (15 μ M API + 15 μ M AR) y (25 μ M API + 25 μ M AR), se observó una disminución en el porcentaje de supervivencia celular tras 24 horas de incubación. Para la mezcla 15 μ M, la supervivencia celular se redujo en un 20,4%, mientras que la mezcla 25 μ M produjo una reducción del 47,43% en la supervivencia celular respecto a los cultivos celulares

controles no tratados. Tras 48 horas de incubación y el tratamiento a las mismas concentraciones (mezclas 15 μ M y 25 μ M), la disminución de la supervivencia celular para la mezcla 15 μ M fue del 40,92%, mientras que la mezcla 25 μ M produjo una reducción del 62,52% de la supervivencia celular respecto a los cultivos celulares controles (Figura C19).

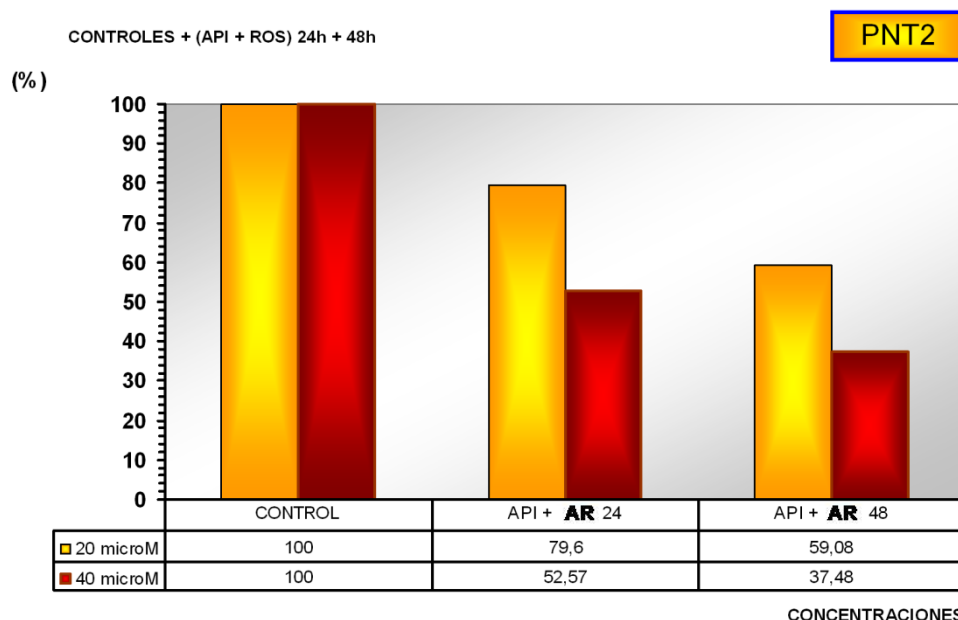


Figura C19. Efecto de la administración de diferentes mezclas de (API + AR) sobre los cultivos de células PNT2 evaluadas después de 24 h y 48 h incubación.

En los cultivos celulares PNT2 tratados con mezclas (API+AR) e irradiados, los resultados obtenidos de cultivos para el periodo de incubación de 24 horas tratados con las dos mezclas (15 μ M y 25 μ M) mostró una mayor supervivencia celular en relación con los controles irradiados. Se observó un aumento en la supervivencia celular del 30,8% para ambas concentraciones cuando las células se irradiaron con 10 Gy de radiación. A ambas concentraciones ensayadas, se ha determinado un aumento significativo en la supervivencia de las células PNT2 en comparación con las células controles irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño inducido por los rayos X (Tabla C12, Figura C20).

Tabla C12. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	91,0 $\pm$ 7,1	86,2 $\pm$ 7,2	79,4 $\pm$ 5,4	69,2 $\pm$ 5,1
15 μ M (Apigenina+AR)	100,0 $\pm$ 8,9	87,5 $\pm$ 8,1	100,0 $\pm$ 12,4	93,8 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 8,5*
25 μ M (Apigenina+AR)	100,0 $\pm$ 8,2	87,5 $\pm$ 7,3	87,5 $\pm$ 7,9	94,6 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 7,8*

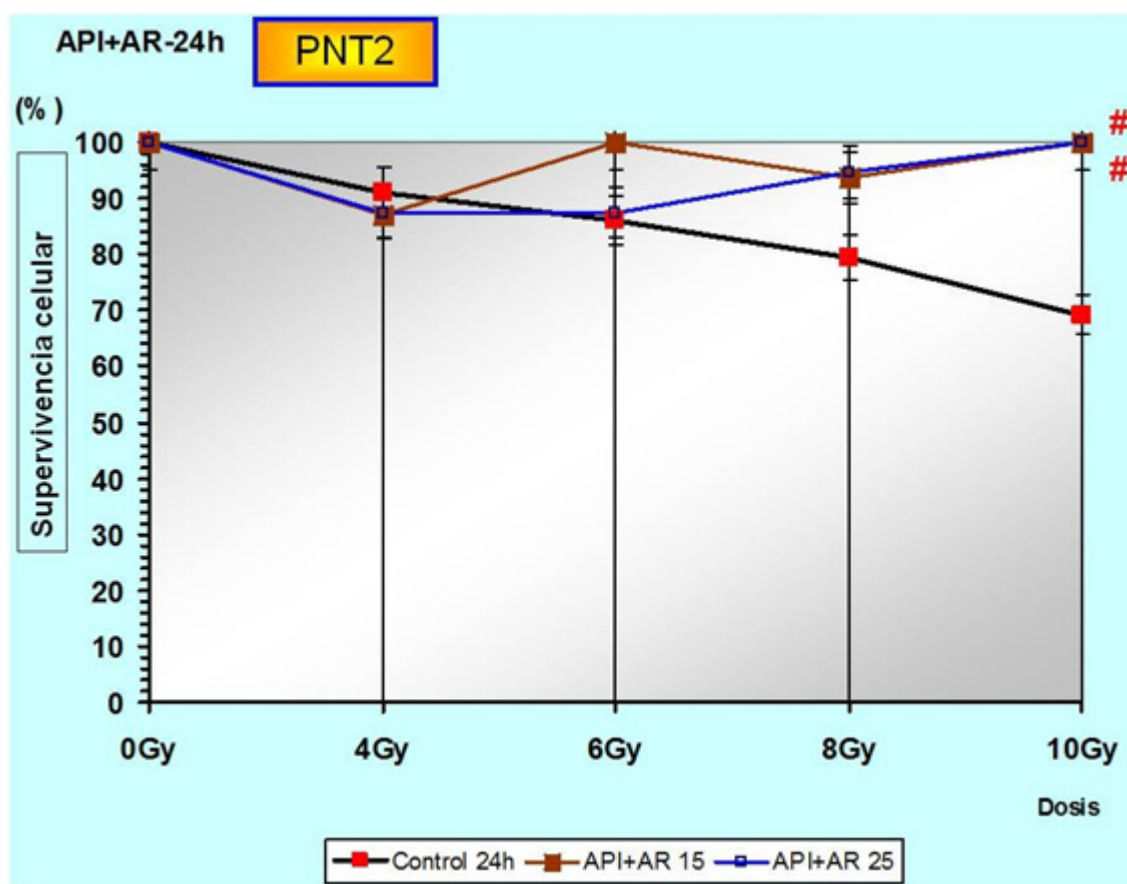


Figura C20. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humana normal PNT2 tratadas con 15 µM y 25 µM de mezcla (API + AR) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Después de 24 horas de incubación, el **FP** obtenido con cultivos celulares PNT2 tratados con ambas concentraciones de la mezcla de API y AR e irradiados con la dosis de radiación más alta (10 Gy) fue del 100%.

Para la dosis de radiación más alta administrada en este estudio (10 Gy), y tras 48 horas de incubación, los resultados obtenidos para los cultivos celulares PNT2 tratados con las mezclas equimolares 15 µM y 25 µM de API + AR mostraron un aumento similar en la supervivencia celular que alcanzó el 100%. La supervivencia celular aumentó en un 38,8% para ambas mezclas equimolares y a la dosis de radiación más alta administrada en este estudio (10 Gy) en ambas concentraciones. En ambas concentraciones estudiadas se ha determinado un aumento significativo en la supervivencia celular en comparación con cultivos controles de células irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora frente al daño citotóxico inducido por los rayos X (Tabla C13; Figura C21).

Tabla C13. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales de próstata humanos normales PNT2 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	84,5 $\pm$ 8,2	77,3 $\pm$ 7,4	71,1 $\pm$ 5,6	61,2 $\pm$ 5,2
15 μ M (API+AR)	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 6,4	83,5 $\pm$ 8,1	85,5 $\pm$ 6,3	100,0 $\pm$ 7,3*
25 μ M (API +AR)	100,0 $\pm$ 6,1	100,0 $\pm$ 7,4	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 9,80	100,0 $\pm$ 8,3*

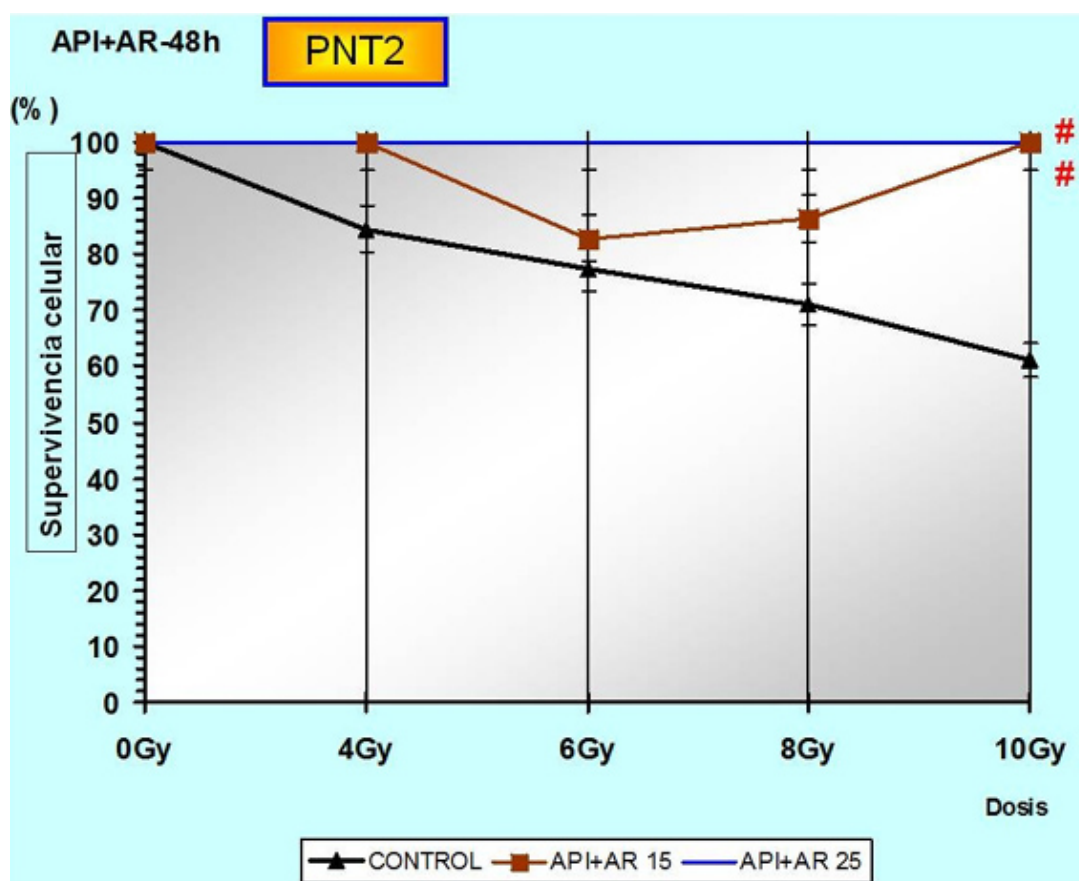


Figura C21. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Después de la irradiación con la dosis de radiación más alta de 10 Gy y tras un período de incubación de 48 horas, el FP obtenido en las células tratadas con las mezclas equimolares 15 μ M y 25 μ M de API y AR fue 100%.

IV.5. Resultados.

**RESULTADOS DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS TRAMPC1
(CELULAS TUMORALES DE PRÓSTATA MURINO).**

IV..5. RESULTADOS DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

RESULTADOS DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS TRAMPC1 (CELULAS TUMORALES DE PRÓSTATA MURINO)

- **Porcentaje de supervivencia celular en los cultivos controles tras la exposición a rayos X**

Los resultados del análisis realizado en células TRAMPC1 que no se trataron con ninguna sustancia pero que se expusieron a dosis de rayos X de 0 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy y 10 Gy se muestran a continuación en la tabla D1. Se observa una progresiva disminución en el número de células vivas que es inversamente proporcional tanto a la dosis de radiación administrada como a al período de incubación de las células tras la irradiación; es decir, cuanto mayor es la dosis de radiación y cuanto mayor es el período de incubación de las células tras la irradiación, menor es la supervivencia celular de estas células. Tras la exposición a 10 Gy de rayos X, la proporción de células supervivientes se redujo en un 53% y un 77% cuando se examinaron tras 24 y tras 48 horas de incubación tras la irradiación, respectivamente ($p < 0,001$); lo que expresa el daño citotóxico inducido por la radiación ionizante y la importancia del tiempo de incubación para que estas lesiones radioinducidas de presenten (Tabla D1; Fig. D1).

Tabla D1. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino controles TRAMPC1

Tiempo/Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
24 horas	100,0 $\pm$ 5,8	88,0 $\pm$ 7,0	64,0 $\pm$ 7,3	61,2 $\pm$ 5,6	47,2 $\pm$ 5,2*
48 horas	100,0 $\pm$ 4,3	51,0 $\pm$ 8,1	35,3 $\pm$ 7,1	35,1 $\pm$ 5,4	23,2 $\pm$ 4,9*

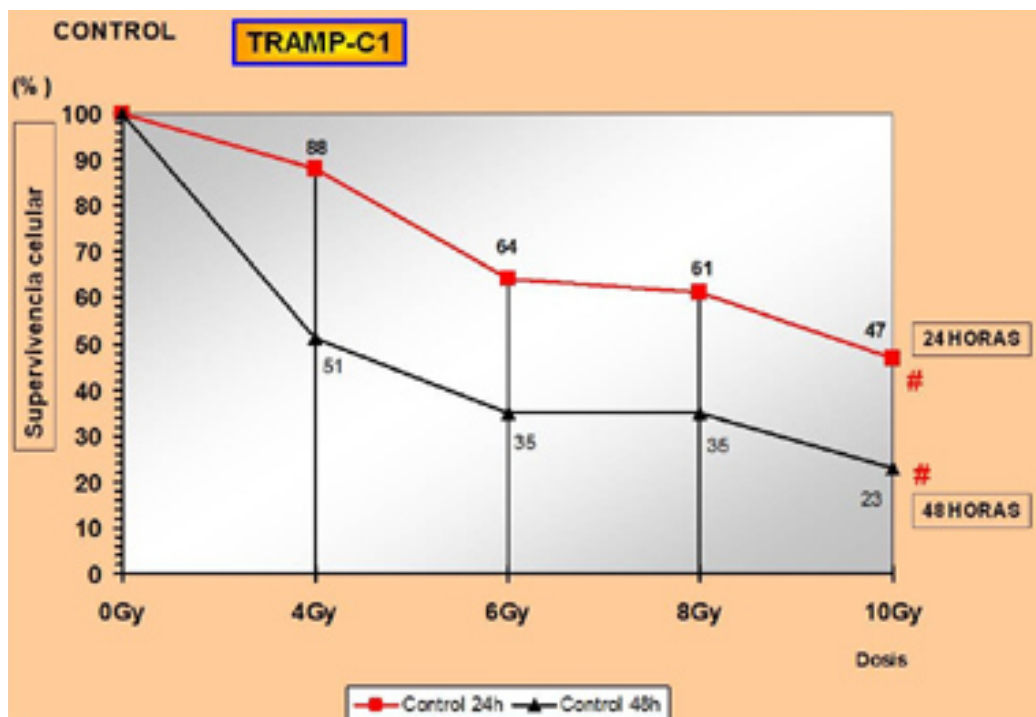


Figure D1. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 (*): ($p < 0,001$) versus células controles irradiadas).

- SUSTANCIAS ENSAYADAS

La Figura D2 muestra el efecto de la administración de diferentes sustancias y algunas de sus mezclas sobre las células tumorales de próstata murino TRAMPC1. Las diferentes sustancias y mezclas (25 μ M y 50 μ M) se utilizaron para determinar su capacidad de radioprotección.

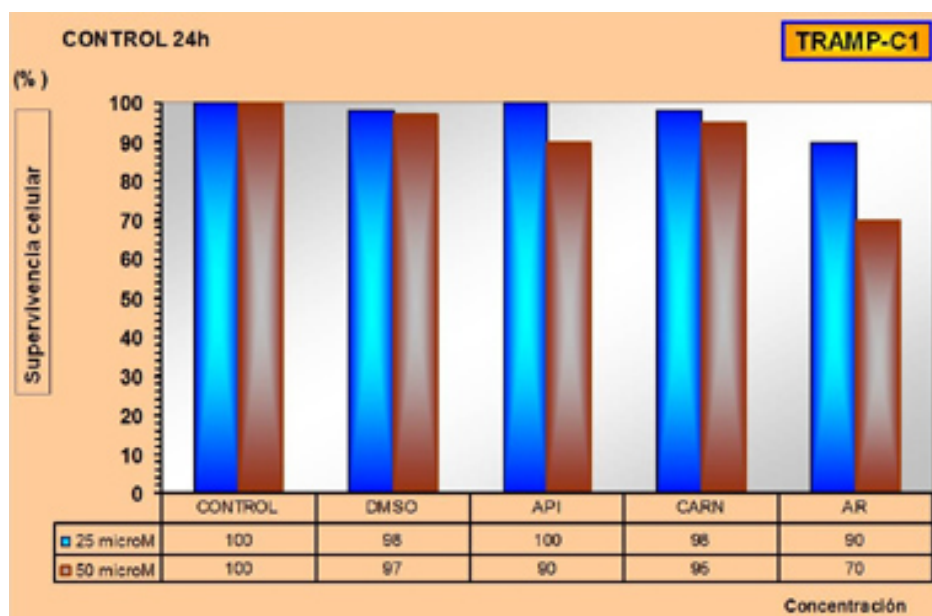


Figure D2. Porcentaje de supervivencia celular de los cultivos de células controles después de la administración de las diferentes sustancias estudiadas en células TRAMPC1 tras un período de incubación de 24 horas (DMSO: Dimethylsulfoxido; API: Apigenina; CARN: ácido carnósico; AR: ácido rosmarínico).

De igual modo las diferentes concentraciones de sustancias y mezclas (25 μ M y 50 μ M) estudiadas para evaluar la capacidad de radioprotección celular en TRAMPC1 con estas sustancias incubadas durante 48h se presentan en la Figura D3.

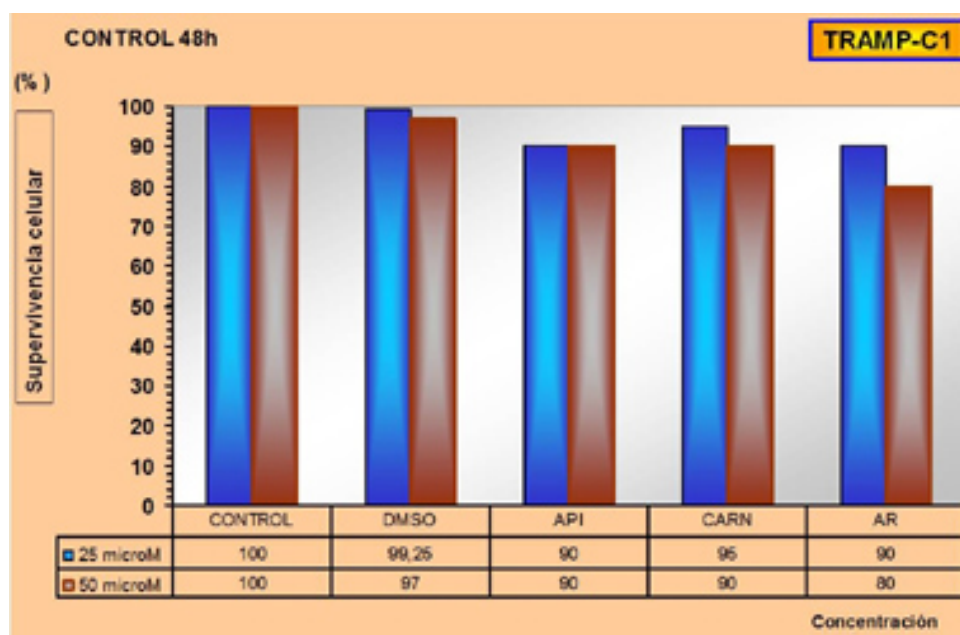


Figure D3. Porcentaje de supervivencia celular de los cultivos de células controles después de la administración de las diferentes sustancias estudiadas en células TRAMPC1 después de un período de incubación de 48 horas (DMSO: Dimethylsulfoxido; API: Apigenina; CARN: ácido carnósico; AR: ácido rosmarínico)

- APIGENINA

Para evaluar la capacidad citoprotectora de la apigenina, las células se TRAMPC1 se trataron con dos concentraciones diferentes de apigenina añadiéndose 20 μ l de cada una de las soluciones 25 μ M y 50 μ M de apigenina durante 30 minutos antes de ser expuestas a 2 Gy de rayos X. Se evaluó la citotoxicidad tras 24 h de incubación de los cultivos celulares. Tras 24 horas después del tratamiento de las células TRAMPC1 con 25 μ M y 50 μ M de apigenina y su exposición a diferentes dosis de irradiación, se determinó una mayor supervivencia celular en comparación con el grupo control irradiado. A 10 Gy, en el grupo control irradiado se observó una reducción de la supervivencia celular del 53%. En las células TRAMPC1 y en ambas concentraciones estudiadas de apigenina, se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular con el grupo control irradiado ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora de la apigenina en las células TRAMPC1 frente al daño citotóxico de la radiación ionizante administrada (Tabla D2; Figura D4).

Tabla D2. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos de celulares tumorales de próstata murino controles TRAMPC1, tratadas con Apigenina 25 μ M y 50 μ M y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	88,0 $\pm$ 6,1	64,5 $\pm$ 8,2	61,0 $\pm$ 4,5	47,1 $\pm$ 3,1
Apigenina 25 μ M	100,0 $\pm$ 6,7	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 6,8	100 $\pm$ 8,5	98 $\pm$ 6,1*
Apigenina 50 μ M	100,0 $\pm$ 7,3	100,0 $\pm$ 6	100,0 $\pm$ 4,1	100,0 $\pm$ 7,4	100,0 $\pm$ 5,1*

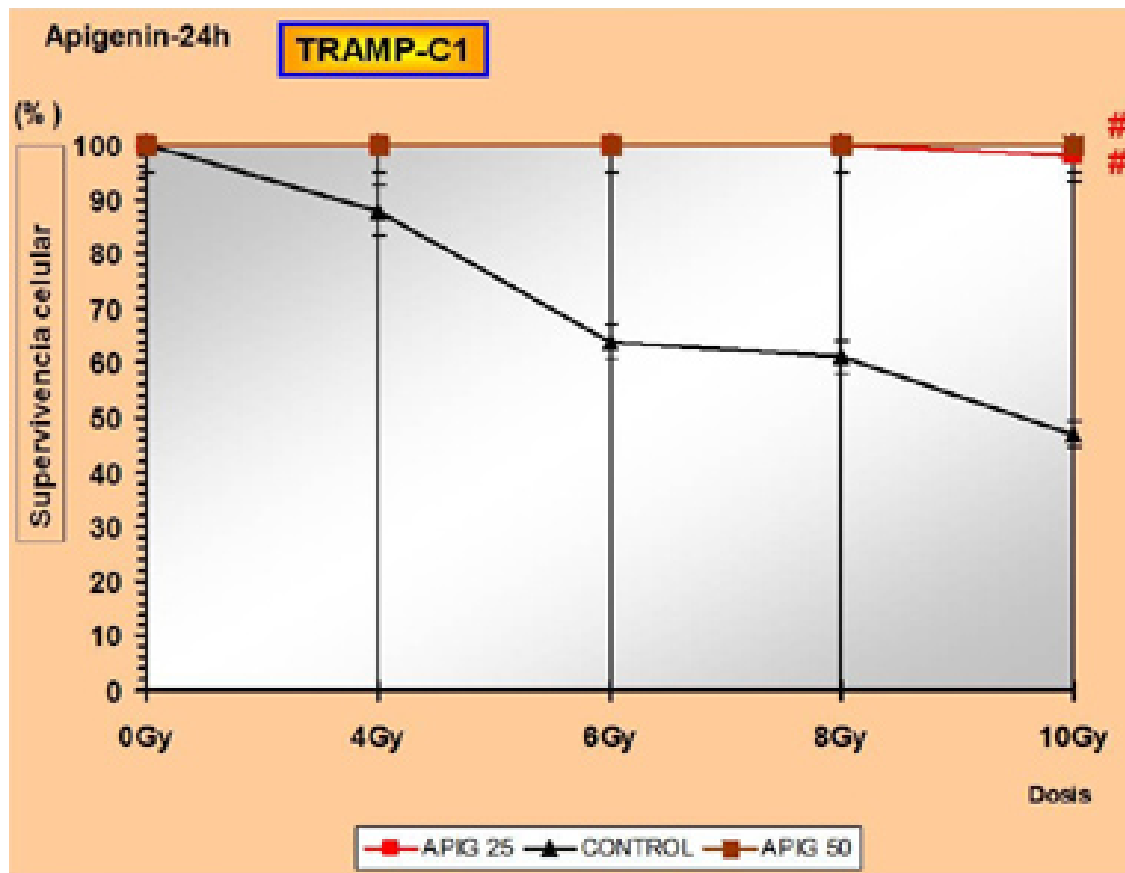


Figura D4. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células tumorales de próstata murina TRAMP-C1 tratadas con apigenina 25 µM y 50 µM e irradiadas con diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Los factores de protección (FP) se evaluaron para los cultivos tratados con apigenina e incubados durante 24 h determinándose que a la dosis de radiación más alta administrada (10 Gy) muestra un FP del 112% para la concentración del 25 µM; mientras que las células tratadas con apigenina 50 µM expresó un FP de 100%.

Después de 48 horas de incubación de las células TRAMP-C1 tratadas con las dos concentraciones de apigenina (25 y 50 µM), los resultados mostraron mayor supervivencia celular que los cultivos controles irradiados, alcanzando un incremento del 77% en la supervivencia celular para las dos concentraciones y con las dosis más altas de radiación utilizada respecto a los cultivos controles irradiados. El análisis estadístico ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en comparación con las células de controles irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa un grado de capacidad radioprotectora de la apigenina frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla D3; Figura D5).

Tabla D3. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con 25 μ M y 50 μ M de Apigenina y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	51,3 $\pm$ 4,2	35,2 $\pm$ 1,8	35,1 $\pm$ 0,6	23,4 $\pm$ 2,0
Apigenina 25 μ M	100,0 $\pm$ 6,5	100,0 $\pm$ 6,2	100,0 $\pm$ 7,8	100,0 $\pm$ 7,6	100,1 $\pm$ 2,6*
Apigenina 45 μ M	100,0 $\pm$ 6,6	100,0 $\pm$ 4,3	100,0 $\pm$ 2,0	100,2 $\pm$ 7,1	98,8 $\pm$ 4,1*

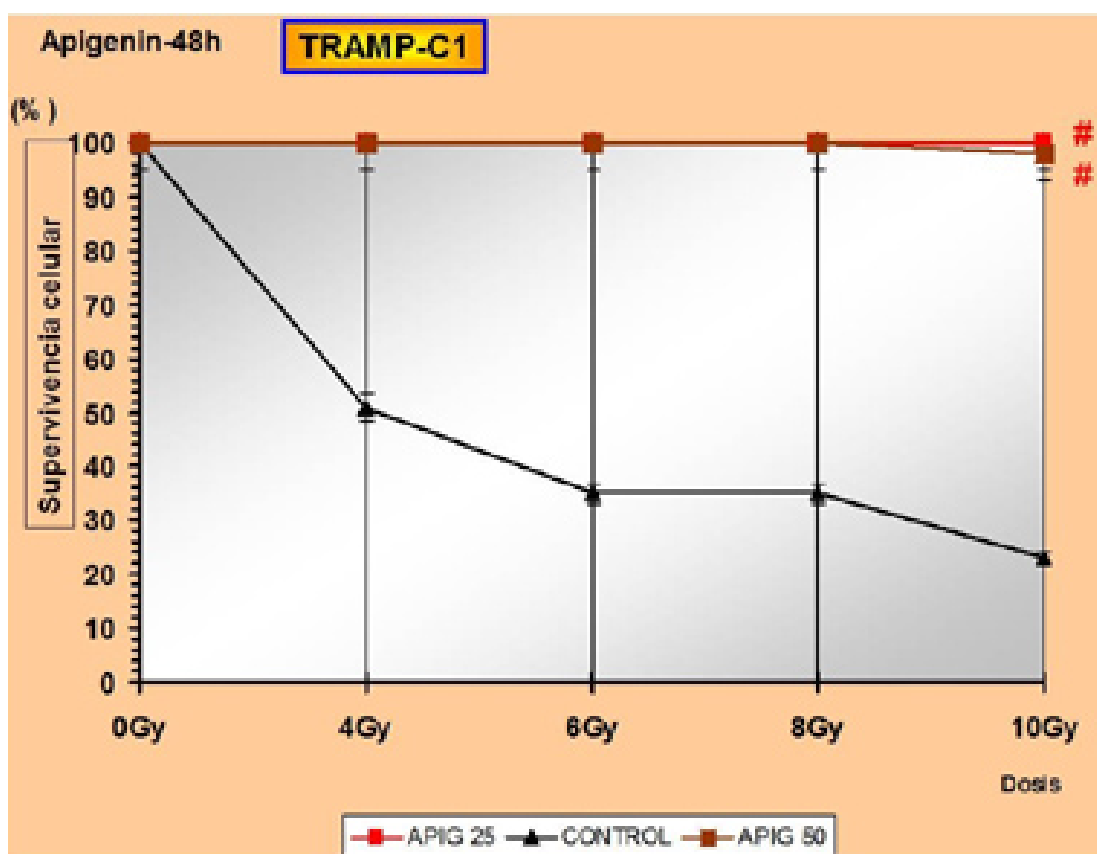


Figura D5. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células tumorales de próstata murina TRAMPC1 tratadas con Apigenina 25 μ M y 50 μ M y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación (*): (p < 0,001) versus control irradiado).

El **Factor de protección (FP)** obtenido cuando las células TRAMPC1 se trataron con 25 μ M de apigenina y se expusieron a una dosis de radiación de 10 Gy tras un período de incubación de 48 horas fue del 334,2%; mientras que para el tratamiento de 50 μ M se obtuvo un valor del 326,8%.

- DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

La administración de DMSO al 0,1% y 0,2% a los cultivos de células TRAMPC1 produjo una disminución de la supervivencia celular del 6,56 % y 14,22 % respectivamente a

las 24 horas de incubación respecto a los cultivos controles no tratados; esto muestra un efecto inhibitorio del crecimiento celular pequeño producido por el DMSO sobre la supervivencia celular de las células TRAMPC1. Tras 48 horas de incubación del tratamiento con DMSO (0,1% y 0,2%) se observó también una disminución del crecimiento celular del 0,75 % y 15,29 % respectivamente en comparación con los cultivos controles no tratados de la misma línea celular.

Después de 24 horas de incubación, los resultados obtenidos de cultivos de células TRAMPC1 con las dos concentraciones de DMSO estudiadas (0,1% y 0,2%) e irradiadas mostraron una mayor supervivencia celular que las células controles irradiadas. Se ha determinado tuvo un incremento del 368% en supervivencia celular para los cultivos de control irradiados a la dosis más alta empleada (10 Gy) y tratados con una concentración del 0,1% y del 53% en la supervivencia celular cuando las células se trataron con DMSO al 0,2%. El análisis estadístico ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en estos cultivos tratados con DMSO en comparación con los cultivos celulares controles irradiados y no tratados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora del DMSO frente al daño citotóxico inducido por los rayos X (Tabla D4; Figura D7).

Tabla D4. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con DMSO (0,1% y 0,2%) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	88,2 $\pm$ 5,1	64,2 $\pm$ 2,0	61,2 $\pm$ 0,4	47,1 $\pm$ 6,0
DMSO 0,1%	100,0 $\pm$ 7,0	100,0 $\pm$ 6,3	100,0 $\pm$ 5,4	95,70 $\pm$ 7,5	83,6 $\pm$ 3,4*
DMSO 0,2%	100,0 $\pm$ 6,5	100,0 $\pm$ 7,0	100,0 $\pm$ 6,2	100 $\pm$ 4,4	100 $\pm$ 4,3*

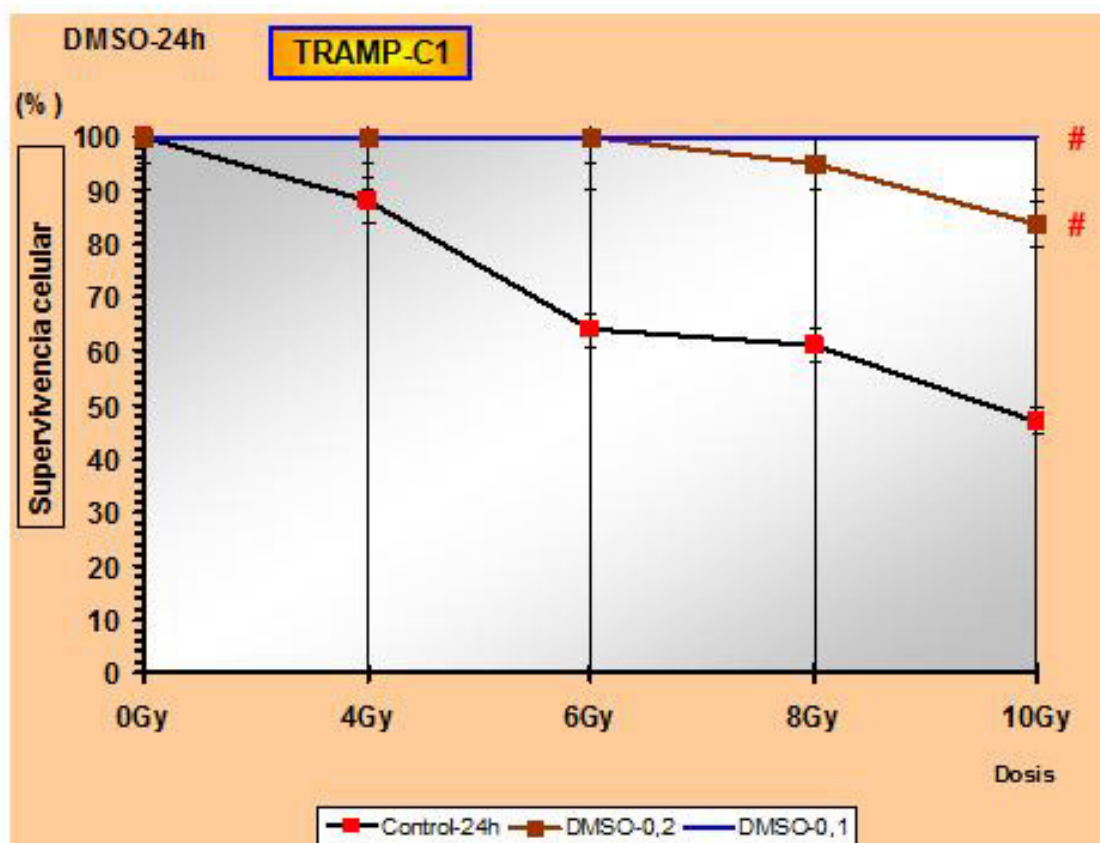


Figura D7. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMP-C1 tratadas con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas tras 24 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de protección (FP)** obtenido para cultivos tratados con DMSO al 0,1% después de una incubación de 24 horas y exposición a la dosis de irradiación más alta (10 Gy) fue del 76%, que alcanza un FP del 112% cuando se administró una solución al 0,2% de DMSO en las mismas condiciones.

Después de 48 horas de incubación, los resultados de supervivencia celular obtenidos para los cultivos celulares TRAMP-C1 tratados con las dos concentraciones de DMSO (0,1% y 0,2%) fueron mucho más elevados que los determinados en el grupo de control irradiado; aunque similares en ambas concentraciones de DMSO utilizadas en el estudio. Ambas concentraciones de DMSO produjeron un incremento del 77% en la supervivencia celular de los cultivos tratados en comparación con la de los controles irradiados. En ambas concentraciones de DMSO, se han determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en comparación con las células controles irradiadas y no tratadas ($p < 0,001$), lo que expresa la capacidad radioprotectora del DMSO frente al daño inducido por la radiación ionizante (Tabla D5; Figura D8).

Tabla C5. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10Gy
Control	100,0 ± 4,5	51,25 ± 6,7	35,7 ± 0,4	35,1 ± 0,5	23,8 ± 6,2
0,1% DMSO	100,0 ± 7,0	100,0 ± 5,4	100,0 ± 7,4	100,0 ± 5,7	100,0 ± 6,2*
0,2% DMSO	100,0 ± 6,1	100,0 ± 7,2	100,0 ± 6,2	100,0 ± 8,2	100,0 ± 9,4*

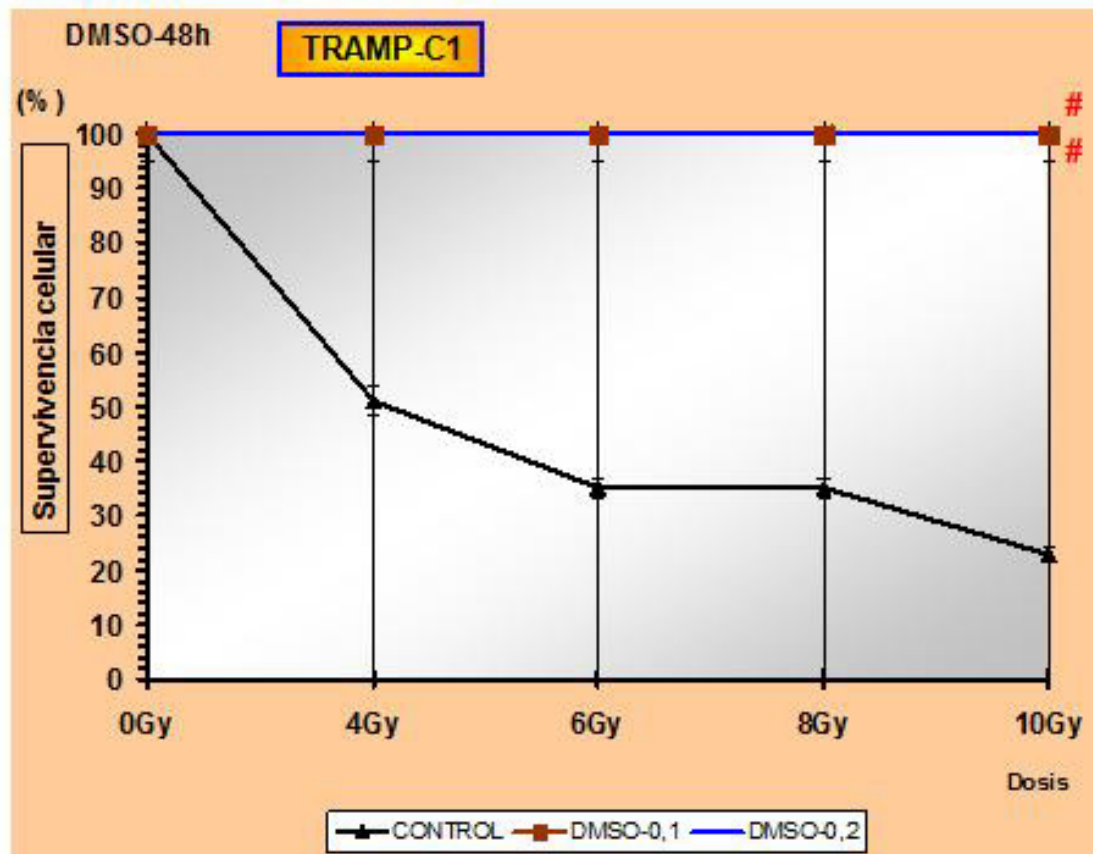


Figura D8. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratadas con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación (*): (p < 0,001) versus control irradiado).

El FP obtenido de los cultivos celulares tratados con las dos concentraciones de DMSO e irradiados con la dosis más alta (10 Gy) tras 48 horas de incubación fue del 334% para ambas concentraciones de DMSO.

- ÁCIDO CARNOSICO

La administración de 20 µl de ácido carnósico al 25 µM y 50 µM tras 24 horas de incubación a las células TRAMPC1 provocó a una disminución del 0,21% y del 15,39% en la viabilidad de las células TRAMPC1 respectivamente, respecto a los resultados obtenidos de los cultivos celulares controles. Tras 48 horas de incubación y a las mismas concentraciones (25 µM y 50 µM), la disminución en la supervivencia celular fue del 18,63% y 33,26% respectivamente. En los cultivos celulares TRAMPC1 tratados con 25 µM y 50 µM de CARN que se irradiaron y se incubaron durante 24 horas, se obtuvo una supervivencia celular

significativa mayor que la determinada en los cultivos controles irradiados. A la dosis de radiación más alta (10 Gy) utilizada en este estudio, la supervivencia celular en los cultivos tratados e irradiados aumentó un 53% en comparación con los cultivos controles irradiados, determinándose un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora del CARN frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (tabla D6; Figura D10).

Tabla D6. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con CARN (25 μ M y 50 μ M) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	88,3 $\pm$ 1,1	64,8 $\pm$ 7,0	61,3 $\pm$ 6,5	47,2 $\pm$ 0,1
25 μ M Ácido Carnósico	100,0 $\pm$ 8,2	100,0 $\pm$ 7,6	100,0 $\pm$ 6,9	100,0 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 9,2*
50 μ M Ácido Carnósico	100,0 $\pm$ 7,9	100,0 $\pm$ 8,3	100,0 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 9,0	90,2 $\pm$ 10,2*

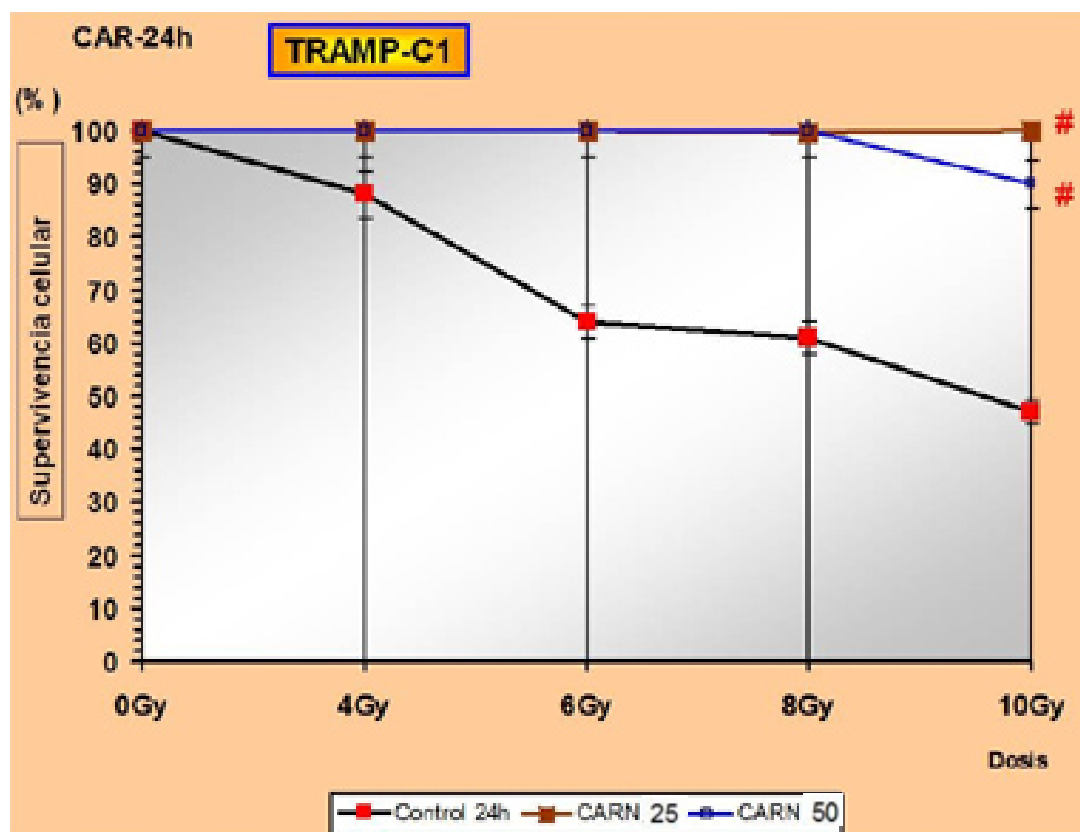


Figura D10. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratadas con CARN (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor De Protección (FP)** obtenido de los cultivos celulares tratados con las dos concentraciones de CARN e irradiados con la dosis más alta (10 Gy) tras 24 horas de incubación fue del 112 % para 25 μ M; mientras que del 91% para 50 μ M de ácido carnósico.

Tras 48 horas de incubación de los cultivos de células TRAMPC1 tratadas con 25 y 50 μ M de ácido carnósico e irradiados con la dosis de radiación más alta (10 Gy) se observó

un incremento de la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares controles irradiados. Tras los dos períodos de incubación (24 h y 48 h), la supervivencia celular similar entre ambos períodos, obteniéndose un prácticamente 77% de incremento en la supervivencia celular en comparación con los controles irradiados y no tratados. En ambas concentraciones utilizadas, se demostró un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular de las células TRAMPC1 respecto a los cultivos celulares de control irradiados y no tratados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora del CARN frente al daño inducido por los rayos X (Tabla D7; Figura D11).

Tabla D7. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con CARN (25 μ M y 50 μ M) y expuestos a diferentes

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 2,5	51,3 $\pm$ 6,2	35,4 $\pm$ 4,4	35,8 $\pm$ 4,4	23,2 $\pm$ 0,2
25 μ M CARN	100,0 $\pm$ 5,5	100,0 $\pm$ 7,4	100,0 $\pm$ 4,7	100,0 $\pm$ 5,7	100,0 $\pm$ 4,9*
50 μ M CARN	100,0 $\pm$ 5,7	100,0 $\pm$ 7,1	100,0 $\pm$ 6,8	100,0 $\pm$ 5,7	98,0 $\pm$ 0,0*

dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

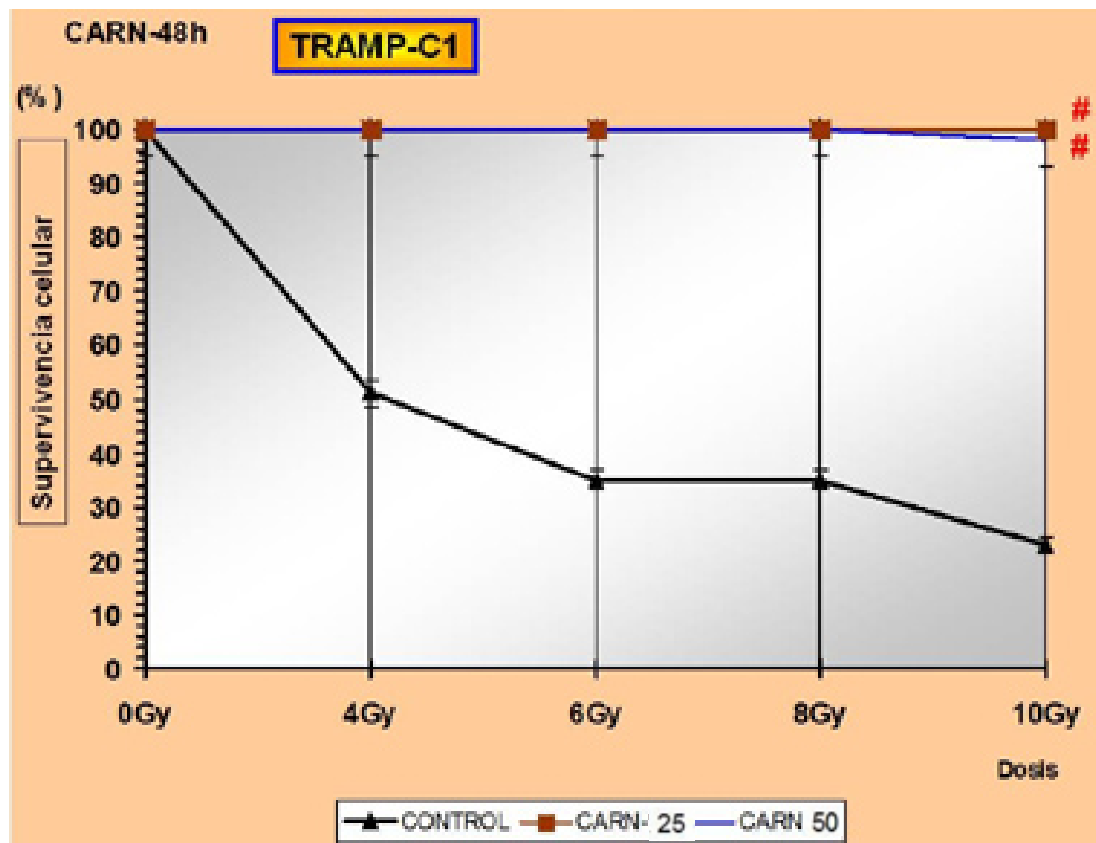


Figura D11. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratadas con CARN (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección (FP)** obtenido de los cultivos tratados con 25 μ M y 50 μ M de ácido carnósico después de 48 horas y la irradiación con la dosis de más alta (10 Gy) fue del 334% para ambas concentraciones de ácido carnósico.

- ACIDO ROSMARINICO (AR)

La administración de 20 μ l de soluciones de AR 25 μ M y 50 μ M a los cultivos de células TRAMPC1 e incubados durante 24 horas no produjo disminución de la supervivencia celular respecto a la de cultivos controles no tratados. Sin embargo, cuando las células se incubaron durante 48 horas, a las mismas concentraciones de AR (25 μ M y 50 μ M), se observó una disminución del 5,77% en supervivencia celular de sólo en los cultivos tratados a la concentración de 25 μ M, ya que a la concentración de 50 μ M tampoco se observó ninguna disminución en la supervivencia celular.

Tras la irradiación y 24 horas de incubación, los resultados obtenidos de los cultivos de células TRAMPC1 tratados con las dos concentraciones de AR (25 μ M y 50 μ M) mostraron una mayor supervivencia celular respecto a los cultivos celulares controles irradiados. A la dosis de radiación más alta (10 Gy) y a la concentración más elevada utilizada en este estudio (50 μ M), se observó un aumento de la supervivencia celular del 21,7% respecto a las células controles irradiadas. Con las dos concentraciones utilizadas se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en comparación con las células control irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora del AR frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla D8; Figura D13).

Tabla D8. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	88,0 $\pm$ 2,0	64,3 $\pm$ 7,2	61 $\pm$ 5,4	47,5 $\pm$ 6,1
Ácido Rosmarínico 25 μ M	100,0 $\pm$ 6,0	71,0 $\pm$ 8,8	71,4 $\pm$ 5,0	64,5 $\pm$ 4,1	64,8 $\pm$ 7*
Ácido Rosmarínico 50 μ M	100,0 $\pm$ 9,2	72,2 $\pm$ 6,1	72, $\pm$ 4,8	68,2 $\pm$ 6,4	68,8 $\pm$ 6*

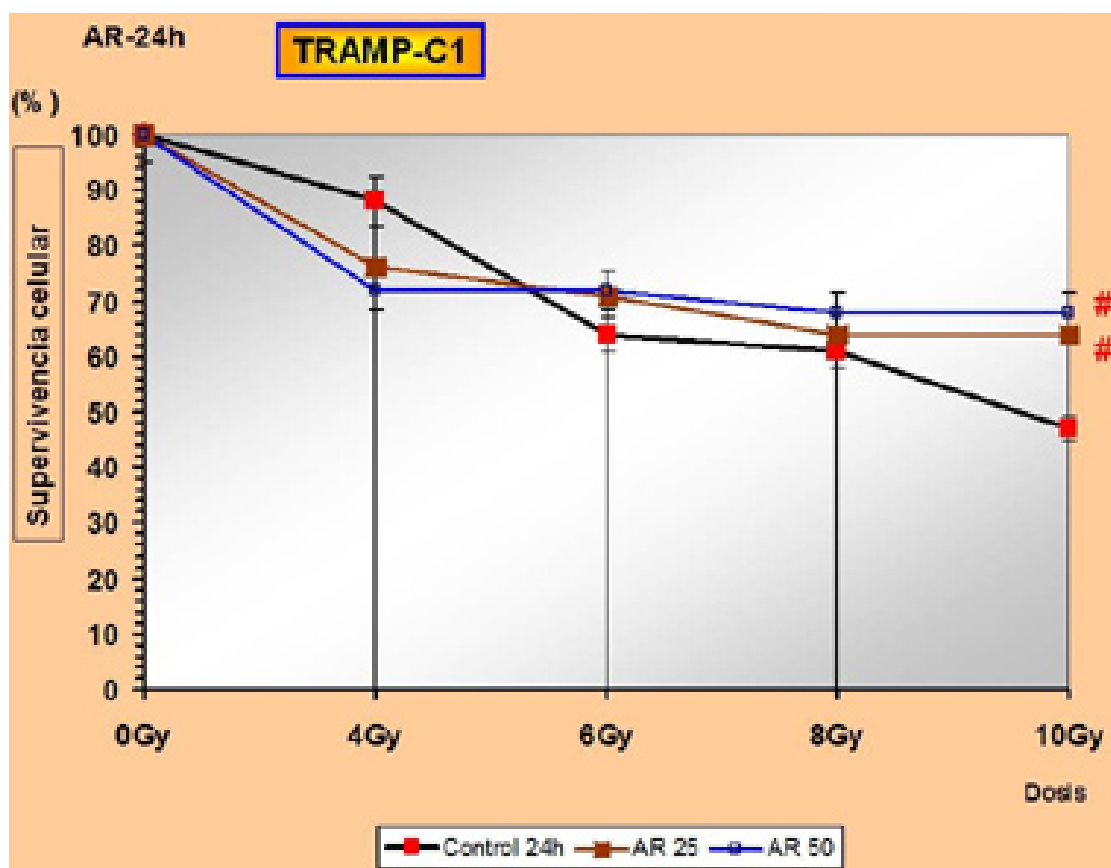


Figura D14. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMP-C1 tratadas con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección** (FP) obtenido en las muestras tratadas con ácido rosmarínico durante 24 horas e irradiadas con la dosis más alta (10 Gy) fue del 36% para las células tratadas con ácido rosmarínico al 25 μ M y del 44,2% con el tratamiento de ácido rosmarínico al 50 μ M.

Después de 48 horas de incubación, los resultados obtenidos para los cultivos de células TRAMP-C1 tratadas a las dos concentraciones de AR (25 y 50 μ M) mostraron una menor supervivencia celular respecto a los cultivos celulares controles irradiados. A la mayor dosis de radiación y a la mayor concentración utilizada en este estudio, la supervivencia celular fue del 20% menor respecto a los cultivos celulares controles irradiados. A ambas concentraciones, se ha determinado una reducción estadísticamente significativa de la supervivencia celular en comparación con las células controles irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una ausencia de capacidad protectora frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla D9; Figura D15).

Tabla D9. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con AR (25 μ M and 50 μ M) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	54,3 $\pm$ 5,2	35,3 $\pm$ 5,5	35 $\pm$ 6,6	23,0 $\pm$,2
Ácido Rosmarínico 25 μ M	100,0 $\pm$ 8,4	41,0 $\pm$ 69,1	19,7 $\pm$ 8,4	14,3 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 1*
Ácido Rosmarínico 50 μ M	100,0 $\pm$ 9,3	5,7 $\pm$ 6,9	6,3 $\pm$ 1,5	3,4 $\pm$ 2,9	3,1 $\pm$ 5,*

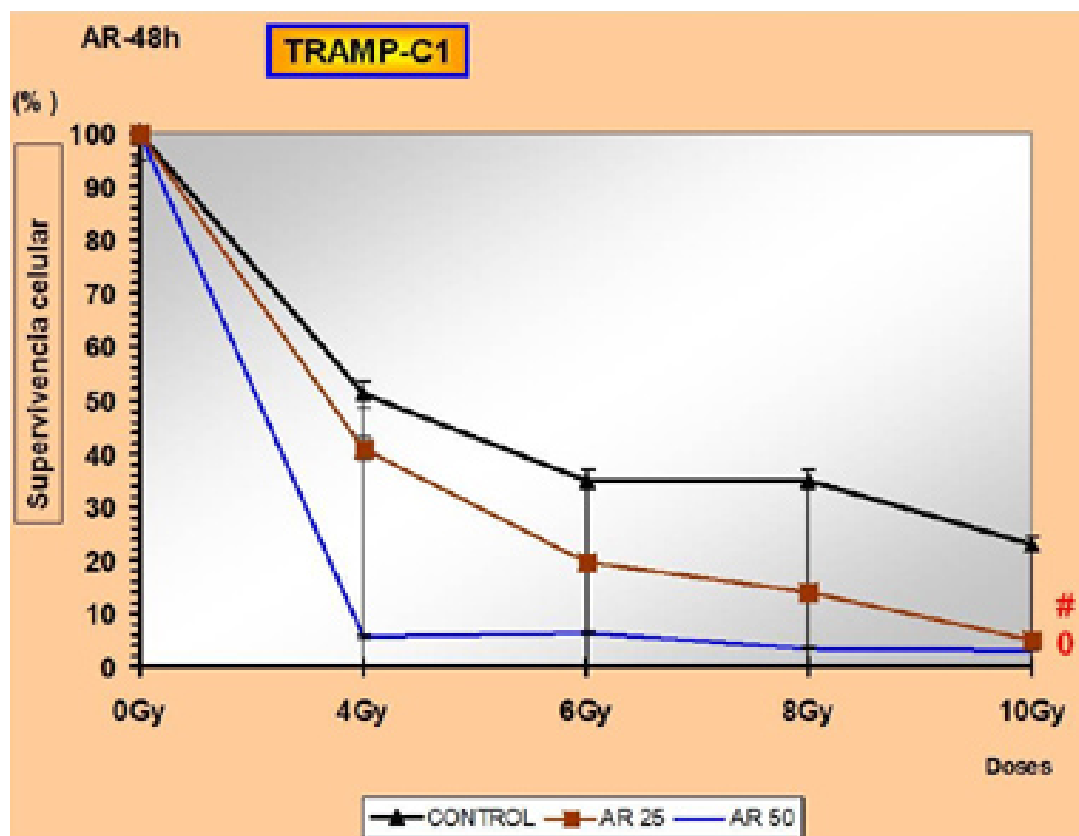


Figura D15. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratadas con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación ((*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Cuando las células se irradiaron con la dosis más alta de 10 Gy y se incubaron durante 48 horas, no se determina ningún factor de protección ya que se pone de manifiesto un efecto radiosensibilizante del ácido rosmarínico sobre las células TRAMPC1.

- MEZCLAS DE APIGENINA Y ÁCIDO CARNÓSICO (API + CARN)

La administración simultánea de cantidades de igual concentración (equimolar) de Apigenina y CARN 20 μ l de 15 μ M (15 μ M API+15 μ M CARN) y 25 μ M (25 μ M API+25 μ M CARN) se evaluó para valorar la supervivencia celular. Después de 24 horas de incubación, la mezcla equimolar 15 μ M no condujo a una disminución de la supervivencia celular; sin embargo, la mezcla equimolar 25 μ M provocó una reducción del 11% de la supervivencia celular con respecto a las células control no tratadas. Tras 48 horas de incubación, no se observó disminución en la supervivencia celular a la concentración más baja (15 μ M), pero se

observó una disminución del 27,5% en la supervivencia celular con la mezcla 25 μM en comparación con los cultivos controles.

Después de la irradiación de las células con la dosis más alta de 10 Gy y la incubación durante 24 horas, los resultados obtenidos con los cultivos celulares TRAMPC1 tratados conjuntamente con las dos sustancias en ambas concentraciones mostraron una mayor supervivencia celular que alcanzo un 53% en comparación con las células controles irradiadas. A ambas concentraciones, se demostró un aumento significativo en la supervivencia celular en comparación con los cultivos controles ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora de la mezcla API+CARN frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla D10; Figura D17)

Tabla D10. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con 15 μM y 25 μM de mezcla (API + CARN) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	88,8 $\pm$ 7,1	64,3 $\pm$ 7,2	61,1 $\pm$ 5,4	47,2 $\pm$ 5,2
15 μM (API + CARN)	100,0 $\pm$ 8,2	91,5 $\pm$ 7,4	88,2 $\pm$ 9,1	89,2 $\pm$ 7,6	73,2 $\pm$ 7,8*
25 μM (API + CARN)	100,0 $\pm$ 8,1	95,5 $\pm$ 7,3	85,1 $\pm$ 6,5	96,1 $\pm$ 2,7	100,0 $\pm$ 8,4*

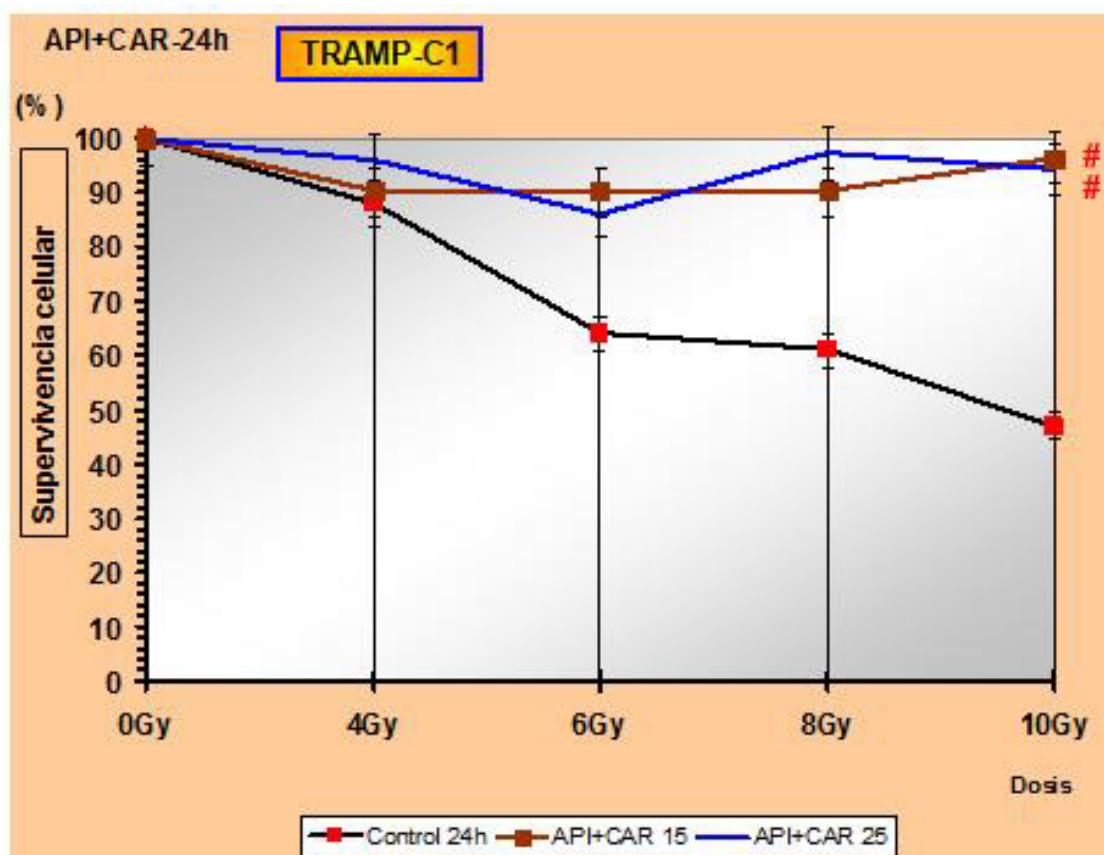


Figura D18. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratadas con 15 μM y 25 μM de mezcla (API + CARN) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Después de de la irradiación de las células con la dosis más alta de 10 Gy y una incubación de 24 horas, el **FP** obtenido de los cultivos celulares tratados con la mezcla de apigenina y CARN fue del 102% para una concentración equimolar de 15 μ M y del 97 % para las mezcla a una concentración de 25 μ M.

Cuando se irradiaron con la dosis de radiación más alta de 10 Gy después de 48 horas de incubación, los cultivos celulares TRAMPC1 tratados con las mezclas 15 μ M y 25 μ M mostraron un aumento de la supervivencia celular de hasta un 77% para la mezcla equimolar mas alta en relación con los controles irradiados y no tratados. A ambas concentraciones, se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora de la mezcla estudiada frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (tabla D11; Figura D18).

Tabla D11. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	51,8 $\pm$ 8,2	35,3 $\pm$ 7,4	35,1 $\pm$ 5,6	23,2 $\pm$ 5,2
15 μ M (API + CARN)	100,0 $\pm$ 8,2	70,5 $\pm$ 7,4	70,2 $\pm$ 9,1	70,8 $\pm$ 7,6	73,2 $\pm$ 8,9*
25 μ M (API + CARN)	100,0 $\pm$ 7,7	88,5 $\pm$ 7,3	92,1 $\pm$ 6,5	86,1 $\pm$ 2,7	100,0 $\pm$ 10,4*

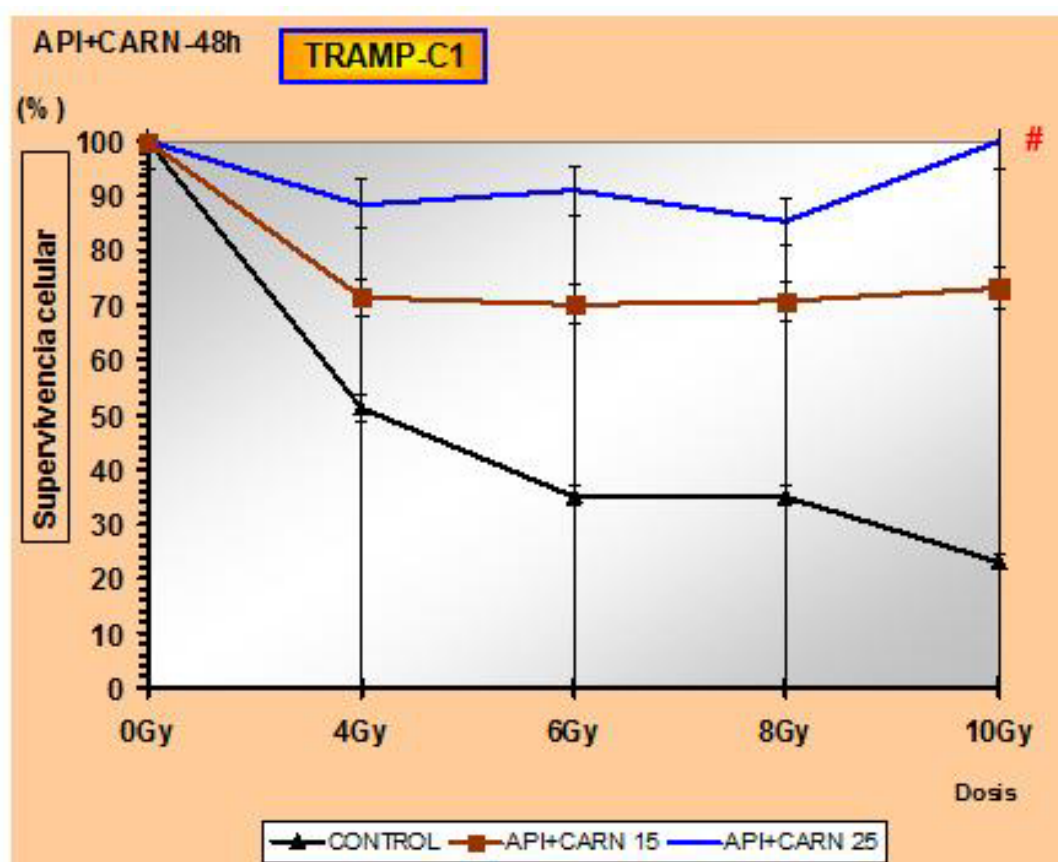


Figura D18. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación ((*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Cuando los cultivos celulares se irradiaron con la dosis de radiación más alta de 10 Gy y se incubaron durante 48 horas, el **FP** obtenido de las células tratadas con apigenina y ácido carnósico fue del 217% para la mezcla 15 μ M y del 334% cuando se utilizó la mezcla 25 μ M.

- **MEZCLAS DE APIGENINA Y ACIDO ROSMARINICO (API + AR)**

Cuando la apigenina y el ácido rosmarínico se coadministraron en concentraciones equimolares de 20 μ l de (15 μ M API + 15 μ M AR) y (25 μ M API + 25 μ M AR), se observó una disminución en el porcentaje de supervivencia celular tras 24 horas de incubación. Para la mezcla 15 μ M, la supervivencia celular se redujo en un 20,4%; mientras que la mezcla 25 μ M produjo una reducción del 47,43%. Después de 48 horas de incubación y el tratamiento a las mismas concentraciones (mezclas 15 μ M y 25 μ M), la disminución de la supervivencia celular para la mezcla 15 μ M fue del 40,9%, mientras que la mezcla 25 μ M produjo una reducción de 62,5%,

En los cultivos celulares TRAMPC1 tratados con mezclas (API + AR) e irradiados, los resultados obtenidos de cultivos para el periodo de incubación de 24 horas tratados con las dos mezclas (15 μ M y 25 μ M) se observó una mayor supervivencia celular en relación con los controles irradiados. Se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular del 53% para ambas concentraciones cuando las células se irradiaron con 10 Gy de radiación. ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora de la mezcla API + AR frente al daño citotóxico inducido por los rayos X (Tabla D12, Figura D20).

Tabla D12. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 5,8	88,0 $\pm$ 7,1	64,2 $\pm$ 7,2	61,2 $\pm$ 5,4	47,2 $\pm$ 5,1
15 μ M (Apigenin+AR)	100,0 $\pm$ 8,9	87,5 $\pm$ 8,1	100,0 $\pm$ 12,4	93,8 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 8,5*
25 μ M (Apigenin+ AR)	100,0 $\pm$ 8,2	87,5 $\pm$ 7,3	87,5 $\pm$ 7,9	94,6 $\pm$ 7,5	100,0 $\pm$ 7,8*

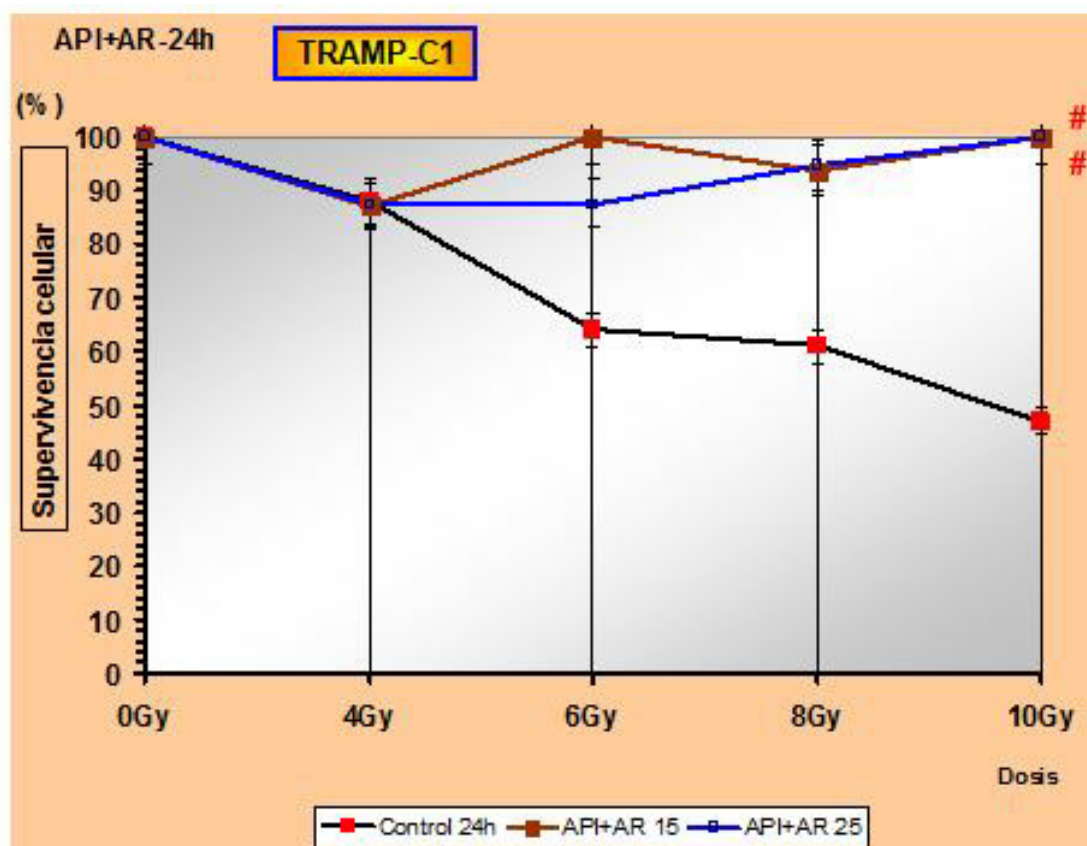


Figura D20. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMP-C1 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Después de 24 horas de incubación, el **FP** obtenido con cultivos celulares TRAMP-C1 tratados con ambas concentraciones de la mezcla de API + AR e irradiados con la dosis de radiación más alta (10 Gy) fue del 112%.

Para la dosis de radiación más alta administrada en este estudio (10 Gy), y después de 48 horas de incubación, los resultados obtenidos para los cultivos celulares TRAMP-C1 tratados con las mezclas equimolares 15 μ M y 25 μ M de API + AR mostraron también un aumento igual en la supervivencia celular. La supervivencia celular aumentó en un 77% para ambas mezclas equimolares y a la dosis de radiación más alta administrada en este estudio (10 Gy). El análisis estadístico ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular de las muestras tratadas con API y AR en comparación con cultivos controles de células irradiadas y no tratadas, lo que expresa una capacidad radioprotectora de la mezcla utilizada frente al daño citotóxico inducido por los rayos X ($p < 0,001$) (Tabla D13; Figura D21).

Tabla C13. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 4,5	51,5 $\pm$ 8,2	35,1 $\pm$ 7,4	35,3 $\pm$ 5,6	23,2 $\pm$ 5,2
15 μ M (API + ROS)	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 6,4	83,5 $\pm$ 8,1	85,5 $\pm$ 6,3	100,0 $\pm$ 7,3*
25 μ M (API + ROS)	100,0 $\pm$ 6,1	100,0 $\pm$ 7,4	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 9,80	100,0 $\pm$ 8,3*

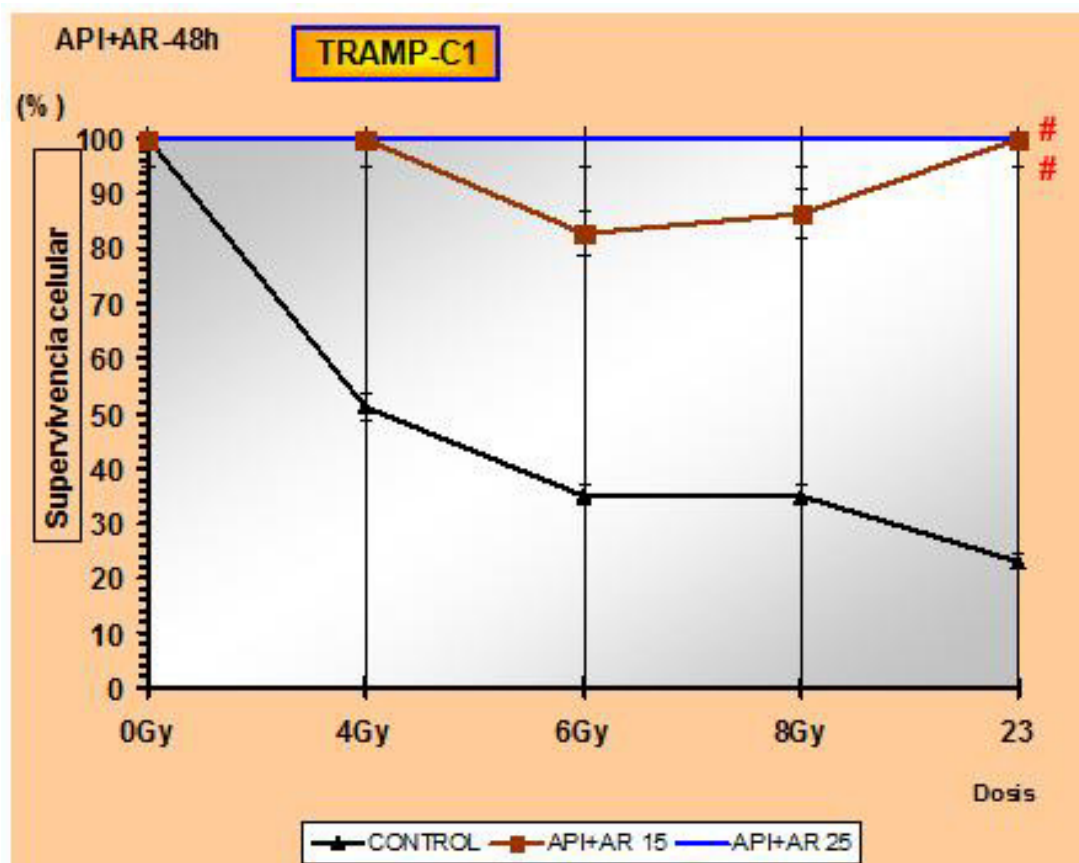


Figura D21. Curvas de supervivencia celular de los cultivos celulares tumorales de próstata murino TRAMPC1 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación (*): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Tras la irradiación con la dosis más alta (10 Gy) y después de un período de incubación de 48 horas, el **FP** obtenido en las células tratadas con las mezclas equimolares 15 μ M y 25 μ M de API y AR fue 334%.

IV.6. Resultados.

**RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA
METASTÁSICO DE RATÓN (B16F10).**

IV.6. Resultados.

RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁSICO DE RATÓN (B16F10).

- **Porcentaje de supervivencia celular en los cultivos B16F10 controles tras la exposición a rayos X**

Los resultados de supervivencia celular de las células B16F10 no tratadas con ninguna sustancia pero irradiadas con varias dosis de rayos X (0 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy y 10 Gy) mostraron una disminución progresiva en el número de células viables determinándose una relación inversamente proporcional a la dosis de radiación y al período de incubación posterior a la irradiación ($p < 0,001$), determinándose que la viabilidad celular disminuye al aumentar la dosis de radiación y al aumentar el período de incubación estudiado. La supervivencia celular tras 24 horas de incubación se redujo en un 33,1% con la dosis de radiación más alta utilizada (10 Gy) y del 41% tras 48 horas de incubación a la misma dosis de radiación ($p < 0,001$); lo que expresa el daño citotóxico inducido por la radiación ionizante y la importancia del tiempo post-irradiación necesario para poder evaluar la muerte celular inducida por los rayos X (Tabla E1; Figura E1).

Tabla E1. Porcentaje de supervivencia celular (%) de cultivos de células B16F10 irradiadas con rayos X tras los dos periodos de incubación post-irradiación estudiados.

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

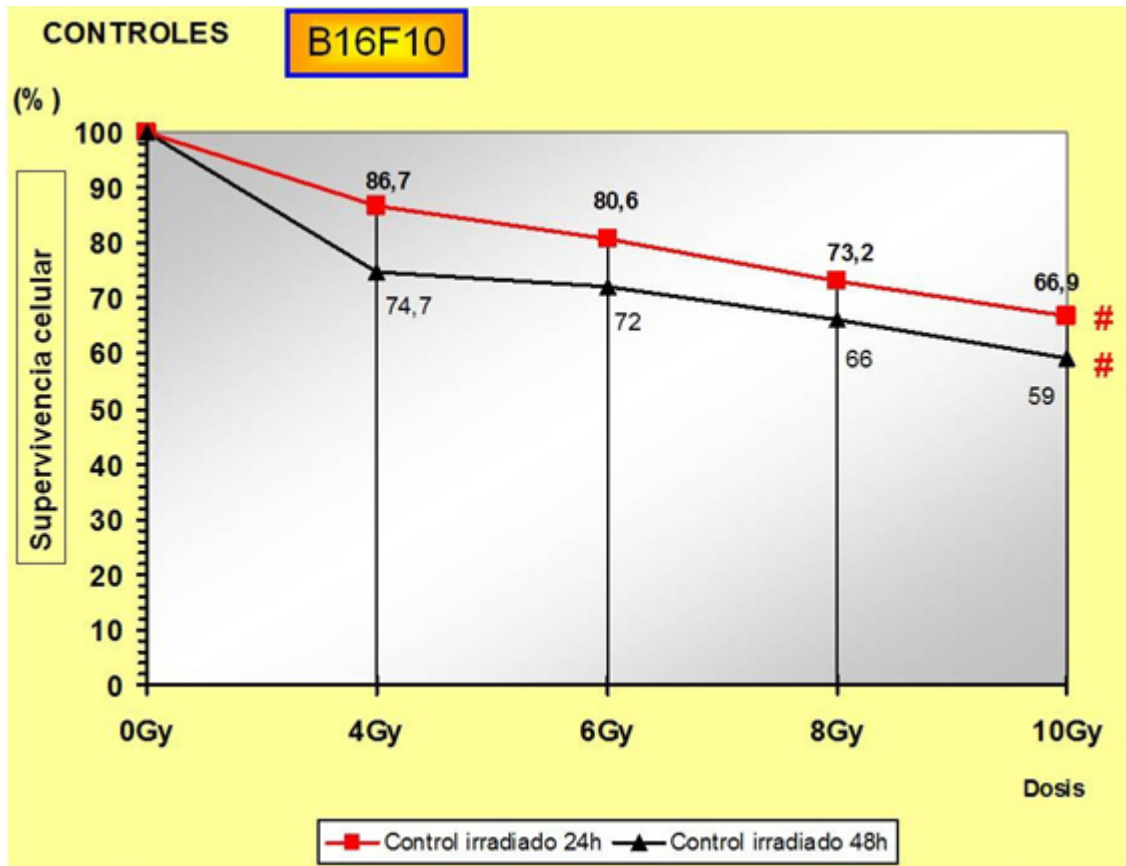


Figura E1. Curvas de supervivencia celular de cultivos celulares controles de melanoma metastásico B16F10 ((#): ($p < 0,001$) frente a las células control irradiadas).

- SUSTANCIAS ENSAYADAS

La figura E2 muestra el efecto de la administración de las diferentes sustancias y mezclas ensayadas sobre las células metastásicas de melanoma B16F10. Se utilizaron diferentes concentraciones de sustancias y mezclas (25 μM y 50 μM) para analizar su capacidad radioprotectora. Los resultados obtenidos después de tratar los cultivos de células B16F10 con estas sustancias e incubar posteriormente los cultivos celulares durante 24 h se resumen en la Figura E2.

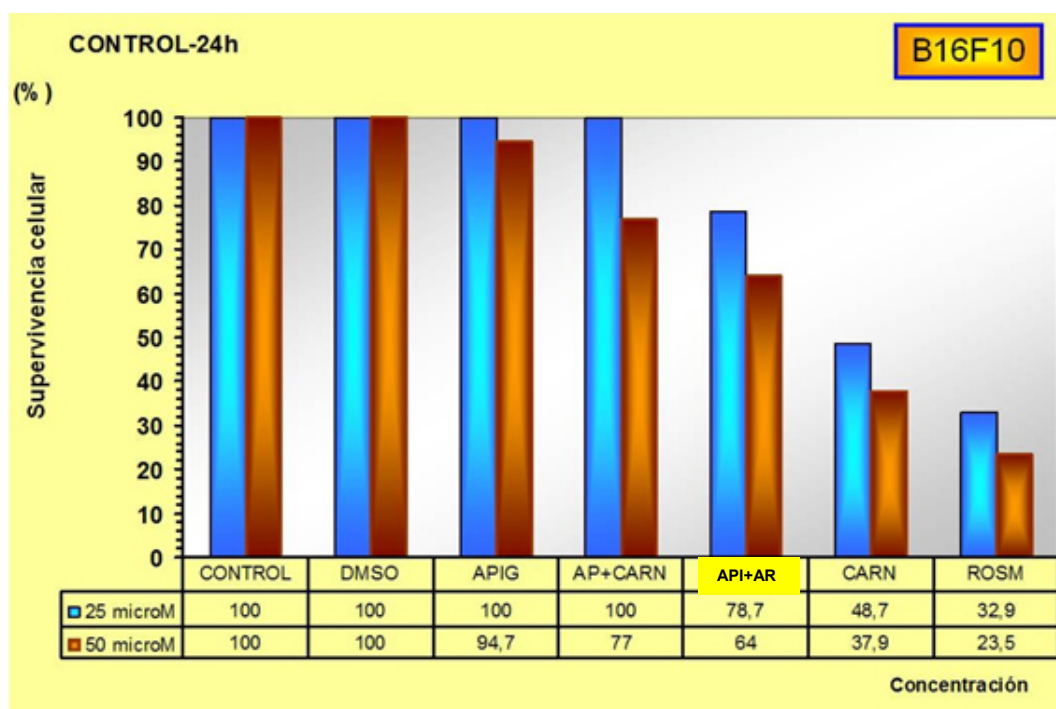


Figura E2. Porcentaje de supervivencia celular de cultivos de células tras la administración de las diferentes sustancias estudiadas en células de melanoma B16F10, después de un período de incubación de 24 h (DMSO: dimetilsulfóxido, API: apigenina, CARN: ácido carnósico, AR: ácido rosmarínico).

Los resultados obtenidos después de tratar los cultivos de células B16F10 con estas sustancias e incubar los cultivos celulares durante 48 h se muestran en la Figura E3.

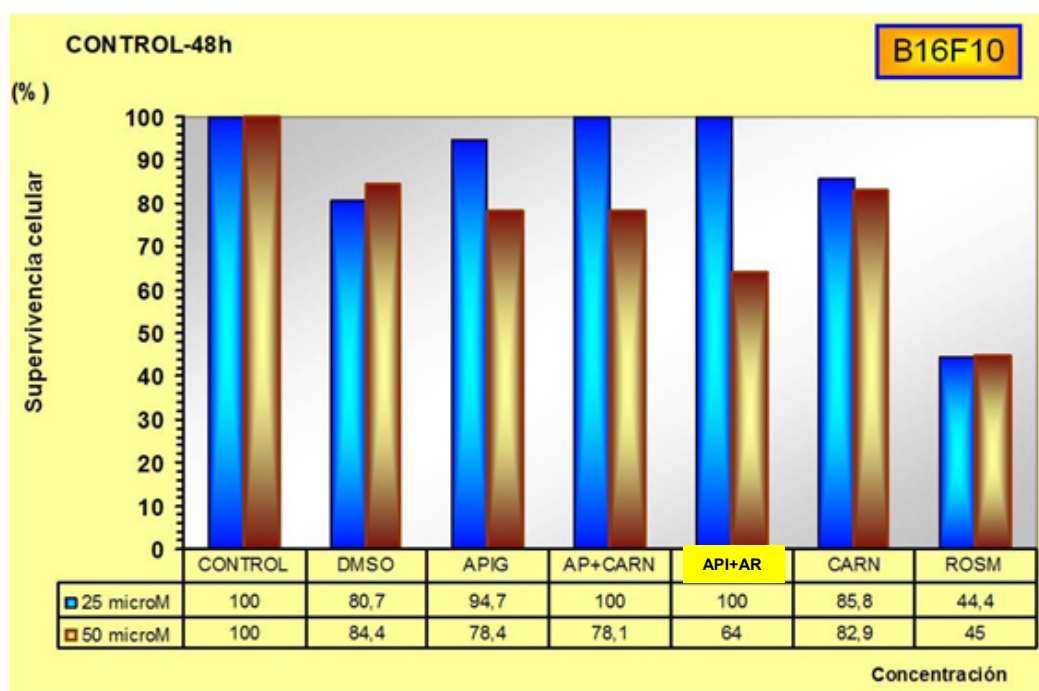


Figura E3. Porcentaje de supervivencia celular de cultivos de células control tras la administración de las diferentes sustancias estudiadas en células de melanoma B16F10 después de un período de incubación de 48 h (DMSO: dimetilsulfóxido, API: apigenina, CARN: ácido carnósico, AR: ácido rosmarínico).

- APIGENINA

El tratamiento de las células B16F10 no irradiadas con 20 μ l de una solución 25 μ M de apigenina durante un período de incubación de 24 horas no produjo disminución en la supervivencia celular en comparación con los cultivos control mostrando ausencia de capacidad citotóxica de la apigenina. Los cultivos celulares B16F10 tratados con las dos concentraciones (25 μ M y 50 μ M) de apigenina y expuestos a rayos X han mostrado una mayor supervivencia celular que las células controles irradiadas. A la dosis de radiación más alta (10 Gy) se ha determinado un incremento de la supervivencia celular del 21% y del 33% en las células tratadas con apigenina e irradiadas (tras 24 y 40 horas respectivamente) en comparación con las células controles irradiadas, determinándose a ambas concentraciones estudiadas un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora de la Apigenina frente al daño citotóxico inducido por los rayos X sobre las células B16F10 (Tabla E2; Figura E4).

Tabla E2. Porcentaje de supervivencia celular (%) de las células B16F10 tratadas con Apigenina 25 μ M y 50 μ M y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas tras 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 9,5	86,7 $\pm$ 7,4	80,6 $\pm$ 8,2	73,2 $\pm$ 6,8	66,9 $\pm$ 7,7
Apigenina 25 μ M	100,0 $\pm$ 7,4	100 $\pm$ 7,1	91,4 $\pm$ 6,5	88,9 $\pm$ 5,3	85,7 $\pm$ 5,2*
Apigenina 50 μ M	100,0 $\pm$ 7,1	100 $\pm$ 8,1	100,0 $\pm$ 5,7	100,0 $\pm$ 6,2	100,0 $\pm$ 6,9*

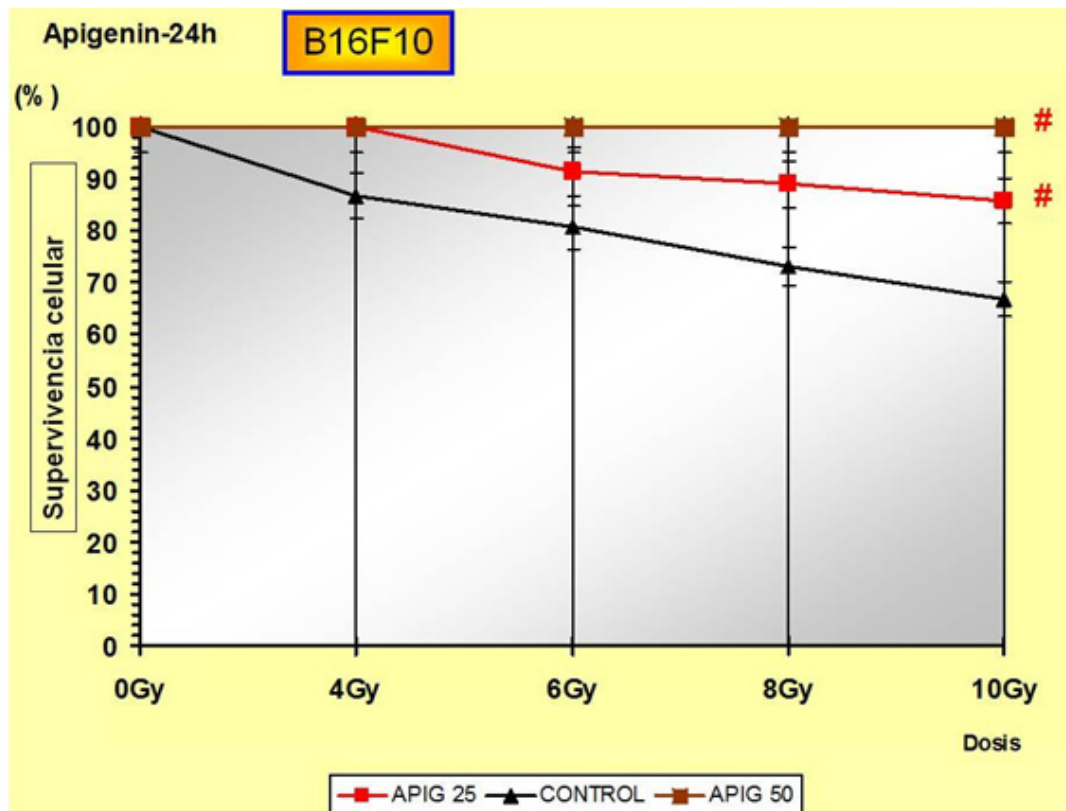


Figura E4. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con apigenina 25 μ M y 50 μ M e irradiadas con diferentes dosis de rayos X, evaluadas tras 24 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección** (FP) obtenido en los cultivos de células B16F10 a las 24 horas de incubación tratados con apigenina 25 μM y expuestos a la dosis de radiación más alta de 10 Gy es 56,8%; y, del 100% cuando las células se trataron con la solución de apigenina 50 μM e incubada durante el mismo período.

Tras 48 horas de incubación en la administración de las dos concentraciones de apigenina (25 y 50 μM), los resultados mostraron también un aumento en la supervivencia celular en comparación con cultivos controles irradiados. Se obtuvo un aumento del 14% en la supervivencia celular para la mayor concentración de apigenina (50 μM) a la dosis de radiación más alta empleada (10 Gy); mientras que el aumento fue del 24% para la concentración más baja (25 μM). A ambas concentraciones de apigenina estudiadas, se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia de células de melanoma B16F10 cuando se comparan con cultivos de células controles irradiadas ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora de la apigenina frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla E3; Figura E5).

Tabla E3. Porcentaje de supervivencia celular (%) de las células B16F10, tratadas con Apigenina 25 μM y 50 μM y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 0	74,7 $\pm$ 8,3	72,0 $\pm$ 6,8	66,0 $\pm$ 7,4	59,0 $\pm$ 5,9
Apigenina 25 μM	100,0 $\pm$ 9,1	100,0 $\pm$ 8,1	83,2 $\pm$ 7,8	74,6 $\pm$ 7,5	83,3 $\pm$ 7,9*
Apigenina 50 μM	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 8,7	90,7 $\pm$ 8,1	82,9 $\pm$ 7,5	73,5 $\pm$ 7,9*

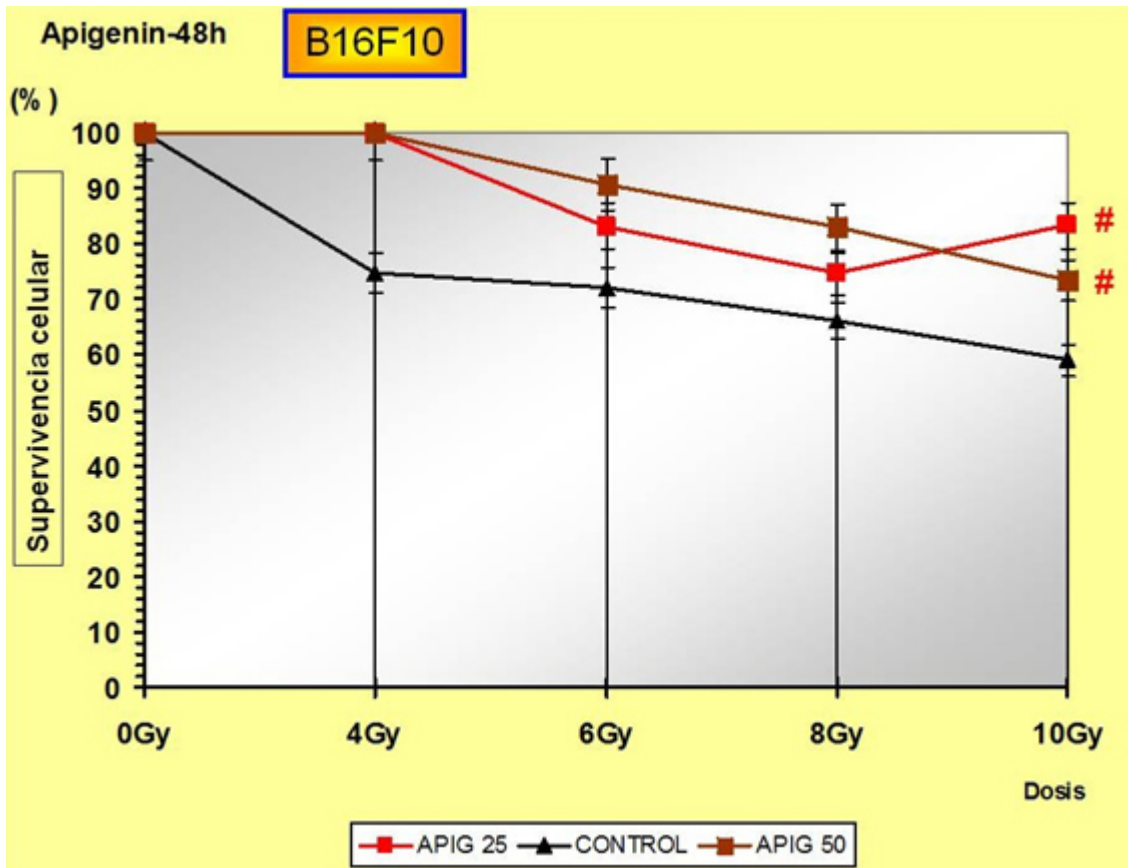


Figura E5. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con apigenina 25 μ M y 50 μ M e irradiadas con diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección** (FP) obtenido de cultivos celulares B16F10 tratados con apigenina 25 μ M después de la exposición a la dosis de radiación más alta (10 Gy) fue del 59% tras 48 horas de incubación y del 35% cuando se utilizó una concentración de apigenina 50 μ M.

- DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

La administración de DMSO al 0,1% y 0,2% a los cultivos de células B16F10 incubadas durante 24 horas produjo una disminución de la supervivencia celular del 19% y 156% respectivamente respecto a los controles no tratados.

Tras 24 horas de incubación de células B16F10 con las dos concentraciones de DMSO estudiadas (0,1% y 0,2%) y la exposición a la mayor dosis de radiación (10 Gy), se observó una mayor supervivencia celular del 21,8% con respecto a células controles irradiadas con la menor concentración de DMSO estudiada (0,1%); mientras que se obtuvo una supervivencia celular del 10% respecto a los cultivos de control irradiados para la concentración más alta de DMSO (0,2%). A ambas concentraciones de DMSO estudiadas, se puso de manifiesto un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia de células de melanoma B16F10 en comparación con cultivos de células controles irradiados ($p < 0,01$); lo

que expresa una capacidad radioprotectora del DMSO frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla 4; Figura E6).

Tabla E4. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 ± 9,5	86,7 ± 7,4	80,6 ± 8,2	73,2 ± 6,8	66,9 ± 7,7
DMSO 0,1%	100,0 ± 5	100,0 ± 8	94,7 ± 3	88,0 ± 3	88,7 ± 2*
DMSO 0,2%	100,0 ± 7	100,0 ± 1	89,0 ± 2	87,6 ± 4	77,0 ± 4 Δ

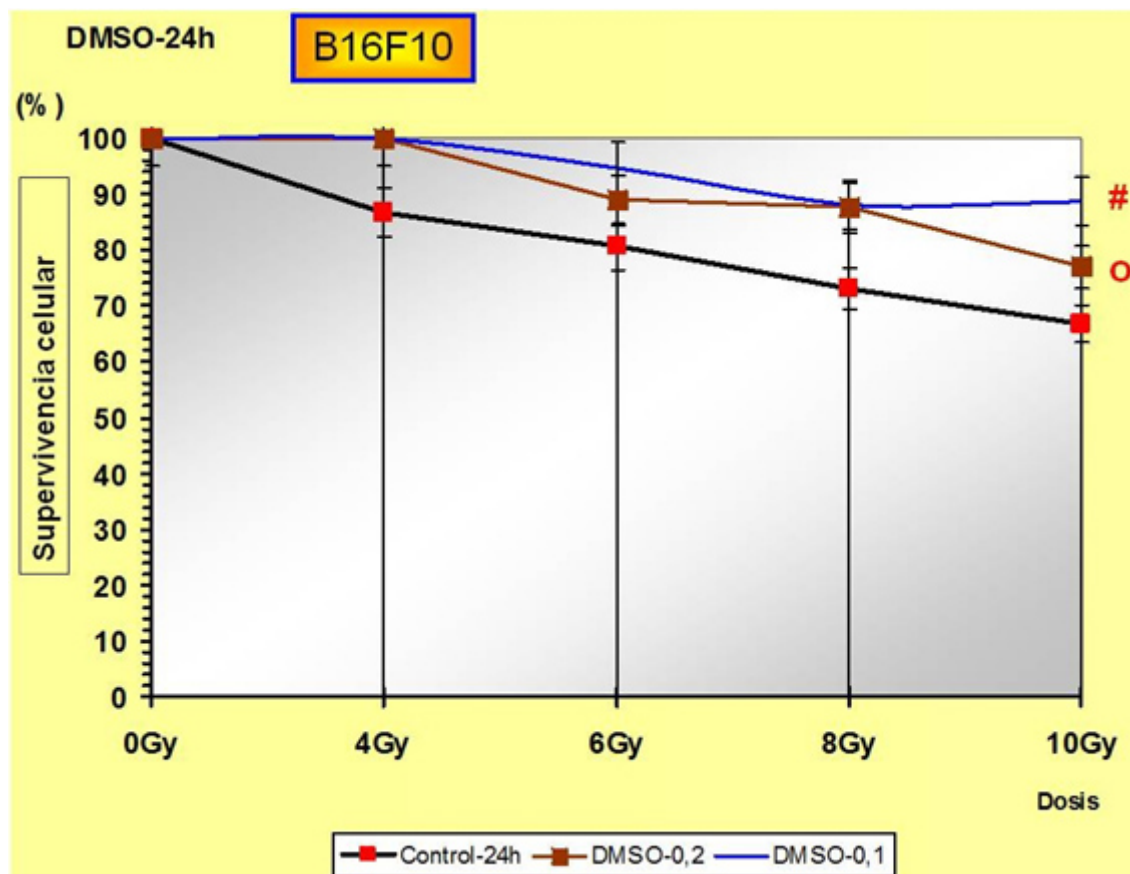


Figura E6. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección** (FP) obtenido de cultivos celulares B16F10 tratados con DMSO al 0,1% y expuestas a 10 Gy de radiación fue del 65,8% tras 24 horas de incubación, mientras que se estableció un FP del 30,5% para cultivos tratados con la mayor concentración de DMSO (0,2%), a la misma dosis de radiación y el mismo período de incubación.

Después de 48 horas de incubación tras la irradiación con rayos X, se observó una mayor supervivencia celular del 6,1% con respecto a los controles irradiados cuando se administró la solución de DMSO al 0,1% a una dosis de radiación de 10 Gy, mientras que a la

concentración más alta de DMSO (0,2%) produjo una supervivencia celular del 7% menos que los controles irradiados a 10 Gy (Tabla E5; Figura E7). Con 48 h de incubación, la supervivencia celular obtenida para cultivos de células de melanoma B16F10 tratados con las dos soluciones de DMSO (0,1% y 0,2%) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con la supervivencia celular obtenida en cultivos celulares controles irradiados; lo que expresa la ausencia de capacidad radioprotectora del DMSO en estas concentraciones frente al daño inducido por la radiación ionizante en este período de incubación estudiado (48 horas) (Tabla E5; Figura E7).

Tabla E5. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 ± 1,2	74,7 ± 8,3	72,0 ± 6,8	66,0 ± 7,4	59,0 ± 5,9
DMSO 0,1%	100,0 ± 6,1	65,0 ± 7,5	71,9 ± 7,1	72,5 ± 6,4	65,1 ± 6,9
DMSO 0,2%	100,0 ± 7,4	58,4 ± 7,0	61,9 ± 6,4	60,1 ± 8,0	52,0 ± 8,1

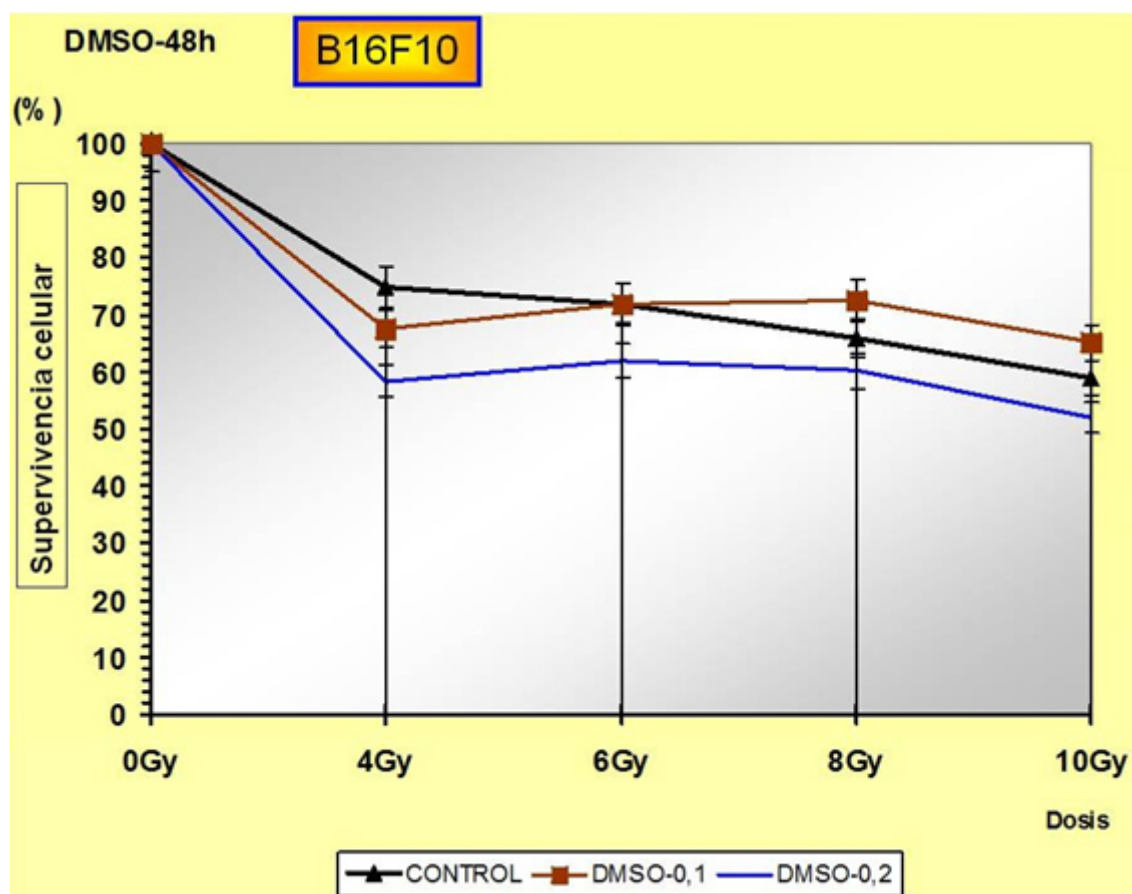


Figura E7. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con DMSO 0,1% y 0,2% y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección (FP)** obtenido para cultivos celulares B16F10 de 48 horas tratados con DMSO al 0,1% y expuestos a la dosis más alta (10 Gy) fue del 14,8%;

mientras que se determina una ausencia de capacidad protectora cuando se utilizó 0,2% de DMSO.

- ACIDO CARNÓSIDO

El tratamiento de cultivos de células B10F16 con 20 microlitros de soluciones 25 μM y 50 μM de ácido carnósido durante 24 horas de incubación produjo una disminución de la supervivencia celular del 51,3% y 62,1% respectivamente con respecto a cultivos de control. Después de 48 horas de incubación a las mismas concentraciones de ácido carnósido (25 μM y 50 μM), la supervivencia celular disminuyó adicionalmente en un 14,2% y 17,1%, respectivamente, en comparación con los cultivos de células controles no tratadas, mostrando un grado de toxicidad del ácido carnosito en estas células B10F16 (Figura E1;E2).

Tras 24 horas de incubación de las células B16F10 irradiadas y tratadas con ambas concentraciones de ácido carnósido (25 y 50 μM), se observó que la supervivencia celular aumentaba un 15,5% para la concentración más baja (25 μM) y un 33,1% para la concentración más alta (50 μM) de ácido carnósido cuando se comparan con los cultivos celulares controles irradiados, para la dosis de radiación más alta (10 Gy) en este estudio. A ambas concentraciones de CARN utilizadas, se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia de las células de melanoma B16F10 en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa una capacidad radioprotectora del CARN frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla E6; Figura E8).

Tabla E6. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con CARN (25 μM y 50 μM) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 9,5	86,7 $\pm$ 7,4	80,6 $\pm$ 8,2	73,2 $\pm$ 6,8	66,9 $\pm$ 7,7
Ácido Carnósido 25 μM	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 8,1	100,0 $\pm$ 7,6	100,0 $\pm$ 7,9	82,3 $\pm$ 9,2*
Ácido Carnósido 50 μM	100,0 $\pm$ 7,9	100,0 $\pm$ 8,4	100,0 $\pm$ 8,2	100,0 $\pm$ 9,1	100 $\pm$ 0,2*

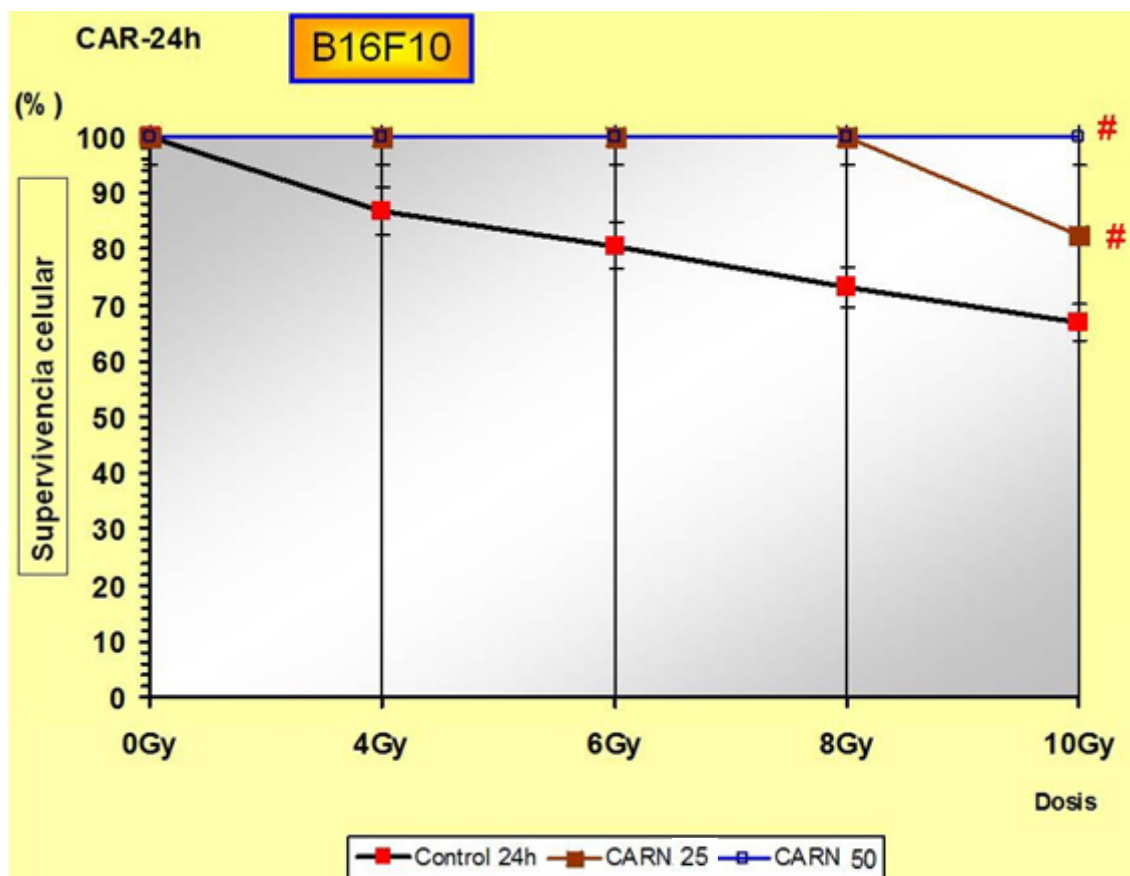


Figura E8. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con CARN (25 µM y 50 µM) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación (#): (p < 0,001) versus control irradiado).

El **Factor de Protección (FP)** obtenido para cultivos celulares B16F10 tratados con ácido carnósico 25 µM y expuestos a la dosis más alta (10 Gy) fue del 46,5% tras 24 horas de incubación y del 100% cuando se utilizó solución de CARN 50 µM.

Después de 48 horas de incubación tras la irradiación, el tratamiento de las células B16F10 la supervivencia celular disminuyó en un 19% y 2% para las concentraciones 25 µM y de 50 µM respectivamente, en comparación con las células controles irradiadas. En ambas concentraciones de CARN no se han determinado diferencias estadísticamente significativas con las obtenidas en los cultivos de células controles irradiados (Tabla E7; Figura E9). Por el contrario, la administración de CARN mostró un efecto de radiosensibilización, incrementando el daño citológico inducido por la radiación ionizante (Figura E9).

Tabla E7. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con CARN (25 µM y 50 µM) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10Gy
Control	100,0 ± 0	74,7 ± 8,3	72,0 ± 6,8	66,0 ± 7,4	59,0 ± 5,9
Ácido Carnósico 25 µM	100,0 ± 6,9	100,0 ± 7,9	77,7 ± 7,1	62,3 ± 6,2	39,8 ± 6,2 ^Δ
Ácido Carnósico 50 µM	100,0 ± 8,4	100,0 ± 9,1	76,1 ± 7,4	71,2 ± 6,2	56,5 ± 6,7

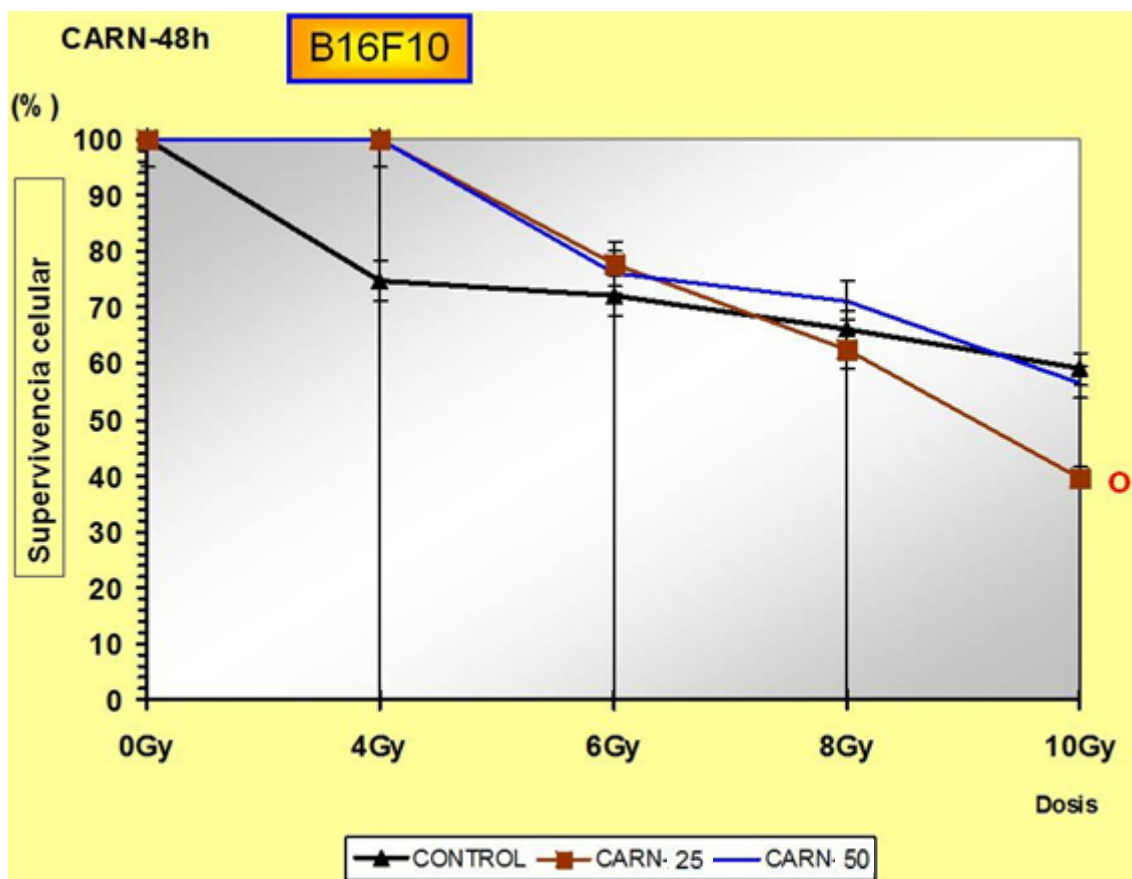


Figura E9. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con CARN (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación ((O): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **Factor de Protección (FP)** obtenido de los cultivos celulares B16F10 tras 48 horas de incubación tratados con las dos concentraciones de ácido carnósico probadas (25 μ M y 50 μ M) y expuestos a la dosis de radiación más alta (10 Gy) fue cero, no determinándose capacidad de protección.

- **ACIDO ROSMARINICO (AR)**

La administración de las dos concentraciones ácido rosmarínico (25 μ M y 50 μ M) e incubadas durante 24 horas produjo una disminución significativa en la supervivencia celular en comparación con los cultivos controles no tratadas. La supervivencia celular disminuyó un 67,1% a la concentración más baja (25 μ M) y un 76% cuando se administró la mayor concentración (50 μ M) de AR (Figura E1). Después de 48 horas de incubación, y a las mismas concentraciones de AR usadas (25 μ M y 50 μ M), hubo una mejoría en la supervivencia celular (ligeramente más alta que a las 24 horas) de 55,6% y 55% para las soluciones 50 μ M y 25 μ M, respectivamente, en relación con los cultivos control (Figura E2).

Los cultivos celulares B16F10 tratados con ambas concentraciones de ácido rosmarínico (25 μ M y 50 μ M) e irradiados con 10 Gy tras 24 horas de incubación muestran una disminución de la supervivencia celular en un 18% con la concentración 25 μ M; mientras que con la concentración de 50 μ M se observa un ligero aumento del 6,6% en comparación con los controles irradiados. En estos cultivos no se han determinado diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con los valores de supervivencia celular obtenidos en los cultivos controles irradiados, lo que expresa ausencia de capacidad protectora del AR frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante. Pero además, los resultados obtenidos con la solución AR 25 μ M en B16F10 mostraron un efecto radiosensibilizador aumentando el daño provocado por los rayos X (Tabla E8; Figura E10).

Tabla E8. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 9,5	86,7 $\pm$ 7,4	80,6 $\pm$ 8,2	73,2 $\pm$ 6,8	66,9 $\pm$ 7,7
A. Rosmarínico 25 μ M	100,0 $\pm$ 6,1	61,0 $\pm$ 6,3	46,5 $\pm$ 5,5	48,9 $\pm$ 7,1	48,9 $\pm$ 6,8*
A. Rosmarínico 50 μ M	100,0 $\pm$ 9,2	70,0 $\pm$ 7,1	73,0 $\pm$ 4,7	73,0 $\pm$ 9,2	73,5 $\pm$ 6,9

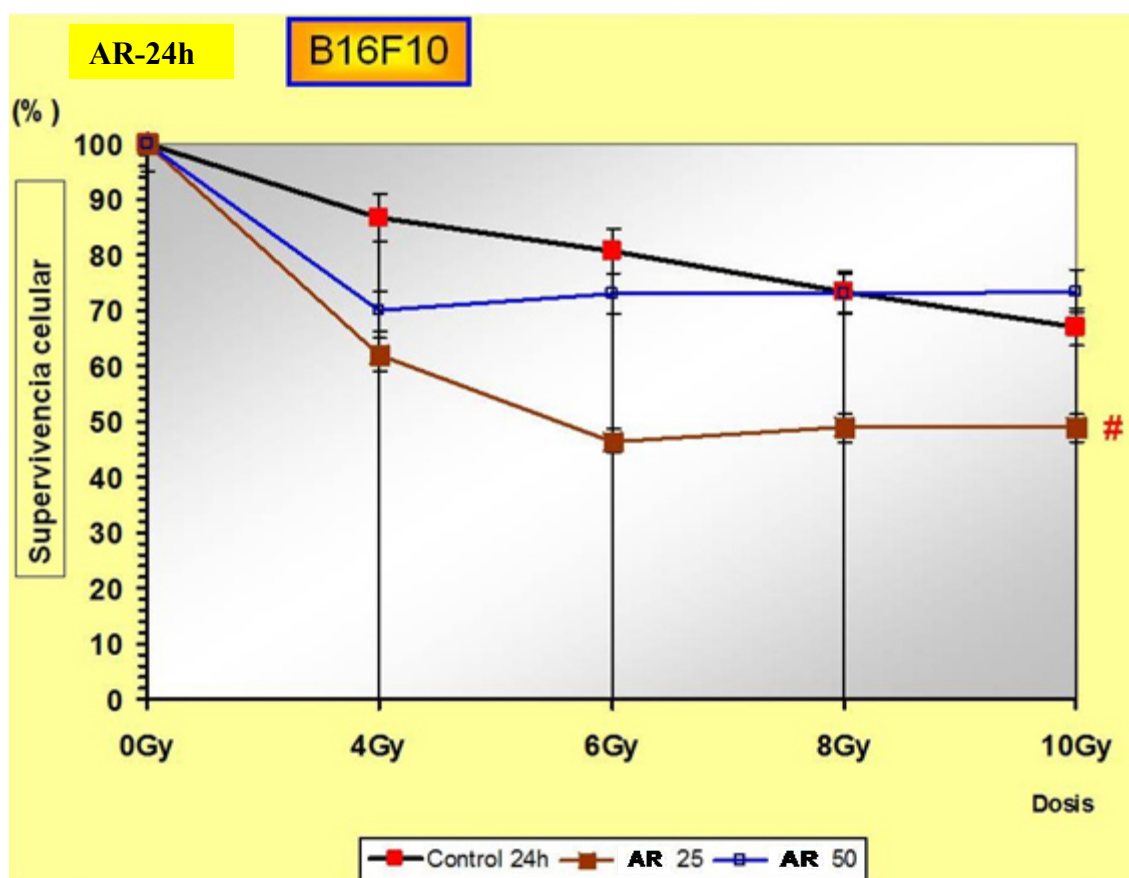


Figura E10. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con AR (25 μ M y 50 μ M) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación ((#): (p < 0,001) versus control irradiado).

El **Factor de Protección** (FP) obtenido en las muestras **B16F10** tratadas con ácido rosmarínico 25 μM e irradiados a la dosis más alta (10 Gy) fue del 0% tras 24 horas de incubación; el AR a la concentración 25 μM no muestra capacidad radioprotectora; sin embargo, cuando las células se trataron con 50 μM de ácido rosmarínico, se irradiaron con 10 Gy y se incubaron durante 24 horas, se obtuvo un FP del 19,9 %.

En los cultivos tratados con ambas concentraciones (25 y 50 μM) de ácido rosmarínico con 48 horas de incubación celular tras la exposición a los rayos X se ha determinado una menor supervivencia celular en comparación con los cultivos de control irradiados. A la concentración de 50 μM se registró una disminución del 25% de supervivencia celular en comparación con los cultivos de control irradiados; determinándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$); lo que expresa la ausencia de capacidad protectora alguna del ácido rosmarínico frente al daño inducido por los rayos X. Además, los resultados obtenidos muestran una disminución estadísticamente significativa de la supervivencia celular en las muestras tratadas con AR respecto a los cultivos controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa un efecto de radiosensibilización a la concentración de 50 μM de AR en células de melanoma metastásico B16F10 aumentando el daño citotóxico inducido por la radiación ionizante.

Tabla E9. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con AR (25 μM y 50 μM) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 0	74,7 $\pm$ 8,3	72,0 $\pm$ 6,8	66,0 $\pm$ 7,4	59,0 $\pm$ 5,9
Á. Rosmarínico 25 μM	100,0 $\pm$ 8,5	81,0 $\pm$ 9,4	63,0 $\pm$ 7,8	56,8 $\pm$ 7,3	58,2 $\pm$ 6,9
Á. Rosmarínico 50 μM	100,0 $\pm$ 10,3	58,3 $\pm$ 9,5	63,2 $\pm$ 8,4	36,4 $\pm$ 8,1	34,0 $\pm$ 7*

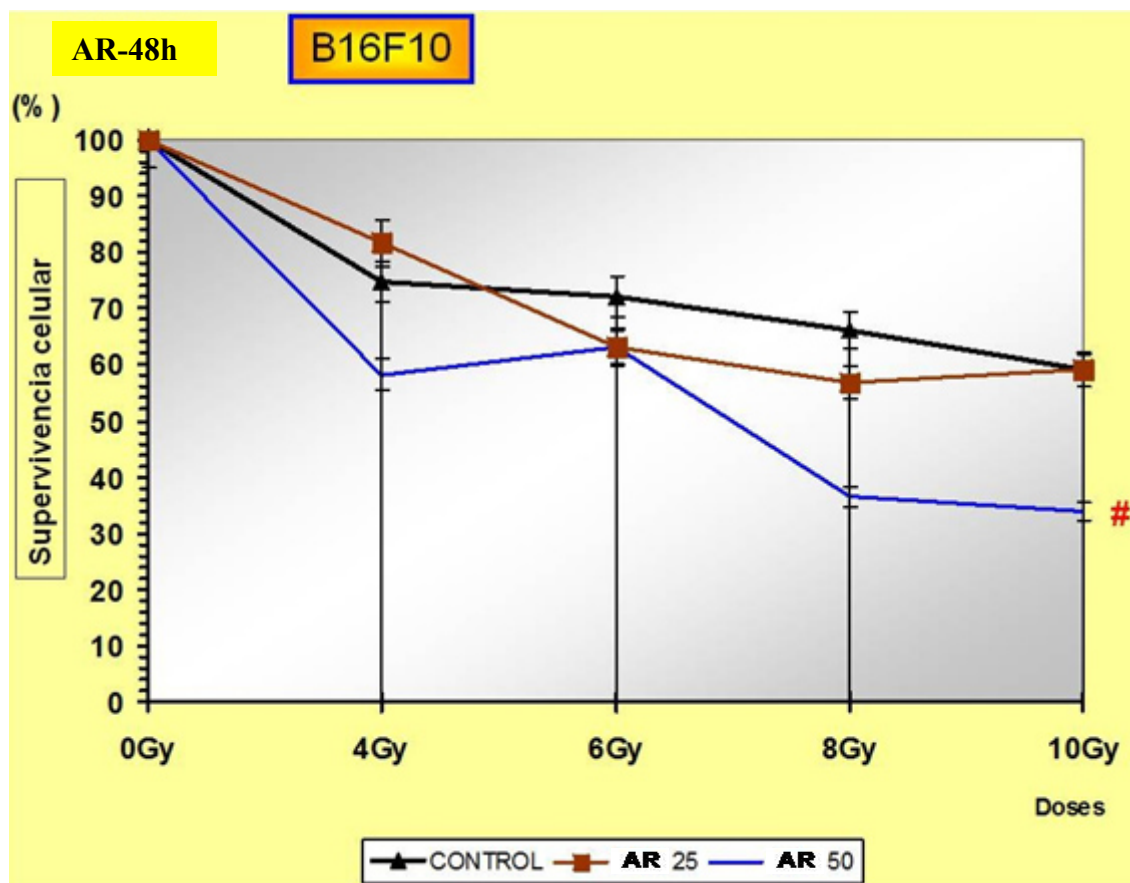


Figura E11. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con AR (25 µM y 50 µM) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Los cultivos celulares incubados durante 48 horas tratados con ácido rosmarínico 25 µM e irradiados con la dosis de radiación más alta de 10 Gy produjeron un **Factor de Protección (FP)** del 0,48% y cero (0%) cuando se trataron con AR 50 µM e irradiados con una dosis de 10 Gy, poniendo de manifiesto la ausencia de capacidad radioprotectora del AR en las células B10F16.

- MEZCLAS DE APIGENINA Y ÁCIDO CARNÓSICO (API + CARN)

Las mezclas de apigenina y ácido carnósico (API + CARN) a concentraciones de 15 µM (15 µM API + 15 µM CARN) y 25 µM (25 µM API + 25 µM CARN) se administraron a cultivos celulares y se evaluó su efecto radioprotector. Tras 24h de incubación de las células B16F10 tratadas simultáneamente tanto con apigenina como con ácido carnósico a las dos concentraciones indicadas anteriormente no mostraron ninguna disminución en supervivencia celular con la mezcla 15 µM, mientras que se observó una disminución en supervivencia celular del 23% en el cultivo de células B16F10 tratadas con la mezcla 25 µM. De forma similar, tras 48 horas de tratamiento a las mismas concentraciones de la mezcla (15 µM y 25 µM) no se observó disminución de la supervivencia celular a la concentración de la mezcla más baja (15 µM) (Fig. E30) pero mostró una disminución de la supervivencia celular del 21,9% con la

concentración de la mezcla 25 μM en comparación con los cultivos de controles no irradiados (Figura E1 y E2).

En los cultivos irradiados, tras 24 horas de incubación de las células B16F10 con el tratamiento conjunto de apigenina y ácido carnósico a las dos concentraciones (15 μM y 25 μM) y la irradiación a la dosis más alta utilizada en este estudio (10 Gy), se observó una disminución en la supervivencia celular en comparación con cultivos celulares control irradiados. Se observó una disminución del 46,9% para la combinación 15 μM mientras que la combinación 25 μM produjo solo un 3% de disminución de la supervivencia celular. No se determinó ningún efecto radioprotector para esta mezcla (Tabla E10; Figura E12); sin embargo, por el contrario, los resultados obtenidos mostraron un efecto radiosensibilizador de la mezcla de 15 μM (API + CARN) sobre células de melanoma B16F10 ya que se han determinado diferencias estadísticamente significativas determinándose una disminución de la supervivencia celular en las muestras tratadas con esta mezcla respecto a los cultivos controles tratados ($p < 0,001$); lo que expresa un efecto radiosensibilizante de esta mezcla frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante (Tabla E10; Figura E12) que en cierta forma es similar al efecto mostrado por la administración de CARN 15 μM administrado de forma aislada.

Tabla E10. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con 15 μM y 25 μM de mezcla (API + CARN) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 9,5	86,7 $\pm$ 7,4	80,6 $\pm$ 8,2	73,2 $\pm$ 6,8	66,9 $\pm$ 7,7
15 μM (API + CARN)	100,0 $\pm$ 6,9	79,0 $\pm$ 9,2	45,2 $\pm$ 7,8	34,3 $\pm$ 8,4	20,0 $\pm$ 9,1*
25 μM (API + CARN)	100,0 $\pm$ 8,1	92,8 $\pm$ 7,9	90,9 $\pm$ 5,3	77,0 $\pm$ 6,2	63,9 $\pm$ 7,5

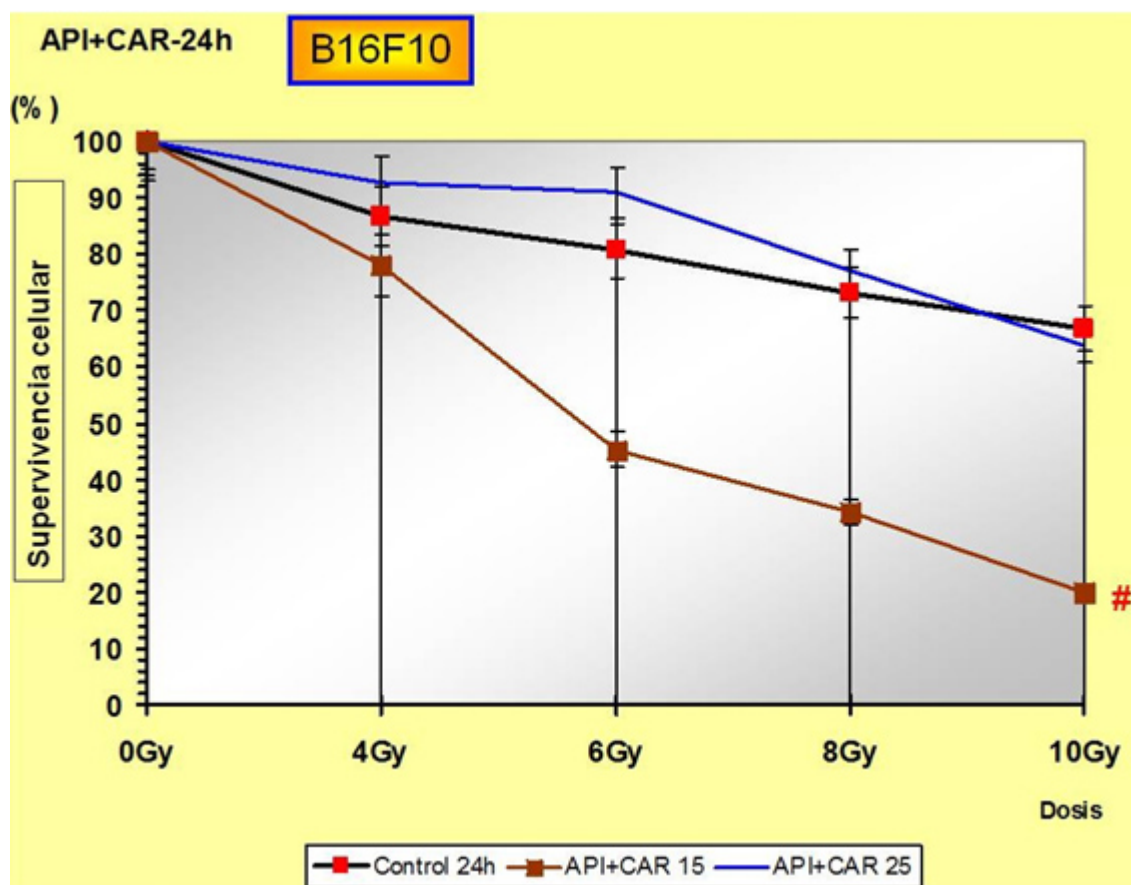


Figura E12. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células epiteliales B16F10 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 24 horas de incubación (#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Los cultivos celulares B16F10 tratados simultáneamente con 15 μ M y 25 μ M de ácido carnósico y apigenina e irradiados con una dosis de radiación de 10 Gy tras 24 horas de incubación produjeron un **Factor de Protección (FP)** del 0%, es decir, ausencia de capacidad radioprotectora alguna para ambas combinaciones.

Los cultivos celulares B16F10 tras 48 horas de incubación, tratados simultáneamente con ambas combinaciones de apigenina y ácido carnósico (15 μ M y 25 μ M) y e irradiados con la dosis de radiación más alta (10 Gy), mostraron una disminución de la supervivencia celular respecto a las células controles irradiadas. La supervivencia celular de los cultivos tratados con la combinación 15 μ M disminuyó en un 8,3%; mientras que los tratados con la combinación 25 μ M produjeron una disminución del 45,8% en la supervivencia celular. No se ha determinado efecto radioprotector alguno para esta mezcla (Tabla E11; Figura E13). Por el contrario, los resultados obtenidos mostraron una reducción estadísticamente significativa de la supervivencia celular en las células tratadas con esta mezcla en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa un efecto radiosensibilizante de la mezcla que incrementa el daño citológico inducido por la radiación ionizante de la mezcla de 25 μ M (API + CARN) en células de melanoma B16F10 ($P < 0,001$).

Tabla E11. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 0	74,7 $\pm$ 8,3	72,0 $\pm$ 6,8	66,0 $\pm$ 7,4	59,0 $\pm$ 5,9
15 μ M (API + CARN)	100,0 $\pm$ 7,9	98,5 $\pm$ 8,1	81,3 $\pm$ 9,2	64,9 $\pm$ 7,5	50,7 $\pm$ 8,3
25 μ M (API + CARN)	100,0 $\pm$ 7,7	91,8 $\pm$ 6,9	61,9 $\pm$ 5,3	24,0 $\pm$ 7,4	13,12 $\pm$ 12*

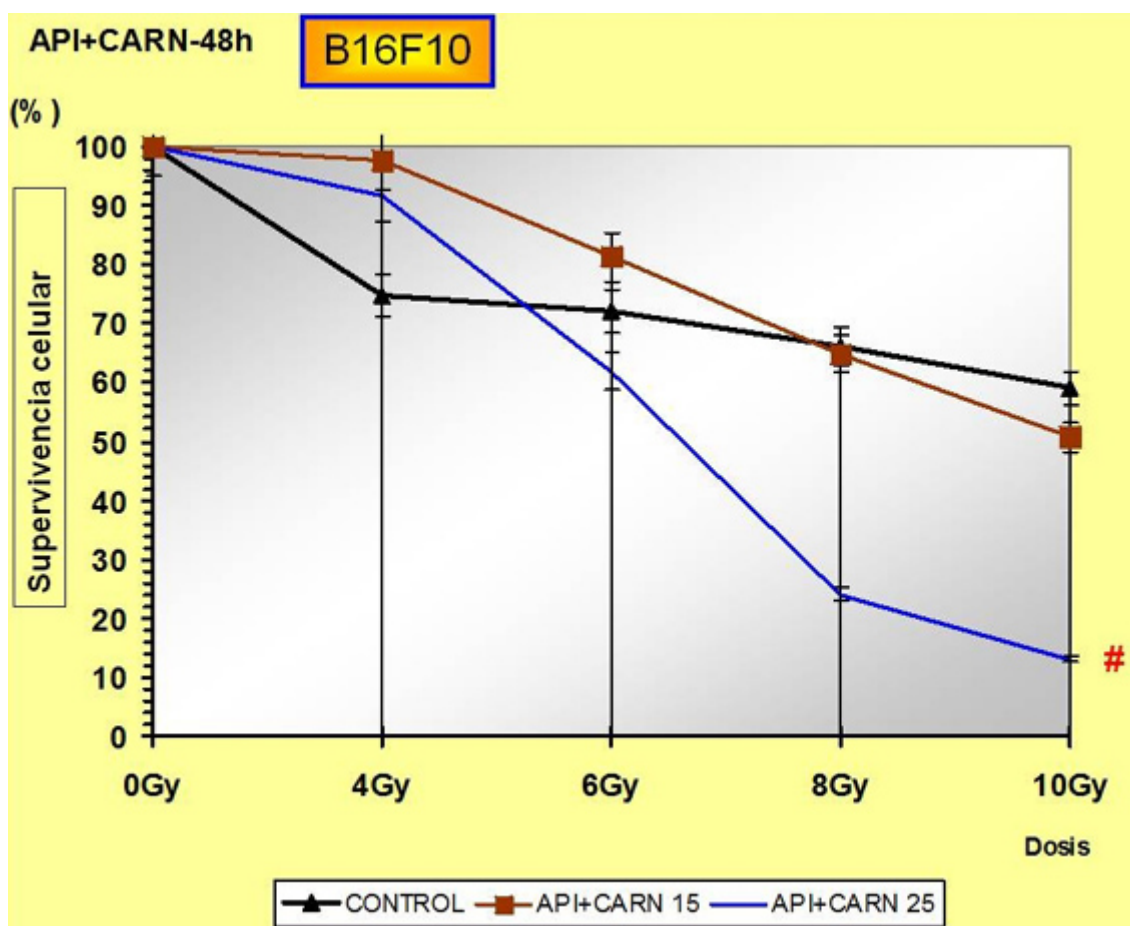


Figura E13. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + CARN) y expuestas a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

El **factor de protección (FP)** de los cultivos de células B16F10 a las 48 horas de incubación tratados simultáneamente con ambas combinaciones de apigenina y ácido carnósico (15 μ M y 25 μ M) e irradiadas con la dosis de radiación más alta utilizada en este estudio (10 Gy) es del 0% cero; poniendo de manifiesto la ausencia de capacidad radioprotectora de cualquiera de las combinaciones utilizadas (15 μ M o 25 μ M).

- MEZCLAS DE APIGENINA Y ACIDO ROSMARINICO (API + AR)

Se administraron mezclas de apigenina y ácido rosmarínico a concentraciones de 15 μ M (15 μ M API + 15 μ M AR) y 25 μ M (25 μ M API + 25 μ M AR) a los cultivos celulares y se evaluó su efecto radioprotector. Tras 24h de incubación de las células B16F10 tratadas simultáneamente a ambas concentraciones de la mezcla y no irradiadas se observó una disminución supervivencia celular. Las células tratadas con la mezcla 15 μ M mostraron una reducción de la supervivencia celular del 21,3%, mientras que las células expuestas a la mezcla de 25 μ M mostraron un 36% de reducción de la supervivencia celular en comparación con los cultivos controles (Figura E1). Después de 48 horas de incubación, los cultivos celulares B16F10 tratados con las mismas concentraciones de la mezcla de apigenina y ácido rosmarínico que antes (15 μ M y 25 μ M) no produjeron ningún cambio significativo en la supervivencia celular a la concentración más baja (15 μ M), sin embargo, se observó una disminución del 36% en el porcentaje de proliferación celular cuando las células se expusieron a la mezcla de 25 μ M en comparación con cultivos control de las mismas células (Figura E2).

En los cultivos celulares irradiados, tras 24 horas de incubación de las células B16F10 con el tratamiento conjunto a ambas concentraciones de apigenina y ácido rosmarínico (15 μ M y 25 μ M) e irradiadas con 10 Gy mostraron una mayor supervivencia celular respecto a los controles irradiados en la combinación 15 μ M. La supervivencia celular observada para los cultivos en la mezcla 15 μ M aumentó en un 9,1%; por otro lado, una reducción del 0,4% en la supervivencia celular se observó con la combinación de 25 μ M (Tabla E12; Figura E14). No se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas con esta mezcla respecto a los cultivos controles irradiados, lo que expresa la ausencia de capacidad radioprotectora alguna de esta mezcla frente al daño inducido por la radiación ionizante.

Tabla E12. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares B16F10 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestos a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 9,5	86,7 $\pm$ 7,4	80,6 $\pm$ 8,2	73,2 $\pm$ 6,8	66,9 $\pm$ 7,7
15 μ M (API + AR)	100,0 $\pm$ 8,1	79,0 $\pm$ 8,7	74,5 $\pm$ 11,1	68,5 $\pm$ 9,2	76,0 $\pm$ 8,9
25 μ M (API + AR)	100,0 $\pm$ 8,5	86,2 $\pm$ 7,9	67,5 $\pm$ 7,6	81,0 $\pm$ 8,1	66,5 $\pm$ 9,5

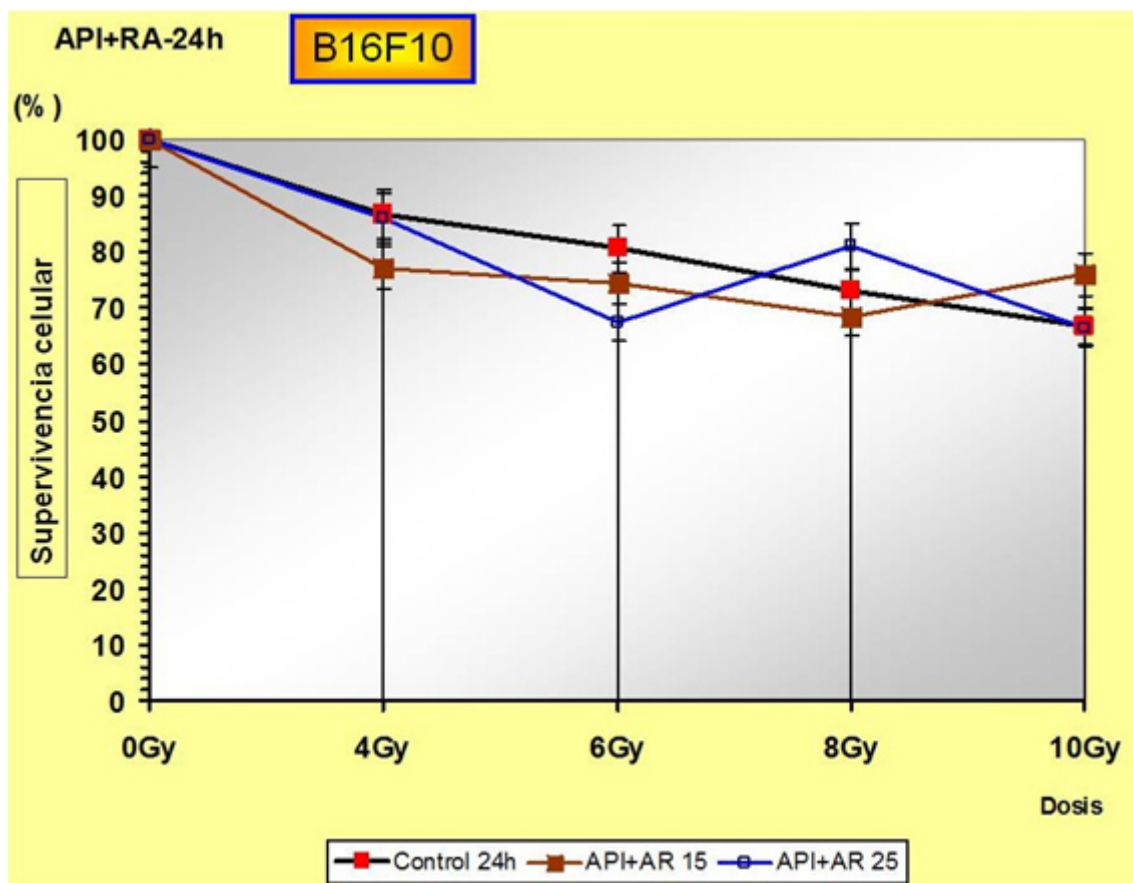


Figura E14. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 24 horas de incubación ((#): ($p < 0,001$) versus control irradiado).

Se obtuvo un **Factor de Protección (FP)** del 27,5% con cultivos de células B16F10 tratados con la combinación de apigenina y ácido rosmarínico al 15 μ M e irradiados con la dosis de radiación más alta (10 Gy) tras 24 horas de incubación; mientras que se registró un FP del 0% para las células tratadas con la combinación 25 μ M, por lo que, no se observó capacidad radioprotectora a esta concentración,

En los cultivos de células B16F10 tras 48 h de incubación, se observó una disminución de la supervivencia celular en comparación con los cultivos celulares de control irradiados a ambas concentraciones de apigenina y ácido rosmarínico estudiadas (15 μ M y 25 μ M) e irradiadas con 10 Gy. La supervivencia celular disminuyó en un 22,6% cuando las células se trataron con la mezcla 15 μ M y del 13,1% en la mezcla 25 μ M. El análisis estadístico ha determinado diferencias estadísticamente significativas de los cultivos tratados con la mezcla e irradiados en comparación con los cultivos controles irradiados ($p < 0,001$); lo que expresa no sólo la ausencia de cualquier efecto radioprotector de la muestra; sino que pone de manifiesto un efecto radiosensibilizador en donde la administración de la mezcla API+AR aumenta el daño citotóxico inducido por la radiación ionizante en células de melanoma B16F10 (Tabla E13, Figura E15).

Tabla E13. Porcentaje de supervivencia celular (%) de los cultivos celulares epiteliales B16F10 tratados con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestos a diferentes dosis de rayos X evaluadas después de 48 horas de incubación.

Dosis de Radiación	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control	100,0 $\pm$ 0	74,7 $\pm$ 8,3	72,0 $\pm$ 6,8	66 $\pm$ 7,4	59,0 $\pm$ 5,9
15 μ M (API + AR)	100,0 $\pm$ 9,1	60,0 $\pm$ 8,3	46,3 $\pm$ 7,5	36,6 $\pm$ 7,6	36,4 $\pm$ 8,2*
25 μ M (API + AR)	100,0 $\pm$ 7,5	72,4 $\pm$ 8,2	46,2 $\pm$ 8,1	40,1 $\pm$ 6,9	45,9 $\pm$ 8,3*

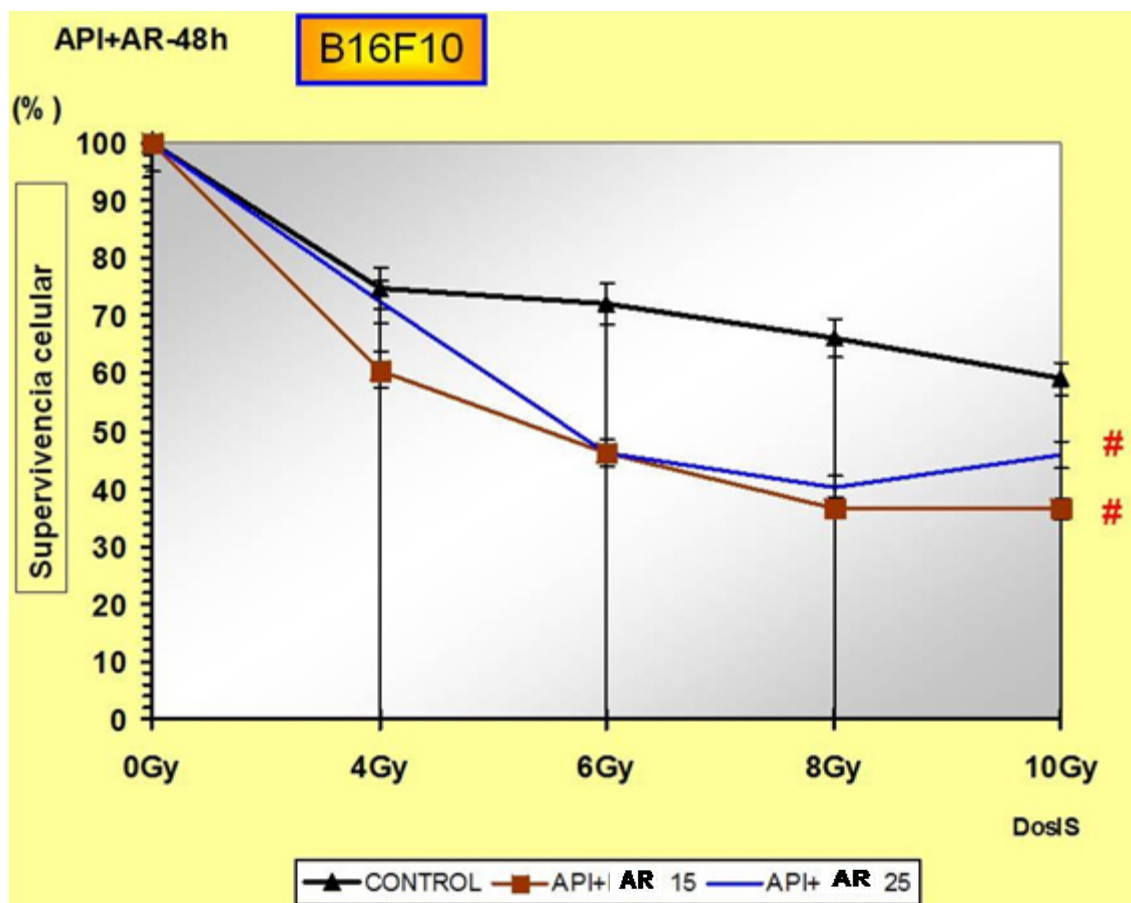


Figura E15. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de células B16F10 tratadas con 15 μ M y 25 μ M de mezcla (API + AR) y expuestas a diferentes dosis de rayos X, evaluadas después de 48 horas de incubación (#): (p <0,001) versus control irradiado).

Se observó un **Factor de Protección (FP)** del 0% en los cultivos celulares B16F10 tras 48 horas tratados con ambas concentraciones de apigenina y ácido rosmarínico (15 μ M y 25 μ M) y expuestos a la dosis de radiación más alta utilizada en este estudio (10 Gy). Las mezclas utilizadas no producen efecto radioprotector alguno.

IV.7.Resultados

ENSAYO DE DETERMINACION DEL GLUTATION INTRACELULAR

IV.7.RESULTADOS

ENSAYO DE DETERMINACION DEL GLUTATION INTRACELULAR)

Los resultados obtenidos en la realización de la curva estándar de la concentración total de glutatión intracelular se muestran en la Figura G1. La determinación realizada por triplicado muestra una buena linealidad hasta la concentración de 8 μM para mostrar cierto grado de saturación a concentraciones mayores mostrando una pendiente correcta para la técnica utilizada. Los resultados obtenidos en la repetitibilidad del ensayo muestran una reproducibilidad aceptable.

Dado que los resultados obtenidos nunca superan las 500.000 unidades, se encuentran dentro de la zona lineal de la curva dosis respuesta obtenida y permite considerar al método utilizado como una técnica validada para la determinación de Glutatión propuesta.

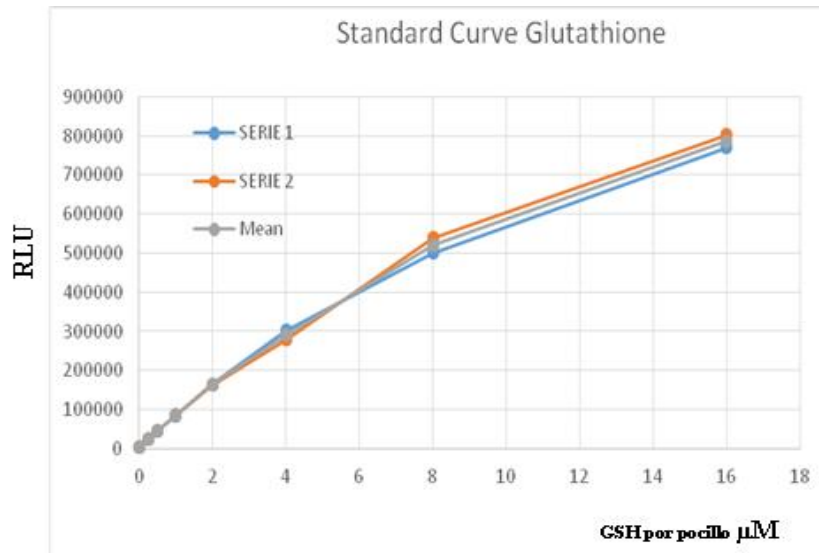


Figura G1. Determinación de Glutathión intracelular: curva estándar de glutathión intracelular

La determinación del Glutathión total (GSH total) obtenidas en ambos tipos celulares estudiados (PNT2 y B16F10) muestra una mayor concentración de GSH total en las células tumorales de melanoma murino (B16F10) que en las células epiteliales normales de próstata humana (PNT2), ya que llega a doblar su concentración y alcanza diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), situación que se mantiene en los dos períodos estudiados (1 hora y 3 horas) (Figuras G2).

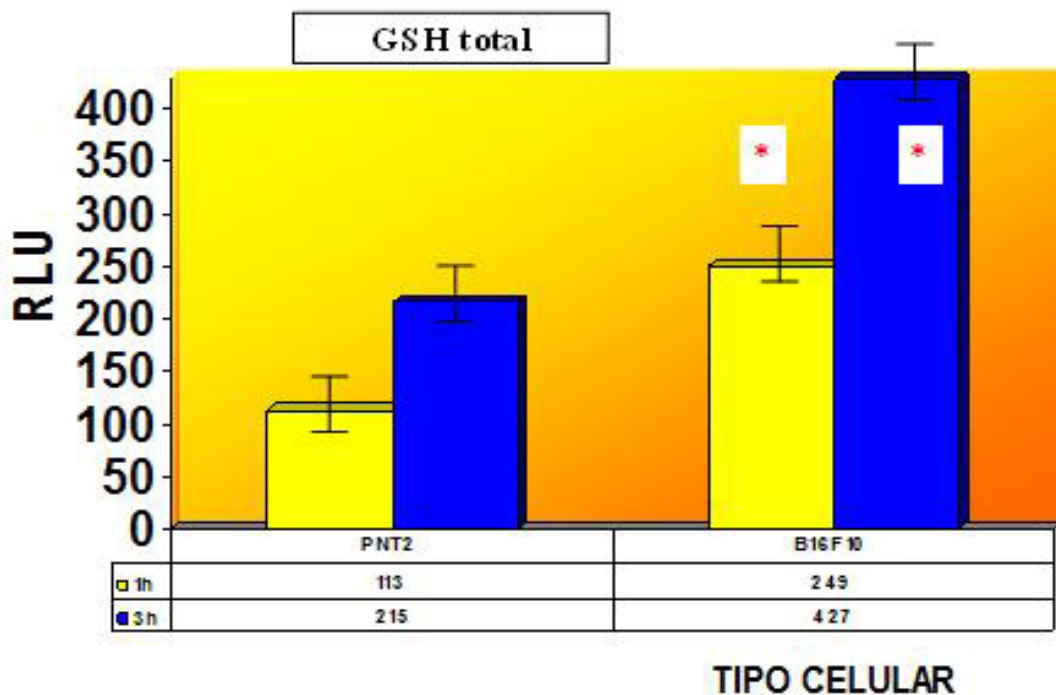


Figura G2. Determinación de Glutathión intracelular total en las células PNT2 y B16F10 a diferentes períodos (*: ($p < 0,001$) frente a la concentración en células PNT2)

La irradiación de las células con 20 Gy de rayos X produce un aumento del contenido total de glutatión y una disminución del GSSG oxidado en las células PNT2 para los dos tiempos estudiados (1h y 3h). Como consecuencia se aprecia el incremento de GSH reducido que podría ser interpretado como un mecanismo de defensa celular frente al daño citotóxico inducido por la radiación ionizante. En principio podría interpretarse que la irradiación con rayos X estimula las actividades de la GR y de la GPX y que en estas células el desvío de GSH a eliminar quinonas y producir pseudofeomelaninas no es posible, por lo que no habría posibilidad de drenar o desviar concentraciones de glutatión hacia estos pigmentos. Sin embargo en la línea celular B16F10, mientras que para el tiempo 1h también ocurre el mismo efecto que en las células no tumorales aumentando el contenido total de glutatión pero al mayor tiempo estudiado (3h) observamos el efecto contrario con un ligero descenso del glutatión total, sin ser estadísticamente significativos (Figura G3 y G4).

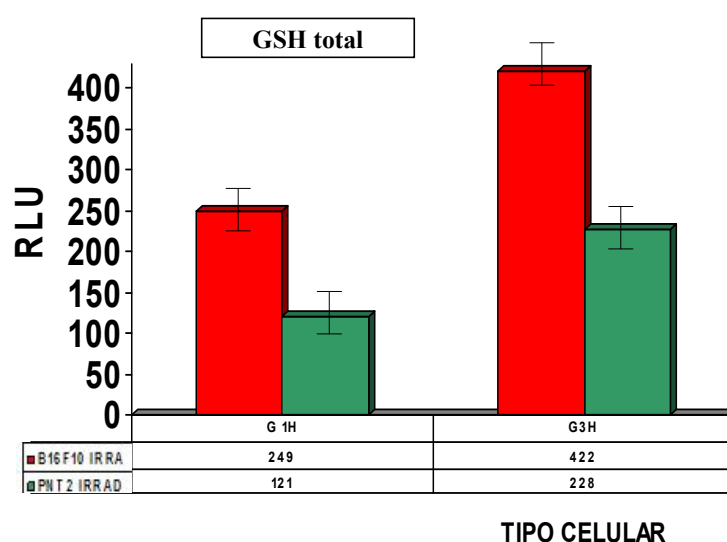


Figura G4. Determinación de Glutatión intracelular total en las células PNT2 y B16F10 irradiadas con 20 Gy de rayos X.

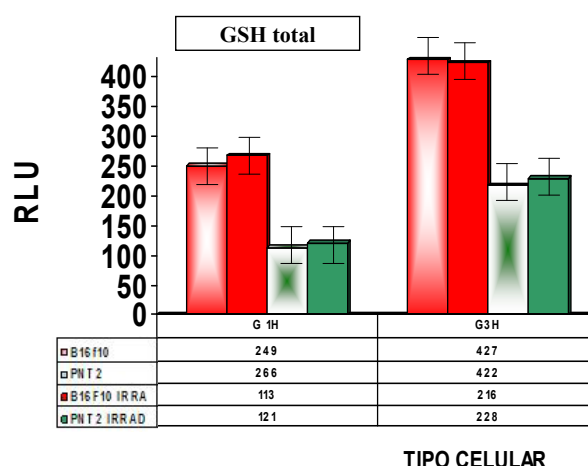


Figura G3. Determinación de Glutatión intracelular total en las células PNT2 y B16F10 controles e irradiadas con 20 Gy de rayos X.

Al contrario de lo que se podría esperar, los niveles de GSH total en las células no disminuyen por efecto de la exposición a rayos X, al menos en los tiempos post-irradiación estudiados.

La irradiación produce cambios significativos en las células B16F10 como puede establecerse también de los resultados obtenidos con las células PNT2. Estos resultados están en concordancia con la conocida mayor radiorresistencia de las células de melanoma a la radiación ionizante.

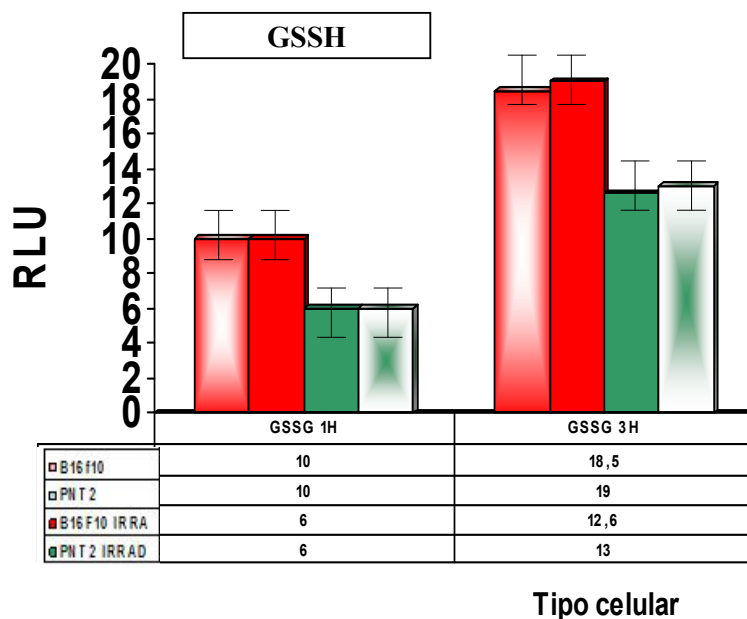


Figura G5. Determinación de Glutathión oxidado GSSG intracelular total en las células PNT2 y B16F10 controles e irradiadas con 20 Gy de rayos X.

La concentración de GSSG determinada para el grupo control irradiado es ligeramente inferior que la observada en el grupo control no irradiado en ambas líneas celulares PNT2 y B16F10 para el menor tiempo estudiado (1h) y para el mayor tiempo (3h) en las células no tumorales PNT2. Sin embargo, para las células tumorales B16F10 al mayor tiempo estudiado (3h), observamos un ligero aumento de GSSG oxidado, sin significación estadística (Figura G5).

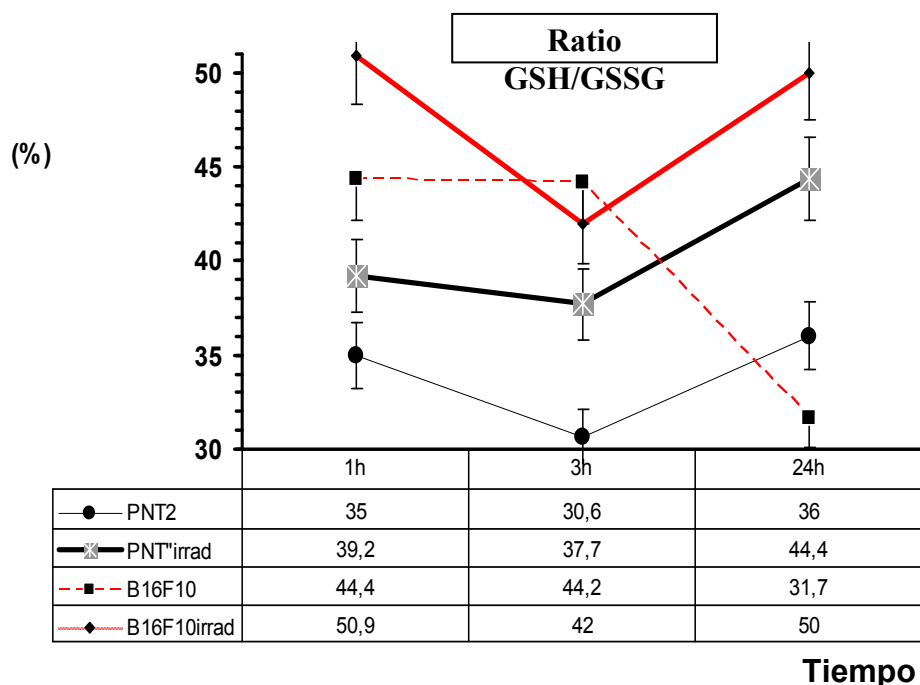


Figura G6. Determinación de los ratios GSH/GSSG en las células PNT2 y B16F10 controles e irradiadas con 20 Gy de rayos X.

En los cultivos celulares PNT2 y en todos los periodos estudiados (1h, 3h y 24h) hemos determinado un incremento significativo de la ratio GSH/GSSH producido por la exposición a 20 Gy de rayos X; manteniendo la misma tendencia disminuyendo a las 3h e incrementándose significativamente hasta un 23% tras 24h (Figura G6).

En los cultivos celulares B16F10 determinamos una ratio de GSH/GSSH significativamente mayor que la determinada en las células PNT2 ($p < 0,001$). Las células no irradiadas presentan una tendencia similar a la descrita en las células PNT2 con un incremento significativo a las 24 h ($p < 0,001$). Sin embargo las células de melanoma irradiadas con 20 Gy de rayos X presentan una ratio menor a la hora de la exposición que se mantiene hasta las 3h y que disminuye significativamente hasta las 24h ($p < 0,001$) (Figura G6).

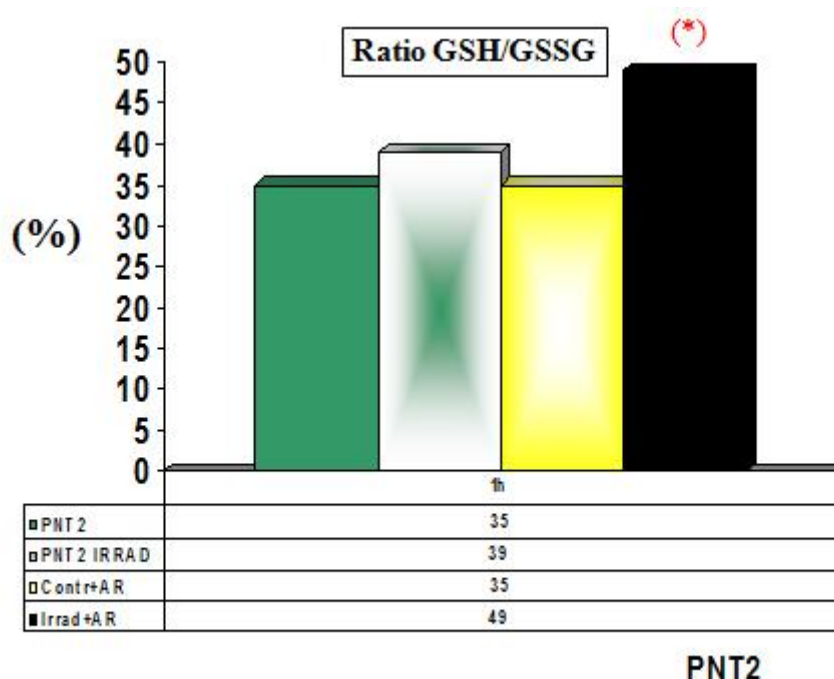
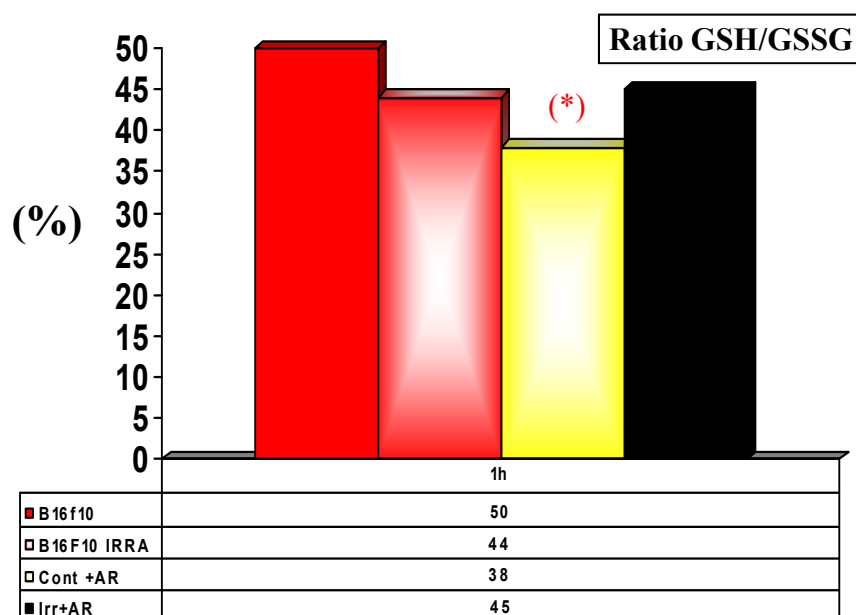


Figura G7. Determinación de los ratios GSH/GSSG en las células PNT2 controles y tratadas con ácido rosmarínico (AR) e irradiadas con 20 Gy de rayos X.

La administración de ácido rosmarínico en las células PNT2 no presenta ningún efecto sobre el GSH/GSSG que presentan las células controles; sin embargo, en las células irradiadas con 20 Gy de rayos X provoca significativo de la ratio GSH/GSSG ($p < 0,01$) lo que implicaría un intento de disminuir el efecto lesivo inducido por la radiación ionizante (Figura G7).

Por el contrario, en las células B16F10, la administración de ácido rosmarínico (AR) provoca la disminución estadísticamente significativa del ratio GSH/GSSG ($p < 0,01$), lo que podría expresar que produce un nivel significativamente menor de glutatión libre intracelular para disminuir el daño inducido por la radiación ionizante. En este mismo sentido, la administración del AR en las células de melanoma irradiadas con 20 Gy no consigue aumentar el ratio GSH/GSSG ($p < 0,01$) que podría implicar una escasa disponibilidad del glutatión intracelular para eliminar los radicales libres intracelulares producidos por la radiación ionizante (Figura G8).



B16F10

Figura G8. Determinación de los ratios GSH/GSSG en las células B16F10 controles y tratadas con ácido rosmarínico (AR) e irradiadas con 20 Gy de rayos X.

V. Discusión.

V. DISCUSIÓN.

La radiación ionizante tiene muy importantes aplicaciones en medicina, especialmente en el diagnóstico por la imagen, la medicina nuclear y la radioterapia; sin embargo, los efectos biológicos lesivos inducidos por la exposición del tejido corporal normal a la radiación ionizante suponen una de sus limitaciones más importantes. Por ello, siempre se exige un equilibrio riesgo-beneficio para el paciente cuando se aplica radiación ionizante en entornos o aplicaciones médicos. Este desafío radiobiológico ha estimulado el interés en el desarrollo de agentes químicos que podrían utilizarse como agentes radioprotectores para los tejidos normales contra el efecto tóxico radioinducido (radioprotector) o mejorar el daño por radiación a los tumores (radiosensibilizadores) mientras se preservan los tejidos normales durante la radioterapia. Además, el creciente uso industrial de la energía nuclear, el riesgo de accidentes / eventos nucleares y ataques nucleares realizados potencialmente por terroristas, y el aumento de profesionales expuestos a la radiación han aumentado el interés en este aspecto de la radiobiología (WEISS, 1997; PRASAD et al., 2004; ALCARAZ et al., 2011). Numerosos estudios han intentado proporcionar guías sobre cómo reducir el daño inducido por la radiación ionizante en los pacientes que reciben radioterapia, trabajadores expuestos profesionalmente y víctimas de accidentes por radiación (ALCARAZ et al., 2010, 2011). Además, hay muchos artículos en la literatura científica que intentan demostrar las capacidades protectoras de diferentes sustancias contra el daño inducido por la exposición a la radiación ionizante (KONOPACKA y REZESZOWSKA-WOLNY, 2001; GREENROD Y FENECH, 2003, LEE et al., 2004).

La absorción de radiación ionizante por parte del organismo depende del tipo y de la calidad de la radiación, pero también de la sensibilidad del tejido irradiado. La radiación es de

naturaleza aleatoria y la energía depositada por la longitud de la trayectoria en el tejido biológico crea una multitud de ionizaciones y excitaciones en las que las moléculas de agua que siempre están involucradas. Estas ionizaciones causan al menos dos tipos de alteraciones moleculares: por efectos directos impredecibles o estocásticos o no deterministas; y otros, por efectos indirectos, no estocásticos o deterministas. Pero a través de ambos, muchos constituyentes moleculares diferentes de las células y de la matriz extracelular se ven alterados; y transfieren su energía a partículas cargadas dando lugar a diferentes especies moleculares que conducen a la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas a partir de la hidrólisis del agua (ALCARAZ et al., 2009a).

Cuando las radiaciones ionizantes (RI) interactúan con los tejidos biológicos, se generan grandes cantidades de radicales libres del oxígeno también conocidos como especies de oxígeno reactivo (ROS) in vivo por la escisión homolítica del agua corporal (radiólisis). Estas especies reactivas de oxígeno incluyen los radicales hidroxilo $\bullet\text{OH}$, aniones superóxido, $\text{O}_2^{\bullet -}$, $\text{HO}_2^{\bullet}$ o $\text{RO}_2^{\bullet}$ y electrones hidratados $e(\text{aq})$. El peróxido de hidrógeno endógeno también se forma por la reducción del anión superóxido a través de dos mecanismos: los modelos Haber-Weiss y Fenton. El radical hidroxilo es el más citotóxico de todos estos radicales mencionados, con una vida media estimada de 10^{-9} s la alta reactividad de estos radicales implica una reacción casi inmediata en su lugar de generación (SCHWARTZ y TERNS, 1992; MUNNÉ-BOSCH et al., 1999; MASUDA et al., 2001). Por lo tanto, en el caso de una generación masiva de radicales hidroxilo como sucede durante la irradiación con rayos X, el efecto citotóxico se potencia mediante la interacción de estos radicales con estructuras celulares ricas en ácidos grasos poliinsaturados, como los fosfolípidos de la membrana celular, donde la exposición a la radiación puede inducir reacciones en cadena de peroxidación lipídica que desencadenan reacciones dentro y fuera de la propia membrana (LAMAISON et al., 1991; MUNNÉ-BOSCH et al., 1999; SÁNCHEZ-CAMPILLO et al., 2009; ALCARAZ et al., 2009a; KIANG et al., 2012).

En estas situaciones, las elevadas cantidades de ROS en cualquier sistema biológico conducen a un estrés oxidativo y bajo tales condiciones de estrés oxidativo, los sistemas antioxidantes endógenos están abrumados o son defectuosos y pueden verse saturados. Es en este momento cuando pueden usarse agentes exógenos con fuerte capacidad de eliminación de radicales como complementos para disminuir el daño biológico inducido por los ROS. Las capacidades de captación de estos agentes exógenos propuestos dependen de su alta afinidad específica por unirse a los diferentes radicales libres generados por la radiación ionizante y al alto grado de estabilidad de los radicales intermedios formados, lo que requiere que la disponibilidad biológica, la solubilidad y la farmacocinética de estos antioxidantes puedan relacionarse a través de su estructura molecular, propiedades físicas y biodisponibilidad (ALCARAZ et al. al., 2010; ZAFIROV y col., 1990; GÁBOR, 1986; TERCENIO et al., 1991).

La capacidad de las diferentes sustancias antioxidantes para prevenir el daño genotóxico y citotóxico inducido por la RI se mide en términos de su capacidad para eliminar el

exceso de ROS generado por la radiólisis del agua (ALCARAZ et al., 2009). Anteriormente hemos utilizado el ensayo de MN para evaluar las capacidades genoprotectoras de numerosos compuestos y sustancias. Además, también hemos puesto de manifiesto que algunos flavonoides puros (por ejemplo, diosmina y apigenina) y algunos extractos polifenólicos de origen vegetal expresan capacidades radioprotectoras más elevadas que algunos radioprotectores tradicionales, como por ejemplo los compuestos que contienen sulfhidrilo (DMSO y AMF), tanto contra rayos X *in vivo* (CASTILLO et al., 2000; BENAVENTE-GARCÍA et al., 2002; 2005) como con radiación gamma *in vitro* (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2005). También hemos puesto de manifiesto cómo estas capacidades protectoras dependen del grado de polimerización y su grado de solubilidad en agua o en grasa (hidro o liposolubilidad, respectivamente) de las sustancias ensayadas, ya que ambas modifican su biodisponibilidad (CASTILLO et al., 2000; 2001). De igual forma, y en concordancia con otros autores, hemos descrito que los extractos antioxidantes polifenólicos procedentes de diferentes plantas como la hoja de olivo (*Olea europaea*) y cítricos (citroflavonoides) (CASTILLO et al., 2000; 2002; 2010; BENAVENTE et al., 2002; BENAVENTE-GARCÍA et al., 2005;) muestran una gran prometedora capacidad genoprotectora cuando se administran solos, incluso en mayor medida que cuando se administran en mezclas que contienen diferentes agentes activos.

En este estudio, se evalúan diferentes sustancias para determinar la capacidad de genoprotección frente al daño cromosómico y genotóxico inducido por las RI, en primer lugar. Posteriormente, hemos evaluado la capacidad radioprotectora o anticitotóxica de dichas sustancias y así, establecer las diferencias más significativas que muestran en su capacidad de protección frente a las RI; siempre en comparación con los compuestos radioprotectores de referencia. Para lograr estos objetivos y permitir comparaciones efectivas, hemos utilizado los mismos protocolos experimentales utilizados en estudios previos y se han adaptado e incorporado para este estudio.

Hemos utilizado un conjunto de pruebas o ensayos de micronúcleos *in vitro* e *in vivo* como herramientas para la evaluación de la genotoxicidad así como de la capacidad de protección de las sustancias frente al daño cromosómico inducido por la RI; mientras que el ensayo de viabilidad de células MTT la hemos utilizado para determinar las curvas de crecimiento celular y de supervivencia celular para la evaluación la capacidad citotóxica de la RI así como de la capacidad radioprotectora celular o anticitotóxica de las sustancias ensayadas. El ensayo de mutagenicidad *in vivo* de micronúcleos de médula ósea de ratón (TAKECHI et al., 1985) y el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinéticos *in vitro* con linfocitos humanos irradiados (FECNECH y MORLEY, 1985) son dos ensayos citogenéticos basados en un aumento en la frecuencia de micronúcleos como expresión del daño genotóxico y cromosómico inducidos por la RI. Estos ensayos son las herramientas analíticas más comunes empleadas para evaluar la capacidad mutagénica de un agente genotóxico químico o físico.

El ensayo de micronúcleos bloqueados citocinéticamente con citochalasina B en cultivos directos de linfocitos humanos irradiados descritos por Fenech y Morley (1985), basado en algunas observaciones iniciales descritas por Carter (1967), es en la actualidad una de las mejores pruebas de MN para los fines de detedminación de las dosis de radiación absorbida en hombre (KORMOS y KOTELES, 1988; RAMALHO et al., 1988; PROSSER et al., 1988; GATENBERG et al., 1991; BALASEM y ALI, 1991; BAN et al., 1993, KIM et al. ., 1993; WUTTKE et al., 1993; FENECH, 2000; AIEA, 2011). Por su parte, el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón in vivo, también utilizado en este estudio es uno de los ensayos más ampliamente utilizados para evaluar la genotoxicidad y la mutagenicidad a corto plazo empleado en estudios de citotoxicidad (SCHMID, 1976; MAZUR, 1995b). Utilizando estos dos ensayos, el efecto radioprotector de diferentes compuestos o agentes pueden evaluarse mediante el grado en que reducen la frecuencia de aparición de MN producido cuando los modelos experimentales se exponen a los diferentes agentes genotóxicos, como la radiación ionizante, como hemos llevado a cabo en este estudio (STONE et al., 2004; OECD, 2004, IAEA, 2011). Previamente, nuestro grupo de trabajo ha utilizado el ensayo de MN para demostrar que la ausencia de lesiones genotóxicas por radiación ionizante en pacientes irradiados durante pruebas diagnósticas de medicina nuclear; pero también, para identificar los efectos genotóxicos inducidos por dosis más altas como las utilizadas en tratamientos de ablación con yodo radiactivo en el cáncer de tiroides o en exámenes complejos de radiodiagnóstico utilizando rayos X.

Recientemente, numerosos investigadores han recomendado la evaluación de la frecuencia de micronúcleos mediante el método de micronúcleos bloqueados con citochalasina B en linfocitos humanos como una herramienta precisa como dosímetro biológico en la exposición a la radiación ionizante in vivo (ARMERO et al., 2000; ALCARAZ et al., 2000; AIEA, 2011). Esto es particularmente adecuado tras los cambios técnicos que recomendaron el estudio de la frecuencia de MN después de la primera división mitótica (FENECH, 1993a, 1993b), así como de las decripciones de numerosos autores que establecieron relaciones dosis-efecto entre la exposición de las células en cultivos celulares y diferentes dosis de radiación ionizante administradas (ALMASSY et al., 1987; BAN et al., 1993).

En este estudio, la frecuencia de micronúcleos espontánea o basal determinada en linfocitos de sangre total periférica no irradiados es de 0,02 MN / CB. Esta tasa espontánea es acorde con la observada por otros numerosos autores (BALASEM y ALI, 1991; KIM et al., 1993); pero algo más alta que las descritas por otros (KREPINSKY y HEDDLE, 1983; AGHAMOHAMMADI et al., 1984; FENECH y MORLEY, 1985a, 1985b). La mayoría de los estudios revisados en la lieteratura científica recomiendan que los micronúcleos se recuenten al menos en 500 células bloqueadas por citocinesis con el fin de minimizar las pequeñas diferencias existentes (GATENBERG et al., 1991). En este estudio, la frecuencia espontánea de MN en las muestras controles es de 10 MN / 500 CB, también acorde con lo descrito en diferentes estudios previos (KIM et al., 1993; FENECH, 2000).

En este estudio, una sustancias pro-oxidantes (quercetina) y una sustancia genotóxica (ácido zoledrónico), previamente identificada por nuestro equipo trabajo como genotóxica, se han incorporaron en el ensayo como controles positivos junto con un agente mutagénico (rayos X). En general, esta incorporación se ha realizado para complementar la validación de la calidad técnica del ensayo bajo las condiciones experimentales en el laboratorio y sirve como una herramienta esencial de garantía de calidad para determinar que estos resultados son correctos y reproducibles, apoyando la capacidad radioprotectora de las sustancias evaluadas (LENARZYK y SLOWIKOWSKA, 1995).

Respecto a las frecuencias espontáneas de MN o basales determinadas para eritrocitos policromatófilos in vivo, las frecuencias de MN descritas en los diferentes estudios previamente publicados son siempre inferiores a 5 MN / 1000 PCE en los animales controles no irradiados, considerándose esta frecuencia , a menudo, como el parámetro básico de control de calidad para tales preparaciones (SCHMID, 1976; ABRAHAM et al., 1993, SARMA y KESAVAN, 1993; MAZUR, 1995a; SINGH et al., 1995a; HENNING et al., 1996; BISHT y UMA DEVI, 1995). La tasa basal de MN determinada en los animales controles no irradiados en nuestro estudio es de 3 MN / 1000 PCEs, lo que está, por lo tanto, dentro de los límites establecidos de esta técnica.

La revisión de la literatura científica de los ensayos de MN in vivo muestra relaciones de dependencia entre la dosis de radiación y el tiempo post-irradiación y la frecuencia de aparición de MN en los PCEs. Se pueden encontrar estudios previos en células de médula ósea de ratón irradiados con diferentes dosis de radiación gamma (UMA DEVI y SARMA, 1990, JAGETIA, 1990 y ABRAHAM et al., 1993), otros en eritrocitos policromatófilos de cerdo (LUDEWIG et al., 1991) y médula ósea de ratón irradiados con rayos X (LENARCZYK y SLOWIKOWSKA 1995; MAZUR, 1995b).

Generalmente, las dosis de radiación utilizadas en la experimentación in vivo son diferentes, pero generalmente son relativamente altas: 0,25 Gy (SINGH y col., 1995a, HENNING et al., 1996), 0,5 Gy (SINGH et al., 1995b; LENARCZYK y SLOWIKOWSKA, 1995), 1 Gy (SARMA y KESAVAN, 1993; BISHT y UMA DEVI, 1995 ; SHIMOI et al., 1996), 2 Gy (SINGH et al., 1995b; MAZUR, 1995b), 6 Gy (MAZUR, 1995a) e incluso 8 Gy (HENNING et al., 1996). En la mayoría de los estudios revisados, se aprecian aumentos estadísticamente significativos de la frecuencia de aparición de micronúcleos inducidos por la exposición tanto a rayos X (MAZUR, 2000; 1995a, 1995b) como a radiación γ (BROWN et al., 1982, ABRAHAM et al., 1993; SARMA y KESAVAN, 1993; SINGH et al., 1995; BISHT y UMA DEVI, 1995; SHIMOI et al., 1996).

Nuestro estudio muestra la siguiente capacidad genoprotectora de las diversas sustancias analizadas y pone de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre los

períodos de pre y postratamiento de las sustancias respecto a la exposición a la radiación ionizante. Así de mayor a menor capacidad genoprotectora se observa:

- Antes de la irradiación X:

Ácido rosmarínico (AR) > Procianidina (P90) > Ácido carnósico (CAR) = Apigenina (API) = Vit. E (E) > Carnosol (COL) = Extracto soluble de cítricos (CE) > Vit (C) = Aminofistina (AMIF) > Extracto de té verde (TE) = Rutina (RUT) = sulfóxido de dimetilo (DMSO) ($p < 0.001$)

- Después de la irradiación X:

Carnosol (COL) > Ácido carnósico (CAR) > Procianidina (P90) > Apigenina (API) = Vit. E (E) > Extracto de Cítricos Soluble (CE) > Vit C (C) > Extracto de Té Verde (TE) = Rutina (RUT) = Ácido Rosmarínico (AR) = Dimetilsulfóxido (DMSO) ($p < 0.001$)

Hemos determinado diferencias estadísticamente significativas entre los dos períodos de aplicación del tratamiento, antes o después de la irradiación con rayos X. Las sustancias de carácter lipófilo o liposoluble presentan un aumento de la actividad genoprotectora cuando se administran tras la exposición a radiación ionizante y probablemente indican que esta capacidad lipófila proporciona una barrera radioprotectora efectiva, como hemos descrito en nuestro grupo de trabajo (ALCARAZ et al 2009; 2010).

Nosotros hemos utilizado en este estudio la técnica de MN en eritrocitos policromatófilos *in vivo* (MNPCE) de médula ósea de ratón como una herramienta complementaria, para confirmar los resultados obtenidos *in vitro* mediante el ensayo de linfocitos humanos irradiados. La técnica *in vivo* permite la evaluación de las capacidades genoprotectoras de las sustancias ensayadas teniendo en cuenta las respuestas biológicas en los organismos vivos y sus problemas de biodisponibilidad. La prueba de micronúcleos *in vivo* se diseñó fundamentalmente para evaluar la capacidad de sustancias químicas para producir aberraciones y rupturas cromosómicas. Estas sustancias normalmente se administran subcutáneamente a pequeños mamíferos y sus efectos se determinan a partir de frotis de la médula ósea de dichos animales. Se ha utilizado para determinar los efectos genotóxicos de agentes físicos como RI (ALMASSY et al., 1987; ALCARAZ et al 2009a,b; 2010) y campos magnéticos (VIJAYALAXMI y OBE, 2005; ALCARAZ et al., 2015)). El ensayo de MN en eritrocitos policromatófilos de médula ósea (PCE) de ratón desarrollado originalmente por Schmid (1975), es actualmente la prueba de genotoxicidad a corto plazo *in vivo* más frecuentemente utilizada, de forma aguda o subaguda. Los eritrocitos policromatófilos micronucleados (MNPCE) en médula ósea constituyen un método simple y rápido para la detección del daño cromosómico inducido por agentes tanto químicos como físicos (HEDDLE y SALAMONE, 1981; ALMASSY et al., 1987; MAVOURNIN et al., 1990; MAZUR, 1995a); y los resultados obtenidos son probablemente los más significativos para evaluar los riesgos potenciales de las sustancias ensayadas en el hombre (ASHBY et al., 1997). Un aumento en la frecuencia de aparición de micronúcleos en los PCE es una indicación de aneuploidía o inducción clastogénica. Por esta razón, estos ensayos de micronúcleos se han usado

ampliamente *in vivo* e *in vitro* para detectar las roturas cromosómicas y el retraso en la división de los cromosomas durante la mitosis (MORITA et al., 2012; KIERSCH-VOLDERS et al., 1997).

Por esta razón, los resultados obtenidos respecto a la magnitud de la genoprotección ofrecida por los diferentes tratamientos ensayados con exposición previa y/o posterior a rayos X sugieren la probable existencia de diferentes mecanismos radioprotectores. En los tratamientos de irradiación pre-tratamiento, los efectos radioprotectores (actividad anti-mutagénica) de los compuestos fenólicos se basan teóricamente, como se mencionó anteriormente, en su capacidad de eliminación de los ROS generados durante la exposición a la radiación, especialmente del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), cuya generación es masiva durante la irradiación. A partir de las consideraciones estructurales anteriores, la actividad antimutagénica de los compuestos ensayados administrados como tratamientos previos a la irradiación son coherentes con sus propiedades antioxidantes y afinidades específicas con los radicales libres citolíticos.

Cuando las sustancias analizadas se añadieron después de la exposición a la radiación ionizante, los únicos ROS que probablemente están presentes en las células, de acuerdo con la vida media del anión superóxido y de los radicales hidroxilo, son los radicales lipoperoxi ($\text{R-OO}\bullet$), que son principalmente los responsables del daño oxidativo cromosómico continuado. Además, la radiación ionizante potencia la secreción de enzimas lisosomales y la liberación de ácido araquidónico desde las membranas a través de actividades de lipooxigenasa, ciclooxigenasa y fosfolipasa, aumentando así las respuestas inflamatorias celulares. Bajo estas condiciones complejas de estrés oxidativo, es muy difícil determinar los elementos estructurales responsables de los resultados experimentales obtenidos que expliquen su actividad anti-mutagénica, aunque algunas consideraciones son posibles (ALCARAZ et al., 2009a).

En este estudio, hemos evaluado la capacidad genoprotectora de la Amifostina, un fármaco radioprotector aprobado para su uso en clínica. Los estudios preclínicos demostraron que la amifostina puede proteger selectivamente a casi todos los tejidos normales de los efectos citotóxicos de algunos agentes quimioterapéuticos y también de la radiación ionizante en los tratamientos oncológicos de radioterapia; aunque su uso está restringido por problemas de citotoxicidad (HENSELEY et al., 1999; 2009; LINKS y LEWIS, 1999; MORAIS et al., 1999). La amifostina es un pro-fármaco inactivo que no puede proteger hasta que se desfosforila al metabolito activo, WR-1065, por fosfatasa alcalina en el plasma. El pro-fármaco (WR2721) se acumula preferentemente en los riñones y en las glándulas salivales, donde se metaboliza al WR1065 activo. Una vez dentro de la célula, el WR-1065 elimina o limpia de radicales libres O_2 , así como del $\bullet\text{OH}$ y del lipoperoxilo ($\text{LOO}\bullet$), protegiendo así las membranas celulares y reduciendo el daño radioinducido del ADN. La amifostina necesita estar presente dentro del organismo en el momento de la radiación y en cantidades suficientes (BACQ, 1953; TRAVIS, 1979); los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio son consistentes con los descritos en estudios previos. La ausencia de capacidad protectora cuando se administró

Amifostina inmediatamente después de la irradiación en nuestro estudio (tratamiento de Amifostina después de la irradiación) y las capacidades genoprotectoras mucho más bajas que la obtenida por algunas de las otras sustancias ensayadas en este estudio también confirman los resultados previamente descritos de la amifostina. El factor de genoprotección radiológica de la Amifostina es significativamente más bajo que el obtenido con otras sustancias ensayadas. Todas las sustancias probadas (flavonoides y compuestos organosulfurados) parecen actuar a través de una acción antioxidante al atrapar radicales libres en el medio inducido por la radiación ionizante, tal como se describe para las sustancias organosulfuradas, especialmente aquellas que contienen puentes disulfuro (S-S).

La protección radiológica aportada por estas sustancias a las células no cancerosas frente al daño inducido por la radiación (efectos radioprotectores) que hemos determinado en nuestro estudio se pueden atribuir a varios factores. Los mecanismos precisos por los cuales los amino-tioles ejercen su acción protectora en los tejidos normales no se conocen bien, aunque se ha llegado a considerar que estos mecanismos pueden ser múltiples:

- A nivel molecular, ejercen su efecto citoprotector eliminando radicales libres del oxígeno, donando iones de hidrógeno a radicales libres o tioles, uniéndose e inactivando así fármacos citotóxicos y sustancias citotóxicas (MAZUR, 1995a).

- Los tumores son relativamente hipovasculares, lo que conlleva una hipoxia comparativa, y por lo tanto, a nivel fisiológico, inducida por la disminución del oxígeno (hipoxia), hipotermia o shock, bajo pH intersticial y menor expresión de fosfatasa alcalina les hace menos sensibles al efecto protector de los tioles.

- A nivel celular, estimulan la recuperación de células madre hematopoyéticas (MAZUR, 1995a; CULY y SPENCER, 2001).

Otras sustancias organosulfuradas que hemos evaluado son el fármaco tiourea tiourea, 6-n-propiltiouracilo (PTU) y el dimetil-superóxido (DMSO). La capacidad antioxidante del DMSO ha sido ampliamente reconocida y se sabe que es un potente neutralizador y eliminador de radicales libres inducidos por la radiación, especialmente de los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). También se cree que sus propiedades radioprotectoras están mediadas por la facilitación de la reparación de roturas de doble cadena de ADN (KASHINO et al., 2010). El DMSO resulta más "líquido" que el agua y, por lo tanto, puede penetrar en lugares del cuerpo a los que nada puede llegar tan rápido. El enlace DMSO-agua es 1,3 veces más fuerte que el enlace agua-agua. Este atributo de la unión con el agua mayor que el de las moléculas de agua entre sí es muy significativo. DMSO sustituye al agua y se mueve rápidamente a través de las membranas celulares y, por lo tanto, puede eliminar fácilmente los radicales libres del oxígeno, incluso a nivel intracelular (SZMANT., 1975).

En general, se ha demostrado que más de 300 sustancias diferentes que contienen compuestos azufrados poseen algún nivel significativo de radioprotección o genoprotección. Estos compuestos poseen ciertas características similares que probablemente

expliquen su capacidad de protección contra el daño inducido por la radiación ionizante. Estas características incluyen aunque no se limitan exclusivamente a las siguientes (BROWN et al., 1967; 1982):

1. Son análogos químicos de la cisteína (un aminoácido que contiene grupos tiol). Similares a la cisteína con el grupo sulfhidrilo protegido por un fosfato.
2. Estas sustancias tienen su grupo SH separado por dos o tres átomos de carbono del grupo amino básico.
3. Tienen otro grupo amino separado del primero por tres átomos de carbono.
4. Precisan una dosis media efectiva alta, aproximadamente de 600 mg / kg.
5. Son solubles en agua destilada a pH 6, que es indicativo de un alto valor de pK.

Sin embargo, el DMSO y el PTU no presentan todas estas propiedades, por lo que probablemente por ello se expliquen sus factores de genoprotección significativamente más bajos. Desafortunadamente, las dosis radioprotectoras efectivas de todos estos elementos azufrados suelen ser tóxicas para los tejidos animales a las dosis recomendadas lo que agrava el inconveniente que presentan todos ellos y es que, además, deben administrarse o estar presentes en el organismo de forma previa antes de la exposición a la radiación ionizante. Nuestro estudio también pone de manifiesto que las tres sustancias azufradas descritas utilizadas en este estudio (Amifostina, DMSO y PTU) carecen de capacidad genoprotectora cuando se administran inmediatamente después de la irradiación.

En principio, todas las sustancias probadas parecen actuar como antioxidantes al neutralizar los radicales libres inducidos por la radiación ionizante. De acuerdo con nuestros resultados, Sarma y Kesavan (1993) describieron que el α -tocoferol (vitamina E) proporciona sistemáticamente una radioprotección mayor que el ácido ascórbico en los tratamientos pre y post-irradiación. Los efectos radioprotectores se explicaron por la eliminación de ROS, pero debido a que ambas vitaminas están presentes en el sistema durante la exposición al clastógeno utilizado (pre-irradiación), el mecanismo de acción de las vitaminas como agentes radioprotectores observado cuando se administraron después de la irradiación quedó sin explicación plausible.

Aunque algunos investigadores han atribuido los efectos radioprotectores de la vitamina E al aumento de la respuesta inmune, también se ha sugerido la necesidad de realizar estudios para aclarar el posible mecanismo por el cual los radicales peróxido generados *in vitro* son más eficientemente reparados por el alfa-tocoferol que por el ácido ascórbico; lo que sugiere un mecanismo que protege las membranas liposómicas contra la peroxidación lipídica inducida por la radiación por la vit E, y que no se consigue mediante la vit. C. Otros autores describen que esta reducción de los radicales peróxido generados durante la radiación por las vitaminas aplicadas sugiere la existencia de otros tipos de mecanismos de protección más operacionales (SALAH, et al., 1995; RICARDO da SILVA et al., 1991)

Nuestros resultados muestran que esta vía de eliminación del radical lipoperoxi es cuantitativamente mayor cuando los compuestos antioxidantes se administran inmediatamente después de la exposición a la radiación ionizante en aquellas sustancias que tienen una alta liposolubilidad. La diferenciación entre actividades anti-radicales (vs anión superóxido y radicales hidroxilo) y anti-lipoperoxidantes (frente a radicales lipoperoxilo) propuestas por Pincemail et al (1989) parece razonable, y acordes con nuestros resultados en los modelos de irradiación pre y post-irradiación, por lo que podrían utilizarse para explicar los diferentes comportamientos de los compuestos ensayados en este estudio, explicados en términos de procesos de peroxidación lipídica. La actividad anti-lipoperoxidante de los compuestos fenólicos y de los flavonoides depende de manera compleja de diversos factores, incluyendo la naturaleza del sustrato lipídico susceptible a la oxidación, las condiciones de cultivo celular e incluso el método utilizado para la evaluación. Los resultados obtenidos muestran que los únicos compuestos con una capacidad radioprotectora-antimutagénica significativa administrados inmediatamente después de la exposición a la radiación ionizante son los compuestos liposolubles (CARN, COL y vitamina E) (ALCARAZ *et al.*, 2013).

Similares resultados de reducción del daño cromosómico inducido por la radiación ionizante se han descrito utilizando el mismo ensayo de micronúcleos en médula ósea con la administración de diferentes antioxidantes como la vitamina E (SARMA y KESAVAN, 1993) beta-carotenos (ABRAHAM *et al.*, 1993), extractos de ajo fresco (SINGH *et al.*, 1995b) e incluso aglomerantes del ADN (MAURYA y DEVASAGAYAM, 2011; LOBACHEVSKY *et al.*, 2011). En estos informes, se han demostrado ampliamente diferentes grados de reducción en la ocurrencia de los micronúcleos de frecuencia en eritrocitos policromatófilos (MnPCE) de médula ósea de ratón y linfocitos de sangre periférica humana (CBMN). Más recientemente se ha descrito la capacidad radioprotectora de la luteolina, un flavonoide derivado de las plantas de té utilizando el ensayo de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica (MnRET) que es una variación de la prueba de micronúcleos de médula ósea (LEE *et al.*, 2004).

La radioprotección proporcionada por algunas sustancias administradas tras la exposición a la radiación ionizante tradicionalmente se ha considerado como imposible (TRAVIS, 1979), ya que ninguno de los compuestos radioprotectores conocidos hasta ese momento (básicamente los amino-tioles) consiguieron demostrar ningún grado de protección. Algunos de nuestros resultados con las vitaminas C y E son consistentes con los resultados previamente descritos por Konopacka y Rzeszowska-Wolny (2001), que mostraron un efecto radioprotector de las vitaminas C y E en linfocitos expuestos a la radiación de rayos X ya se hubieran administrados antes o después de la irradiación. Sin embargo, el efecto máximo se observa cuando se administra dentro de la primera hora tras la exposición a la irradiación. Describieron, también, que el efecto radioprotector dependía de la concentración de vitaminas en el cultivo de linfocitos; estableciendo que las concentraciones superiores administradas previa a la exposición de vitaminas C a 1 µg / ml y de vitamina E a 2 µg / ml redujeron con máxima intensidad la frecuencia de micronúcleos inducida por la radiación ionizante.

Nuestros resultados obtenidos con las procianidinas (P90) son consistentes con los resultados obtenidos por otros investigadores ya que confirman que los principales componentes fenólicos del vino alcohólico (P90) pueden reducir el daño en el ADN inducido por la radiación ionizante y el peróxido de hidrógeno generado por ella (GREENROD y FENECH, 2003).

Se ha descrito que algunos flavonoides como la luteolina, quercetina y rutina, de las que se conocen algunas actividades antioxidantes, son capaces de inhibir o minimizar los efectos perjudiciales causados por la radiación ionizante a través de la eliminación de los radicales libres inducidos por la radiación (SHIMOI et al. , 1996). Más recientemente, utilizando el ensayo de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica (MnRET) de ratas, describiéndose un significativo efecto radioprotector de la luteolina, un flavonoide derivado del té (LEE et al., 2004). Los mecanismos de acción de estos compuestos parecen estar influenciados por factores estructurales tales como la presencia o ausencia de azúcar en uno de los grupos hidroxilo (formas glicosiladas), el número total de posiciones hidroxiladas y la existencia de grupos hidroxilo metilados. Estos elementos estructurales de los flavonoides son esenciales para la activación y/o inhibición de múltiples sistemas enzimáticos implicados en las cascadas enzimáticas en la regulación metabólica; p.ej. ciclooxigenasa, lipoxigenasa, fosfolipasa y prostaglandina sintetasas como hemos descrito previamente (MARTINEZ et al., 2002b).

Obviamente, el grado de efectividad de lucha y eliminación de los radicales libres realizados por nuestras sustancias ensayadas como la Diosmina, RUT, CE y TE que las caracterizan como agentes radioprotectores depende de sus estructuras químicas. Es conocida que la capacidad de captar y eliminar radicales hidroxilo se basa principalmente en la combinación de estructuras conjugadas en el esqueleto polifenólico, principalmente la estructura o-dihidroxifenol o catecol; por lo tanto, la presencia en CARN y AR de dos grupos catecol conjugados con un grupo ácido carboxílico aumenta sus actividades antioxidantes en medios acuosos. De hecho, siguiendo las consideraciones estructurales mencionadas anteriormente, la actividad antimutagénica de AR y del CARN administrada antes de la exposición a rayos X es consistente con sus propiedades antioxidantes y con sus altas actividades específicas para eliminar los radicales libres. Esto explicaría la mayor actividad antimutagénica de AR sobre las encontradas en la AMF y en el DMSO (ALCARAZ et al., 2011). Las propiedades antioxidantes y la capacidad de captación de radicales libres de los flavonoides generalmente se han atribuido principalmente a la presencia de tres elementos estructurales químicos principales:

1. La presencia de una estructura orto-difenol en el anillo B del esqueleto flavonoide (grupo catecol), que confiere una mayor estabilidad al radical aroxilo ($\text{ArO} \cdot$) formado.
2. El doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C en conjugación con la función 4-oxo. La presencia de dos anillos de catecol, conjugados con un grupo ácido carboxílico es,

probablemente, el elemento estructural más importante en la actividad antioxidante de este compuesto (DEL BAÑO et al., 2003).

3. La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 de los anillos C y A, respectivamente.

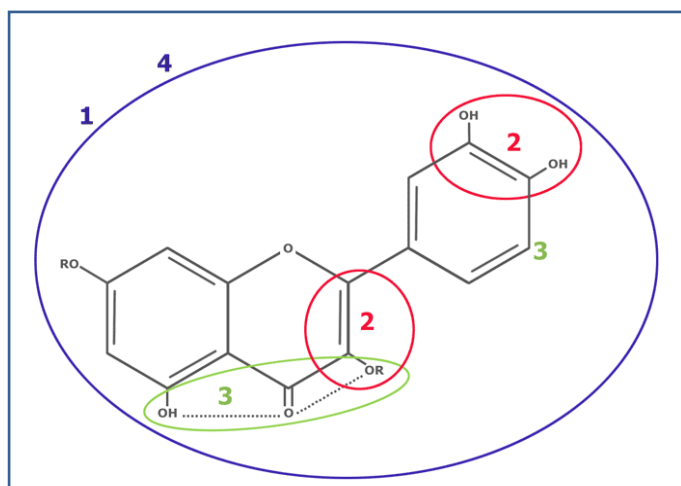


Figura D1. Posibles mecanismos de acción de los flavonoides ensayados:
1. La nube de electrones puede interrumpir la reacción en cadena de los radicales libres al capturar los radicales libres.
2. El grupo Catechol en el anillo B y el doble enlace en C2-C3 pueden capturar los radicales libres.
3. Los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo C y A respectivamente pueden facilitar o promover la complejación de metales.
4. Algunos flavonoides y compuestos fenólicos son conocidos por inhibir la actividad de la prostaglandina sintetasa.

Las capacidades de eliminación de radicales libres, las capacidades de complejación de metales y las propiedades antioxidantes generales del flavonoide serían, por lo tanto, establecidas por una combinación de estos tres elementos estructurales básicos. Además, otros elementos estructurales pueden participar ya que la presencia de tres grupos hidroxilo adyacentes en la estructura de flavonoides permite la conjugación de esqueletos de flavonoides adyacentes para formar polímeros.

Nuestros resultados sugieren claramente que no hay una única estructura química que pueda relacionarse, con exclusividad, con la capacidad genoprotectora en los compuestos que hemos ensayado. Sugieren que los efectos antimutagénicos y genoprotectores observados son proporcionales a la capacidad antioxidante de cada sustancia, aunque también depende de las propiedades de biodisponibilidad de la sustancia en el medio del ensayo analizado. Por ello, hemos observado que los flavan-3-oles muestran la mayor capacidad genoprotectora de todos los polifenoles analizados como hemos descrito previamente (CASTILLO et al., 2000, 2001); mientras que otros flavonoides con una gran capacidad antineoplásica y antiproliferativa muestran una menor capacidad antimutagénica (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2005; MARTÍNEZ-CONESA et al., 2005a; YÁÑEZ et al., 2004). Continuando con la búsqueda de compuestos con altas capacidades antioxidantes, nuestro equipo describió otras sustancias

con una estructura química diferente e incluso con una mayor capacidad genoprotectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación tales como el AR y el CARN (DEL BAÑO et al., 2006).

En definitiva, los requisitos básicos de un radioprotector/genoprotector ideal incluye que sean menos tóxicos que los actuales (amifostina) y altamente efectivos en niveles de dosis no tóxicos, que sean antioxidantes efectivos y con alta capacidad de eliminación de radicales libres junto con una buena biodisponibilidad y propiedades de solubilidad. Deben ser capaces de actuar a través de mecanismos múltiples y no deben estar limitados por el tiempo de aplicación. Cuando los agentes protectores se administran **antes** de la irradiación, la capacidad radioprotectora parece estar dictada por la capacidad antioxidante del compuesto, independientemente de los parámetros estructurales que confieren esta propiedad al compuesto. Cuando estas sustancias se administran después de la exposición a radiación ionizante, los radicales hidroxilo y superóxido habrían desaparecido del entorno biológico debido a sus semividas extremadamente cortas causando una cascada de eventos que conducen a lesiones por radiación, por lo que se buscan algunas características adicionales de los radioprotectores. Los resultados obtenidos muestran que los antioxidantes lipídicos son capaces de atrapar radicales peroxi formados en las membranas celulares y, por lo tanto, producen un mayor grado de protección contra el daño inducido por la radiación ionizante. De esta manera, estas sustancias pueden trabajar contra la eliminación del producto de peroxidación lipídica y reducir sus efectos nocivos produciendo productos menos nocivos cuando reaccionan con los radicales libres asociados con la peroxidación lipídica (ALCARAZ 2009; 2013).

A partir de los resultados obtenidos puede ser esencial en el futuro inmediato realizar un análisis genoprotector sobre la administración simultánea de mezclas de diferentes sustancias para evaluar sus posibles sinergias radioprotectoras. En esta búsqueda, la mezcla de sustancias radioprotectoras podría proporcionar una mejora o una modificación de las capacidades radioprotectoras de las sustancias ensayadas según el momento de la administración (es decir, si se administran antes o después de la irradiación); o incluso reducir el efecto citotóxico causado por la administración de una sola de las sustancias y permitir que se administre una mayor concentración del radioprotector. Ello conduciría a seleccionar diferentes sustancias radioprotectoras según los objetivos deseados en el desarrollo de fármacos radioprotectores, es decir, como un profiláctico (prevención), administrado antes de la exposición a la radiación (prevención); como mitigador de radiación (protección) contra una exposición conocida o incluso como un tratamiento administrado después de horas tras una exposición accidental a la radiación (tratamiento).

En este estudio, el efecto genoprotector de las diferentes sustancias ensayadas se ha complementado mediante el estudio de los efectos citotóxicos de estos compuestos utilizando el ensayo de viabilidad celular del MTT que nos permite evaluar la supervivencia celular y la

capacidad radioprotectora de esas sustancias. El ensayo del MTT se ha empleado ampliamente para evaluar el efecto citotóxico de numerosos y agentes sobre cultivos celulares. Este ensayo proporciona un medio para medir la actividad de las células vivas a través de la determinación de la actividad de las deshidrogenadas mitocondria les. En esta prueba, el 3- (4, 5-dimethythiazol-2-y) -2, 5-diphenyl tetrazolium bromuro (MTT) se reduce metabólicamente por la succinato deshidrogenasa mitocondrial a un compuesto insoluble, púrpura oscuro (formazán) que puede ser cuantificada mediante técnicas de colorimetría. Cualquier factor que inhiba la actividad deshidrogenasa afectará a la reacción de color asociada y podrá ser cuantificada. Se ha descrito ampliamente que las células activadas producen más formazán que las células en reposo y, por lo tanto, permite la medición de la actividad celular sometida a diferentes estímulos (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL et al, 1987a,b).

Para el estudio de radioprotección hemos elegido tres líneas celulares que se corresponden con dos tipos de células que clásicamente se consideran de muy diferente grado de radiosensibilidad celular: una, la célula epitelial de próstata, de una radiosensibilidad conocida que sustenta los tratamientos radioterápicos que se utilizan actualmente clínica con buenos resultados en el tratamiento del cáncer de próstata; y otra, el melanoma, considerado de una gran radorresistencia en donde el efecto inducido por la RI es pequeño (BACQ y ALEXANDER, 1964). En principio, los resultados que hemos obtenido en este estudio pone de manifiesto las diferencias significativas del sistema de Glutation intracelular, tradicionalmente considerado como el principal factor endógeno de radioprotección celular frente a los radicales libres inducidos por la RI, en donde hemos determina do el doble de cantidad de GSH en las células de melanoma B16F10 que en las de próstata normal (PNT2) y que podría explicar en alguna manera la gran radorresistenncia de estas células en comparación con las células de próstata.

En los estudios de genotoxicidad, la amifostina es un potente agente antimutagénico y radioprotector, pero las reacciones cruzadas que se producen con la técnica del MTT no han permitido su empleo en el ensayo de viabilidad celular. Sin embargo, si hemos podido utilizar el DMSO, un eliminador de radicales libres, con una alta capacidad de eliminación de radicales hidroxilo *in vitro*; aunque también se ha descrito que a altas concentraciones es tóxico para las células animales cuando se utiliza en estudios de radioprotección (MURRAY et al., 1988, WEISS et al., 1990).

Nuestros resultados en los estudios de citotoxicidad muestran efectos significativos de las sustancias ensayadas como radioprotectores celulares en todas aquellas sustancias que han mostrado capacidad genoprotectora (API, DMSO, AR y CARN), así como en todas las mezclas entre estas sustancias tanto en las células epiteliales de próstata humana (PNT2) como en las células tumorales de próstata murino TRAMPC1. Se ha descrito previamente que estas sustancias tienen mínimos efectos tóxicos sobre las células epiteliales prostáticas no tumorigénicas incluso cuando se han tratado con concentraciones crecientes (JOHNSON,

2011). Así, también en los estudios de anticitotoxicidad o radioprotección hemos obtenido un efecto radioprotector aumentando los porcentajes de supervivencia celular de forma significativa frente el daño celular citotóxico inducido por RI; lo que confirma una capacidad similar al obtenido en nuestros ensayos de genoprotección. Los resultados de este estudio confirman nuestros resultados previamente descritos en las células epiteliales humanas de próstata (PNT2) (ALCARAZ et al., 2013) e incorporan efectos de radioprotección en las células tumorales de próstata murino (TRAMPC1) incluso con más agentes ensayados y con diferentes mezclas entre las sustancias estudiadas.

Pero de forma sorprendente hemos determinado una ausencia de capacidad radioprotectora en la línea celular de melanoma metastásico murino B16F10 por dos de nuestros más potentes sustancias radioprotectoras (AR, CARN y en todas las mezclas en las que intervienen), ya que hemos puesto de manifiesto un significativo efecto de radiosensibilización inducido por el CAR y el AR así como de las diferentes mezclas en las que intervienen, que consigue anular cualquier tipo de efecto radioprotector del resto de componentes de la mezcla utilizada.

En este sentido, las capacidades antitumorales del AR, CARN e incluso del carnosol (COL) se han descrito previamente en diferentes líneas celulares tumorales humanas y no humanas (ONG et al., 2011, YESIL-CELIKAS et al., 2010, JOHNSON, 2011), en células de melanoma humano (RUSSO et al., 2009) y también en la línea celular B16F10 (YOSHIDA et al., 2005, HUANG et al., 2005, YESIL-CELIKAS et al., 2010; JOHNSON, 2011). Se ha descrito que el COL inhibe la invasión de células B16F10 de melanoma de ratón altamente metastásico *in Vitro*; llevando a la conclusión de que el COL dirige eventos celulares mediados por MMP en células cancerosas que le proporcionan un nuevo mecanismo para su actividad anticancerígena (HUANG et al., 1994). Además, Visanji et al (2006) postularon que la inducción de la detención del ciclo celular en la fase G2 / M producida por el carnosol y el ácido carnósico se asocia con la alteración de los niveles de ciclina A y B1.

Según nuestra experiencia, en el estudio de la inhibición del crecimiento de diferentes tipos de células de melanoma inducidas por sustancias polifenólicas (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2005; MARTÍNEZ-CONESA et al., 2005b; YÁÑEZ et al., 2004), nunca habíamos esperado encontrar una pérdida completa de la capacidad radioprotectora de estas sustancias. No hemos encontrado ningún tipo de referencia sobre este tema en la literatura científica revisada; y no está claro el mecanismo o las causas por las que el AR y el CARN podrían perder su capacidad radioprotectora en las células tumorales de melanoma. Pero, en nuestra opinión, pero podría ofrecer una nueva aplicación para proteger selectivamente células sanas de la RI sin proteger a las células tumorales, cuando ambos tipos de células quedan expuestas conjuntamente a la RI en un mismo campo de radioterapia. En este caso, las células normales podrían beneficiarse de sus efectos radioprotectores y genoprotectores; mientras que, por el contrario, las células tumorales sufrirían un efecto radiosensibilizador que potenciaría el efecto

lesivo del tratamiento con RI empleado. Por lo tanto, y de acuerdo con la idea postulada previamente por Yesil-Celiktas et al. (2010), el AR y el CARN solos o en combinación con otros medicamentos contra el cáncer podrían ofrecer una buena estrategia para el tratamiento de una variedad de cánceres humanos que son resistentes a la quimioterapia y/o radioterapia.

Dado que el mecanismo por el cual CARN y AR (e incluso el Carnosol) pierden sus capacidades radioprotectoras en las células de melanoma murino B16F10 es nueva (ALCARAZ et al., 2013) el mecanismo por el que esto sucede es completamente desconocido. Un posible mecanismo que podría explicar esta pérdida de actividad radioprotectora podría estar relacionado con una actividad funcional muy específica de estas células de melanoma: melanogénesis. El efecto de algunos extractos botánicos sobre la melanogénesis ha sido previamente descrito (KIM et al., 2006) demostrando que algunos flavonoides como la naringina (OHGUCHI et al., 2006), compuestos cafeoílicos como el ácido caféico (KUDUGUNTI et al., 2011) y su dímero el ácido rosmarínico (AR) (LEE et al., 2007, SANCHEZ-CAMPILLO et al., 2009) estimulan la melanogénesis en células de melanoma metastático B16F10 de ratón. También hemos descrito previamente un aumento estadísticamente significativo de la actividad y expresión de la tiroxinasa en las células de melanoma B16F10 de ratón tras 48 horas de estimulación con AR cuando se comparan con los niveles de los correspondientes en las células controles. De hecho, al inspeccionar visualmente los sedimentos celulares de las muestras de los cultivos de células de melanoma B16F10 tratadas con AR, se observa un color más oscuro en comparación con las muestras control y que podría explicarse por el aumento en el contenido de melanina en las células tratadas (SANCHEZ-CAMPILLO et al., 2009). De acuerdo con todo ello, postulamos que el AR inducen el incremento de la actividad melanogénica (aumento del contenido de melanina y expresión de tiroxinasa) de forma dependiente a la concentración AR administrada, probablemente, como se ha descrito anteriormente, a través de la señalización de activación de la proteína quinasa A (LEE et al., 2007).

Tradicionalmente se considera que el sistema redox de Glutación (GSH) intracelular es esencial para la producción y la atenuación de la producción anormal de melanina, y, además, que el glutatión participa en la regulación de la síntesis de melanina durante la melanogénesis. Por otra parte, en Radiobiología se considera que el glutatión (GSH) y las enzimas relacionadas con el GSH, incluyendo la gamma-glutamato cisteína ligasa (gamma-GLC) y glutatión S-transferasa (GST) son importantes componentes de las defensas antioxidantes responsables de mantener el equilibrio interno redox intracelular con elevada capacidad para eliminar las radicales libres (ROS) inducidos por la RI (PANICH et al., 2012; ALCARAZ et al., 2013)

Se ha descrito previamente que la administración del éster del ácido caféico (dímero del AR) para participar en la melanogénesis da como resultado la depleción del GSH intracelular, así como el aumento de los radicales libres (ROS) en las células de melanoma

B16F10, y la inducción de apoptosis en células B10F16 con la inhibición del crecimiento del tamaño tumoral B16F0 *in vivo*. También se ha descrito una disminución concomitante de la actividad alanina-aminotransferasa y un aumento en los niveles de malondialdehído (MDA) celular que muestran una capacidad muy disminuida de la peroxidación lipídica y también con una disminución del contenido de tiol libre en hígado y riñón (KUDUGUNTI et al., 2011). Todo ello, mostraría efectos similares a los inducidos por la RI de forma generalizada, pero en esta situación producida por el AR que podría tener un efecto aditivo o sinérgico con la exposición a RI.

De forma similar, es conocido que la línea celular B16F10 altamente metastásica tiene una actividad de superóxido-dismutasa (SOD) más baja (eliminación de radicales superóxido) que otras líneas menos metastásicas (KWEE, et al., 1991). En definitiva, la administración del éster del ácido caféico modifica todos estos mecanismos de protección del Glutatión intracelular durante la melanogénesis; que, por otra parte es el responsable más importante de la capacidad radioprotectora "endógena" de las células expuestas a radiaciones ionizantes.

Por lo tanto, en este estudio, en las células epiteliales prostáticas normales (PNT2), y en las prostáticas tumorales (TRAMPC1) el AR y el CARN actúan como agentes antioxidantes que eliminan el exceso de radicales libres inducidos por la RI sumándose al sistema de defensa redox intracelular. Sin embargo, en las células de melanoma B10F16, la administración del AR y del CARN activa la melanogénesis y conduce a la redistribución de los equilibrios enzimáticos del glutatión y de la cisteína ligasa para facilitar la producción de melanina que podría comprometer el sistema de defensa redox intracelular de GSH. Es decir, el AR obliga al glutatión a ser utilizado en el proceso de melanogénesis disminuyendo la disponibilidad del mismo para eliminar los radicales libres inducidos por la radiación ionizante ; provocando con ello una situación de "depleción" funcional de glutatión intracelular que pudiere hacer frente al daño citotóxico de los radicales libres inducidos por la radiación ionizante. Esto implica una reducción en los niveles de eliminación de los radicales superóxido junto con una pérdida de parte de las capacidades antioxidantes de AR y del CARN, lo que causa una elevación de los elementos intermedios tales como peróxido de hidrógeno intracelular que conduce a una mayor intensidad del daño celular. El efecto final de todo esto se presentaría como un aumento en la capacidad de daño inducida por la RI, y por lo tanto, su expresión como un potente efecto paradójico de estas sustancias antioxidantes sólo en las células de melanoma (ALCARAZ et al, 2013; 2015).

El ácido rosmarínico (RA) es un éster de ácido caféico y ácido 3,4-dihidroxifeniláctico que se encuentra comúnmente en especies de Boraginaceae y la subfamilia Nepetoideae de Lamiaceae, principalmente, la *Rosmarinus officinalis* L (DEL BAÑO et al, 2003). El AR tiene una serie de actividades biológicas interesantes, que incluyen efectos antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios y antioxidantes. La presencia del AR en plantas medicinales, hierbas y especias tiene efectos beneficiosos para la salud. En las plantas, se supone que el

AR actúa como un compuesto de defensa constitutivamente acumulado preformado. Los extractos de plantas que contienen AR también tienen un excelente potencial como antioxidantes para la conservación de alimentos (DEL BAÑO et al, 2003; 2006). Se han descrito efectos como la eliminación de radicales libres de oxígeno. Los estudios más recientes confirman que los caffeoyl ésteres como el AR muestran una alta actividad antioxidante específica, retrasan el agotamiento de la vitamina E, disminuyen la producción de lisofosfatidilcolina proinflamatoria y previenen la oxidación del LDL, que es compatible con su función antiinflamatoria y antiateroesclerótica en condiciones fisiopatológicas (SÁNCHEZ CAMPILLO et al., 2009).

El ácido carnósico es un bencenodiol abietane dieterpeno natural que se encuentra en el romero (*Rosmarinus officinalis*) y la salvia común (*Salvia officinalis*) (DEL BAÑO et al., 2006). Las hojas secas de romero o salvia contienen de un 1,0 a un 2,5% de ácido carnósico. Es importante tener en cuenta que el ácido carnósico que espontáneamente se oxida a carnosol, por lo que son dos sustancias que suelen estar presentes de forma conjunta. El ácido carnósico es conocido por potenciar la actividad anticancerígena de la vitamina D3 y sus análogos (DANILENKO et al., 2003), inhibir la proliferación de las células de leucemia mieloide humana HL-60 y U937 (STEINER et al., 2001), promover la síntesis de factor de crecimiento nervioso en células de glioblastoma humano T98G (KOSAKA y YOKOI, 2003), e inhibe las funciones de las células endoteliales, y promocionado como un nuevo agente potencial quimioprotector del cáncer (BERTL et al., 2004).

El AR y el CARN que hemos utilizado en este estudio son extractos naturales obtenidos del romero (*Rosmarinus officinalis*) que es una planta labiada reconocida por contener compuestos fitoquímicos con alta actividad antioxidante y utilizados ampliamente como planta aromática, con carácter culinario e interés en diversas aplicaciones de la medicina tradicional o natural. Entre estos compuestos del romero, los compuestos fotoquímicos más significativos son los diterpenos fenólicos, tales como ácido carnósico, carnosol, rosmarol, y algunos ácidos fenólicos, como el ácido rosmarínico (DEL BAÑO et al, 2006; ALCARAZ et al 2009).

La actividad antioxidante de los extractos de romero depende de su composición fenólica y ha sido evaluada por diversos métodos en diferentes sistemas lipídicos y acuosos. En los sistemas lipídicos, los extractos con un alto contenido de ácido carnósico son más efectivos (ARUOMA et al., 1992; HOPIA et al., 1996; DEL BAÑO et al., 2003), mientras que en los sistemas acuosos, el ácido rosmarínico muestra la mayor actividad antioxidante (FRANKEL et al., 1996; DEL BAÑO et al., 2003).

La mayoría de las sustancias analizadas en este estudio son antioxidantes y son componentes habituales de la dieta humana que se consumen de forma diaria durante dentro de ciertos rangos de dosis durante varias décadas de la vida y que se han considerado

carentes de toxicidad alguna (HERTOG et al., 1993; HOLLENBERG, et al., 2004, COOK y SAMMAN, 1996; AHERNE y O'BRIEN, 2002). Incluso, algunos autores han propuesto que una combinación de antioxidantes dietéticos podría ser útil para proteger los tejidos normales contra el daño por radiación ionizante, sin importar lo pequeño que éste sea; sugiriendo que las cantidades de antioxidantes individuales que se incluirían en la mezcla dependerían de las dosis de radiación (diagnóstico o tratamiento) que se van a aplicar, la biodisponibilidad y las propiedades de liposolubilidad de las sustancias, así como de la concentración de las sustancias, ya que algunas de ellas pueden mostrar en ocasiones una actividad pro-oxidante, que aumentaría el daño inducido por la radiación ionizante.

En concordancia con Prasad et al (2002), hemos descrito que se debe realizar un ensayo clínico para evaluar el valor radioprotector de los antioxidantes entre los pacientes que reciben radiación ionizante en las exploraciones de radiodiagnóstico y, también, su aplicación en los trabajadores profesionalmente expuestos a radiación ionizante utilizando el estrés oxidativo y el daño cromosómico como puntos finales biológicos que permitan evaluar el interés de estas sustancias en reducir los efectos indeseables y lesivos de la RI (ALCARAZ et al., 2013).

Sin embargo, los efectos de la suplementación con antioxidantes en oncología pueden tener consideraciones diferentes e incluso ser lesivos para el paciente (ALCARAZ et al., 2009). Aunque algunos estudios han sugerido que los antioxidantes pueden proteger los tejidos normales de la quimioterapia o el daño inducido por la radiación ionizante, otros han afirmado que no se debe recomendar administrar complementariamente antioxidantes durante la quimioterapia y/o la radioterapia porque en realidad pueden proteger no sólo a las células sanas sino también a las células tumorales y aumentar su supervivencia tumoral. Posiblemente, los estudios sobre sustancias como el AR y el CARN podrían ayudar a aclarar los mecanismos intrínsecos que podrían proteger a las células sanas normales mientras que lesionan exclusivamente a las células neoplásicas presentando con ello una nueva estrategia para los pacientes con cáncer sometidos a radioterapia. Dado que los mecanismos radioprotectores y la diversidad celular son variados, el conocimiento efectivo de los mismos podría aportar criterios selectivos de utilización de estas sustancias para conseguir esta especificidad del efecto y la selección de las lesiones sólo en las células tumorales.

VI. Conclusiones.

VI. Conclusiones

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

- 1ª. No existe una única estructura química ni un único mecanismo de acción relacionado con la capacidad genoprotectora y con la radioprotectora. En este estudio la actividad antioxidante, la hidro o liposolubilidad de las sustancias, su presencia en el medio biológico antes de la irradiación y su disponibilidad biológica son características relacionadas con esta actividad protectora.
- 2ª. El ácido carnósico y el ácido rosmarínico, ambas sustancias extraídas del romero (*Rosmarinus Officinalis*) presentan la mayor capacidad radioprotectora de todas las sustancias analizadas tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo* y administrados en cualquier período en relación con la radiación ionizante (períodos pre y post-irradiación).
- 3ª. Algunas sustancias con intensa capacidad genoprotectora y radioprotectora pueden, en ocasiones, provocar un incremento del daño radioinducido produciendo, por tanto, un paradójico mayor efecto lesivo sobre algunas células tumorales como ocurre en el melanoma; poniendo de manifiesto mecanismos específicos o individuales de cada sustancia que permitirían esclarecer nuevos mecanismos y potenciar el desarrollo de agentes que protegiendo a las células sanas lesionen exclusivamente las células neoplásicas. Ello supondría alcanzar una estrategia idónea para los pacientes con cáncer sometida a radioterapia, incluso en el tratamiento de cánceres humanos que son resistentes a radiación ionizante.

VII. Resumen

VII. RESUMEN

Introducción: la radiación ionizante constituye una importante herramienta diagnóstica y terapéutica ineludible en la medicina y en la industria moderna; sin embargo, sus grandes beneficios se ven limitados por el daño inducido en los tejidos normales. En la vida cotidiana, la exposición a radiación ionizante es habitual con el fondo radiactivo natural pero también puede ocurrir en otros entornos y aplicaciones tales como la obtención de una imagen radiográfica, una exploración de medicina nuclear, el tratamiento antitumoral en oncología radioterápica, la fabricación de equipos radiológicos, la obtención y producción de radionúclidos, la investigación biomédica, la utilización de reactores nucleares, o el uso de las radiaciones en el campo militar y los riesgos de accidentes y ataques terroristas. Una buena opción sería desarrollar contramedidas contra los efectos indeseables de las radiaciones ionizantes; lo cual conduce a la búsqueda de una radioprotección química que complemente la estrategia ALARA adoptada para las personas que trabajan con radiaciones ionizantes para reducir los riesgos de lesiones deterministas y no deterministas radioinducidas.

Un radioprotector químico ideal debería tener una alta efectividad contra el daño biológico inducido por las radiaciones ionizantes con ausencia de toxicidad propia. En un intento de modificar la tendencia farmacológica existente de sintetizar artificialmente estos radioprotectores, durante los últimos años se están desarrollando agentes o sustancias procedentes de productos naturales. Dentro estos productos de origen natural, algunos que proceden de plantas muestran una gran efectividad y, hoy día, se consideran de futuro muy prometedor ya que se basan en la búsqueda de mecanismos protectores específicos para cada situación de exposición que permitiría obtener los beneficios deseados reduciendo o eliminando el riesgo de estas lesiones radioinducidas indeseables.

Objetivos: comparar el efecto genoprotector y radioprotector de algunas sustancias antioxidantes extraídas del romero (*Rosmarinus officinalis*) (ácido carnósico y ácido rosmarínico) frente al daño biológico inducido por la radiación ionizante con el de otros compuestos antioxidantes y determinar un posible efecto paradójico de estas sustancias que siendo intensos radioprotectores cuando se administran a células normales y tumorales se caracterizan por una intensa acción radiosensibilizante cuando se administran a células de melanoma metastásico.

Material y método: se estudia el efecto genoprotector de diferentes sustancias mediante dos ensayos de micronúcleos para cuantificar la actividad antimutagénica mediante la reducción de la frecuencia de micronúcleos *in vitro* en linfocitos humanos irradiados y bloqueados con citochalasina B e *in vivo* sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón. Para determinar su efecto radioprotector sobre la supervivencia celular se ha utilizado el ensayo de viabilidad celular (MTT) en cultivos de células PNT2 (células epiteliales normales de próstata humana), células TRAMPC1 (epiteliales tumorales de próstata murino) y en células

B16F10 (melanoma metastático murino), que se administraron antes de la exposición a diferentes dosis de rayos X (0 Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy y 10Gy). El análisis estadístico en los ensayos de genoprotección ha consistido en comparaciones entre grupos realizando contrastes de igualdad de medias mediante análisis de varianza. Asimismo, se ha realizado un análisis de regresión y correlación lineales y polinómicos. Consideramos los resultados estadísticamente significativos cuando p era menor de 0,05 ($p < 0,05$). Además, se ha determinado el Factor de Protección (FP) o capacidad de protección de una sustancia radioprotectora ensayada tanto administrada antes como después de la exposición a la radiación ionizante, expresada como porcentaje de protección siguiendo la fórmula: $FP (\%) = (F_{\text{control}} - F_{\text{tratado}} / F_{\text{control}}) \times 100$. En los ensayos de radioprotección o viabilidad/supervivencia celular se ha realizado un análisis de la varianza de medidas repetidas para comparar los porcentajes de supervivencia celular en los cultivos con diferentes concentraciones de los compuestos y complementando con contraste de igualdad de pares con el método de la mínima diferencia significativa (M.D.S.). Los análisis fueron realizados transformando logarítmicamente los datos para ajustarse a las condiciones del ANOVA.

Resultados: nuestros resultados muestran una capacidad genoprotectora de las diferentes sustancias ensayadas, destacando el ácido rosmarínico y el ácido carnósico, que consiguen una reducción estadísticamente significativa de la frecuencia de aparición de micronúcleos ($p < 0,001$) como expresión de su capacidad antimutagénica, presentando un factor de protección que alcanza un máximo del 62% en la administración preirradiación de dichas sustancias.

De igual forma, para estas sustancias y en las diferentes mezclas y concentraciones en las que se han utilizado se determina una capacidad radioprotectora en la supervivencia celular que alcanza con la dosis de 10 Gy un Factor de Protección del 100%, eliminando el 40% de la muerte celular radioinducida en células de próstata humana normales (PNT2) ($p < 0,001$); así como del 77% de la muerte celular radioinducida en las células tumorales de próstata (TRAMPC1) ($p < 0,001$) en las que se cuantifica un factor de protección del 334%.

Sin embargo, en la línea celular de melanoma metastático (B16F10) mientras que el resto de sustancias ensayadas mantienen su intensa actividad radioprotectora, el ácido carnósico y el ácido rosmarínico carecen de cualquier efecto radioprotector provocando una disminución significativa de la supervivencia celular que oscila entre el 20-40% según la concentración y la mezcla analizada ($p < 0,01$), careciendo de factor de protección y mostrándose como sustancias radiosensibilizantes frente al daño citotóxico inducido por los rayos X administrados.

Conclusiones: no existe una única estructura química ni un único mecanismo de acción relacionado con la capacidad radioprotectora de las sustancias ensayadas. La actividad antioxidante, su disponibilidad biológica, y su hidro o liposolubilidad y su presencia en el medio biológico son características relacionadas con esta actividad protectora.

Sin embargo, algunas sustancias, como el ácido carnósico y el ácido rosmarínico, con intensa capacidad radioprotectora pueden producir, en ocasiones, un incremento del daño

radioinducido, produciendo, por tanto, un mayor efecto lesivo paradójico como ocurre en células de melanoma poniendo de manifiesto circunstancias o mecanismos específicos o individuales que podrían permitir esclarecer nuevos mecanismos y potenciar el desarrollo de agentes que puedan proporcionar protección a las células sanas normales al tiempo que dañen exclusivamente a las células neoplásicas, presentando así una nueva estrategia para los pacientes con cáncer sometidos a radioterapia, incluso para el tratamiento de cánceres humanos que son resistentes a la radiación ionizante.

VII. Abstract

Introduction: ionizing radiation is an important diagnostic and therapeutic tool, unavoidable in medicine and modern industry; nonetheless, its major advantages are limited by the damage it may induce in normal body tissues. In everyday life, exposure to background ionizing radiation is natural but exposure to ionizing radiation also occurs in other settings and applications such as the procurement of radiographic images, nuclear medicine techniques, antitumor treatment in radiotherapeutic oncology, the manufacture of radiological equipment, the procurement and production of radionuclides, biomedical research, the utilization of nuclear reactors, or the military use of radiation and the risk of accidents and terrorist attacks. A sensible option would be to develop countermeasures against the undesirable side-effects of ionizing radiation; leading to the search for a chemical radioprotector which complements the ALARA strategy adopted by those who work with ionizing radiation, in order to reduce the risk of deterministic and non-deterministic radio-induced lesions.

An ideal chemical radioprotector should be highly effective against the biological damage caused by ionizing radiation while being void of toxicity. In an attempt to modify the pharmacological tendency to artificially synthesize such radioprotectors, recently, agents or substances are being developed from sources of natural products. Among these naturally occurring products, those sourced from plants show an excellent effectiveness and, at the present time, are thought to have a very promising future since they are based on the search for protective mechanisms specific to each type of exposure which would enable the harnessing of desirable benefits while reducing or eliminating the risk of unwanted radio-induced lesions.

Aims: to compare the genoprotective and radioprotective effects of certain antioxidative substances extracted from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) (carnosic acid and rosmarinic acid) against ionizing-radiation-induced biological damage with those of other antioxidative compounds and determine the possibly paradoxical effect of these substances whereby despite being potent radioprotectors when applied to normal and tumour cells, they display an intense radiosensitizing action when applied to metastatic melanoma cells.

Material and method: the genoprotective effect of various substances was studied in two micronucleus assays in order to quantify the antimutagenic activity via micronucleus frequency reduction *in vitro* in irradiated Cytochalasin B-blocked human lymphocytes and *in vivo*

in mouse bone marrow polychromatophilic erythrocytes. To determine the radioprotective effect on cellular survival, a cellular viability assay (MTT) was performed on PNT2 cell cultures (normal human prostate epithelial cells), TRAMP-C1 cells (transgenic murine prostate epithelial adenocarcinoma cells) and in B16F10 cells (metastatic murine melanoma), which were applied prior to exposure to a range of different X-ray doses (0Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy and 10Gy). The statistical analysis of the genoprotective assays consisted of group comparisons whereby means contrasts were performed via analysis of variance. Likewise, a lineal and polynomic regression and correlation analysis was performed. The results are considered statistically significant when p is less than 0.05 ($p < 0.05$). Furthermore, the Protection Factor (PF) or protective capacity of the radioprotective substances tested was determined for administration both prior and subsequent to ionising radiation exposure. This is expressed as a percentage of the protection provided according to the formula: $PF (\%) = (F_{\text{control}} - F_{\text{treated}} / F_{\text{control}}) \times 100$. A repeated measures ANOVA was performed for the radioprotection or cellular survival/viability assays in order to compare the percentages of cell survival for cultures containing different concentrations of the compounds, complemented by a paired-means contrast via Fisher's least-significant-difference method (L.S.D.). These analyses were performed on data transformed logarithmically in order to adjust them to ANOVA requirements.

Results: the results show that the substances tested have a genoprotective capacity with an emphasis on rosmarinic acid and carnosic acid which achieved a statistically significant reduction in micronuclei frequency ($p < 0.001$), thus displaying their antimutagenic capabilities. The aforementioned substances presented a Protection Factor which reached a maximum of 62% in the case of pre-exposure application.

Likewise, these substances, both alone and in the varying mixtures and concentrations at which they were utilized, a radioprotective capability was determined in terms of cell survival, which reached a Protection Factor of 100% at doses of 10 Gy, eliminating 40% of the radio-induced cell death in normal human prostate cells (PNT2) ($p < 0.001$); as well as 77% of the radio-induced cell death in transgenic mouse prostate cancer cells (TRAMPC1) ($p < 0.001$) for which a Protection Factor of 334% was found.

However, in the metastatic melanoma cell line (B16F10), while the remaining substances tested maintained an intense radioprotective activity, both carnosic acid and rosmarinic acid completely lacked any radioprotective effect, wherein a significant decrease in cell survival was produced, varying from 20-40% depending on the concentration and mixture analysed ($p < 0.01$). Likewise, they also failed to provide any Protective Factor and proved to be radiosensitizing substances in terms of the cytotoxic effects induced by the X-rays administered.

Conclusions: one sole, unique, chemical structure or action mechanism related with radioprotective capacity does not exist among the substances tested. Antioxidant activity, biological availability, hydro- or liposolubility and its presence in the biological environment before exposure to ionizing radiation are characteristics related with the aforementioned protective activity.

Nonetheless, certain substances, such as carnosic acid and rosmarinic acid, which do display an intense radioprotective capacity, on occasion can produce increased radio-induced damage, and therefore, a paradoxically greater damage effect as occurs in melanoma cells. This reveals the existence of circumstances or specific or individual mechanisms which might enable new mechanisms to be identified and the development of agents providing protection for normal cells while exclusively targeting neoplastic cells, thus presenting a novel strategy for cancer patients subject to radiotherapy, including the treatment of human cancers resistant to ionising radiation.

VIII. Bibliografía.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

ABRAHAM, S. K.; SARMA, L and KESAVAN, P. C (1993).- Protective effects of chlorogenic acid, curcumin in β -carotene against γ -radiation-induced in vivo chromosome damage. **Mutat. Res.** **303**: 109-112.

ACEVEDO, C. (2005). - Efecto antimutagénico frente a radiación gamma de diferentes antioxidantes evaluado mediante la técnica de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

ACHEL, D. G.; ALCARAZ, M.; KINGSFORD-ADABOH, R.; NYARKO, A. K and GOMDA Y (2012).- A review of the medicinal properties and applications of *Pycnanthus angolensis* (Welw) Warb. **Pharmacologyonline**, **2**: 1 – 22.

AGHAMOHAMMADI, S. Z.; HENDERSON, L and COLE, R. J (1984). - The human lymphocyte micronucleus assay. Response of cord blood lymphocytes to gamma irradiation and bleomycin. **Mutat. Res.**, **130**: 395-401.

AHERNE SA, O'BRIEN NM (2002).- Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, **18**(1):75-81.

ALCARAZ M, ACEVEDO C, CASTILLO J, BENAVENTE-GARCIA O, ARMERO D, VICENTE V and CANTERAS, M (2009a).- Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. **Br J Radiol.**, **82**:605-609.

ALCARAZ M, OLIVARES A, ACHEL DG, GARCÍA-CRUZ E, FONDEVILLA-SOLER A, CANTERAS-JORDANA M. (2015).- Toxicity of a dental adhesive compared with ionizing radiation and zoledronic acid. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, **1**;20 (4):427-34.

ALCARAZ, M., GÓMEZ-MARAGA, A.; ROSA, B.; VICENTE, V and CANTERAS, M (2000).- Micronucleus assay in human lymphocytes irradiated during medical radiodiagnostic exploration. 2000 Annual Radiation Research Meeting and Grant holders Meeting of Committee on Cancer Research, 10-12 April 2000. Churchill Hall of University of Bristol.

ALCARAZ, M., PARRA, C.; MARTINEZ BENEYTO, Y.; VELASCO, E and CANTERAS, M (2009b).- Is it true that the radiation dose to which patients are exposed has decreased with modern radiographic films? **Dentomaxillofac Radiol.**, **38**: 92-97.

ALCARAZ, M.; ACHEL, D. G., OLIVARES, A.; OLMOS, E.; ALCARAZ-SAURA, M and CASTILLO, J (2013).- Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility. **Clin Transl Oncol.**, **(4)**:300-306.

ALCARAZ, M.; ARMERO, D.; MARTÍNEZ-BENEYTO, Y.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; FERNANDEZ, H.; ALCARAZ-SAURA, M and CANTERAS, M. (2011).- Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. **Dentomaxillofacial Radiol.**, **40**: 310-314.

ALCARAZ, M.; VELASCO, H. (2013)- *Bases físicas del radiodiagnóstico médico. Curso de capacitación para dirigir y operar equipos de radiodiagnóstico médico y dental (3ªed)*. Colección Edit.um. Publicaciones Universidad de Murcia. Murcia.

ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L and CZERWINSKI, M. J (1988). - Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.**, **48**: 589-601.

ALMASSY, Z.; KREPINSKY, A. B.; BIANCO, A and KOTELES, G.J (1987). - The present state and perspectives of micronucleus assay technique in radiation protection. **Int J Rad Appl Instrum.**, **38 (4)**: 241-249.

ARMERO D., BERNAL F., ROSA B., GOMEZ-MORAGA A., FELICES J.M., ALCARAZ M. (2000). Test de micronúcleos en linfocitos de pacientes irradiados durante exploraciones de radiología vascular. XII Congreso Nacional de Enfermería Vascular, 31 de mayo y 1-3 de Junio, Barcelona, p.72.

ARORA, R.; KUMAR, R.; SHARMA, S and TRIPATHI, R. P. (2008).- Radiomodulatory compounds of herbal origin for new frontiers in medicine, homeland security, management of radiological incidents and space applications. In; *Herbal radiomodulators: Applications in medicine, homeland defence and space*, Arora, R ed. CAB Int. UK: 1-22.

ARORA, R.; GUPTA, D.; CHAWLA, R.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; PRASAD, J.; SINGH, S.; SAMANTA, N and SHARMA, R. K (2005).- Radioprotection by plant products: Present status and future prospects. **Phytother Res.**, **19**: 1-22.

ARUOMA O.I; HALLIWELL B; AESCHBACH R; LÖLIGERS J (1992).- Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. **Xenobiotica.**, **22(2):257-68.**

ASHBY, J.; FLETCHER, K.; WILLIAMS, C.; ODUM, J and TINWELL, H (1997). - Lack of activity of estradiol in rodent bone marrow micronucleus assays. **Mutat. Res.**, **395**, 83-88.

BACQ, Z. M.; DENECHAMPS, G.; FISHER, P.; HERVE, A.; LEBIHAN, H; LECOMTE, J.; PIROTTE, M and RAYET, P (1953).- Protection against X-rays and therapy of radiation sickness with β -mercaptoethylamine. **Science.**, **117: 633-636.**

BADR F.M., EL HABIT O.H.M., HARRAZ M.M. (1999). -Radioprotective effect of melatonin assessed by measuring chromosomal damage in mitotic and meiotic cells. **Mutat Res.**, **444: 367-372.**

BAKKA A., JOHNSEN A.S., ENDRESSEN L., RUGSTAD H.E. (1982).- Radioresistance in cells with high content of metallothioneine. **Experientia.**, **38: 381-383.**

BALASEM, A. N and ALI, A. S (1991).- Establishment of dose-response relationship between doses of Cs 137 gamma rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. **Mutat. Res.**, **259: 133-138.**

BAN, S.; DONOVAN, M. P.; COLOGNE, J. B.; FUJITA, S and AWA, A. A (1993). - Radiosensitivity of atomic bomb survivors as determined with a micronucleus assay. **Radiol., Res.** **134: 170-178.**

BARABOI V.A., BELOSHISKII P.V., KRASIUK A.N., KORKACH V.I (1994). - Oxygen dependent processes in the irradiated organisms. **Fiziol Zh.**, **40: 116-128.**

BARANOV A. E., GUSKOVA A.K., NADEJINA N.M., NUGIS V.YU. (1995). - Chernobyl Experience: Biological indicators of exposure to ionizing radiation. **Stem Cells**, **13, Suppl.1: 69-77.**

BATE SMITH E.C. (1962).- Phytochemical Ecology. Academic Press (J.B.Harbone, ed.), London, pp.: 45-56.

BELLI J.A., SHELTON M. (1969). -Potentially lethal radiation damage: Repair by mammalian cells in culture. **Science.**, **165: 490-492.**

BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., SABATER F., DEL RIO J.A.(1995). - Characterization of a S-adenosyl-L-methionine: Eriodictyol 4'-O-methyltransferase from citrus aurantium. **Plant. Physiol. Bioch.** **33: 263-271.**

BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., DEL RIO J.A (1993).- Changes in Neodiosmin levels during the development of citrus aurantium leaves and fruits. Postulation of a Neodiosmin Biosynthetic Pathway. **J. Agric. Food Chem.** **41: 1916-1919.**

BENAVENTE-GARCÍA O., CASTILLO J., SABATER F., DEL RIO J.A. (1997).- 4'-O-methyltransferase from citrus. A comparative study in citrus aurantium, c.paradisi and tangelo nova. **Plant. Physiol. Siochem** **36**: 789-794.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; ALCARAZ, M.; VICENTE, V.; RIO, J. A. D AND ORTUNO, A (2007).- Beneficial action of Citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. **Curr Cancer Drug Targ.**, **7**:795-809.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J and ALCARAZ, M. (2002).- Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfur-containing compounds. **J Med Food.**, **5**: 125-135.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ALCARAZ, M.; YAÑEZ, J.; MARTINEZ, C.; VICENTE, V and LOZANO, J. A (2005).- Antiproliferative activity of several phenolic compounds against melanoma cell lines: Relationship between structure and activity. **Agro Food Ind. Hi-Tech.**, **4**:30-34.

BENDER M.A., AWA A. A., BROOKS A.L., EVANS H.J., GROER P., LITTLEFIELD L.G., PEREIRA C., PRESTON R.J., WACHHOLZ B.W. (1988).- Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. **Mutat Res.** **196**: 103-159.

BERET A., y CAZENAVE J.P. (1988).- The effects of flavonoids on bloodvessel wall interactions. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties; Cody, V., Middleton E., Harborne J. B: Beretz A., Eds.; Progress in Clinical and Biological Research 280; Alan R. Liss Inc.: New York; pp 187-200.

Bertl E, Becker H, Eicher T, Herhaus C, Kapadia G, Bartsch H, Gerhäuser C (2004). Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents. **Biochem Biophys Res Commun.** **3** ;325(1):287-95.

BERTSCHE U., SCHORN H. (1986). Glutathione depletion by dl-buthione-SR-sulfoximine (BSO) potentiates X-ray induced chromosome lesions after liquid holding recovery. **Radiat Res.**, **105**: 351-369.

BLAKOV V.M., STEPANOV S.V. (1997). Mechanism of primary radiobiologic action. **Radiat Biol Radioecol.**, **37**: 469-474.

BISHT, K. S and UMA DEVI, P (1995). - Modification of radiation induced chromosomal damage and micronucleus induction in mouse bone marrow by misonidazole and hyperthermia. **Acta Oncol.**, **34**: 913-918, 1995.

BLAKELY W.F., PRASANNA P.G.S., KOLANKO C.J., PYLE M.D., MOSBROOK D.M., LOATS A.S., RIPPEON T.L., LOATS H. (1995). -Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder. **Stem Cells** . **13**: 223-230.

BOHM B.A. (1975). -Flavanones and Dihydroflavonols. In JB Harborne; TJ Mabry; H Mabry. Eds, The Flavonoids. Chapman and Hall. London, pp.: 560-631.

BOMBARDELLI E. y MORAZZONI P. (1993).- The flavonoids. New perspectives in biological activities and therapeutics. **Chim Oggi** **3**: 25-28.

BOREK C., ONG A., MASON H., DONAHUE L., BIAGLOW J. (1986).- Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanisms. **Proc Natl Acad Sci., (USA)** **83**: 1490–1494.

BORS W., HELLERS W., MICHEL C., SARAN M. (1990a).- Radical chemistry of flavonoids antioxidant. In: Antioxidants in therapy and preventive medicine; Emerit, Ed. Pienun Press; New York 1: 165-170.

BORS W., HELLERS W., MICHEL C., SARAN M. (1990b).- Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In: Methods in enzymology, Packer, L., Glazer, A. N., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 186: 343-355.

Bradford, M.M. (1976) -Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry.**, **72**, 248-254.

BROWN, D. Q.; PITTOCK, J. W and RUBINSTEIN, J (1982). - Early results of the screening program for radioprotectors. **Int. J. Radiat. Biol. Phys.**, **5**: 565-570.

BRYANT P. (1985). -Enzymatic restriction of mammalian cell DNA: evidence for double strand breaks and potentially lethal lesions. **Int J Radiat Biol.**, **48**: 55–60.

BUMP E.A., YU N.Y. (1982). -Radiosensitization of hypoxic tumor cells by depletion of intracellular glutathione. **Science.**, **217**: 544–549.

BUMP E.A., YU N.Y., BROWN J.M. (1981). -The use of drugs which deplete intracellular glutathione in hypoxic cell radiosensitization. **Int J Radiat Oncol Biol Phy.**, **8**: 439–442.

BURHAN A; BARIS CE; K M; LINU A AND N E. (2009) -Determination of glutathione disulfide levels in biological samples using thiol–disulfide exchanging agent, dithiothreitol. **Biomed Chromatogr.**, **23**: 119–123

CAPIZZI RL, OSTER W. (1995). -Protection of normal tissue from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine: clinical experiences. **Eur J Cancer.**, **31A Suppl** 1:S8-13

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D and MITCHELL, J.B (1987b). - Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res.**, **47**, 936–942.

CARMICHAEL, J.; DeGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D and MITCHELL, J.B (1987a). - Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. **Cancer Res.**, **47**:943-946.

CASTILLO J.; ALCARAZ, M and BENAVENTE-GARCÍA, O (2010).- Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract. In: Preedy, V. R and Watson, R. R, eds., *Olives and Olive oil in health and disease prevention*. **Oxford: Academic Pres. 951-958.**

CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., DEL RIO J.A. (1992). Naringin and Neohesperidin levels during development of leaves, flower buds and fruits of citrus aurantium. **Plant Physiol.**, **99**: 67-73.

CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., DEL RÍO J.A. (1994). Study and optimization of citrus flavonone and flavones elucidation by reverse phase HPLC with severas mobile phases: Innuece of the structural characteristics. **Journal of Liquid Chromatography** **17**: 1497-1523.

CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; DEL BANO, M. J; LORENTE, J.; ALCARAZ, M and DATO, M. J (2001).- Radioprotective effects against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays as a function of polymerization grade of grape seed extracts. **J Med Food.**, **4**: 117-123.

CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; LORENTE, J.; ALCARAZ, M.; REDONDO, A.; ORTUÑO, A and DEL RIO, J. A (2000).- Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. **J Agric Food Chem.**, **48**: 1738-1745.

CASTILLO, J.; PIEDAD, M.; MARCHANTE, C.; DEL BAÑO, M. J.; LORENTE, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O and ALCARAZ, M (2002).- Citroflavonoids and Flavon-3-ols. High radioprotective capacity and prospects for health. **Nutrafoods.**, **1**:27–39.

CILLARD J. y CILLARD P. (1988).- Composés phenoliques et radicaux libres. **STP Pharma Sci.**, **4**: 592-596.

CITRIN, D.; COTRIM, A. P.; HYODO, F.; BAUM, B. J.; KRISHNA, M. C and MITCHELL, J. B (2010). -Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. **Oncologist.**, **15**: 360-371.

CLARK, E.P.; EPP, F.R.; BIAGLOW, J.E.; (1984).- Glutathione depletion, radiosensitization and misonidazole potentiation in hypoxic Chinese hamster ovary cells by butathione. **Radiat Res.**, **98**: 370–380

COOK, N. C and SAMMAN, S. (1996).- Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **J Nutr Biochem.**, **7**(2):66-76.

CRITCHFIELD J.W., WELSH C.I., PHANG J.M., YEH G.C. (1994).- Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT15 colon celis. Activation Of P-gLYcoprotein as a Putative mechanism. **Siochem. Pharmacolol.**, **48**: 1437-1445.

CUCINOTTA, FA. (2001). -“Once we know all the radiobiology we need to know, how can we use it to predict space radiation risks and achieve fame and fortune?” **Phys Med.**, **17**: 5-12.

CULY, C. R and SPENCER, C.M (2001). - Amifostine: An update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving Chemotherapy or Radiotherapy and its Potential Therapeutic Application in myelodysplastic syndrome. **Drugs., 61 (5): 641-684.**

DANILENKO M.; WANG Q.; WANG X.; LEVY J.; SHARONI Y.; STUDZINSKI GP.; (2003). -Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in leukemia cells but does not promote elevation of basal levels of intracellular calcium. **Cancer Res., 15;63(6):1325-32.**

DARMON N., FERRANDIZ V., CANAL M.T., MILTJAVILLA S. (1987). -Activite antiradicallaire de flavonoides vis-à-vis de l'anion superoxide et dur radical hydroxyle. **Liaison Grupe Polyphenols Bull., 3: 158-162.**

DAS N.P y PEREIRA T.A. (1990).- Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: Structure-activity relationships. **J Am Oil Chem Soc., 4: 255-258.**

DEL BANO, M. J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; LORENTE, J.; MARTIN-GIL, R.; ACEVEDO, C and ALCARAZ, M (2006).- Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. **J Agric Food Chem., 54: 2064-2068.**

DEL BAÑO, M. J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL RÍO, J. A.; ORTUÑO, A.; QUIRIN, K. W and GERARD, D (2003).- Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. **J Agric Food Chem 51:4247-4253.**

DENISON L.; HAIGH A.; D'CUNHA G.; MARTIN F. (1992).- DNA ligands as radioprotectors: molecular studies with Hoechst 33342 and Hoechst 33258. **Int J Radia. Biol., 61: 69-81.**

DIXON R.A., DEY P.M., WHITHEAD I.M. (1986).- Purification and properties of chalcone isomerase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. **Biochem Biophys Acta .,715: 25-33.**

DRAGARIC I.G. y DRAGARIC Z.D. (1971). The radiation chemistry of water. pp. 256, Academic Press, New York.

DUARTE J., PEREZ-VIZCAINO F., ULTRILLA P. JIMENEZ J., TAMARGO J., ZARZUELO A. (1993). Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. **Gen Pharmacol., 24: 857-862.**

DURANTE M., GEORGE K., YANG TC. (1996).- Biological dosimetry by interphase chromosome painting. **Radiat Res.,15: 53-60.**

EBEL J. (1986)- Hytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annu Rev Phytopathol., 24: 235-264.**

EDGREEN M. (1983).- Depletion of cellular thiols by misonidazole pretreatment prevent some post irradiation repair processes. **Br J Radiol.**, **56**: 211–212.

EDGREEN M., REVESZ L., LARSON A. (1981).- Induction and repair of single strand DNA breaks after X-irradiation of human fibroblasts deficient in glutathione. **Int J Radiat Biol.**, **40**: 355–363.

ELDJARN L. y PHIL A. (1958).- Cysteine and cysteamine group of protective agents: chemical structure, protective ability and mixed disulfide formation. **Radiat Res.**, **9**: 110.

EMERIT I.; OGANESIAN N.; SARKISIAN T.; ARUTYUNYAN R.; POGOSIAN A.; ASRIAN K.; LEVY A.; CERNJAVSKI L. (1995).- Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. **Radiat Res.**, **144**(2):198-205.

ESPOSITO RD.; DURANTE M.; GIALANELLA G.; GROSSI G.; PUGLIESE M.; SCAMPOLI P.; JONES TD. (2001).- “A model of radiation-induced myelopoiesis in space.” **Phys Med.**, **17** (1):181-2.

FEDOROCKO F. y MACKOVA O. (1996).- Radioprotective effects of combination broncho-vaxom, a macrophage activator and indomethacin, an inhibitor of prostaglandin production: relationship to myelopoiesis. **Eur J Haematol.** ,**56**: 54–61.

FEDOROCKO P.; BREZANI P.; MACKOVA N.O. (1992).- Radioprotection of mice by the bacterial extract Broncho-Vaxom: haemopoietic stem cells and survival enhancement. **Int J Radiat Biol.**, **61**: 511–518.

FENECH M. (1993a). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations., **Mutat. Res.**, **285** (1): 35-44.

FENECH M. (1993b). The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. **Environ. Health. Perspect.**, **285** Suppl.3: 101-7.

FENECH M., BAGHURST P., LUDERER W., TURNER J., RECORD S., CEPPI M., BONASSI S. (2005). -Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis.**, **26**(5): 991-9.

FENECH, M and MORLEY, A (1985a).- Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios.**, **43**: 233-246.

FENECH, M (1997).- The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat Res.**, **392**: 11 - 18.

FENECH, M (2000).- The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res.**, **455**: 81 - 95.

FENECH, M (2007). - Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.**, **2**: 1084–1104.

FENECH, M and MORLEY, A. A (1985b).- Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat Res.**, **147**: 29-36.

FENECH, M. and MORLEY, A. A. (1986) Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X irradiation. **Mutat. Res.**, **161**, 193–198.

FENECH, M.; BONASSI, S.; TURNER, J.; LANDO, C.; CEPPI, M.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BIGATTI, M. P.; BOLGNESE, C.; CAO, J.; DE LUCA, G.; DI GIORGIO, M.; FERGUSON, L. R.; FUCIC, A.; LIMA, O. G.; HADJIDEKOVA, V. V.; HRELIA, P.; JAWORSKA, A.; JOKSIC, G.; KRISHNAJA, A. P.; LEE, T. K.; MARTELLI, A.; McKAY, M. J.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; MULLER, W. U.; ODAGIRI, Y.; ORSIERE, T.; SCARFI, M. R.; SILVA, M. J.; SOFUNI, T.; SURALLES, J.; TRENTA, G.; VOROBTSOVA, I.; VRAL, A and ZIJNO, A (2003).- Human MicroNucleus Project. Intra and interlaboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. **Mutat. Res.**, **534 (1-2)**: 45-64.

FENECH, M.; DENHAM, J.; FRANCIS, W and MORLEY, A. A (1990). - Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. **Int J rad Biol.**, **5**: 373-383.

FILATOV D., BJORKLUND S., JOHANSSON E., THELANDER L. (1996). Induction of the mouse ribonucleotide reductase R1 and R2 genes in response to DNA damage by UV light. **J Biol Chem.**, **271**: 23.698–23.704.

FILLAT C.; RODRIGUES-GIL J.E.. GUINOVART J.J. (1992). -Molybdate and tungstate act like vanadate on glucose metabolism in isolated hepatocytes. **Biochem J.**, **282**: 659–663.

FRIDOVICH I. (1978). -The biology of oxygen radicals. **Science.**, **201**: 875–880.

FRIEDBERG E.C. (1985). -DNA repair, Freeman, New York.

FURUSE M.; TSUNEOKA K.; UCHIDA K.; NOMOTO K. (1997). -Acceleration of granulocytic cell recovery in irradiated mice by a single subcutaneous injection of a heat killed *Lactobacillus casei* preparation. **J Radiat Res.**, **38**: 111–120.

GÁBOR, M (1986). - Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. In: Cody, V.; Middleton, E and Harborne, J. B (Eds.), *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, Alan R. Liss, New York, pp. 471-480.

GALATI E.M., MONFORTE M.T., KIRJAVAIN S., FORESTIERI A., TROVATO A., TRIPODO M.M. (1994).- Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I) Antiinflammatory and analgesic activity. **Farmacol.**, **40**: 709-712.

GATENBERG, H.W.; WUTTKE, K.; STREFFER, C and MULLER, W. U (1991).- Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. **Radiat. Res.** **128**: 276-281.

GAURAS I.; GAURAS H. (1987). -The use of ACE inhibitors in hypertension. In: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, Eds. J.B. Kostis and E. De Felice, pp 93–122, Liss, New York.

GIAMBARRESI, L. I and WALKER, R, I (1991).- *Textbook of Military Medicine-Part I: Warfare, Weaponry, and the Casualty. Medical Consequences of Nuclear Warfare.* Office of the Surgeon General U S Army.

GLOWE P.J.; GLICK J.H.; WEILER C. (1984).- Phase I trials of WR 2721 and cisplatinum. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, **10**: 1781–1787.

GOEL, H. C.; PRASAD, J.; SHARMA, A and SINGH, B (1998).- Antitumour and radioprotective action of *Podophyllum hexandrum*. **Indian J Exp Biol.**, **36**: 583-587.

GOEL, H. C.; PRASAD, J.; SINGH, S.; SAGAR, R. K.; AGRAWALA, P. K.; BALA, M.; SINHA, A. K and DOGRA, R (2004).- Radioprotective potential of an herbal extract of *Tinospora cordifolia*. **J Radiat Res.**, **45**: 61-68.

GRAB D., LOYAL R., EBEL J. (1985).- Elicitor induced phytoalexin synthesis in soybean cells: changes in the activity of chalcone synthase mRNA and the total population of traslatable mRNA. **Arch Biochem Biophys.**, **243**: 523-529.

GREENPENBERG. J. (1962).- Flavones. T. Geissman ed the chimistry of flavonoid compounds. Mc Millan Co. New York.

GREENROD, W and FENECH, M. (2003).-The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage *in vitro*. **Mutagenesis** **18(2)**:119-26.

GREINERT R.; DETZLER E.; VOLKMER B.; HARDER D. (1995). -Kinetics of the formation of chromosome aberrations in x-irradiated human lymphocytes: analysis by premature-chromosome condensation with delayed fusion. **Radiat Res.**, **144**: 190-197.

GUENECHEA G.; ALBELLA B.; BUEREN J.A.; MAGANTO G.; TUDURI P.; GUERREO A.; PIVEL J.P.; REAL A. (1997). -AM218, a new polyanionic polysaccharide, induces radioprotection in mice when administered shortly before irradiation. **Int J Radiat Biol.**, **71**: 101–108.

HAHN S.M.; DeLUCA A.M.; COFFIN D.; KRISHNA C.M.; MITCHELL J.B. (1998).- In vivo radioprotection and effects on blood pressure of the stable free radical nitroxides. **Int. J. Radiat. Oncol Biol Phys.**, **42**: 839–842.

HAHN S.M.; KRISHNA C.M.; SAMUNI A.; DEGRAFF W.; CUSCELA D.O.; JOHNSTONE P.; MITCHELL J.B. (1994). -Potential use of nitroxides in radiation oncology. **Cancer Res.**, **54 (7)**: 2006S–2010S.

HAHN S.M.; SULLIVAN F.J.; DeLUCA A.M.; BACHER J.D.; LIEBMANN J.; KRISHNA M.C.; COFFIN D.; MITCHELL J.B. (1999).- Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. **Free Radical Biol Med.**, **27**: 529-535.

HALL S.C. y WELLS J. (1988).- Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter: preliminary data following beta irradiation in vitro. **Journal Radiology Protection** **8**: 97-101.

HAMILTON C., POTTEN C. (1995).- Hair cortical cell counts (HCCC) as an indicator of radiation dose and sensitivity in humans. Abstracts, **Int. J Radiat Res., Wurzburg**, **P30,24**.

HANSON W.R.; ZHEN W.; GENG L.; HUNTER N.; MILAS L. (1995). -The prostaglandin E1 analog, misoprostol, a normal tissue protector, does not protect four murine tumors in vivo from radiation injury. **Radiat Res.**, **142**: 281-287.

HARAPANHALLI R.S. NARA V.R.; YAGHMAI V.; AZURE M.T.; GODDU S.M.; HOWELL R.W.; RAO D.V. (1994).- Vitamins as radioprotectors in vivo: II Protection by vitamin A and soyabean oil against radiation damage caused by internal radionucleides. **Radiat Res.**, **139**: 115-122.

HARSHMAN K.D.; DERVAN P.B. (1985).- Molecular recognition of B-DNA by Hoechst 33258. **Nucleic Acids Res.**, **13**: 4825-4835.

HASLAM E. (1975). -Natural Proanthocyanidins. En JB Harborne, TJ Mabry, H Mabry, eds, The Flavonoids. Chapman and Hall, London, pp: 506-559.

HAYASHI K. (1962).- The Anthocyanins. En T Geissman ed, The Chemistry of Flavonoid Compounds. (McMillan Co.), New York pp: 248-285.

HAYASHI M., SOFUNI T., ISHIDATE M. (1983).- An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutat Res.** **120**: 241-243.

HE J., CHEN W., JIN L., JIN H. (2000).- Comet assay and cytokinesis-blocked micronucleus test for monitoring the genotoxic effects of X-ray radiation in humans. **Chin Med J.**, **113** (10): 911-4.

HEDDLE, J. A and SALOMONE, M. F (1981).- Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity. *Environ. Health. Persp.* **39**: 23-27.

HENNIG, U. G.; WANG, Q.; GEE, N. H.; VON BORSTEL, R. C and HENNING, U. G (1996). - Protection and repair of gamma-radiation-induced lesions in mice with DNA or deoxyribonucleoside treatments. **Mutat Res.**, **350** (1): 247-54.

HENSELEY, M. L.; SCHUCHTER, L. M.; LINDLEY, C.; MEROPOL, N. J.; COHEN, G. I.; BORDER, G.; GRADISHAR, W. J.; GREEN, D. M.; LANGDON, R. J. JR.; MITCHELL, R. B.; NEGRIN, R.; SZATROWSKI, T. P.; THIGPEN, J.T.; VON HOFF, D.; WASSERMAN, T. H.; WINER, E. P and FISTER, D. G (1999). American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for use of chemotherapy and radiotherapy protectants. **J. Clin. Oncol.**, **17**: 3333-3355.

HENSLEY, M. L.; HAGERTY, K. L.; KEWALRAMANI, T.; GREEN, D. M.; MEROPOL, N. J.; WASSERMAN, T. H.; COHEN, G. I.; EMAMI, B.; GRADISHAR, W. J.; MITCHELL, R. B.; THIGPEN, J. T.; TROTTI (III), A.; VON HOFF, D and SCHUCHTER, L. M (2009).- American Society of Clinical Oncology 2008 Clinical Practice Guideline Update: Use of chemotherapy and radiation therapy protectants. **J Clin Onco.**, **27** .

HEO H.Y., LEE S.J., KWON C.H., KIN S.W., SOHN D.H., AU W.W. (1994). - Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. **Mutat Res.**, **311**: 225-229.

HERNÁNDEZ J.A.; FERRER M.A.; JIMÉNEZ A.; BARCELÓ A.R.; SEVILLA F. (2001) - Antioxidant Systems and O₂·-/H₂O₂ Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. **Plant Physiology.**, **127(3)**:817-831.

HERTOG, M. G. L.; FESKEENS, E.J.M.; HOLLMAN, C.H.; KATAN, M. B and KROMHOUT, D (1993). - Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease. **Lancet.**, **(342)**: 1007-1011.

HIGHLY M.S.; UNDERHILL C.R.; PARNIS F.X.; KARAPETIS C.; RANKIN E.; DUSSEK J.; BRYANT B.; ROWLAND C.; HODSON N.; HUGHES J.; HARPER P.G. (1999).- Treatment of invasive thymoma with single agent ifosfamide. **J Clin Oncol.**, **17**: 2737-2744.

HOLLENBERG, N. K.; SCHMITZ, H.; MACDONALD, I and POULTER, N (2004). - Cocoa, flavanols and cardiovascular risk. **Br J Cardiol.** **11(5)**: 379-86.

HOLT J.A. (1975).- The principles of hyperbaric and anoxic radiotherapy. **Br J Radiol.**, **48**: 819-826.

HOPIA A.; HUANG S.W.; FRANKEL E.N. (1996)- Effect of alpha-tocopherol and Trolox on the decomposition of methyl linoleate hydroperoxides. **Lipids.**, **31(4)**:357-65.

HOROWITZ R. y GENTILI B. (1977).- Flavonoids constituents of Citrus. **Citrus Science and Technology.**, 397-426.

HUANG M.T.; HO C.T.; WANG Z.Y.; FERRARO T.; LOU Y.R.; STAUBER K.; MA W.; GEORGIADIS C.; LASKIN J.D.; CONNEY AH. (1994)- Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer Res.**, **1**;54(3):701-8.

HURTA RAR., WRIGHT JA. (1992). -Alterations in the activity and regulation of mammalian ribonucleotide reductase by chlorambucil, a DNA damaging agent. **J. BiolChem.**, **267**: 7066-7071.

HWANG P.L.; RYAN R.J. (1981).- Tungstate stimulates adenylate cyclase. **Endocrinology.**, **108**: 435-439.

IAEA (2001). - Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. IAEA Technical Reports report 405. IAEA: Vienna, Austria.

IAEA (2011).- *Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies*. IAEA: Vienna, Austria.

JAGETIA, C. G (2007).- Radioprotective Potential of Plants and Herbs against the Effects of Ionizing Radiation. **J Clin Biochem Nutr.**, **40**: 74-81.

JAGETIA, G. C (1990). - Frequency of micronucleated cells in the mouse bone marrow after exposure to various doses of γ -irradiation. **Mutat Res.** **230**: 45-48

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S.; VENKATESH, P and ULLOOR, J. N (2003a).- Influence of ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc) on survival, glutathione and lipid peroxidation in mice after whole-body exposure to gamma radiation. **Radiat Res.**, **160**: 584-592.

JAGETIA, G. C.; SHIRWAIKAR, A.; RAO, S. K and BHILEGAONKAR, P. M (2003b).- Evaluation of the radioprotective effect of *Ageratum conyzoides* Linn. extract in mice exposed to different doses of gamma radiation. **J Pharm Pharmacol.**, **55**: 1151-1158.

JOHNSON, J. J (2011). - Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. **Cancer Lett.**, **305**:1-7.

JOSHIMA H.; OHARA H.; AOKI Y. (1992).- The effect of OK-432 upon erythropoietic recovery in sub-lethally irradiated mice: A preliminary report. **J Radiat Res.**, **33**: 290-300.

KAGI J.H.R., y SCHAFFER A. (1988).- Biochemistry of metallothioneine. **Biochemistry.**, **27**: 8509-8515.

KALECHMAN Y.; SHANI A.; ALBECK M.; SREDNI B. (1995a).- Induction of acute phase proteins in mice and humans by treatment with AS101, an immunomodulator with radioprotective properties. **Immunopharmacology.**, **29**: 149-158.

KALECHMAN Y.; ZULOFF A.; ALBECK M.; STRASSMANN G. (1995b).- Role of endogenous cytokines secretion in radioprotection conferred by the immunomodulator Ammonium trichloro-(dioxyethylene-0,0')tellurate. **Blood.**, **85**: 1555-1561.

KAMAT J.P.; BOLOOR K.K.; DEVASAGAYAM T.P.A.; VENKATACHALAM S.R. (2000). -Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by gamma-radiation in rat liver mitochondria. **J Ethnopharmacology.**, **71**: 425-435.

KASHINO, G.; LIU, Y.; SUZUKI, M.; MASUNAGA, S-i.; KINASHI, Y.; ONO, K.; TANO, K and WATANABE, M (2010).- An Alternative Mechanism for Radioprotection by Dimethyl Sulfoxide; Possible Facilitation of DNA Double-strand Break Repair. **J. Radiat. Res.**, **51**: 733-740.

KAUL T.N., MIDDLETON E., OGRA P.L. (1985). -Antiviral effects of flavonoids on human viruses. **J Med Virol.**, **15**: 71-79.

KENNEDY AR, ZHOU A, DONAHNE JJ, WARE JH. (2006).- “Protection against adverse biological effects induced by space radiation by the Bowman-Birk inhibitor and antioxidants”. **Radiat Res.**, **166**: 327-32

KENNEDY A.R. (1993).- “Overview: anticarcinogenic activity of protease inhibitors.” En: Troll W y Kennedy AR. (Eds.) Protease inhibitor as cancer chemopreventive agents. Plenum Press, New York, EEUU. pp. 9-64.

KHOJASTEH N.H.; ZAKERINIA M.; RAMZI H.; HAGHSHENAS M. (2000). -A new regimen of MESNA (2-mercaptoethanesulfonate) effectively prevents cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplant recipients. **Transplant Proc.**, **32**: 596.

KIANG, J. G.; FUKUMOTO R and NIKOLAI GORBUNOV V (2012).- Lipid peroxidation after ionizing leads to apoptosis and autophagy. In: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, Lipid Peroxidation, A Catala (ed). pp. 261–278.

KIM , H. J.; CHO, Y. D.; LEEM, K. H.; LEE, D. N.; KIM, E. H.; KIM, M. G.; KIM, D. K.; SHIN, T. Y.; BOO, Y.; LEE, J. H AND KIM, H. K (2006).- Effects of *Ephedrae herba* on melanogenesis and gene expression profiles using cDNA microarray in B16 melanocytes. **Phytother Res.**, **20**:748–754.

KIM, S. H.; CHO, C. K.; KIM, T. H.; YOO, S. Y.; KOH, K. H and YUN, H.G (1993).- Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast neutron irradiations. **Anticancer. Research.**, **13**: 1587-1591.

KIMERY A.(2003).- “Radiological race.” **HDJ.**, **1**:16-7.

KIRSCH-VOLDERS, M.; ELHAJOUJI, A.; CUNDARI E and VAN HUMMELEN, P (1997). - The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mutat Res.**, **392**: 19–30.

KLETA R. (1999).- Cyclophosphamide and mercaptoethanesulfonate therapy for minimal lesion glomerulonephritis. **Kidney Int.**, **56**: 2312–2313.

KOHN K.W. (1979).- DNA as target in cancer chemotherapy. Measurement of macromolecular DNA damage produced in mammalian cells by anticancer agents and carcinogens. **Meth Cancer Res.**, **16**: 297–345.

KOLLMANN G.; YUHAS J.M.; LEONE S.; SHAPIRO B. (1973).- Mechanism of differential radiation protection of normal versus tumor tissues by WR2721 in tumor bearing mice. **Radiat Res.**, **55**: 603.

KONOPACKA M. (1996).- Vitamines as radioprotectors of normal cells. **Postepy Hig Med Dosw.**, **50**: 145–156.

- KONOPACKA M. y ROGOLINSKI J. (2004). -Thiamine prevents X-ray induction of genetic changes in human lymphocytes in vitro. **Acta Biochim Pol.**, **51 (3): 839-43.**
- KONOPACKA, M and RZESZOWSKA-WOLNY, J (2001). - Antioxidant vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. **Mutation Research** **49, 1-7.**
- KOOSTSTRA M. (1994).- Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. **Plant Mol Biol.**, **26: 771-774.**
- KORMOS, C and KOTELES, G .J (1988). - Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. **Mutat., Res.** **199: 31-35.**
- KOSAKA K.; YOKOI T. (2003)- Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. **Biol Pharm Bull.** **26(11):1620-2.**
- KOTELES G.J. (1996).- Biological dosimetry. International congress on Radiation Protection (IRPA), Viena. Lectures noter for Refresher Course (R-06: Biological Dosimetry).
- KOTELES G.J. y BENKO I. (1994). -Thermography in radiation injuries. **Thermologie Osterreich** **4: 55-65.**
- KOTELES G.J., BERCES J., KORMOS Cs., HORVATH Gy (1993). -Detection of scavenger effects by micronucleus assay in human lymphocytes, in vitro in Role of Free Radicals in Biological Systems. Eds Feher I. Akademiai Kiado, Budapest: 149-159.
- KREPINSKY, A. B and HEDDLE, J A (1983).- Micronuclei as rapid and inexpensive measure of radiation induced chromosomal aberrations. In: Radiation Induced Chromosomal Damage in Man (Eds. Ishihara, T and Sasaki M.S.), Alan R. Liss Ins., New York, pp. 93-109.
- KRISHNA G., FRIEDLER R., THEISS J.C. (1992).- Simultaneous evaluation of clastogenicity, and eugenecity and toxicities in the mouse micronucleus assay using immunofluorescence. **Mutat Res.**,**282: 159-167.**
- KUDUGUNTI, S. K.; VAD, N. M.; EKOGB, E and MORIDANI, M. Y (2011). - Efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in skin B16–F10 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. **Invest New Drugs.**, **29:52–62.**
- KUDYNSKY R., KUDYNSKA J., BUCKMASTER H.A. (1994). -The decay constant for irradiated human hair using EPR spectroscopy. **Appl Radiat Isot.**, **45: 645-650.**
- KUMAR P.; KUTTAN R.; KUTTAN G. (1996).- Radioprotective effect of Rasayanas. **Ind J Exp Biol.**, **34: 848-850.**
- KWEE, J. K.; MITIDIERI, E and AFFONSO, O. R (1991). - Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B16 melanoma cells. **Cancer Lett.**, **57:199–202.**

LANDAUER M.R.; MCCHESENEY D.G.; LEDNEY G.D. (1997).- Synthetic trehalose dicorynomycolate (S-TDCM): behavioral effects and radioprotection. **J Radiat Res.**, **38**: 45–54.

LAZUTKA J.R. (1995).- Increased frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers. **Int J Radiat Biol.**, **67**: 671–676.

LEE T.K.; ALLISON R.R.; O'BRIEN K.F.; KHAZANIE P.G.; JONKE R.M., BROWN R.; BLOCH R.; BLOCH R.M.; TATE M.L.; DOBBS L.J and KRAGEL P.J (2004).- Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. **Mutat Res.**, **557**: 75–84.

LEE, J.; KIM Y, S and PARK, D (2007). - Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. **Biochem Pharmacol.**, **74**:960–968.

LENARZYK, M and SLOWIKOWSKA, M (1995). -The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from X-ray-exposed mice. **Mutat Res.**, **335**: 229–234.

LEWINSOHN E., BRITSCH L., MAZUR Y., GRESSEL J. (1989).- Flavanone glycoside biosynthesis in citrus: chalcone synthase, UDP-glucose: flavanone-7-o-glucosyl-transferase and-Rhamnosyl-transferase activities in cell free. **Plant Physiol.**, **91**(4): 1323–28.

LINKS, M and LEWIS, C (1999). - Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficiency. **Drugs** ., **57** (39): 293–308.

LIVESEY J.C. y REED D.J. (1987).- Chemical protection against ionizing radiation. **Adv Radiat Res.**, **13**: 285–353.

LIVINGSTON G.K., FALK R.B., SCHMID E. (2006). -Effect of occupational radiation exposures on chromosome aberration rates in former plutonium workers. **Radiat Res.**, **166** (1): 89–97.

LOBACHEVSKY, P.; IVASHKEVICH, A.; MARTIN, O. A and MARTIN, R. F (2011).- DNA-Binding Radioprotectors. In: *Selected Topics in DNA Repair*, Chen, C. C ed. University of California San Diego, USA. DOI: 10.5772/23156

LOHMAN P.H.M., COX R., CHADWICK K.H. (1995).- Role of molecular biology in radiation biology. **Int J Radiat Biol.**, **68**: 331–340.

LOSCHKE D.C., HADWIGER L.A., WAGONER W. (1983). -Comparison of mRNA populations coding for phenylalanine ammonia-lyase and others peptides from pea tissue treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. **Physiol Plant Pathol.**, **23**: 163–173.

MAISIN J.R. (1998).- Bacq and Alexander award lecture-chemical radioprotection : past present and future. **Int J Radiat Biol.**, **73**: 443–450.

MAISIN J.R.; ALBERT C.; HENRY A. (1993).- Reduction of short term radiation lethality by biological response modifiers given alone or in association with other

chemical protectors. **Radiat Res.**, **135**: 332–337.

MANACH C., REGERAT F., TEIXER O., AGULLO G., DEMIGNE C., REMESY C. (1996).- Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. **Nutr Res.**, **16**: 517-544.

MARTIN R.F.; ANDERSON R.F. (1999). - Pulse radiolysis studies indicate that electron transfer is involved in radioprotection by Hoechst 33342 and methylproamine. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, **42**: 827–831.

MARTIN R.F.; BROADHURST S.; D'ABREW S.; BUDD R.; SEPHTON R.; REUM M.; KELLY D.P. (1996).- Radioprotection by DNA ligands. **Br J Cancer.** **27**: S99–101.

MARTIN R.F.; HOLMES N. (1981). -Use of ¹²⁵I labeled ligand to probe DNA structure. **Nature.**, **302**: 452–454.

MARTÍNEZ C. (2004). -Tratamiento del melanoma metastásico pulmonar: Modelo experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

MARTÍNEZ C.; YÁÑEZ J.; ALCARAZ M.; CANTERAS M.; VICENTE V. (2002b). Anticlastogenetic activity of several plant polyphenols against chromosomal damage induced “in vivo” by X-rays. XXVIII European Workshop of Drug Metabolism. Valencia.

MARTINEZ CONESA, C.; VICENTE ORTEGA, V.; YANEZ GASCON, M. J.; ALCARAZ BAÑOS, M.; CANTERAS JORDANA, M.; BENAVENTE-GARCIA, O and CASTILLO, J (2005b).- Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. **J Agric Food Chem.**, **53**: 6791-6797.

MARTÍNEZ, C.; CASTILLO, J.; ALCARAZ, M.; MARTÍNEZ, C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; YÁÑEZ, J.; CASTELLS, M. T and ORTEGA, V. V (2005a).- The effect of the flavonoid diosmin, grape seed extract and red wine on the pulmonary metastatic B16F10 melanoma. **Histol Histopathol.**, **20**: 1121-1129.

MATSUBARA J.; TAJIMA Y.; KARASAWA M. (1987).- Metallothionine induction as a potent means of radiation protection in mice. **Radiat Res.**, **111**: 267–275.

MATSUDA H. (1991). -Pharmacological study on citrus fruits. Antialergic effects of fruits of Citrus unshiu Markovich (2) on flavonoid components. **Yakugaku Zasshi.**, **111**: 193-198.

MAURYA, D.K.; SALVI, V.P.; NAIR, C.K.K. (2004). -Radioprotection of normal tissues in tumor-bearing mice by troxerutin. **J Radiat Res.**, **45**:221–228.

MAURYA, D. K and DEVASAGAYAM, T. P. A (2011).- Role of radioprotectors in the inhibition of DNA damage and modulation of DNA repair after exposure to gamma-radiation, Selected Topics in DNA Repair, Prof. Clark Chen (Ed.), ISBN: 978-953-307-606-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/selected-topics-in-dna-repair/role-of-radioprotectors-in-the-inhibition-of-dnadamage-and-modulation-of>

[dna-repair-after-exposure.](#)

MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALOMONE, M. F and HEDDLE, J. A (1990).- The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood, a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res.**, **239**: 29-80.

MAZUR, L (1995a).- Induction micronucleated erythrocytes by MEA, AET, WR-2721 and X-rays. **Mutat Res.**, **334**: 317-322.

MAZUR, L. (1995b).- Frequency of Micronuclei in mouse peripheral blood erythrocytes following WR-2721 application and X-Irradiation. **Folia Biol (Kraków)**, **43**: 3-4.

MAZUR, L. (2000). - Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. **Mutat Res.**, **468**, 27–33.

MEISTER, M.E.; ANDERSON. (1983).- Glutathione. **Ann Rev Biochem.**, **52** pp. 711-760

METODIEWA D., SKOLIMOWSKI J., KAROLCZAK S. (1996).- Tempace and troxyl—novel synthesized 2,2,6,6-tetramethylpiperidine derivatives as antioxidants and radioprotectors. **Biochem Mol Biol Int.**, **40**: 1211–1219.

MIDDLETON E. y DRZEWIWCKI G. (1982).- Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophils. **Biochem Pharmacol.**, **31(1)**: 1449-1453.

MIDDLETON E.; DRZEWIWCKI G.; HRISHNARAO D. (1981).- Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. **J Immunol.**, **27(2)**: 546-550.

MIKO S.; YANAI T.; HASEGAWA H.; AKATA N.; KANAIWA-KUDO S.; MATSUMOTO T.; NODA Y.; OTSU H.; SATO F. (1998).- Concentration of metallothionin in mice livers after small dose of irradiation. **J Radiat Res.**, **39**: 239–242.

MOLTENI A.; MOULDER J.E.; COHEN E.F.; WARD W.F.; FISH B.L.; TAYLOR J.M.; WOLFE L.F.; MOLTENI L.B.; VENO P. (2000).- Control of radiation induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II type I receptor blocker. **Int J Radiat Biol.**, **76**: 523–532.

MORAIS, M. M.; BELARMINO, F. J. N.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. (1999).- A phase II study of ifosfamide, 5-fluorouracil and leucovorin induced hemorrhagic cystitis— comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. **Braz J Med Biol Res.**, **32**: 1211–1215.

MOREL I.; LESCOAT G.; COGREL P.; SERGENT O.; PASDECOUP N.; BRISSOT P.; CILLARD P.; CILLARD J. (1993).- Antioxidant and ironchelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem Pharmacol.**, **1**: 13-19.

MORITA, T.; HONMA, M, and MORIKAWA, K. (2012).- Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. **Mutat Res.**, **741(1-2):32-56**.

MOSMAN, T (1983). - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth.**, **65**, **55-63**.

MOULDER J.E. y FISH B.L. (1997).- Angiotensin converting enzyme inhibitor captopril does not prevent acute gastrointestinal radiation damage in the rat. **Radiat Oncol Investig.**, **5**: **50-53**.

MOULDER J.E., FISH B.L., COHEN E.F. (1998a).- Angiotensin II receptor antagonists in treatment and prevention of radiation nephropathy. **Int J Radiat Biol.**, **73**: **415-421**.

MOULDER J.E.; FISH B.L.; COHEN E.F. (1998b). - Brief pharmacological intervention in experimental radiation nephropathy. **Radiat Res.**, **150**: **535-541**.

MUNNE'-BOSCH, S.; SCHWARZ, K and ALEGRE, L (1999). - Response of abietane diterpenes to stress in *Rosmarinus officinalis* L.: New insights into the function of diterpenes in plants. **Free Radical Res** **31**: **107-112**.

MURATA R.; NISHIMURA Y.; HIRAOKA M.; ABE M.; SATOH M. (1995). - Manganese chloride treatment does not protect against acute radiation injury of skin or crypt cells. **Radiat Res.**, **143**: **316-319**.

MURRAY, D.; MILAS, L and MEYN, R. E (1988). - Radioprotection of mouse jejunum by WR-2721 and WR- 1065: effects on DNA strand-break induction and re-joining. **Radiat Res.**, **114**:**268-80**.

NAGANO J.; KONO S.; PRESTON D.L.; MORIWAKI H.; SHARP G.B.; KOYAMA K, MABUCHI K. (2000)- Bladder-cancer incidence in relation to vegetable and fruit consumption: a prospective study of atomic-bomb survivors. **Int J Cancer.**, **1**; **86(1):132-8**.

NAIR, C. K.; PARIDA, D. K and NOMURA, T (2001). -Radioprotectors in radiotherapy. **J Radiat Res.**, **42**: **21-37**.

NAVARRO J.L.; ALCARAZ M.; GÓMEZ A.; VICENTE V.; CANTERAS M. (2004a).- Ausencia de daño cromosómico y genotóxico inducido por la dosis de radiación administrada en las exploraciones gammagráficas. **Rev Esp Med Nucl.**, **23 (3)**: **174-82**.

NAVARRO J.L.; ALCARAZ M.; GÓMEZ A.; VICENTE V.; CANTERAS M. (2004b).- Actividad genotóxica de la terapia con I-131 en pacientes tratados por carcinoma de tiroides. **Oncología.**, **27 (1)**: **28-36**.

NETA R. (1988). -Role of cytokines in radiation protection. **Pharmacol Ther.**, **39**: **261-266**.

NETA R.; DOUCHES S.D.; OPPENHEIM J.J. (1986). -Interlukin I is a radioprotector. **J Immunol.**, **136**: 2483–2485

NOCTOR G.; VELJOVIC-JOVANOVIC S.; DRISCOLL S.; NOVITSKAYA L.; FOYER CH. (2002). - Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: a Predominant Role for Photorespiration?, **Annals of Botany.**, **89** (7): 841–850

OECD, 2004. *In Vitro* Micronucleus Test. Guideline 487. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OHGUCHI K.; AKAO Y.; NOZAWA Y. (2006)- Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. **Biosci Biotechnol Biochem.**, **70**(6):1499-501.

OIKAWA T.; FREEMAN M.; LOW W.; VAUGHAN D.E.; FOGO A. (1997).- Modulation of plasminogen activator inhibition in vivo: a new mechanism for the antifibrotic effect of renin angiotensin inhibition. **Kidney Int.** **51**: 164–172.

ORR J.S. (1984). - Cocepts, problems and the role of modifying agents in the relationship between recovery of cells' survival ability and mechanisms of repair of radiation lesions. *Br. J. Cancer.*, **49** (6): 1–6.

OZAKI Y.; YATOMI Y.; JINNAI Y.; KUME S. (1993). -Effects of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on platelet functions. Genistein attenuates thrombin-induced Ca²⁺ mobilization in human platelets by affecting poiyposphoinositide turnover. **Biochem Pharmacolol.**, **46**: 395-403.

PANICH, U.; ONKOKSOONG, T.; LIMSAENGURAI, S.; AKARASEREENONT, P and WONGKAJORNILP, A (2012). - UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: the protective effect of gallic acid. **J Photochem Photobiol.**, **108**:16–22.

PATT, H. M (1953).- Protective mechanisms in ionizing radiation injury. **Physiol Rev.**, **33**: 35-76.

PIERI C.; MARRA M; MORONI F.; RECCHIONI R., SELLI F.M. (1994). -Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci.**, **15**: 271–276.

PIERREFICHE G. y LABORIT H. (1995).- Oxygen free radicals, melatonin and aging. **Exp Gerontol.**, **30**: 213–227.

PINCEMAIL J.; DEBY C.; LION Y.; BRAGUET P.; HANS P.; DRIEN K., GOUTIER R. (1985).- Role of flavonoids in lipoperoxidation and radicalar reactions. In: Flavonoids and Bioflavonoids. VII Symposium Hungaro sobre flavonoides. 1985

PINCEMAIL, J.; DUPUIS, M.; NASR, C.; HANS, P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R and DEBY C (1989) Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. **Experientia.** **45**(8):708-712.

PLAPPERT U.; RADDATZ K.; ROTH S.; FLIEDNER T.M. (1995).- DNA-damage detection in man after radiation exposure –the comet assay- its possible application for human biomonitoring. **Stem cells**, **13** (1): 215-222.

PRABHAVATHI P.; ARUNA F.; SHEHLA K.; PADRAVATHI P.; KUMARI C.; KUSUMA C.; REDDY P.P. (1995).- Sister chromatid exchanges in nuclear fuel workers. **Mutat Res Letts**, **347**: 31-35.

PRADHAN D.S.; NAIR C.K.K.; SREENIVASAN A. (1973).- Radiation injury repair and sensitization of microorganisms. **Proc Ind Natl Sci Acad**. **39B**: 516-530.

PRASAD, K. N.; COLE, W. C and HAASE, G. M (2004).- Radiation protection in humans: extending the concept of as low as reasonably achievable (ALARA) from dose to biological damage. **Br J Radiol**, **77**: 97-99.

PRASAD, K. N.; COLE, W. C.; KUMAR, B and CHE PRASAD, K (2002). - Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy. **Cancer Treat Rev**, **28**:79-91.

PROSSER, J. S. ; MOQUET, J. E. ; LLOYD, D. C and EDWARDS, A. A (1988).- Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. **Mutat. Res**. **199**: 37-45.

PUJOL J.L.; GIBNEY D.J.; SU J.Q.; MAKSYMCIUK A.W.; JER J.R. (1993). - Immune response induced in small cell lung cancer by maintenance with interferon gamma. **J Natl Cancer Inst**, **85**: 1844-1850.

PULATOVA M.K., SHARYGIN V.L., TODOROV I.N. (1999).- The activation of ribonucleotide reductase in animal organs as the cellular response against the treatment with DNA damaging factors and the influence of radioprotectors on this effect. **Biochim Biophys Acta**, **1453**: 321-329.

RADFORD I. (1985). -The level of induced DNA double strand breaks correlates with cell killing after X-irradiation. **Int J Radiat Biol**, **48**: 45-54.

RAMALHO, A.; SUNJEVARIC, I and NATARAJAN A.T. (1988). Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-rays induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. **Mutat. Res**, **207**: 141-146.

RAMNATH N.; LO RUSSO P.; SIMON M.; MARTINO S. (1997).- Phase II evaluation of cisplatin and WR 2721 for refractory metastatic breast cancer. **Am J Clin Oncol**, **20**: 368-372

REAL A.; GUENECHEA G.; BUEREN J.A.; MAGANTO G. (1992). - Radioprotection mediated by the haemopoietic stimulation conferred by AM5: a protein-associated polysaccharide. **Int J Radiat Biol**, **62**: 65-72.

REDONDO, A.; ALCARAZ, M.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; GOMEZ-MORAGA, A., CANTERAS, M. (1999).- Efecto protector in vivo de compuestos polifenólicos naturales. XIII Congreso Español de Toxicología, Facultad de Medicina , 22-24 de septiembre del 1999, Granada, 52.

RENAN M.J. y DOWMAW P.I. (1989).- Increased radioresistance of tumour cells exposed to metallothioneine inducing agents. **Radiat Res.**, **120**: 442–455.

REVESZ L. (1985).- The role of endogenous thiols in intrinsic radioprotection. **Int J Radiat Biol.**, **47**: 361–368.

REVESZ L. y EDGREEN M. (1984). Glutathione dependent yield and repair of single strand DN breaks in irradiated cells. *Br. J. Cancer* 49 Suppl. 6: 55–60.

RICARDO da SILVA, J.M.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; CHEMINAT, A and MOUTOUNET, M (1991). - Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. **Phytochemistry.**, (30): 1259-1264.

RIEHL T.; COHEN S.; TESSNER T.; SCHOLEMANN S.; STENSON W.S. (2000).- Lipopolysaccharide is radioprotective in mouse intestine through a prostaglandin mediated mechanism. **Gastroenterology.**, **118**: 1106–1116.

ROBBINS R.C. (1976). -Regulatory action of phenylbenzo-Y-pyrone (PBP) derivatives on blood constituents affecting rheology in patients with coronary heart disease (CHD). **Int J Vit Nutr Res.**, **46**: 338-347.

ROIZIN TOWLE L., HALL E.J.; COSTELLO T. (1984).- Chemosensitization: Do thiols matter? **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, **10**: 1599–1602.

SAEZ-TORMO G.; OLIVA M.R.; MUÑIZ P.; VALLS V.; IRADI A.; RAMOS M.; CLIMENT J. (1994).- Oxidative stress and genetic damage. Health and Orange; Fundación Valenciana de Estudios Avanzados: Valencia, Spain, pp: 51-60.

SALAH, N.; MILLER, N. J.: PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G.P and RICE-EVANS, C. (1995). Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, **Arch. Biochem. Biophys.**, (2): 339-346.

SANCHEZ-CAMPILLO, M.; GABALDON, J. A.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; DEL BAÑO, M. J.; ALCARAZ, M.; VICENTE, V.; ALVAREZ, N and LOZANO, J. A (2009).- Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food Chem Toxicol.**, **47**: 386-392.

SARMA, L and KESAVAN, P.C (1993). - Protective effects of vitamins C and E against γ -ray-induced chromosomal damage in mouse. **Int J Radiol Biol.**, **63**: 759-764.

SATO K.; ICHIMASA M.; MIYAHARA K.; SHIOMI M.; NISHIMURA Y.; ICHIMASA Y. (1999).- Radioprotective effects of sodium tungstate on hematopoietic injury by exposure to ^{60}Co γ -rays in Wistar rats. **J Radiat Res.**, **40**: 101–113.

SATOH M.; MIURA N.; NAGANUMA A.; MATSUZAKI N.; KAWAMURA E.; IMURA N. (1989). -Prevention of adverse effects of gamma ray irradiation after metallothioneine induction by bismuth subnitrate in mice. **Eur J Canc Clin Oncol.**, **25**: 1729–1731.

SCAMBIA G.; RANELLETI F.O.; BENEDETTI-PACINI P.; DE VINCENZO R.; BONANNO G.; FERRANDINA G.; PIANTELLI M.; BUSSA S.; RUMI C. y CIANFRIGLIA M. (1994). -Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breastcancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. **Cancer Chemother Pharmacol.**, **34**: 459-464.

SCHEMELZER E.; BÖRNER H.; GRISEBACH H.; EBEL J.; HAHLBROCK K. (1984).- Phytoalexin synthesis in soybean (glicine max). Similar time courses of mRNA induction in hypocotyls infected whith a fungal pathogen and in cell cultures treated with fungal elicitor. **F.E.B.S. (Letter)** **172**: 59-63.

SCHMID W (1976). - The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Chemical Mutagens IV (Ed. Hollaender A.), Plenum Press, New York, pp: 31-53.

SCHOLES G. (1983).- Radiation effects on DNA: The Silvanus Thomson memorial lecture April 1982. **Br J Radiol.**; **56**: 221–231.

SCHUNCK C., JOHANNES T., VARGA D., LORCH T., PLESCH A. (2004).- New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and flurescence signals. **Cytogenetic Genome Res.**, **104** (1-4): 383-9.

SCHWARZ K and TERNES, W (1992). - Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung.**, **195**: 99-103.

SEED T.; KUMAR S.; WHITNALL M.; SRINIVASAN V.; SINGH V.; ELLIOTT T.; LANDAUER M.; MILLER A.; CHANG C.M.; INAL C.; DEEN J.; GEHLHAUS M.; JACKSON W 3RD.; HILYARD E.; PENDERGRASS J.; TOLES R.; VILLA V.; MINER V.; STEWART M.; BENJACK J.; DANILENKO D.; FARRELL C. (2002).- “New strategies for the prevention of radiation injury: possible implications for countering radiation hazards of long-term space travel.” **J Radiat Res.**, **43**: S239-44.

SEED TM. (2005).- “Radiation protectants: current status and future prospects.” **Health Phys.**, **89**: 531-45.

SHIMOI, K.; MASUDA, S.; FUROGORI, M.; ESAKI, S and KIANE, N (1996).- Radioprotective affect of antioxidative flavonoids in gamma ray irradiated mice. **Carcinogenesis.**, **15**: 2669-2672.

SHIMOKORIYAM M. (1975).- Interconversion of chalcones and flavanones of a pholoroglucinol–type structure. **J Am Chem Soc.**, **79**: 4199-4202.

SHINODA M. (1995). -Studies on chemical radioprotectors against X-irradiation used by soft X-ray accelerator. **Yakugaku Zasshi.**, **115**: 24–41.

SHUENG P.W.; HSU W.L.; JEN Y.M.; WU C.J.; LIU H.S. (1998).- Neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy should not be a standard approach for locally advanced cervical cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, **40**: 889–896.

SICHEL G.; CORSARO C.; SCALIA M.; Di BILIO A.J.; BONOMO R.(1991).- In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanin against O₂. **Free Radical Biol Med.**, **11**: 1-8.

SINGH N.P., GRAHAM M.M., SINGH V., KHAN A. (1995a). Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of gamma-rays. *Int J Radiat Biol.*, **68**: 563-569

SINGH S.P., ABRAHAM S., KESAVAN P.C. (1995b). In vivo radioprotection with garlic extract. **Mutat Res.**, **345**: 147-153.

SORIANO, J.M.; MONTORO, A. (2013)- Últimos avances en radioprotectores de origen natural. **Consejo de Seguridad Nuclear**, Publicaciones CNS. Madrid

STAPLETON A.E. y WALBOT V. (1994).- Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. **Plant Physiol.**, **105**: 881-889.

STEINER M.; PRIEL I.; GIAT J.; LEVY J.; SHARONI Y.; DANILENKO M. (2001) - Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. **Nutr Cancer.**, **41**(1-2):135-44.

STONE, H. B.; MOULDER, J. E.; COLEMAN, C. N.; ANG, K. K.; ANSCHER, M. S.; BARCELLOS-HOFF, M. H.; DYNAN, W. S.; FIKE, J. R.; GRDINA, D. J.; GREENBERGER, J. S.; HAUER-JENSEN, M.; HILL, R. P.; KOLESNICK, R. N.; MACVITTIE, T. J.; MARKS, C.; McBRIDE, W. H.; METTING, N.; PELLMAR, T.; PURUCKER, M.; ROBBINS, M. E.; SCHIESTL, R. H.; SEED, T. M.; TOMASZEWSKI, J. E.; TRAVIS, E. L.; WALLNER, P. E.; WOLPERT, M and ZAHAREVITZ, D (2004).- Models for evaluating agents intended for the prophylaxis, mitigation and treatment of radiation injuries. Report of an NCI Workshop, December 3-4, 2003. **Radiat Res.**, **162**: 711-728.

SZENT-GYORGYI A. (1938). -Methoden zur Herstellung von Citdn. **Physiol Chem.**, **255**: 128-131.

SZEPESI T. Y FLIEDNER T.M. (1994).- Evaluation of accidental acute irradiated persons with respect to therapeutic measures. **Izotoptechnika Diagnosztika.**, **37**: 5-15.

SZMANT, H. H (1975). - Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems, *Biological Actions of Dimethyl Sulfoxide*. Stanley W. Jacob and Robert Herschler eds. New York: New York Academy of Sciences. pp. 20-23.

TAN E.H.; WEE J.; ANG P.T.; FONG K.W.; LEONG S.S.; KHOO K.S.; TAN T.; LEE K.S.; ENG P.; HSU A.; TAN Y.K.; CHUA E.J.; ONG Y.Y. (1999).- Induction of chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy in stage III unresectable non-small cell lung cancer. **Acta Oncol.**, **38**: 1005-1009.

TANAKA K.; TCHAJUNUSOVA N.J.; TAKATSUJI T.; GUSEV BL.; SAKERBAEV A.K.; HOSHI M.; KAMADA N. (2000). - High incidence of micronuclei in

lymphocytes from residents of the area near the Semipalatinsk nuclear explosion test site. **J Radiat Res.**, **41**: 45-54.

TANNEHILL S.P. y MEHTA M.P. (1996).- Amifostine and radiation therapy: past, present and future. **Semin Oncol.**, **23(8)**: 69-77

TANNEHILL S.P.; MEHTA M.P.; LARSON M.; STORER B.; PELLET J.; KINSELLA T.J.; SCHILLER J.H. (1997).- Effect of amifostine on toxicities associated with sequential chemotherapy and radiation therapy for unresectable non small cell lung cancer. Results of a phase II trial. **J Clin Oncol.**, **15**: 2850-2857.

TERENCIO, M.C.; SANZ, M. J. and PAYA M (1991). - Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*. **J Ethnopharmacol.**, **(31)**: 109-114.

THOMAS, P.; WANG, Y. J.; ZHONG, J. H.; KOSARAJU, S.; O'CALLAGHAN, N. J.; ZHOU, X. F and FENECH, M (2009).- Grape seed polyphenols and curcumin reduce genomic instability events in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. **Mutat Res.**, **661**: 25-34.

THOMPSON WR, MEINWALD J., ANESHANSLEY D., EISNER T. (1972).- Flavonols, pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. **Science.**, **177**: 528-530.

TIMBERLAKE C.F. y BRIDLE P.(1975).- The Anthocyanins. En J.B. Harbone, Tj Mabry, H Mabry, eds, The Flavonoids. Chapman and Hall, London, pp: 214-266.

TORDERA M.; FERRANDIZ M.L., ALCARAZ M.J. (1994).- Influence of antiinflammatory flavonoids on granulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. **Z Naturforsch C.**, **49**: 235-240.

TOREL J.; CILLARD J. Y CILLARD P. (1986).- Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry.**, **2**: 383-385.

TRAVIS, E (1979).-Bioeffects of Radiation. In: Seeram E (ed.) Radiation Protection, Lippincott, Philadelphia, 73 -98.

TUSCHL H.; STEGER F. Y KOVAC R. (1995).- Occupational exposure and its effect on some immune parameters. **Health Phys.**, **68**: 59-66.

TZENG S.H.; KO W.C.; KO F.N.; TENG C.M. (1991). -Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thromb Res.**,**64**: 91-100.

UMA DEVI, P Y SHARMA, A. S (1990). - Mouse bone-marrow response to low doses of whole-body gamma irradiation: induction of micronuclei. **Int J Radiat Biol.**, **57(1)**:97-101.

UPADHYAY, S. N.; DWARAKANATH, B.S.; RAVINDRANATH, T and MATHEW T.L (2005). - Chemical Radioprotectors. **Def Sci J.**, **55 (4)**: 403-425.

UTSUMI H.; KODAMA S.; TANO K.; HASHIMOTO M.W.; WATANABE H. (1998).- Establishment and characterization of a hypocatalasemic mouse cell strain. **J Radiat Res.**, **39**: 165–174.

VALLES E.G.; DE CASTRO C.R.; CASTRO J.A. (1995).- Radioprotectors as late preventive agents against carbon tetra chloride induced liver necrosis: protection by 2-(3-aminopropylamino) ethyl phosphorothioic acid (WR 2721). **Exptl Molec Pathol.**, **63**: 101–109

VAN BUUL P.P.W.; VAN DUYN-GOEDHART A.; SANKARANARAYANAN K. (1999).- In vivo and in vitro radioprotective effects of prostaglandin E1 analogue misoprostol in DNA repair-proficient and-deficient rodent cell systems. **Radiat Res.**, **152**: 398–403.

VIJAYALAXMI and OBE G (2005).- Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation: A review and future research recommendations. **Bioelectromagnetics.**, **26**: 412-30.

VIJAYALAXMI R.J.R.; HERMAN T.S.; MELTZ. (1996).- Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. **Mutat Res.**, **371**: 221–228.

VISANJI, J. M.; THOMPSON, D. G and PADFIELD, P. J (2006). - Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. **Cancer Lett.**, **237(1)**:130-6.

WALDEN JR.T.L.; FARZANEH N.K. (1995).- Radioprotection by 16,16-dimethyl prostaglandin E2 is equally effective in male and female mice. **J Radiat Res.**, **36**: 1–7.

WALDEN T.L.; PATCHEN N.; SNYDER S.L. (1987).- 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 increases survival in mice following irradiation. **Radiat Res.**, **109**: 440–448.

WALDWORTH A.N. Y FAULDS D. (1992).- Hydroxyethylrutosides: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in venous insufficiency and relates disorders. **Drugs.**, **44**: 1013-1032.

WANG P.F. y ZHENG R.L. (1992).- Inhibition of the autoxidation of linoleic acids flavonoids in micelles. **Chem Phys Lipids.**, **63**: 37-40.

WARD W.F.; HOELLWARTH A.S.; TUTTLE R.D. (1983).- Collagen accumulation in irradiated rat lung: modification by D-pencillamine. **Radiology.**, **146**: 533–537

WARD W.F.; LIN P.J.P.; WONG P.S.; BEHNIA R.; JALALI N. (1993).- Radiation pneumonitis in rats and its modification by angiotensin converting enzyme inhibitor captopril evaluated by high resolution computed tomography. **Radiat Res.**, **135**: 81-87.

WASSERMAN T.H. (1994).- Radiotherapeutic studies with amifostine (Ethyol). **Semin Oncol.**; **21 (11)**: 21– 25.

- WEISS, J. F (1997).- Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. **Environ health perspect.**, **105** (6):1473-8.
- WEISS, J. F and LANDAUER, M. R (2000).- Radioprotection by antioxidants. **Ann N Y Acad Sci.**, **899**: 44-60.
- WILSON R.L. (1983).- Free radical repair mechanisms and the interaction of glutathione and vitamin C and E. In: Radioprotectors and anticarcinogens, Eds. O. F. Nygaard and M. G. Simic, pp. 1-23, Academic Press, New York.
- WUTTKE, K.; STREFFER, C and MÜLLER, W. U (1993). - Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. **Mut Res.**, **286**: 181-188.
- YANEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; CANTERAS, M and TERUEL, J. A (2004).- Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. **Nutr Cancer.**, **49**:191-199.
- YANG F.; WANG R.; ZHAO Y. (1998).- Radioprotective effect of E838 to hemopoietic system. **Zhongguo-Zhongliu-Linchuang.**, **25**: 832-833
- YESIL-CELIKTAS, O.; SEVIMLI, C.; BEDIR, E and VARDAR-SUKAN, F (2010), - Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. **Plant Foods Hum Nutr.**, **65**:158-163.
- YUHAS J.M. (1982).- Protective drugs in cancer therapy: Optimal clinical testing and future directions. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, **8**: 513-517.
- ZAFIROV, D.; BREDY-DOBREVA, G.; LITCHEV, V and PAPASOVA, M (1990).- Antiexudative and capillarytonic effects of procyanidines isolated from grape seeds (*V. vinifera*), **Acta Physiol Pharmacol Bulg.**, (16): 50-54.
- ZAPOROWSKA H. Y WASILEWSKI W. (1992).- Haematological results of vanadium intoxication in Wistar rats. **Comp Biochem Physiol.**, **101C**: 57-61.

IX. Anexos

El doctorando ha realizado las siguientes publicaciones científicas relacionadas con los diferentes aspectos y técnicas relacionadas en la presente memoria de Tesis Doctoral:

1. PUBLICACIONES INTERNACIONALES.

AUTORES/AS (p.o. de firma): M Alcaraz, D Armero, Y Martínez-Beneyto, J Castillo, O Benavente-García, H Fernandez, **M Alcaraz-Saura** and M Canteras.

TÍTULO: [Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels.](#)

REF. REVISTA/LIBRO: **Dentomaxillofacial Radiology (2011) 40:310–314**.Clave:A

PMID:21697157 [PubMed - indexed for MEDLINE]

F.I: 1,081 en 2011; Q3 DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE

AUTORES/AS (p.o. de firma): Alcaraz M, Olivares A, Achel DG, **Alcaraz-Saura M**.

TÍTULO: [Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines.](#)

REF. REVISTA/LIBRO: Anticancer Res. 2013 Aug;33(8):3217-24.PMID:23898082

F.I: 1,872 en 2013; Q3 ONCOLOGY

AUTORES/AS (p.o. de firma): Alcaraz M, Olivares A, Armero D, **Alcaraz-Saura M**, Achel D.

TÍTULO: [Zoledronic acid and radiation: toxicity, synergy or radiosensitization?](#)

REF. REVISTA/LIBRO: Clin Transl Oncol. 2013 Apr;15(4):300-6. doi: 10.1007/s12094-012-0917-9. Epub 2012 Jul 24.PMID:23443898

F.I: 1,600 en 2013; Q4 ONCOLOGY

AUTORES/AS (p.o. de firma): Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, **Alcaraz-Saura M**, Castillo J.

TÍTULO: [Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility.](#)

REF. REVISTA/LIBRO: Clin Transl Oncol. 2013 Sep;15(9):712-9. doi: 10.1007/s12094-012-0994-9. Epub 2013 Jan 29.PMID:23359182

F.I: 1,600 en 2013; Q4 ONCOLOGY

AUTORES/AS (p.o. de firma): Alcaraz M, Olmos E, **Alcaraz-Saura M**, Achel DG, Castillo J.

TÍTULO: [Effect of long-term 50 Hz magnetic field exposure on the micronucleated polychromatic erythrocytes of mice.](#)

REF. REVISTA/LIBRO: Electromagn Biol Med. 2014 ;33(1):51-7.tPMID:23781994

F.I: **1194 en 2014; Q3 BIOLOGY**

AUTORES/AS (p.o. de firma): Alcaraz M, **Alcaraz-Saura M**, Achel DG, Olivares A, López-Morata JA, Castillo J.

TÍTULO: [Radiosensitizing effect of rosmarinic acid in metastatic melanoma B16F10 cells.](#)

REF. REVISTA/LIBRO: Anticancer Res. 2014 Apr;34(4):1913-21. PMID: 24692726

F.I: **1,826 en 2014; Q4 ONCOLOGY**

AUTORES/AS (p.o. de firma): Alcaraz M, Velasco F, Martínez-Beneyto Y, Alcaraz-Saura M, Velasco E, Achel GD, Canteras M.

TÍTULO: [Evolution of diagnostic reference levels in Spanish intraoral radiology.](#)

REF. REVISTA/LIBRO: Radiat Prot Dosimetry. 2012 Aug;151(1):166-71. doi: 10.1093/rpd/ncr467. Epub 2012 Jan 20.PMID:22267271

F.I: **0,909 en 2012; Q2 NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY**

2. PUBLICACIONES NACIONALES.

AUTORES/AS (p.o. de firma): Alcaraz Baños, M., Chico Sánchez, P., Martínez Beneyto, Y., Armero Barranco, D., Meseguer Henarejos, A.B. y **Alcaraz Saura, M.**

TÍTULO: Tele-enseñanza a través de Internet: la protección radiológica en Ciencias de la Salud

REF. REVISTA/LIBRO: Revista Teoría de la Educación: Educación y Cultura en la Sociedad de la Información. Vol. 11, nº 2. Universidad de Salamanca, pp. 232-260. en Juanes Méndez, J.A. (Coord.) Avances tecnológicos digitales en metodologías de innovación docente en el campo de las Ciencias de la Salud en España. Clave:A

http://campus.usal.es/~revistas_trabajo/index.php/revistatesi/article/view/7079/7112

3. COMUNICACIONES Y PÓSTERS EN CONGRESOS INTERNACIONALES.

AUTORES/AS: Alcaraz, M; Castillo, J; Benavente-García, O; Armero, D.; **Alcaraz-Saura, Miguel**; Achel, Daniel; Vicente, Vicente y de las Heras, Manuel

TÍTULO: [Carnosic acid: a promising molecule for radiation protection](#)

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: *3rd International Symposium on Trace Elements and Health*,

PUBLICACIÓN: **Books of abstract: 203-204**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Murcia, May 24-27

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Alcaraz, M; Castillo, J; Benavente-García, O; **Alcaraz-Saura, Miguel**; Achel, Daniel; Vicente, Vicente y de las Heras, Manuel

TÍTULO: [Potassium apigenin: a promising radiation countermeasure](#)

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: 3rd International Symposium on Trace Elements and Health,
 PUBLICACIÓN: **Books of abstract: 201-202**
 LUGAR DE CELEBRACIÓN: Murcia.

4. COMUNICACIONES Y PÓSTERS EN CONGRESOS NACIONALES.

AUTORES/AS: Alcaraz M., Parra C., Velasco E., Velasco F., Armero D., Martínez-Beneyto Y, **Alcaraz-Saura M.** y Martínez García Cervantes A..

TÍTULO: **¿ES VERDAD QUE REDUCEN LA DOSIS DE RADIACIÓN ADMINISTRADA AL PACIENTE LAS PELÍCULAS DENTALES MÁS MODERNAS?**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: XVII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FÍSICA MÉDICA Y XII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PROTECCIÓN RADIOLÓGICA

PUBLICACIÓN. Libro de resúmenes p. 83

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante, España

AÑO: 2 al 5 de junio 2009

AUTORES/AS: Alcaraz M., Parra C., Velasco E., Velasco F., Armero A., Martínez-Beneyto Y., **Alcaraz-Saura M.**, Martínez-García-Cervantes A.

TÍTULO: **DIEZ AÑOS DESPUÉS DE LAS DIRECTIVAS EUROPEAS Y ESPAÑOLAS DE CONTROL DE CALIDAD EN RADIODIAGNÓSTICO DENTAL EN ESPAÑA**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: XVII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FÍSICA MÉDICA Y XII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PROTECCIÓN RADIOLÓGICA

PUBLICACIÓN. Libro de resúmenes p. 325

AÑO: 2 al 5 de junio 2009

AUTORES/AS: Velasco Hidalgo, F.; Velasco Hidalgo, E.; **Alcaraz-Saura, M.**; Martínez García-Cervantes, A.; Andreu- Gálvez, M.; Martínez-Beneyto, Y. y Alcaraz Baños, M

TÍTULO: **Niveles de dosis de referencia en la radiología dental española.**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: II Congreso Conjunto de las Sociedades Española de Protección Radiológica XIII) y de la Sociedad Española de Física Médica (XVIII)

PUBLICACIÓN: **Radioprotección 68 (17) 2011: 407**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Sevilla 10-13 de Mayo

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Montoya Navarro, I.; **Alcaraz Saura, M.**; Alcázar Fernández, MD.; Olmos Ortiz, E.; Montalbán León, F.; Sánchez Villalobos, JM y Alcaraz Baños, M

TÍTULO: **Efecto genotóxico inducido por un campo magnético de 200 microteslas: modelo experimental "in vivo"**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: *II Congreso Conjunto de las Sociedades Española de Protección Radiológica XIII)*
y de la Sociedad Española de Física Médica (XVIII)

PUBLICACIÓN: **Radioprotección 68 (17) 2011: 609**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Sevilla 10-13 de Mayo

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Alcaraz Baños, M.; Villena García, C.; Moreno Capdevila C.; Navarro Fernández, J.L.; **Alcaraz Saura, M.**; Achel, DG.; Claver Valderas, MA.; Olivares Rueda A. y Olmos Ortiz, E.

TÍTULO: **Estimacion del daño genotóxico en pacientes irradiados con (18 FDG) en tomografía por emisión de positrones**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: *II Congreso Conjunto de las Sociedades Española de Protección Radiológica XIII)*
y de la Sociedad Española de Física Médica (XVIII)

PUBLICACIÓN: **Radioprotección 68 (17) 2011: 409**

AUTORES/AS: **Alcaraz Saura, M.**; Martínez García-Cervantes, A.; Andreu-Gálvez, M.; Sánchez Villalobos, JM; Chico Sánchez, P. y Alcaraz Baños, M

TÍTULO: **La protección radiológica en los nuevos estudios de grado: curso de tele-enseñanza en ciencias de la salud**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: *II Congreso Conjunto de las Sociedades Española de Protección Radiológica (XIII)*
y de la Sociedad Española de Física Médica (XVIII)

PUBLICACIÓN: **Radioprotección 68 (17) 2011: 457**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Sevilla 10-13 de Mayo

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Alcaraz Baños, M.; Castillo Sánchez, J.; Benavente García, O.; **Alcaraz Saura, M.**; Achel, DG.; Vicente Ortega, V. y de las Heras González, M.

TÍTULO: **Apigenina potásica: una molécula prometedora en radioprotección.**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: *II Congreso Conjunto de las Sociedades Española de Protección Radiológica (XIII)*
y de la Sociedad Española de Física Médica (XVIII)

PUBLICACIÓN: **Radioprotección 68 (17) 2011: 396-397**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Sevilla 10-13 de Mayo

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Alcaraz Baños, M.; Castillo Sánchez, J.; Benavente García, O.; **Alcaraz Saura, M.**; Achel, DG.; Pérez Ángel, F. y Armero Barranco, D.

TÍTULO: **Genoprotección química y criterio ALARA: reduciendo también el daño biológico tan bajo como sea razonablemente posible.**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: *II Congreso Conjunto de las Sociedades Española de Protección Radiológica (XIII)*
y de la Sociedad Española de Física Médica (XVIII)

PUBLICACIÓN: **Radioprotección 68 (17) 2011: 394-395**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Sevilla 10-13 de Mayo

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Achel, GD; Olivares, A; Armero, D; **Alcaraz-Saura, M**; Olmos, E and Alcaraz, M

TÍTULO: **Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of zolendronic acid.**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: XIX Congreso Español de Toxicología

PUBLICACIÓN: **Rev. Toxicol. 2011; 28 (1):81-82**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Vigo, July 26-29

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Alcaraz, M; García-Cruz, E; Chiva, F; Armero, D; **Alcaraz-Saura, M** y Achel, GD

TÍTULO: **Efecto citotóxico de un adhesivo dental en las condiciones habituales de manipulación clínica.**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: XIX Congreso Español de Toxicología

PUBLICACIÓN: **Rev. Toxicol. 2011; 28 (1):83**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Vigo, July 26-29

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Martin-Gíl, R; Alcaraz, M; Armero, D; **Alcaraz-Saura, M**; Achel, GD y Quesada, S

TÍTULO: **Toxicidad de un anestésico: sevofluorano.**

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación

CONGRESO: XIX Congreso Español de Toxicología

PUBLICACIÓN: **Rev. Toxicol. 2011; 28 (1):84**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Vigo, July 26-29

AÑO: 2011

AUTORES/AS: Olivares, A; Achel, GD; Alcaraz, **M**; **Alcaraz-Saura, M** y Castillo J

TÍTULO: **Carnosic acid radioprotective effects against damage induced by ionizing radiation**

TIPO DE PARTICIPACION: comunicación

CONGRESO: XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica.

PUBLICACION: **REPORTS OF PRACTICAL ONCOLOGY AND RADIOTHERAPY, 18: 386-387, (2013)**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: VIGO, JULIO 18-21

AÑO: 2013

AUTORES/AS: Olivares, A; Alcaraz, M; Armero, D.; Achel, GD; y **Alcaraz-Saura, M**

TÍTULO: **Ibandronate cytotoxicity with zoledronic acid and ionizing radiation.**

TIPO DE PARTICIPACION: comunicación

CONGRESO: XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica.

PUBLICACION: **REPORTS OF PRACTICAL ONCOLOGY AND RADIOTHERAPY, 18: 388, (2013)**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: VIGO, JULIO 18-21

AÑO: 2013

AUTORES/AS: Olivares, A; Achel, GD; Alcaraz, M; **Alcaraz-Saura, M** y Castillo J
TÍTULO: **Paradoxical effect of rosmarinico acido n metastático melanoma B16F10 cells** .
TIPO DE PARTICIPACION: comunicación
CONGRESO: *XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica.*
PUBLICACION: **REPORTS OF PRACTICAL ONCOLOGY AND RADIOTHERAPY, 18: 388-389, (2013)**
LUGAR DE CELEBRACIÓN: VIGO, JULIO 18-21
AÑO: 2013

