

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

Marina Andreu Gálvez<sup>1,2</sup>, Amparo Olivares<sup>2</sup>, Miguel Alcaraz Baños<sup>2</sup>.

1. Servicio Otorrinolaringología, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia, España.

2. Departamento de Radiobiología y Medicina Física, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, España.

E-mail address: maandreg@gmail.com (Marina Andreu Gálvez).

## RESUMEN

El ácido carnósico (AC) es un diterpeno fenólico derivado del romero caracterizado por su elevada actividad antioxidante. Este estudio pretende evaluar la capacidad radioprotectora del AC en células expuestas directamente a rayos X (RX) y en células espectadoras que reciben las señales de células irradiadas con rayos X, conocidas como células bystander (bys). La capacidad genoprotectora se evalúa mediante ensayos de genotoxicidad (test de micronúcleos *in vivo* e *in vitro*). La capacidad radioprotectora mediante ensayos de supervivencia celular (MTT, clonogénico *in vitro*, apoptosis y de determinación de glutatión intracelular), comparando células radiosensibles (epitelio prostático humano normal, PNT2) con células radorresistentes (melanoma metastásico murino, B16F10). El AC presenta una capacidad genoprotectora en células expuestas a RX ( $p < 0,001$ ) y en células RIBE ( $p < 0,01$ ). En células PNT2, consigue un 97% de supervivencia celular, eliminando el 67% de la muerte celular inducida por la radiación ( $p < 0,001$ ), disminuyendo la apoptosis ( $p < 0,001$ ) y aumentando la relación GSH/GSSG ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, en las células B16F10 disminuye la supervivencia celular en un 32%, aumentando la muerte celular en un 200% ( $p < 0,001$ ), y en un 100% ( $p < 0,001$ ) en las células bys ( $p < 0,01$ ). Además, incrementa la apoptosis celular ( $p < 0,001$ ) y disminuye la relación GSH/GSSG ( $p < 0,01$ ), expresando un efecto paradójico radiosensibilizador en estas células.

## INTRODUCCIÓN

El ácido carnósico (AC) (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>), es un diterpeno fenólico presente en especies vegetales de la familia de las lamiáceas (*Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*). Es un compuesto liposoluble caracterizado por su elevada capacidad antioxidante, y se utiliza en muchas aplicaciones industriales, como la alimentación, la cosmética, la salud y la nutrición. A pesar de su potencial económico, se han realizado pocos estudios sobre sus características de absorción, transporte, metabolismo y distribución tisular, que siguen siendo poco conocidas<sup>12</sup>.

Se ha demostrado que el AC posee importantes capacidades radioprotectoras frente al daño celular inducido por la radiación ionizante. Se ha observado que el AC disminuye los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos por la radiación ionizante <sup>3-5</sup> e incluso por la radiación ultravioleta <sup>6</sup> cuando se administra en diferentes líneas celulares. Esta capacidad radioprotectora del AC se ha atribuido a su capacidad antioxidante, mediada por su capacidad para eliminar los radicales libres inducidos por la acción de las radiaciones ionizantes cuando interactúa directamente con las células irradiadas (teoría del "blanco") <sup>5-8</sup>. Sin embargo, no hemos encontrado referencias previas que describan este efecto radioprotector en células receptoras del efecto bystander inducido por la radiación (RIBE) o que el AC pueda mostrar un efecto radiosensibilizador paradójico en determinadas líneas celulares.

Se sabe que el melanoma presenta la tasa de mortalidad más elevada entre los pacientes con cáncer de piel <sup>9</sup>. Su incidencia es marcadamente alta entre el grupo étnico blanco. En Estados Unidos, la tasa de incidencia del melanoma entre la población blanca es mucho mayor que entre la población hispana y la población negra (5 y 19 veces mayor, respectivamente) <sup>10</sup>. Por ello, es de suma importancia desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la supervivencia de los pacientes afectados <sup>11,12</sup>. Además, se trata de un cáncer agresivo con alta resistencia al tratamiento con radiaciones ionizantes y quimioterapia <sup>13</sup>. La línea celular de melanoma B16F10 es una línea celular metastásica de ratón que se utiliza frecuentemente como modelo de investigación de melanomas <sup>13,14</sup>.

En este trabajo, evaluamos las capacidades genoprotectoras y citoprotectoras del CA frente a las lesiones inducidas por la radiación ionizante (RI) cuando actúa directamente sobre las células irradiadas (teoría del "blanco") e indirectamente sobre las células distantes (efecto bystander inducido por la radiación, (RIBE)). Además, examinamos específicamente la capacidad radioprotectora del AC sobre las células normales, que paradójicamente se transforma en un efecto radiosensibilizador en las células del melanoma. Quizás el análisis de estos efectos opuestos pueda ayudar a esclarecer los mecanismos responsables de la protección de las células sanas mientras se lesionan significativamente las células neoplásicas, consiguiendo así una estrategia de tratamiento deseada para los pacientes con cáncer sometidos a radioterapia.

## **OBJETIVOS**

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

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

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

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

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

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

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización de este estudio hemos diseñado el siguiente protocolo general, adaptado en cada una de las técnicas. Para evaluar el efecto diana, es decir, el daño directo producido por los rayos X, irradiamos animales/cultivos celulares y hacemos 4 grupos de comparación: controles (C), controles irradiados (Ci, efecto directo RI), controles + AC (CA, descartar toxicidad AC) y controles irradiados + AC (CAi, evaluar efecto del AC frente al daño directo de la RI). Por otro lado, para estudiar el efecto bystander (EB), es decir, el daño producido por señales inducidas por la radiación ionizante en animales o células receptoras, extraemos suero o medio de los animales/cultivos que hemos irradiado, y se lo administramos a los animales o cultivos que no han recibido radiación. En este caso hemos realizado 3 grupos de comparación: los controles bystander (Bys, animales/cultivos tratados con suero/medio

procedente de animales/cultivos no irradiados), grupos bystander irradiado (Bysi, animales/cultivos tratados con medio/suero procedente de animales/cultivos irradiados) y el grupo BysCA (efecto bystander + AC).

Hemo utilizado 8 técnicas, 3 para evaluar la genotoxicidad utilizando ratones Swiss y muestras de sangre humana: ensayo de micronúcleos (MN) in vitro en linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis, ensayo de MN in vivo: MN en médula ósea de roedor y MN in vivo mediante citometría de flujo; y 4 para evaluar la supervivencia celular: test del MTT, ensayo clonogénico, test de cuantificación de anexina V y test del glutati6n. Para investigar la supervivencia celular utilizamos dos líneas celulares con diferente grado de radioresistencia a la radiaci6n ionizante: células epiteliales de próstata humana PNT2, considerada tradicionalmente radiosensible, y la línea celular de melanoma metastásico murino B16F10, una línea celular altamente radioresistente.

Todos los procedimientos utilizados para la manipulaci6n de muestras humanas fueron aprobados por el Comité de Bioseguridad Experimental de la Universidad de Murcia (ID: 472/2021). Todos los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigaci6n de la Universidad de Murcia (CECA: 510/2018) y por el Gobierno de la Comunidad Autónoma de la Regi6n de Murcia en Espa±a (Nº A13211208).

## **EVALUACI6N DEL EFECTO ANTIGENOT6XICO.**

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

#### **Ensayo de micronúcleos en médula ósea de rat6n (MNPCEs).**

El ensayo de micronúcleos in vivo en médula ósea de rat6n se realiz6 segun la técnica descrita previamente por Schmid <sup>15</sup>. Tras 24 h de exposici6n a 50cGy de rayos X, los animales fueron sacrificados por dislocaci6n cervical, se extrajeron las células de médula ósea localizadas del fémur y se realizaron preparaciones microscópicas. Tres especialistas evaluaron el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) entre 1000 PCE por rat6n en un estudio doble ciego. Para descartar la toxicidad inducida por la AC, se evalu6 en cada animal el número de eritrocitos normocromáticos, el total de eritrocitos y la proporci6n entre eritrocitos policromatófilos y normocromáticos.

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

El análisis de citometría de flujo para reticulocitos micronucleados (MNRET) se realiz6 siguiendo la técnica descrita previamente por Balmus et al. <sup>16</sup>. Resumidamente, tras 48 h de la

exposición a 2 Gy de rayos X, se recogieron muestras de sangre por punción intracardiaca de cada animal. Las células se centrifugaron y transfirieron 20 µL de cada muestra a pocillos de placas de 96 pocillos. Posteriormente se añadió la solución de CD71-FITC/RNasa y tras su procesamiento y centrifugado se añadió 1 µL de yoduro de propidio (PI) a cada pocillo de la placa. El análisis por citometría de flujo se realizó utilizando un FACS Fortessa con la opción de muestreador de alto rendimiento de Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). Se analizaron aproximadamente 190.000 células por ratón. La frecuencia de reticulocitos micronucleados (MN-RET) se calculó mediante la siguiente fórmula:  $MN-RET (\%) = (MN-RET/RET + MN-RET) \times 100$ .

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

### **Ensayo de micronúcleos en linfocitos con bloqueo citocinético con citocalasina B (MNCB).**

Para el ensayo de MN in vitro, utilizamos linfocitos humanos irradiados procedentes sangre venosa obtenida de tres donantes jóvenes sanos. Las muestras de sangre heparinizada se expusieron a los rayos X y se realizó el ensayo de MN bloqueados por citocalasina B (CBMN) descrito por Fenech y Morley <sup>17</sup> y adaptado por el Organismo Internacional de Energía Atómica. Las muestras se cultivaron y se expusieron a irradiación X y al ensayo de micronúcleos en bloque con citocalasina B (CBMN). En los grupos tratados con AC, se añadieron veinte microlitros (20 µL) de una concentración de 25 µM de solución de AC a 2 mL de sangre. La frecuencia de MN en células bloqueadas por citocalasina-B (CB) se determinó analizando al menos 3000 CB en cada uno de los grupos estudiados y expresando sus valores en MN/500 CB. Los portaobjetos se digitalizaron y fueron estudiadas por tres especialistas para confirmar las imágenes dudosas de CBMN. Todos los experimentos se repitieron seis veces.

## **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICITOTÓXICO.**

### **Ensayo de citotoxicidad MTT.**

Siguiendo la técnica descrita por Charmichael et al. <sup>18</sup>, brevemente, los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C y 95% de humedad relativa y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. El AC se administró añadiendo 25 µL a cada pocillo de una concentración de 25 µM inmediatamente antes de la exposición a rayos X durante 15 min. Posteriormente se añadió MTT y se procedió a la lectura de absorbancias a las 24 y 48 h para cuantificar la supervivencia celular.

### **Ensayo de apoptosis con Anexina V.**

Para la determinación de la apoptosis celular mediante citometría de flujo, se utilizó el kit Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog nos. V13241) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, España, Madrid), que permite medir la apoptosis temprana mediante la detección de la expresión de fosfatidilserina (PS) y la permeabilidad de la membrana. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células tratadas se lavaron una vez con solución salina fría tamponada con fosfato (PBS) y se cosecharon. Tras centrifugar y resuspender las células, se añadieron 5 µL de anexina V Alexa Fluor® 488 (componente A) seguidos de la adición de 1 µL de 100 µg/mL de PI a cada 100 µL de suspensión celular. Por último realizamos medición de fluorescencia.

### **Ensayo GSH.**

Se utilizó el ensayo GSH/GSSG-Glo™ (Promega, Madison, MI, EE.UU.) para determinar y cuantificar los niveles de glutatión total (GSH + GSSG), glutatión reducido (GSSG) y la relación GSH/GSSG en células PNT2 y B16F10 sometidas a las diferentes condiciones experimentales tres horas después de la exposición a 20 Gy de rayos X. El método se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, brevemente, se sembraron con medio y células en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran. A continuación, las células se trataron con 25 µl de solución de AC. Se evaluaron las densidades celulares y se realizaron correcciones mediante el ensayo de Bradford <sup>19</sup>. Las células se desprendieron del sustrato por tripsinización y se midió su intensidad de fluorescencia. Todos los experimentos se repitieron seis veces.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

No se dispone de referencias sobre los efectos AC contra la genotoxicidad producida por el efecto bystander inducido por radiación (RIBE).

### **Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón (MNPCEs).**

Para el grupo irradiado (Ci), hemos determinado un aumento en la frecuencia de aparición de MN en comparación con los animales control (C) ( $p < 0,001$ ), lo que expresa el daño genotóxico inducido por los rayos X. Sin embargo, cuando se administra AC a los animales antes de la exposición a los rayos X (CAi), disminuye la frecuencia de MN ( $p < 0,001$ ) comparación con los animales irradiados (Ci). El grupo tratado con AC e irradiado (CAi)

muestra un Factor de Protección (FP) del  $79,9 \pm 3,4\%$ , lo que expresa su capacidad genoprotectora frente al daño inducido por los rayos X (fig. 1).

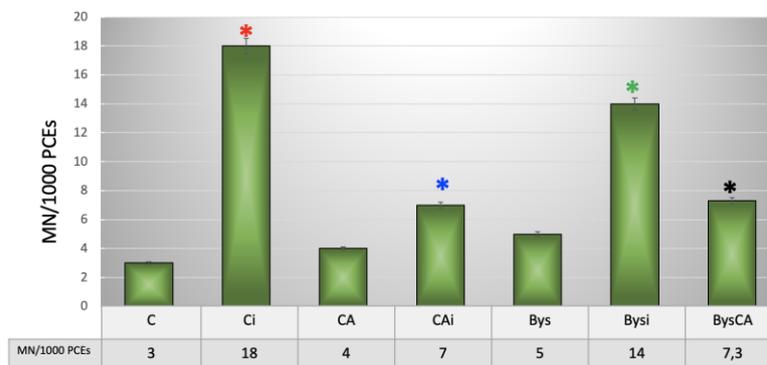


Figura 1. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) en médula ósea de ratón.

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

En los animales expuestos a 2 Gy de rayos X (Ci) hemos constatado un aumento en la frecuencia de MN en comparación con los animales control (C), ( $p < 0,001$ ), lo que expresa el daño genotóxico inducido por los rayos X. La administración de AC pre-exposición (CAi) produce una disminución en la frecuencia de MN ( $p < 0,001$ ) en comparación con los animales irradiados (Ci), lo que expresa la capacidad genoprotectora del AC frente la radiación ionizante. El grupo tratado con AC e irradiado (CAi) mostró un FP de  $73,2 \pm 3,12\%$ , lo que refleja la capacidad genoprotectora de la AC frente al daño inducido por los rayos X. En los grupos bystander la administración previa de AC (BysCA) produce una disminución en la frecuencia de MN esperada, aunque algo menor que en los grupos irradiados, poniendo de manifiesto el efecto genoprotector en el EB (figura 2).

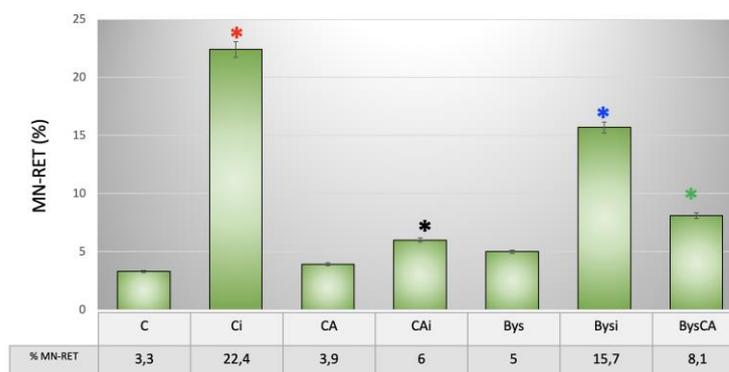


Figura 2. Frecuencia de reticulocitos en sangre determinada por citometría de flujo 48h después de la exposición a radiación ionizante (% MNRET).

### Ensayo de micronúcleos in vitro (CBMN).

La exposición de los animales a 2 Gy de rayos X (Ci) produjo un aumento en la frecuencia de MN ( $p < 0,001$ ), lo que expresa el daño genotóxico inducido por los rayos X. La administración de AC pre-exposición a los rayos X (CAi) produce una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) de MN en comparación con los animales irradiados (Ci). El grupo tratado con AC e irradiado (CAi) mostró un FP de  $41,9 \pm 3,12\%$ , expresando su capacidad genoprotectora frente al daño inducido por los rayos X (fig. 3).

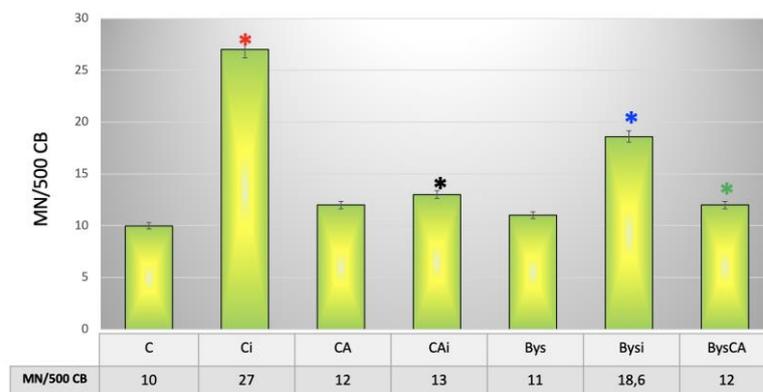


Figura 3. Frecuencia de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos con bloqueo citocinético

La administración intraperitoneal de suero de animales irradiados con rayos X (Bysi) produce un aumento de MN ( $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo tratado con suero de animales no irradiados (Bys), lo que expresa la capacidad genotóxica del suero de animales irradiados. Sin embargo, hemos determinado que la administración intraperitoneal de AC antes de la administración de suero de animales irradiados (BysCA) produce una reducción en la frecuencia de MN ( $p < 0,01$ ) en comparación con los animales irradiados y no tratados (Bysi). Esto expresa la capacidad genoprotectora de la AC, con un FP del  $35,5 \pm 2,5\%$ . Frecuencia de aparición de MN en orden ascendente:  $C \approx Bys \approx CA < CAi \approx BysCA \approx CAi < Bysi < Ci$  ( $p < 0,001$ ) (fig. 3). Nuestros resultados muestran una reducción significativa en la frecuencia de aparición de MN, lo que expresa una capacidad genoprotectora frente a este daño genotóxico inducido en las células receptoras. La homogeneidad de los resultados obtenidos, tanto *in vivo* como *in vitro*, en este estudio nos permitió determinar la capacidad genoprotectora del AC. Esto pone de manifiesto el efecto genoprotector mostrado en células expuestas directamente a la radiación y en células receptoras bystander (RIBE).

#### **Ensayo de citotoxicidad. Ensayo MTT.**

En ambas líneas celulares la supervivencia celular es inversamente proporcional a la dosis de radiación recibida y al tiempo de incubación (fig. 4).

Estos resultados son concordantes con resultados obtenidos en otros estudios previamente por Alcaraz et al. <sup>820820</sup> en ambas líneas celulares.

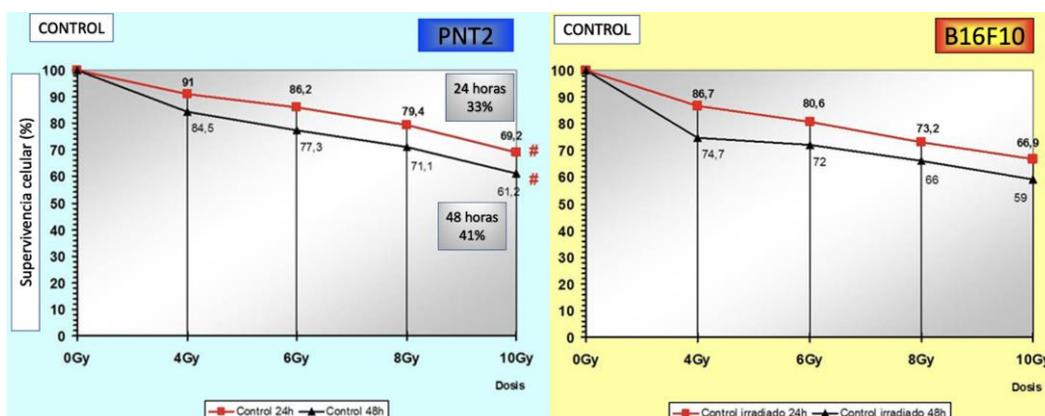


Figura 4. Curvas de supervivencia celular PNT2 y B16F10 a las 24 y 48 h de radiación con distintas dosis.

### Células PNT2

No hemos encontrado en la literatura referencias sobre el efecto del AC en las células de próstata. En las células PNT2, la exposición a 20 Gy de rayos X (Ci) induce una disminución de la supervivencia celular ( $p < 0,001$ ), retratando la capacidad citotóxica de los rayos X. La administración de AC a cultivos celulares PNT2 pre- irradiación (CAi) produce un aumento de la supervivencia celular ( $p < 0,001$ ) con respecto al grupo Ci, lo que demuestra la capacidad citoprotectora del AC frente al daño inducido por los rayos X. En estas células se estableció un FP del  $97 \pm 1,1\%$ , lo que expresa la capacidad radioprotectora del AC, eliminando el 67% de la muerte celular inducida por la radiación ( $p < 0,001$ ) (fig. 5).

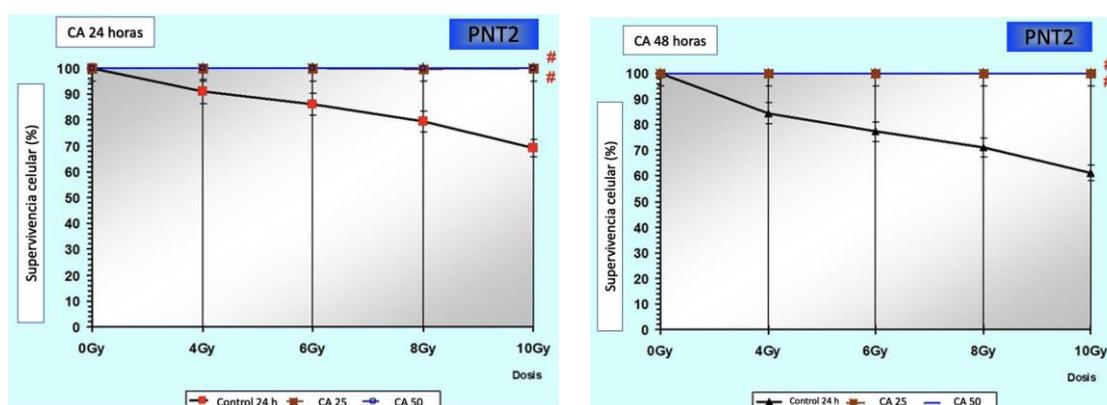


Figura 5. Curvas de supervivencia celular de los cultivos PNT2 tratadas con AC a las 24 y 48 h.

En las células PNT2 receptoras del RIBE, el grupo tratado con medio procedente de cultivos celulares irradiados con 2 Gy (Bysi) mostró una disminución de la supervivencia celular

( $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo control (C), lo que muestra la citotoxicidad inducida por el medio de cultivo irradiado. Sin embargo, la administración de AC (BysCA) no mostró diferencias en la supervivencia celular (falta de efecto del AC en EB), lo que sugiere mecanismos de daño celular diferentes a los radicales libres en el EB (fig. 6).

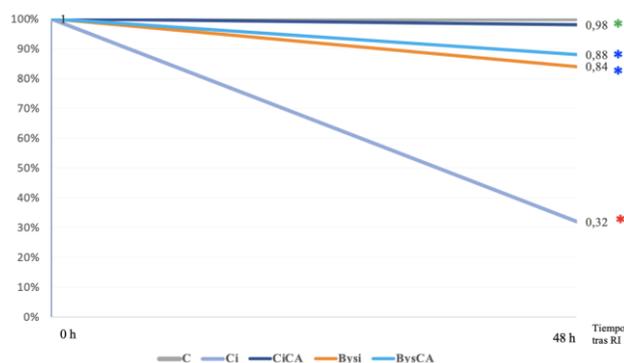


Figura 6. Curvas de supervivencia celular de los cultivos PNT2 tratadas con AC a las 48 h incluyendo RIBE.

### Células B16F10

No hemos encontrado referencias en la literatura científica sobre el efecto del AC en las células de melanoma. Sin embargo, diferentes compuestos polifenólicos y diterpenos han mostrado capacidad antiproliferativa, inhibiendo el crecimiento celular en células B16F10<sup>21</sup> y disminuyendo la invasión metastásica in vivo. Esta inhibición del crecimiento celular aumenta si estas sustancias se administran antes de la exposición a radiaciones ionizantes<sup>2022</sup>.

En las células B16F10, la exposición a 20 Gy de rayos X (Ci) induce una disminución de la supervivencia celular ( $p < 0,001$ ), demostrando la capacidad citotóxica de los rayos X. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, hemos determinado que la administración de AC pre-irradiación (CAi) produce una disminución de la supervivencia celular ( $p < 0,001$ ), expresando un aumento del daño citotóxico inducido por los rayos X.

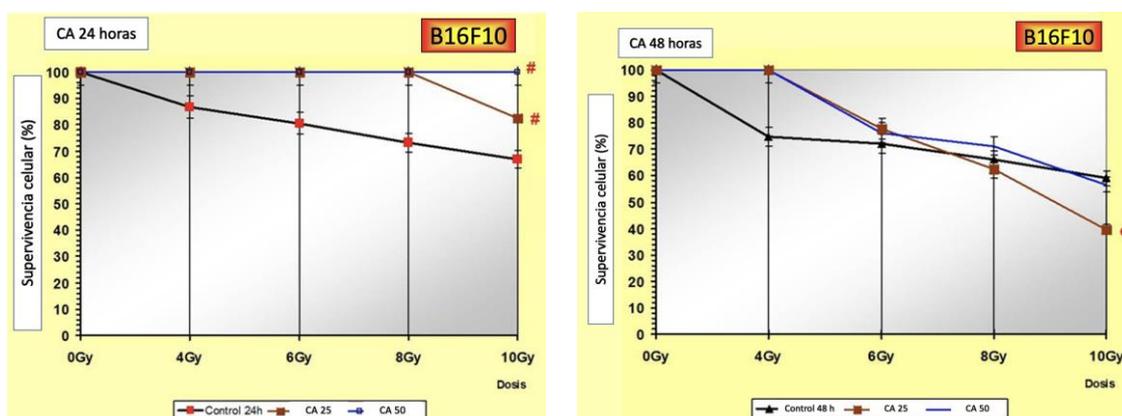


Figura 7. Curvas de supervivencia celular de los cultivos B16F10 tratadas con AC a las 24 y 48 h.

No se determinó ningún factor de protección en estas células, lo que expresa la ausencia de capacidad protectora del AC para estas células. Por el contrario, se determinó una disminución de la supervivencia celular del  $32,1 \pm 3,5\%$ , lo que expresa una capacidad radiosensibilizante del AC sobre la línea B16F10, aumentando la muerte celular en dos veces en comparación con las células irradiadas ( $p < 0,001$ ) (fig. 7).

La administración de AC a estas células antes de añadir el medio de cultivo celular irradiado (BysCA) mostró una disminución de la supervivencia celular ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo Bysi, lo que expresa un aumento del daño citotóxico inducido por la radiación X. No se estableció ningún factor de protección en estas células. Por el contrario, se estableció una disminución de la supervivencia celular del  $100,1 \pm 3,5\%$  respecto al grupo tratado con suero irradiado (Bysi) que expresa la capacidad radiosensibilizadora del AC sobre las células B16F10 (Fig. 8).

Nosotros hemos obtenido resultados similares con el carnosol y el ácido rosmarínico <sup>820</sup>.

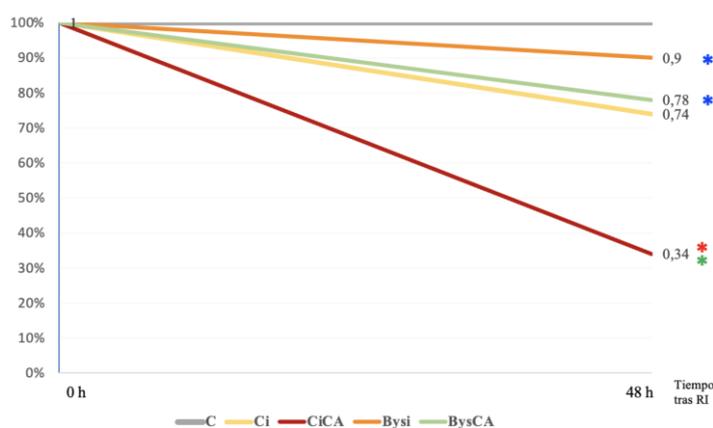


Figura 8. Curvas de supervivencia celular de los cultivos B16F10 tratadas con AC a las 48 h incluyendo RIBE.

### Ensayo clonogénico.

No hemos encontrado estudios previos en la literatura científica sobre el efecto del AC sobre la viabilidad celular en células de próstata o melanoma. En las células PNT2, la exposición a 4 Gy de rayos X (Ci) produce una disminución de la fracción de supervivencia (SF) ( $p < 0,001$ ) demostrando la capacidad citotóxica de los rayos X. La administración de AC pre-irradiación (CiCA) produce un aumento de la SF en comparación con el grupo control irradiado (Ci) ( $p < 0,01$ ), mostrando la capacidad citoprotectora de AC contra el daño citotóxico inducido por la radiación. Se determinó un FP de  $24,4 \pm 2,1\%$ , expresando la capacidad radioprotectora

del AC. En las células PNT2 tratadas con medio de cultivo obtenido de cultivos PNT2 irradiados a 2 Gy (Bysi) la SF disminuye ( $p < 0,01$ ) lo que muestra la citotoxicidad inducida por el medio de cultivo celular irradiado. Sin embargo, la administración de AC sobre estas células (BysCA) no presenta ningún efecto, expresando una falta de efecto de AC sobre la SF en estas células Bys (Bysi) (fig. 9).

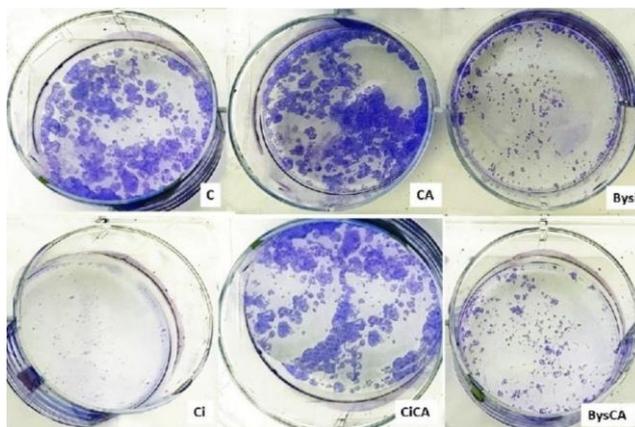


Figura 9. Resultados del ensayo clonogénico en las células PNT2 donde se observan las colonias supervivientes tras someter cada cultivo celular a las distintas condiciones de estudio.

En las células B16F10, la exposición a 4 Gy de rayos X (Ci) produce una disminución de la SF ( $p < 0,001$ ), lo que demuestra la citotoxicidad inducida por los rayos X. La administración de AC pre-irradiación (CiCA) produce una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) de la SF con respecto al grupo irradiado (Ci), mostrando un aumento de la capacidad citotóxica del AC en estas células. No se determinó un FP; por el contrario, en las células irradiadas (Ci) se determinó una disminución de la SF superior al  $60\% \pm 5,3\%$ , junto con un factor de radiosensibilización y potenciación del daño  $32,7 \pm 3,1\%$  superior al efecto esperado de los rayos X (Ci). Todo ello expresa la capacidad paradójica radiosensibilizadora del AC sobre las células B16F10.

Al analizar el EB la SF de las células B16F10 tratadas con medio de cultivos celulares B16F10 irradiados disminuye en comparación con las células control (C) ( $p < 0,01$ ), lo que demuestra la citotoxicidad inducida por el medio de cultivo irradiado. Estos dos grupos (Bysi y BysCA) muestran diferencias significativas con respecto a las células control irradiadas (Ci) ( $p < 0,01$ ), retratando una mayor supervivencia en estas células que en las células expuestas directamente a los rayos X (Ci). Todas estas observaciones expresan la pérdida de capacidad protectora o sensibilizadora del AC sobre las células B16F10 receptoras (fig. 10). Por lo tanto, en las células B16F10, se estableció el siguiente SF en orden descendente:  $C \approx CA \approx Bys \approx Bysi > BysCA > Ci > CiCA$  ( $p < 0,001$ ).

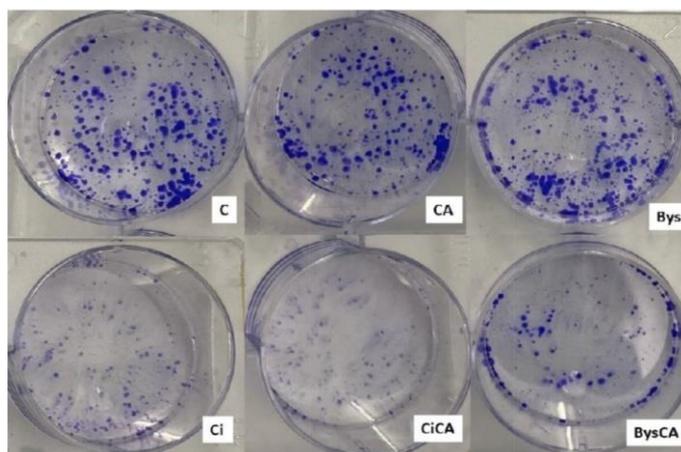


Figura 10. Resultados del ensayo clonogénico en las células PNT2 donde se observan las colonias supervivientes tras someter cada cultivo celular a las distintas condiciones de estudio.

### Ensayo de Anexina -V.

La exposición de las células control a 20 Gy de rayos X (Ci) produce un aumento significativo de células apoptóticas ( $p < 0,001$ ), lo que expresa el nivel de daño celular inducido por la exposición directa a RI. Las células PNT2 tratadas con AC y radiación (CiCA) determinamos una reducción de células apoptóticas respecto a las células tratadas sólo con radiación (Ci) ( $p < 0,001$ ). Esto expresa la capacidad radioprotectora de la AC frente al daño inducido por los rayos X. Además, la administración del medio de cultivo irradiado obtenido de cultivos de células PNT2 irradiadas (Bysi) mostró un aumento significativo de la apoptosis ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células control (C), expresando un EB inducido en las células receptoras. La administración de AC en estas células produjo una disminución del porcentaje de células apoptóticas ( $p < 0,01$ ) (fig. 11).

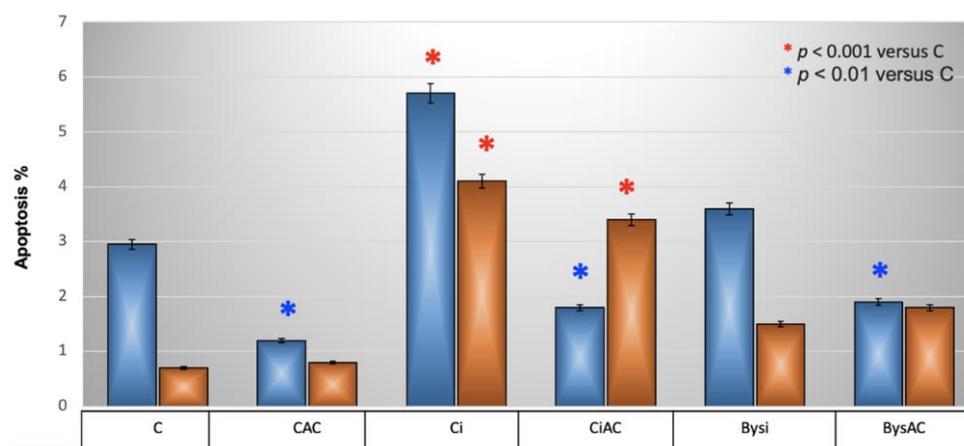


Figura 11. Porcentaje de células PNT2 y B16F10 en apoptosis 48 h después de la exposición a 20 Gy de rayos X.

En las células B16F10, la exposición de las células control irradiadas (Ci) produce un aumento significativo de células apoptóticas ( $p < 0,001$ ), lo que expresa el daño celular inducido por la exposición directa a la RI. Las células tratadas con AC y radiación (CiCA) presentan una reducción significativa de células apoptóticas ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, puede observarse que el porcentaje de células apoptóticas sigue siendo cinco veces superior al determinado en las células control (C) o en las células no irradiadas tratadas con AC (CiCA) ( $p < 0,001$ ). La administración de medio de cultivo irradiado obtenido de cultivos de células B16F10 irradiadas (Bysi) mostró un aumento significativo de la apoptosis ( $p < 0,01$ ) expresión del EB. Sin embargo, la administración de suero irradiado previamente tratado con AC (BysCA) no mostró una diferencia significativa en el porcentaje de células apoptóticas en comparación con el grupo no tratado con AC (Bysi) (fig. 11).

### Ensayo GSH.

Muchos autores han relacionado la radiosensibilidad o radiorresistencia de las células con el glutatión<sup>23</sup> por lo que nos propusimos evaluar la concentración de glutatión en las dos líneas celulares estudiadas. En conjunto, el glutatión y su precursor la cisteína (Cys) son los principales antioxidantes intracelulares con capacidad para contrarrestar eficazmente las ERO inducidas por la RI y reducir el estrés oxidativo.

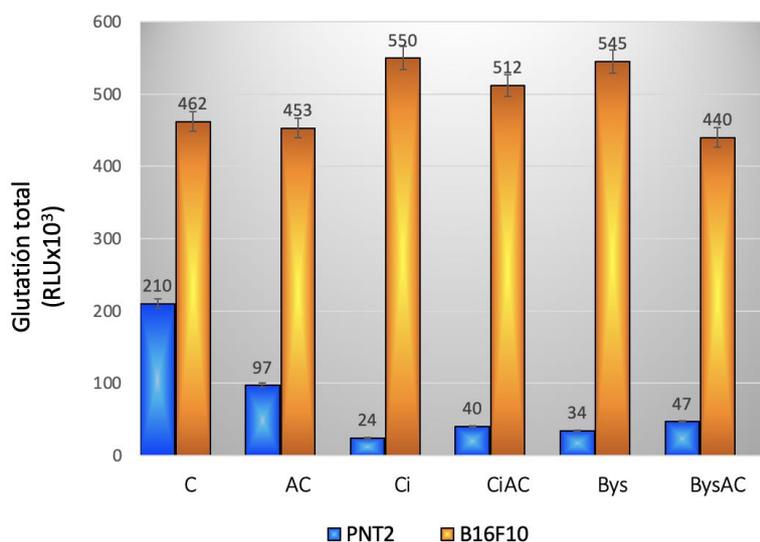


Figura 12. Gráfica comparativa de niveles de GSH de ambas líneas celulares, PNT2 y B16F10.

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

0,001). En las células B16F10, las diferencias observadas entre los distintos grupos no fueron estadísticamente significativas (fig. 12). Numerosos autores han atribuido la resistencia de las células al tratamiento con sustancias quimioterapéuticas y radiación ionizante a la cantidad de glutatión intracelular. Esta gran diferencia en la cantidad de glutatión intracelular total en las células B16F10 podría explicar la mayor radioresistencia de estas células en nuestro estudio.

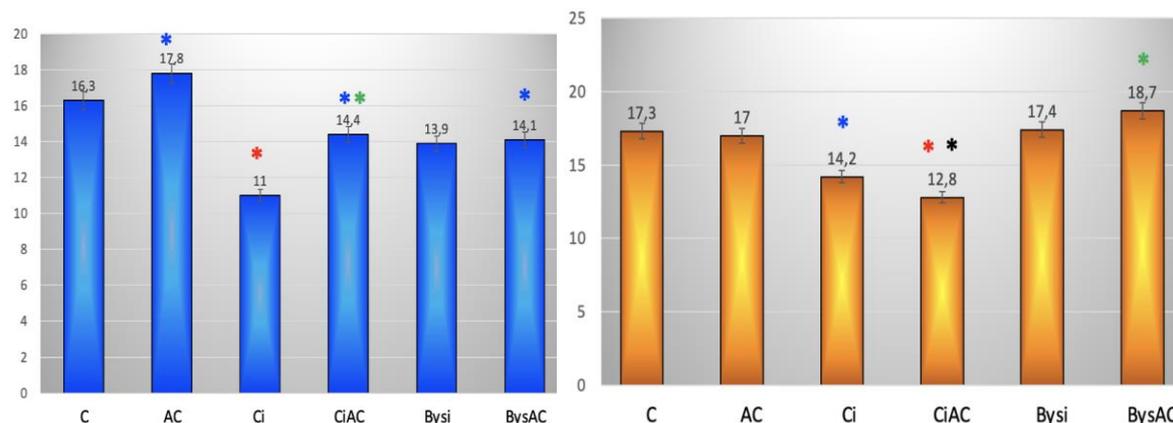


Figura 13. Ensayo ratio GSH-GSSG: concentraciones totales de glutatión de los distintos grupos estudiados en las células PNT2 y B16F10.

En concordancia con diversos autores, la irradiación produce una disminución de la ratio en ambas líneas celulares. La administración de AC incrementa la ratio GSH-GSSG en las células PNT2,, lo que expresa un efecto protector aditivo del AC con el glutatión intracelular. Sin embargo, en las células de melanoma el AC provoca una disminución de la ratio en células irradiadas (CiAC), lo que expresa el mayor daño inducido al tratar con AC (fig. 13). En nuestro estudio, una diferencia importante entre los dos tipos celulares estudiados es la capacidad única de los melanocitos para producir melanina. En los melanocitos, la Cys tiene un destino adicional debido a su implicación con una de las vías de melanogénesis para formar feomelanina <sup>24</sup>. La activación de la vía de síntesis de la feomelanina o un aumento de la concentración intracelular de Cys y/o de los niveles de GSH aumenta su utilización en la síntesis de la feomelanina, en detrimento de su disponibilidad para otras actividades celulares. Nosotros sugerimos que el AC podría actuar mediante un mecanismo, ya descrito para el ácido cafeico y el ácido rosmarinico, como un activador de la melanogénesis vía feomelanina, que obligaría al GSH a consumirse en la producción de feomalánina, provocando una depleción del glutatión intracelular disponible que dejaría desprotegida a la célula para hacer frente al estrés oxidativo.

Nuestros resultados muestran que el AC en estas situaciones permitiría alcanzar uno de los grandes objetivos de la radiobiología clásica: proteger a las células sanas a la vez que aumenta el daño en las células neoplásicas cuando ambas están dentro del mismo campo de radiación.

## **CONCLUSIONES.**

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

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

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

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

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Birtić S, Dussort P, Pierre FX, Bily AC, Roller M. Carnosic acid. *Phytochemistry*. 2015;115(1):9–19.
2. Loussouarn M, Krieger-Liszkay A, Svilar L, Bily A, Birtić S, Havaux M. Carnosic Acid

- and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms. *Plant Physiol.* 2017;175(3):1381–94.
3. Chen X, Huang M, Liu D, Li Y, Luo Q, Pham K, et al. Absorption and Transport Characteristics and Mechanisms of Carnosic Acid. *Biol* 2021, Vol 10, Page 1278. 2021;10(12):1278.
  4. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernandez H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2011;40(5):310–4.
  5. Romo Vaquero M, García Villalba R, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, Fromentin E, Flanagan J, et al. Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: Metabolic profile in the intestine, liver, plasma, and brain of Zucker rats. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(10):1834–46.
  6. Pérez-Sánchez A, Barrajon-Catalán E, Caturla N, Castillo J, Benavente-García O, Alcaraz M, et al. Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2014;136:12–8.
  7. Alcaraz M, Acevedo C, Castillo J, Benavente-Garcia O, Armero D, Vicente V, et al. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol.* 2009;82(979):605–9.
  8. Miguel Alcaraz, Miguel Alcaraz-Saura, Daniel Gyngiri Achel, Amparo Olivares, José Antonio López-Morata JC. Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells | Anticancer Research. *Anticancer Res.* 2014;34(4):913–21.
  9. Garbe C, Keim U, Gandini S, Amaral T, Katalinic A, Holleczek B, et al. Epidemiology of cutaneous melanoma and keratinocyte cancer in white populations 1943–2036. *Eur J Cancer.* 2021;152:18–25.
  10. Rouhani P, Hu S, Kirsner RS. Melanoma in Hispanic and Black Americans. <http://dx.doi.org/10.1177/107327480801500308>. 2008;15(3):248–53.
  11. Allen KJH, Malo ME, Jiao R, Dadachova E. Targeting Melanin in Melanoma with Radionuclide Therapy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17).
  12. Śniegocka M, Podgórska E, Plonka PM, Elas M, Romanowska-Dixon B, Szczygiel M, et al. Transplantable Melanomas in Hamsters and Gerbils as Models for Human Melanoma. Sensitization in Melanoma Radiotherapy—From Animal Models to Clinical Trials. *Int J Mol Sci* 2018, Vol 19, Page 1048. 2018;19(4):1048.
  13. Stevens G, McKay MJ. Dispelling the myths surrounding radiotherapy for treatment of cutaneous melanoma. *Lancet Oncol.* 2006;7(7):575–83.

14. Min Y, Roche KC, Tian S, Eblan MJ, McKinnon KP, Caster JM, et al. Antigen-capturing nanoparticles improve the abscopal effect and cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol* 2017 129. 2017;12(9):877–82.
15. Von Ledebur M, Schmid W. The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutat Res*. 1973;19(1):109–17.
16. Balmus G, Karp NA, Ng BL, Jackson SP, Adams DJ, McIntyre RE. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nat Protoc* 2014 101. 2014;10(1):205–15.
17. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*. 1985;147(1–2):29–36.
18. James Carmichael; William G. DeGraff; Adi F. Gazdar; John D. Minna; James B. Mitchell. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Radiosensitivity. *Cancer Res*. 1987;47(4):943–6.
19. MM B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1–2):248–54.
20. Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J. Carnosol, radiation and melanoma: A translational possibility. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(9):712–9.
21. Rodriguez, J.; Yáñez, J.; Vicente, V.; Alcaraz, M.; Benavente-García, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Lozano JA. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines : relationship between structure and activity. *Melanoma Res*. 2002;12(2):99–107.
22. 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):1–14.
23. Meister A, Anderson ME. GLUTATHIONE. <https://doi.org/101146/annurev.bi52070183003431>. 2003;Vol. 52:711–60.
24. Del Marmol V, Ito S, Bouchard B, Libert A, Wakamatsu K, Ghanem G, et al. Cysteine Deprivation Promotes Eumelanogenesis in Human Melanoma Cells. 1996;