

EFFECTO DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR EN EL EFECTO BYSTANDER INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE

Julia Torrecillas Sánchez, Ana María Mercado, Amparo Olivares Rueda y Miguel Alcaraz
Departamento de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia
julia.torrecillass@um.es, anamaria.mercado@um.es, amparo.o.r@um.es, mab@um.es

RESUMEN

Se ha estudiado las propiedades del ácido rosmarínico (AR), sustancia caracterizada por sus propiedades antioxidantes, en dos líneas celulares: células epiteliales normales de próstata humanas (PNT2), células de melanoma metastásico de ratón (B10F16) y sobre el efecto Bystander inducido por radiación ionizante (RIBE). Se han irradiado con diferentes dosis de rayos X (0-10 Gy), antes y después de la administración de ácido rosmarínico. Se ha determinado la supervivencia celular (SC) a través del ensayo del MTT. Los resultados muestran un descenso significativo de la SC en los cultivos irradiados y en las células receptoras del RIBE ($p < 0,001$). El AR aumenta la SC en las células radiosensibles PNT2 ($p < 0,001$); sin embargo, muestra un efecto radiosensibilizante en las células radiorresistentes B16F10 ($p < 0,001$); y, no presenta ningún efecto protector en las células receptoras RIBE. Así, los radicales libres radioinducidos no constituyen un factor importante en la inducción del efecto bystander.

INTRODUCCIÓN

La radiación ionizante (RI) en Medicina constituye una herramienta empleada en múltiples procedimientos diagnósticos y terapéuticos. Sin embargo, dependiendo de las dosis de RI administradas, los tejidos van a sufrir procesos de desnaturalización de proteínas, pudiendo aparecer lesiones tras un periodo de latencia que oscila entre horas y meses (1). El efecto Bystander inducido por Radiación Ionizante (RIBE) estudia el origen del daño biológico por parte de células que son expuestas directamente a la RI sobre células no irradiadas mediante señales biológicas, produciendo como resultado modificaciones funcionales o estructurales. El fundamento molecular de los RIBE aún no se ha dilucidado en su totalidad. Las principales hipótesis plantean que las células diana sufren un cambio en su estado redox (con reacciones de óxido-reducción que producen transferencias de electrones) generando señales que son recibidas por células que no son objetivo de la RI, y que se transmiten a través de comunicaciones intercelulares mediadas por gap (conexina 43) o a través de mecanismos de difusión. De esta manera, los RIBE parecen estar directamente

relacionados con las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen tras la irradiación de células diana, y que inician una cascada de señales intercelulares provocando alteraciones en las células próximas; entre las que podemos encontrar roturas de cadena doble de ADN (Figura 1) (2).

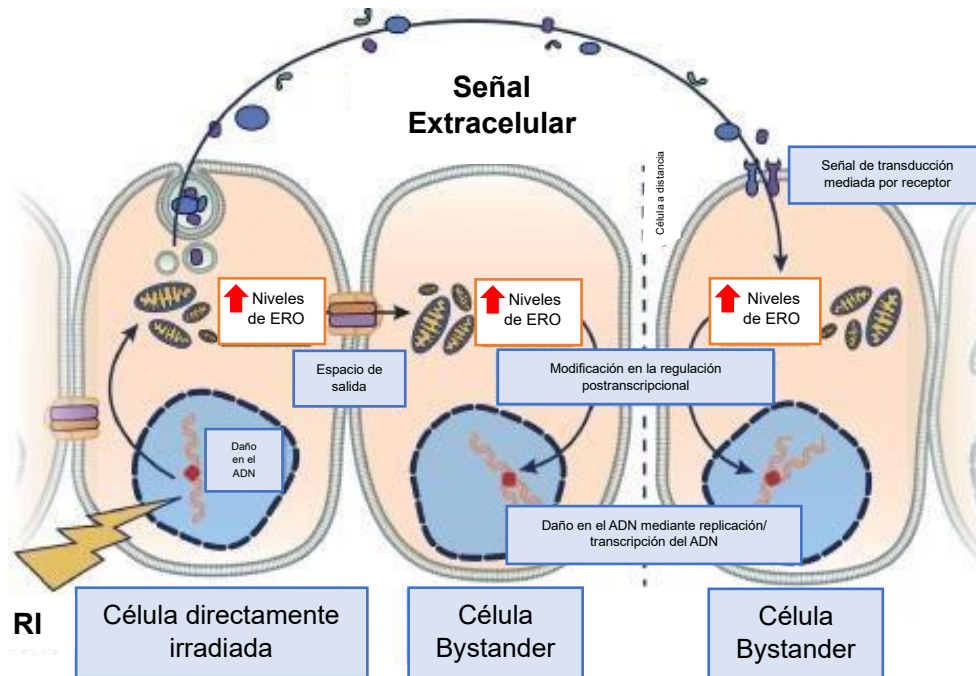


Figura 1. Mecanismo de acción del efecto Bystander inducido por Radiación Ionizante (RIBE)

Otra alteración, igualmente relevante, es la inducción a la apoptosis en células que no son propósito de la RI. El ciclo celular está regulado por las CDK (quinasas dependientes de ciclina), cuya actividad está regulada, a su vez, por ciclinas y otras quinasas. De manera que, el daño en el ADN por la RI, se origina por un fallo en los puntos de control de la señalización de las CDK en la progresión del ciclo celular; error que se produce por el retraso en la activación o supresión de la actividad de dichas quinasas. Al producirse la lesión que no permite la reparación del ADN, se inicia el proceso de apoptosis celular, cuya finalidad es optimizar la función del tejido, mediante la eliminación de células aberrantes, y eliminar el riesgo de cáncer que suponen las células inestables y alteradas. En su evolución intervienen múltiples factores de transcripción que participan en la vía intrínseca de la apoptosis (p53, proapoptóticos como los SMAC y el citocromo C) y la vía extrínseca (CD95/APO-1/FAS, TNF, TRAIL, caspasa-8) que generan estrés en las células dañadas por la radiación y que, finalmente, se traducirá como una señal de peligro para la supervivencia en las células vecinas receptoras del efecto Bys (3). Actualmente, no se puede afirmar si el RIBE es una respuesta que genera daños biológicos adversos y que, deberían evitarse o, si es el resultado de un intento de protección celular. No obstante, sí se puede afirmar que la irradiación de las células

produce que la p53 suprima la expresión de los agentes antioxidantes, como la enzima glutatión peroxidasa-1, que se producen de manera fisiológica, y que se generen ROS cuyo estrés oxidativo conduce hacia la apoptosis y hacia una mayor señalización de RIBE.

Debido a esta acción directa e indirecta de la RI, se hace necesario el desarrollo de sustancias radioprotectoras como el ácido rosmarínico (AR). El AR es una sustancia que se puede extraer de diversas plantas: romero (*Rosmarinus officinalis*, de la familia Lamiaceae) al que le debe su nombre y que fue la primera planta donde se aisló, la albahaca (*Perilla frutescens*) o la menta, (*Melissa officinalis*). A través de numerosos estudios (4), se han encontrado múltiples beneficios para la salud por sus capacidades antioxidante, antiinflamatoria (inhibe enzimas como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, la cascada del complemento y mediadores proinflamatorios) antiviral, antibacteriana, analgésica, inmunomoduladora y anticancerígena, entre otras. Estas características hacen que el AR sea un compuesto de interés farmacológico, puesto que el tratamiento con radioterapia acaba generando toxicidad en las células normales (5), y en este ámbito, los efectos proapoptóticos, antiproliferativos y antioxidantes del AR, pueden proteger al paciente de la capacidad mutagénica de la RI. Por estas razones, nos centraremos en la capacidad antioxidante del AR para inducir la producción de enzimas antioxidantes como el glutatión peroxidasa (6), caracterizada por reducir el estrés oxidativo derivado de la exposición a la RI, así como su capacidad eliminadora de radicales libres (7) como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). Para ello, someteremos a dos líneas celulares (células PNT2 de próstata y células B16F10 de melanoma) a RI con rayos X, y comprobaremos la radioprotección que puede ofrecernos el AR a través de la disponibilidad de glutatión y la reducción de ROS. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo será evaluar la capacidad radioprotectora del AR mediante la determinación de la supervivencia celular a través de un ensayo de supervivencia celular (MTT) frente al daño inducido por la exposición a rayos X en cultivos de células normales de próstata humana (PNT2) consideradas una estirpe celular de elevada radiosensibilidad frente al daño inducido por la RI en células de melanoma metastásico murino (B16F10) caracterizadas por una elevada radiorresistencia y, por último, producir un efecto bystander inducido por la RI (RIBE) para poder analizar el efecto del AR en estas células.

CONTENIDO

LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se seleccionaron dos líneas celulares diferentes según su grado de radiosensibilidad: células tradicionalmente consideradas radiosensibles (células epiteliales de próstata humana (PNT-2)) y células de melanoma B16F10 caracterizadas por su radiorresistencia. La línea

celular de epitelio prostático (PNT2) fue obtenida de La Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC, Salisbury, R.U.). Estas células fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 2mM de glutamina, estreptomina y penicilina (100µg/ml y 100 UI/ml, respectivamente). La línea celular de melanoma metastásico de ratón (B16F10) fue amablemente proporcionada por el Dr. V. Hearnig (NIH, Bethesda, MA, EE.UU.) y cultivada con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/F12K (1:1), (Sigma-Aldrich St. Louis; EE.UU.) suplementado con 10% de SBF, 4mM de glutamina, penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100µg/ml). Ambos cultivos se mantuvieron a 37°C, con una humedad relativa de 90 – 95% y una atmósfera de CO₂ de 5% (PNT-2) Y 7,5% (B16F10) en una incubadora Cytoperm. A lo largo del estudio, se realizaron pruebas para confirmar la ausencia de la especie bacteriana Mycoplasma.

Los grupos de estudio en los que se pretendía analizar la capacidad radioprotectora del AR, después de 48 horas de incubación, se les renovó el medio de cultivo con 200 µL de medio nuevo y se disolvió 25 µL de ácido rosmarínico en tampón fosfato salino (PBS) a una concentración de 20 y 40 µM en el medio de cultivo fresco.

IRRADIACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Se ha utilizado la unidad de control modelo, Smart 583 E, con un tubo de rayos X modelo Smart 200 E de la marca YXLON Internacional AS, Copenhague, Dinamarca. Este equipo está ubicado en el Servicio de Radioprotección y Residuo, SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación), de la Universidad de Murcia. Las características de las exposiciones radiológicas fueron las siguientes: 200 kV, 4.5 mA, tasa de dosis de 1.3 cGy/s a una DFO: 35 cm y dosis total de 10 Gy para el análisis del MTT. La dosis de radiación fue continuamente controlada dentro de la cabina de rayos X mediante un dosímetro universal UNIDOS® con cámara de ionización Farme® TW30010 (PTW-Freiburg, Freiburg, Alemania) y la dosis de radiación final se confirmó usando dosímetros de termoluminiscencia (TLDs) (GR-200; Conqueror Electronics Technology Co Ltd., Shenzhen, China).

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT

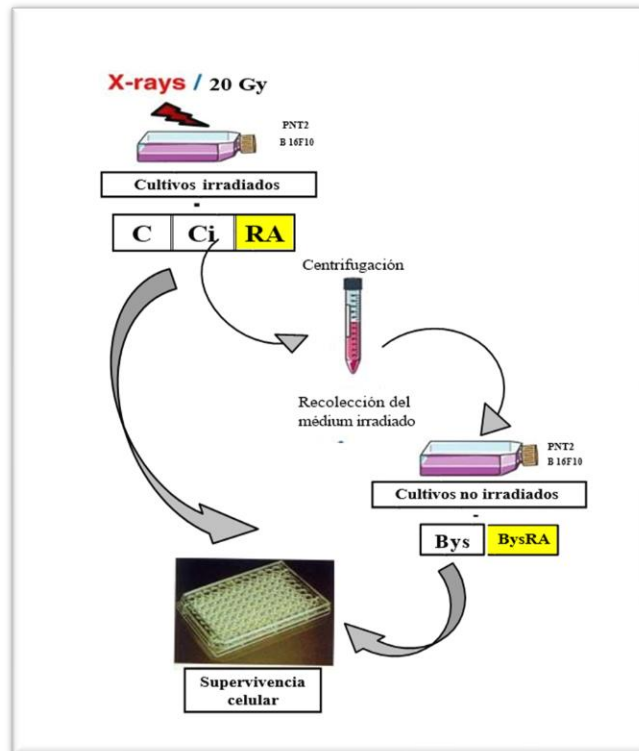
Después de 24h de incubación, los grupos experimentales de ambas líneas celulares en lo que se estudiaba el efecto del AR, se les añadió dos concentraciones diferentes de esta sustancia (20 y 40 µM) y 15 minutos después, se procedió a la irradiación con diferentes dosis de rayos X (0, 4, 6, 8 y 10 Gy). Finalmente, se incubaron las muestras durante 24 y/o 48 horas para evaluar la radioprotección o citoprotección producidas mediante el ensayo de viabilidad celular.

El ensayo de MTT se realizó según la técnica descrita por Carmichael et al. (8) y Alley et al. (9). En primer lugar, se centrifugaron las placas a 1000 r. p. m. durante 10 minutos para poder eliminar el medio de los cultivos celulares y se reemplazó el medio eliminado con 200 μ l de medio fresco suplementado con SBF en cada pocillo. Se añadieron 50 μ l de MTT (8 mg/ml) en cada pocillo y se usó una estufa a 37°C y un 5% de CO₂ para incubar durante 4 horas. Una vez se concluyó este periodo de tiempo, se repitió la centrifugación con el fin de eliminar el medio y el MTT que no se haya metabolizado. Por último, se añadió DMSO (100 μ l) para que se solubilice el formazan que se produjo por las células, se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y con un espectrofotómetro Multiskan MCC/340P con un sistema de doble longitud de onda (de 560 y de 690 nm) se realizó la lectura.

PRODUCCIÓN DEL EFECTO BYSTANDER INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE (RIBE)

Con el fin de desarrollar el efecto Bystander en las líneas celulares objeto de estudio, utilizamos el protocolo de "transferencia del medio de cultivo celular" desde células irradiadas a células no expuestas a RI. Para este protocolo, las células PNT2 y B16F10 fueron sembradas hasta su confluencia. Seguidamente, antes de iniciar la exposición a rayos X, se renovó el medio de cultivo en todos los grupos estudiados (células no irradiadas sin AR, células no irradiadas con AR, células irradiadas sin AR, y células irradiadas con AR); 4 horas después de la irradiación se recolectó este medio de cultivo, en donde se deberían de encontrar los factores que pueden inducir efectos Bys inducidos por la RI. Dicho medio se centrifugó a 200 G y se transfirió a placas de 96 pocillos que contenían células PNT2 y B16F10 receptoras que ya estaban en confluencia. En el "grupo BysAR" se habían añadido 25 μ L de una solución 25 μ M de AR disuelta en PBS (Figura 2). Las células Bys se mantuvieron en cultivo con este medio durante 48 h y se analizaron de igual forma que los ensayos MTT utilizados para el estudio del efecto directo inducido por los rayos X.

Figura 2. Protocolo de estudio con la producción del efecto Bystander inducido por RI (RIBE)



Con motivo de establecer la viabilidad celular, se comparó la absorbancia en las muestras tratadas frente a la absorbancia en los controles no tratados. De manera que:

$$\text{Viabilidad celular} = (\text{absorbancia del cultivo celular tratado} / \text{de absorbancia control}) \times 100$$

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

Finalmente, para calcular la radioprotección obtenida al tratar a los cultivos celulares con ácido rosmarínico, utilizamos la fórmula del Factor de Protección:

$$\text{Factor de Protección} = ((\text{Mic} - \text{MiRA}) / \text{Mic}) \times 100$$

En donde: Mic es el % de mortalidad de los controles irradiados y MiRA es el % de mortalidad de los cultivos tratados con AR.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se realizó en la Cátedra de Bioestadística del Departamento de Ciencias Sociosanitarias de la Universidad de Murcia. Consistió en un análisis de varianza de medidas repetidas con el fin de comparar los porcentajes de supervivencia celular en los cultivos con las diferentes concentraciones de sustancias y complementado con contraste un contraste de igualdad de pares con el método M.D.S. (Mínima Diferencia Significativa). Todos los análisis han sido realizados transformando logarítmicamente los datos para poder ajustarnos a las condiciones del ANOVA.

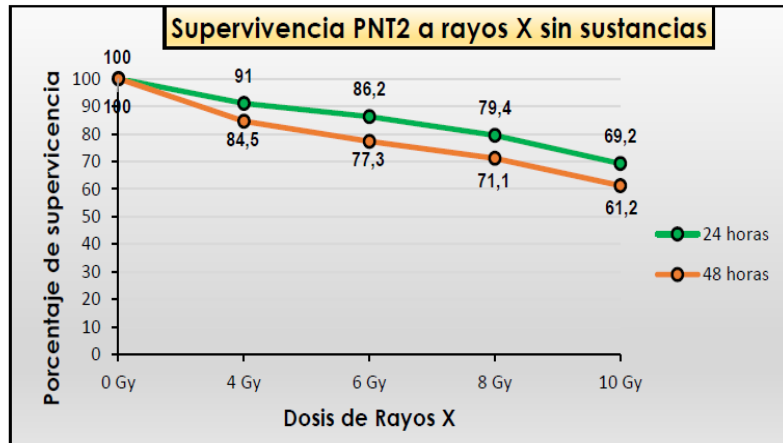
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS EN LÍNEA CELULAR PNT2

Supervivencia celular en cultivos control tras la exposición a R.I.

Las células se expusieron a diferentes dosis de rayos X (0, 4, 6, 8 y 10 Gy) y se incubaron los cultivos celulares durante dos períodos de tiempos: 24h y 48h. De esta forma, se comprobó que a mayor dosis de rayos X y a mayor tiempo de incubación tras la exposición a RI, fue menor la supervivencia de las células. En relación a esto, se observó que, en las células sometidas a una dosis de 10 Gy, la proporción de células supervivientes disminuyó de forma estadísticamente significativa un 30,8% (a las 24 horas de la exposición) y un 38,8% (a las 48 horas) ($p < 0,001$) (Gráfica 1).

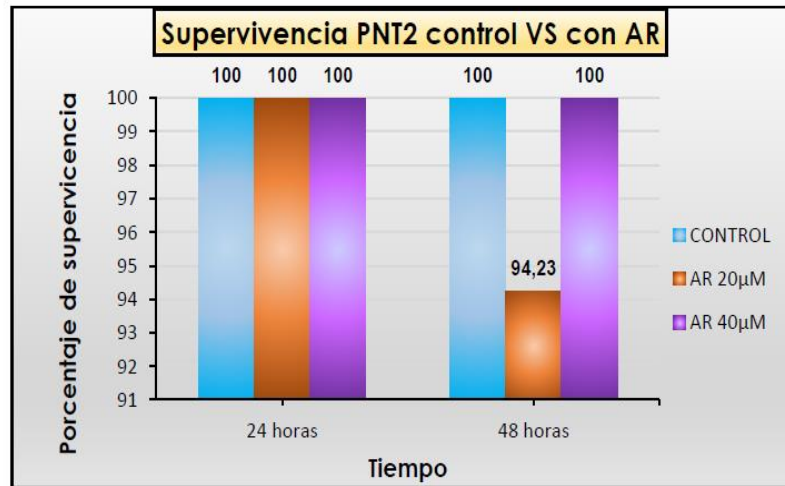
Gráfica 1. Curvas de supervivencia de cultivos celulares PNT2 sin sustancias a rayos X ($p < 0,001$) tras incubación de 24 y 48 horas.



Supervivencia celular en cultivos celulares tratados con AR

Se trataron los cultivos celulares PNT2 con 25 μ l de soluciones de 20 y 40 μ M de ácido rosmarínico y se incubaron durante dos periodos de tiempo: 24 y 48 horas. Así, a las 24 horas de incubación, no se apreció una disminución en la supervivencia de las células PNT2 con respecto a los cultivos control sin ácido rosmarínico. Sin embargo, a las 48 horas sí se observó una disminución del 5,77% de la supervivencia en los cultivos tratados con 20 μ M de ácido rosmarínico, mientras que en los cultivos tratados con 40 μ M de ácido rosmarínico no hubo cambios respecto a los cultivos controles (Gráfica 2). Estos resultados muestran una ausencia de toxicidad del AR sobre las células PNT2 tratadas en las concentraciones utilizadas y en los períodos de estudio seleccionados.

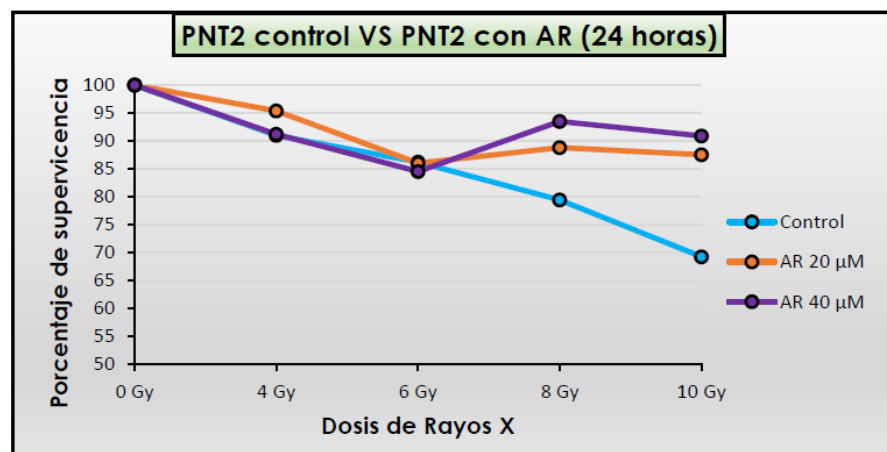
Gráfica 2.
Supervivencia celular tras la administración en cultivos celulares PNT2 de soluciones de 20 μM y 40 μM de AR tras incubación de 24 y 48 horas.



Supervivencia celular en cultivos tratados con AR e irradiados con R.I.

Tras administrar a los cultivos celulares las soluciones de ácido rosmarínico, se irradiaron con las mismas dosis de rayos X que las células controles, y se incubaron durante los dos periodos de incubación estudiados: 24 y 48 horas. Así, se obtuvieron resultados de mayor supervivencia al tratar a las células PNT2 con ácido rosmarínico respecto a los controles irradiados sin dicha sustancia. De esta forma, en la dosis de radiación más alta (10 Gy) y la solución más alta de AR (40 μM), se comprobó que la supervivencia celular fue un 21,7% superior respecto a las células control irradiadas (en los cultivos incubados durante 24 horas después de la irradiación). Estos resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular tras la administración de AR en comparación con los cultivos celulares controles irradiados ($p < 0,001$) lo que expresaría la capacidad radioprotectora del AR sobre las células PNT2 irradiadas con rayos X, (Gráfica 3).

Gráfica 3. Curvas de supervivencia de cultivos PNT2 controles Vs tratados con AR (20 μM y 40 μM), a diferentes dosis de rayos X, después de 24 horas de incubación tras la irradiación ($p < 0,001$).

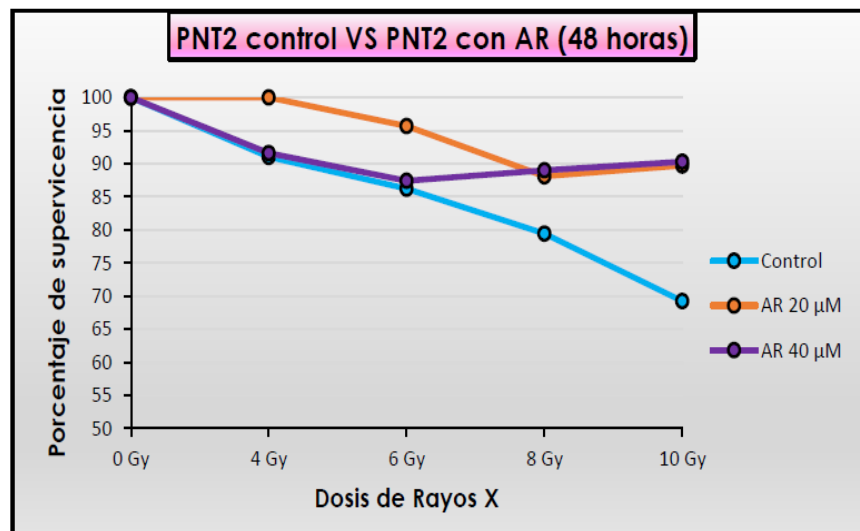


A las 24 horas de incubación tras la irradiación:

El Factor de Protección determinado para los cultivos tratados con ácido rosmarínico durante 24 horas y expuestos a la dosis más alta de radiación (10 Gy) fue del 59,4% para las células tratadas con AR de 20 μM , y del 70,4% en las células tratadas con AR de 40 μM .

De igual forma, durante el periodo de incubación celular de 48 horas tras la irradiación, en la dosis de radiación más alta (10 Gy) y en la solución más alta de AR (40 μM), la supervivencia celular fue un 29,1% superior a los cultivos de células de control irradiados. En ambas concentraciones, se mostró un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en comparación con las células de control irradiadas ($p < 0,001$), (Gráfica 4).

Gráfica 4. Curvas de supervivencia de cultivos PNT2 controles Vs tratados con AR (20 μM y 40 μM), a diferentes dosis de rayos X, evaluados después de 48 horas de incubación tras la irradiación ($p < 0,001$).



A las 48 horas de incubación tras la irradiación:

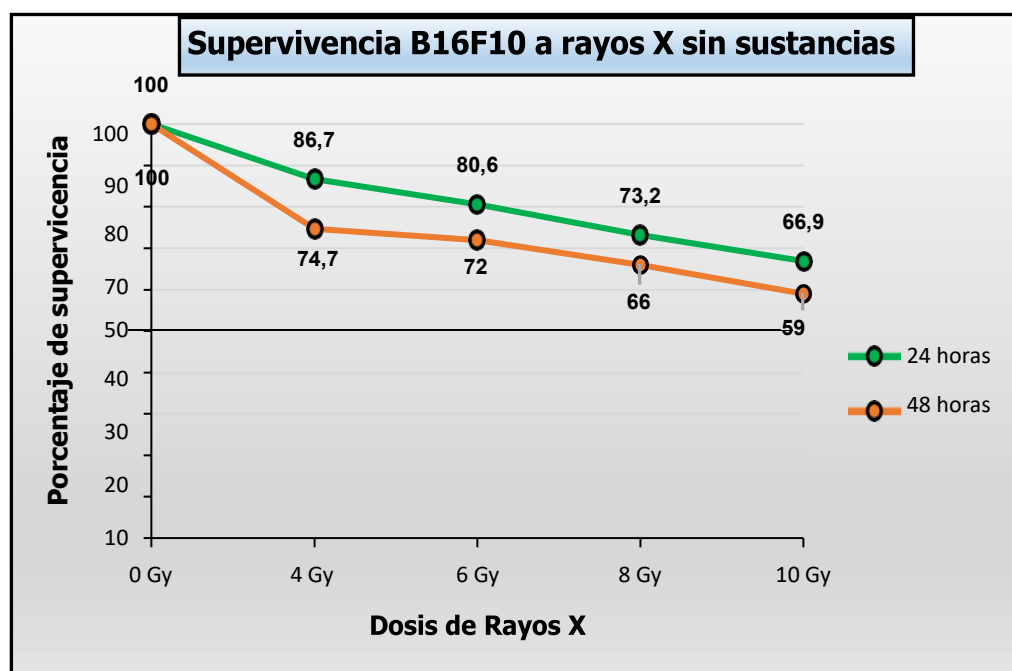
El Factor de Protección determinado para los cultivos tratados con ácido rosmarínico durante 48 horas y expuestos a la dosis más alta de radiación (10 Gy) fue del 73,4% para las células tratadas con AR de 20 μM , y del 75% en las células tratadas con AR de 40 μM con una $p > 0,001$, lo que expresaría la capacidad radioprotectora del AR sobre las células PNT2 irradiadas.

RESULTADOS EN LÍNEA CELULAR B16F10

Supervivencia celular en cultivos control tras la exposición a R.I.

Primero, se comprobó la supervivencia celular de las células B16F10 sin tratar con ninguna sustancia. Para ello las sometimos a diferentes dosis de rayos X (0, 4, 6, 8 y 10 Gy) y

se incubaron los cultivos celulares durante dos períodos de tiempos: 24h y 48h. De esta forma, se comprobó que a mayor dosis de rayos X y a mayor tiempo de incubación tras la exposición RI, menor fue la supervivencia de las células. En relación a esto, se vio que en las células sometidas a una dosis de 10 Gy, la proporción de células supervivientes disminuyó de forma estadísticamente significativa un 33,1% (a las 24 horas de la exposición) y un 41% (a las 48 horas) ($p < 0,001$) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Curvas de supervivencia de cultivos celulares B16F10 sin sustancias a rayos X ($p < 0,001$) tras incubación de 24 y 48 horas.

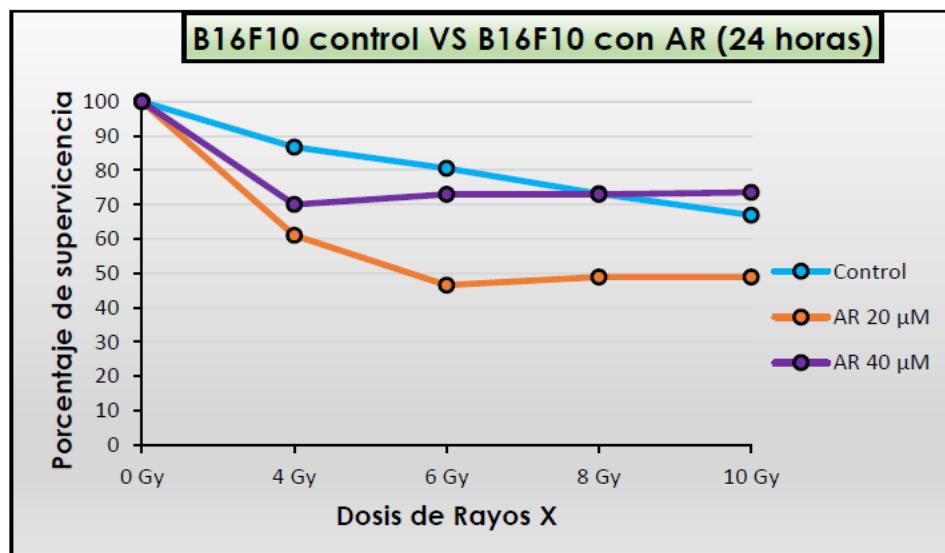
Supervivencia celular en cultivos celulares tratados con AR

La administración de AR a los cultivos celulares de células B16F10 controles, que no se han irradiado, no produjo una disminución significativa de la supervivencia celular en los cultivos tratados mostrando una ausencia de toxicidad del AR sobre las células en las concentraciones ensayadas y durante los dos períodos de incubación estudiados (24h y 48h).

Supervivencia celular en cultivos tratados con AR e irradiados con R.I.

Tras administrar las disoluciones de AR a las células B16F10, se irradió con las mismas dosis de rayos X que a los cultivos de células controles, y se incubó durante dos períodos de tiempo diferentes: 24h y 48h. Sin embargo, la adición de AR no protegió a las células de melanoma de la R.I. Así, después de la incubación durante 24 horas y fijándonos en la mayor dosis de radiación que se administró (10 Gy), la supervivencia celular disminuyó en un 18% en las células tratadas con una disolución de 20 μM con respecto a los cultivos

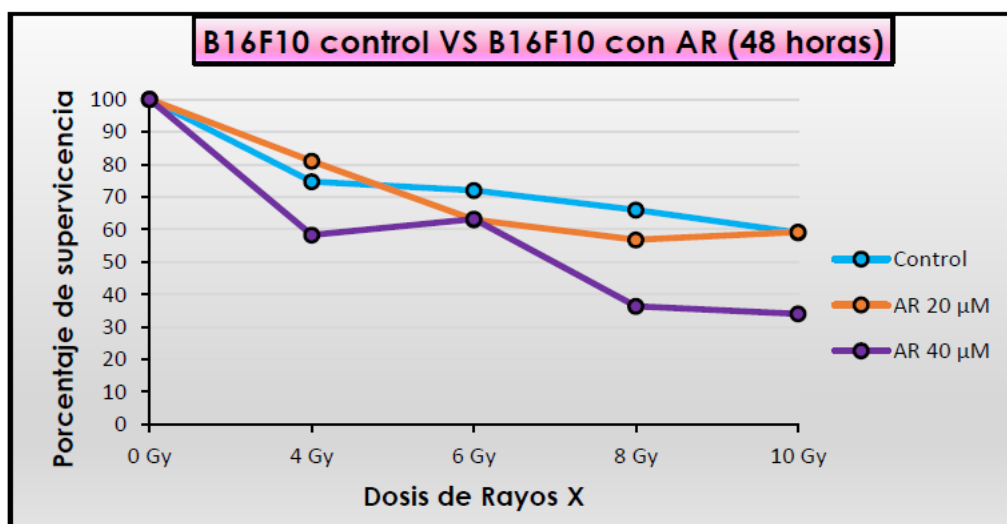
controles, mientras que aumentó en un 6,6% en las células tratadas con la solución de 40 μM . De este modo, aunque no hubo diferencias significativas cuando comparamos los porcentajes de supervivencia celular con los cultivos controles irradiados, sí que obtuvimos un resultado inesperado de efecto radiosensibilizador de la solución de 20 μM de AR sobre la línea celular B16F10 ($p < 0,001$) (Gráfica 6).



Gráfica 6. Curvas de supervivencia de cultivos B16F10 controles Vs tratados con AR (20 μM y 40 μM), adiferentes dosis de rayos X, evaluados después de 24 horas de incubación tras la irradiación ($p < 0,001$).

De manera que, a las 24 horas de incubación tras la irradiación: El Factor de Protección para los cultivos de células B16F10 tratados con AR y expuestos a la dosis más alta de radiación (10 Gy) fue cero (0%) para la solución de 20 μM (no tiene capacidad protectora contra la radiación X), y de 19,9% para la solución de 40 μM .

Posteriormente, se determinaron los resultados tras 48 horas de incubación: la supervivencia celular para la máxima radiación de 10 Gy y para la solución de 20 μM de AR mostró un incremento del 0,2% comparado con los cultivos controles que, por el contrario, con la solución de 40 μM disminuyó un 25% respecto a los cultivos controles. Así, según estos resultados no se obtuvo ningún efecto radioprotector, sino que, por el contrario, se apreció un efecto radiosensibilizador estadísticamente significativo de la disolución de 40 μM de AR en las células de melanoma B16F10 tratadas e irradiadas ($p < 0,001$) que expresaría un efecto radiosensibilizante del AR en las células B16F10 irradiadas con rayos X, (Gráfica 7).



Gráfica 7. Curvas de supervivencia de cultivos B16F10 controles Vs tratados con AR (20 µM y 40 µM), a diferentes dosis de rayos X, evaluados después de 48 horas de incubación tras la irradiación (p<0,001).

A las 48 horas de incubación tras la irradiación:

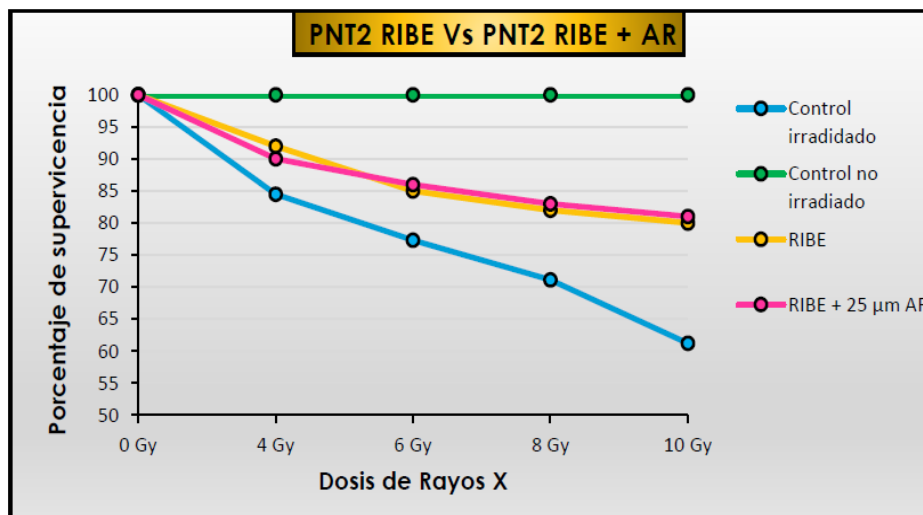
El Factor de Protección para los cultivos tratados con AR y expuestos a la dosis más alta de radiación (10 Gy) fue de 0,48% para la solución de 20 µM y de cero (0%) para la solución de 40 µM mostrando así la ausencia de cualquier efecto radioprotector del AR sobre estas células.

RESULTADOS EN CULTIVOS CELULARES PNT2 Y B16F10 CON EFECTO BYSTANDER (RIBE)

Porcentaje de supervivencia celular RIBE en PNT2 con AR

Se expusieron células de cultivo PNT2 sin irradiar (RIBE) a un medio compuesto por células PNT2 irradiadas con rayos X incubadas en un período de 48 horas. De la misma manera se procedió con células PNT2 sin irradiar tratadas con una concentración de 25 µM de AR (RIBE + 25 µM de AR). Ambos cultivos se incubaron durante 48 horas. Así, se pudo comprobar el efecto RIBE producido y analizar si el AR tiene la capacidad de proteger del efecto Bystander. Nuestros resultados mostraron que el efecto RIBE producía una disminución estadísticamente significativa (p<0,001) de la supervivencia celular de PNT2 respecto a los cultivos controles de un 20% para la mayor dosis de radiación (10 Gy); sin embargo, el AR no mostró capacidad radioprotectora puesto que no modificó la supervivencia celular respecto a los resultados de los cultivos sometidos al RIBE (p<0,001), (Gráfica 8).

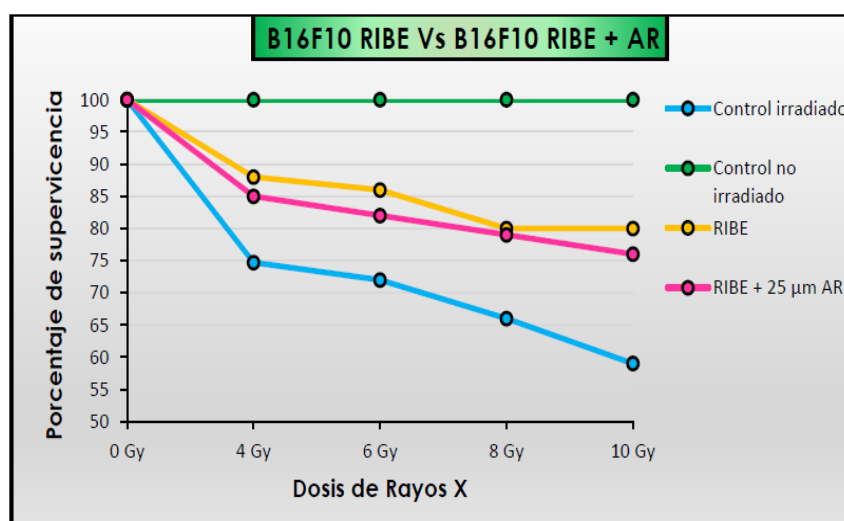
Gráfica 8. Curvas de supervivencia celular de cultivos PNT2 RIBE sin AR Vs PNT2 RIBE tratados con 25 μ M de AR.



Porcentaje de supervivencia celular RIBE en B16F10 con AR

También expusimos a células de cultivo B16F10 sin irradiar (RIBE) a un medio compuesto por células B16F10 irradiadas con rayos X incubadas en un período de 48 horas. Seguidamente, se hizo lo mismo con células B16F10 sin irradiar tratadas con una concentración de 25 μ M de AR (RIBE + 25 μ M AR). Ambos cultivos se incubaron durante 48 horas. De esta forma, se pudo comprobar el efecto RIBE producido y analizar si el AR tiene la propiedad de proteger del efecto Bystander. Nuestros resultados expusieron resultados similares que en el cultivo celular PNT2: el efecto RIBE produce una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,001$) de la supervivencia celular respecto a los cultivos controles de un 20% para la mayor dosis de radiación (10 Gy), pero el AR no tiene capacidad radioprotectora al no mejorar la supervivencia celular respecto a los resultados de los cultivos expuestos al RIBE ($p < 0,001$) (Tabla VIII), (Gráfica 9).

Gráfica 9. Curvas de supervivencia celular de cultivos B16F10 RIBE sin AR Vs B16F10 RIBE tratados con 25 μ M de AR.



En nuestro estudio, se ha experimentado con el AR, una sustancia con amplia evidencia de su capacidad de genoprotección y radioprotección. Diferentes estudios describen esta característica antioxidante del AR (disminuyen ROS radioinducidos y aumentan la disponibilidad del glutatión). Los trabajos de Dickey y cols, sobre el efecto de esta sustancia en ratas, describieron una disminución del estrés oxidativo en el hígado (10) y en el riñón (11) al comparar los resultados con cultivos celulares controles. Dentro del contexto de la R.I ionizante, un estudio que sometió a rayos gamma a muestras de sangre periférica heparinizada obtenida de dos mujeres donantes jóvenes y sanas no fumadoras (12), tratadas con AR antes de la irradiación y estudiadas a través de un ensayo de micronúcleos sobre linfocitos humanos; los resultados obtenidos fueron similares a los recogidos en nuestro trabajo, mostrando efectos radioprotectores con actividad antimutagénica. Por otro lado, un estudio previo de Alcaraz et al. (2019) (13) también intentó analizar la capacidad antioxidante y antimutagénica del AR a través de un estudio de micronúcleos, pero en este caso, irradiando las muestras (sangre de dos mujeres jóvenes y sanas) con rayos X; se documentó una reducción del daño genotóxico de la radiación ionizante de un 58% al utilizar AR, lo que supone una reducción significativa del daño genotóxico que producen los rayos X.

Los datos obtenidos en este estudio sobre la supervivencia celular de las dos líneas empeladas (PNT2 y B16F10) al administrarles AR, nos permite afirmar la capacidad radioprotectora del ácido rosmarínico que se ha observado en estudios similares. Sin embargo, en la línea B16F10 no hemos encontrado este efecto radioprotector, sino que se evidenció un efecto radiosensibilizador paradójico del AR con una disminución significativa de la supervivencia celular. Este efecto paradójico sólo descrito en las células de melanoma B16F10 se podría explicar mediante el conocimiento de la disponibilidad de glutatión intracelular en las células de melanoma, y es que, durante el proceso de la melanogénesis, se consume dicho glutatión para que la feomelanina pueda formarse. Así, en el estudio de Olivares et al. (6) se describe que, aunque no se ha encontrado bibliografía sobre los efectos del AR en la melanogénesis, sí que hay referencias sobre el ácido cafeico (y el AR es un dímero de este ácido) en las cuales se demuestra que es capaz de aumentar la melanogénesis y, por lo tanto, puede llevar al agotamiento intracelular de glutatión y con ello a su depleción y consecuente aumento de ROS producidos por la RI en las células de melanoma B16F10 (14); esto podría producir la disminución de la supervivencia celular; lo que podría ser utilizado en una nueva línea de tratamiento contra el melanoma.

En cuanto a nuestro objetivo de evidenciar que el AR también tiene efecto radioprotector en las células Bys, hemos podido determinar que el AR no tiene esta capacidad radioprotectora aunque sí la tenga en las células directamente expuestas a RI. Esto podría deberse a que los radicales libres que son generados por la RI participan significativamente en la formación de señales en las células

que están directamente expuestas a los rayos X, pero que, en cambio, estos radicales libres radioinducidos no debentener una implicación relevante en las señales que reciben las células bys o receptoras de las células irradiadas, en concordancia a lo previamente mencionado por Harada et al., (15). Sin embargo, también podría explicarse por las propias características del AR, ya que aún con su potente capacidad antioxidante frente a la cascada de radicales libres radioinducidos inmediatamente tras la exposición a la RI, no es capaz de prevenir los eventos más tardíos producidos en la cascada de reacciones posteriores en la peroxidación lipídica que dan lugar a radicales lipoperóxido que se producen cuando se liberan cantidades masivas de ROS tras la exposición a RI, como se ha puesto de manifiesto en estudios previos de nuestro grupo de investigación en donde se describe la capacidad de secuestro de radicales hidroxilo y anión superóxido pero no de radicales lipoperóxido del AR (7).

CONCLUSIONES

El AR presenta una importante capacidad radioprotectora al elevar la supervivencia celular de las células PNT2 irradiadas con rayos X que se atribuye fundamentalmente a su capacidad antioxidante eliminadora de radicales libres radioinducidos; mientras que muestra una capacidad radiosensibilizante al disminuir la supervivencia celular de las células B16F10 irradiadas que se atribuye, fundamentalmente, a su capacidad de promover la utilización del glutatión intracelular hacia la melanogénesis e impidiendo su utilización en la eliminación de radicales libres radioinducidos. Se ha demostrado el efecto bystander inducido por la RI (RIBE) mediante la disminución significativa de la supervivencia celular en las células receptoras al ser expuestas sólo al medio de cultivo obtenido de células directamente irradiadas con rayos X. Sin embargo, el AR no muestra capacidad protectora en las células receptoras del efecto RIBE en las células estudiadas (PNT2 y B16F10), posiblemente, porque la disminución de la supervivencia celular no está producida de forma significativa por los radicales libres radioinducidos en las células expuestas directamente a la RI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Badel AE, Rico-Mesa JS, Gaviria MC, Arango-Isaza D, Hernández Chica CA. Radiación ionizante: revisión de tema y recomendaciones para la práctica. *Rev Colomb Cardiol.* 2018; 25(3):222-229.
2. Klammer H, Mladenov E, Li F, Iliakis G. Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status. *Cancer Lett.* 2015; 356(1):58-71.
3. Hitl M, Kladar N, Gavarić N, Božin B. Rosmarinic Acid—Human Pharmacokinetics and Health Benefits. *Planta Med.* 2021; 87(04):273-282.

4. Noor S, Mohammad T, Rub MA, Raza A, Azum N, Yadav DK, et al. Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid. *Arch Pharm Res.* 2022; 45(4):205-228.
5. Olivares A, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Alcaraz M. Effect of Rosmarinic Acid and Ionizing Radiation on Glutathione in Melanoma B16F10 Cells: A Translational Opportunity. *Antioxidants.* 2020; 9(12):1-13.
6. Alcaraz M, Acevedo C, Castillo J, Benavente-García O, Armero D, Vicente V, et al. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol.* 2009; 82(979):605-609.
7. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987; 47(4):936-942.
8. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 1988; 48(3):589-601.
9. Oğuz A, Büyük A, Ekinçi A, Alabalık U, Türkoğlu A, Tuncer MC, et al. Investigation of antioxidant effects of rosmarinic acid on liver, lung and kidney in rats: a biochemical and histopathological study. *Folia Morphol.* 2020; 79(2):288-295.
10. Xiang Y, Ji M, Wu L, Lv L, Liang Q, Deng R, et al. Rosmarinic Acid Prevents Cisplatin-Induced Liver and Kidney Injury by Inhibiting Inflammatory Responses and Enhancing Total Antioxidant Capacity, Thereby Activating the Nrf2 Signaling Pathway. *Molecules.* 2022; 27(22):1-18.
11. Del Baño MJ, Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Martín-Gil R, Acevedo C, et al. Radioprotective–Antimutagenic Effects of Rosemary Phenolics against Chromosomal Damage Induced in Human Lymphocytes by γ -rays. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(6):2064-2068.
12. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernández H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2011; 40(5):310-314.
13. Kudugunti SK, Vad NM, Ekogbo E, Moridani MY. Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. *Invest New Drugs.* 2011; 29(1):52-62.
14. Harada T, Kashino G, Suzuki K, Matsuda N, Kodama S, Watanabe M. Different involvement of radical species in irradiated and bystander cells. *Int J Radiat Biol.* 2008; 84(10):809-814.