GENOPROTECCIÓN QUÍMICA: REDUCIENDO TAMBIÉN EL DAÑO BIOLÓGICO TAN BAJO COMO SEA RAZONABLEMENTE POSIBLE

Ana María Mercado Díaz, Amparo Olivares Rueda, Jose Antonio García-Gamuz, Miguel Alcaraz Baños
Área de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia
mab@um.es; amparo.o.r@um.es; gamuz@um.es, anamaria.mercado@um.es.

RESUMEN

La radiación ionizante desencadena la generación masiva de especies reactivas de oxígeno que inducen daño en el ADN celular. Se determinaron mediante el ensayo de micronúcleos los efectos antioxidantes y protectores de varios compuestos frente al daño cromosómico inducido por rayos γ, evaluando la reducción de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados por citocinesis. Los compuestos estudiados se añadieron a sangre humana a una concentración de 25 mM, 5 minutos antes o inmediatamente después de la irradiación con 2 Gy de cesio-137. Los resultados sugieren que en ambas situaciones actúan diferentes mecanismos protectores, que podrían explicarse por la diferencia entre las actividades antirradicales y antilipoperoxidantes frente a los procesos peroxidativos lipídicos. Esta actividad antilipoperoxidante depende de varios factores, aunque sólo las sustancias lipoantioxidantes son eficaces para proteger las células humanas frente al daño oxidativo, incluso cuando se administran tras la exposición a radiaciones ionizantes.

INTRODUCCIÓN

Existe una necesidad continua de desarrollar compuestos no tóxicos que puedan reducir los efectos indeseables de la radiación ionizante con capacidad de proteger a los humanos contra el daño genético, la mutación, los cambios en los sistemas fisiológicos y los efectos teratogénicos de los agentes tóxicos que actúan a través de la generación de radicales libres [1, 2]. Durante muchos años, y a pesar de su alta toxicidad, existía el conocimiento que los compuestos sulfhidrilos proporcionaban efectos radioprotectores cuando se administraban antes de la exposición a la radiación ionizante [3], y sólo recientemente se han descubierto otras sustancias radioprotectoras con capacidad antioxidante [4, 5]. Posteriormente, se ha encontrado que otras sustancias tienen el mismo efecto cuando se administran tras la exposición a

radiaciones ionizantes [5, 3] y, más recientemente, algunas sustancias han sido descritas como radioprotectoras únicamente cuando se administran tras la exposición a la radiación [6]. Sin embargo, otros compuestos presentan una capacidad radioprotectora que difiere según se administren antes o después de la radiación [5, 7]. Debido a la naturaleza aparentemente contradictoria de algunos de estos resultados, se ha recomendado el uso de mezclas de dos o más sustancias; al encontrar que el efecto radioprotector resultante es mayor que cuando se utiliza un solo agente [3, 5]. En este trabajo, ensayamos diferentes compuestos antioxidantes que muestran capacidad protectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante y relacionamos los efectos con sus características químicas para dilucidar sus diferentes mecanismos de acción, y así explicar las aparentes discordancias descritas en la literatura.

QUÍMICOS

Los agentes extracto de té verde (ETV) con 90% de catequinas, extracto de semilla de uva (ESU) con 95% de procianidinas, carnosol (COL) al 86%, ácido carnósico (AC) al 82% se obtuvieron en Nutrafur-Furfural Español, SA (Murcia, España): el ácido rosmarínico (AR) al 95%, ácido gálico (AG) al 95%, ácido egálico (AE) al 95%, hidroxitirosol (HITOL) se adquirieron en Extrasynthese (Genay, Francia); mientras que el ácido L-ascórbico al 99% (AA) y el d-tocoferol al 99% (E) en Sigma Co. (Madrid, España). Por último, el dimetilsulfóxido (DMSO) en Merck (Darmstadt, Alemania).

MUESTRAS DE SANGRE Y PROCEDIMIENTO DE IRRADIACIÓN

Se obtuvieron muestras heparinizadas de sangre periférica humana de dos donantes jóvenes sanas no fumadoras. AC, COL y E se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) acuoso al 5 %, y AG, HITOL, AA, AE y AR se disolvieron en agua; se añadieron 20 ml de estas soluciones a 2 ml de sangre humana para obtener una concentración de 25 mM, 5 minutos antes de la irradiación para el grupo pre-irradiación y 5 minutos después de la irradiación para el grupo post-irradiación. Se incluyó un grupo DMSO en este estudio no solo porque se agregó DMSO como disolvente, sino también porque se considera un eliminador de radicales y un agente radioprotector [8, 9]. Las muestras de sangre se expusieron a rayos γ de cesio-137 con un irradiador IBL 437C (CIS, Francia) a una dosis de 2 Gy ± 3%. La irradiación se realizó a temperatura ambiente durante 40 segundos a una tasa de dosis de 5 cGy s-1. La exposición a rayos γ se estableció por medio de dosímetros termoluminiscentes (DTL) (GR-200H,

Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China). Los DTL fueron suministrados y medidos por CIEMAT (Ministerio de Industria y Energía, España).

TÉCNICA DE CULTIVO

El ensayo de micronúcleos se llevó a cabo en linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis irradiados después de la irradiación γ (con las sustancias de tratamiento pre- y post-irradiación), siguiendo el método descrito por Fenech y Morley [10] y adaptado por el IAEA [11]. Se cultivó 1ml de sangre a 37 °C durante 72 h en 9 ml de medio F-10 (Sigma Co, Madrid, España) que contenía 15% de suero bovino fetal (Sigma Co.), 1,6% de fitohemaglutinina (Sigma Co.) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Co.). Después de 44 horas del inicio del cultivo de los linfocitos, se añadió citocalasina B (Cyt B) (Sigma Co.) a una concentración de 3 μg/ml-1. A las 72 horas, los linfocitos se trataron con solución hipotónica (KCl, 0,075 M) durante 3 minutos y fijados con metanol y ácido acético (3:1). Las preparaciones se secaron al aire y los portaobjetos se tiñeron con Giemsa de May–Grünwald.

RECUENTO DE MICRONÚCLEOS

Se calculó el número de micronúcleos (MN) en al menos 500 células bloqueadas por citocinesis (células CB) (MN/500 CB) utilizando un microscopio óptico Zeiss (Oberkochem, Alemania) a 400 aumentos para examinar las muestras, mientras que se utilizó un aumento de 1000 para confirmar la presencia o ausencia de MN en las células.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó el grado de dependencia y correlación entre variables utilizando el modelo de análisis de varianza complementado con un contraste de medias y tomando $p < 0,05$ como nivel de significación. Las medias cuantitativas se compararon mediante análisis de regresión y correlación lineal. Estos resultados se utilizaron para obtener el Factor de Protección (FP), donde Fcontrol es la frecuencia de MN en linfocitos sanguíneos irradiados y Ftratado es la frecuencia de MN en linfocitos sanguíneos tratados pre y post-irradiación γ, como se describió previamente [5]:

$$FP = \frac{(Fcontrol - Ftratado)}{Fcontrol} \times 100$$

RESULTADOS

La frecuencia basal de MN/500 CB en este estudio fue de 7 ± 1 MN/500 CB para las muestras de sangre control no irradiadas y de 30 ± 2 MN/500 CB para las muestras control irradiadas con 2 Gy; mientras que la adición de las sustancias no produjo diferencias significativas con respecto a los controles no irradiados.

La Figura 1 expone el factor de protección calculado para cada uno de los tratamientos y la significancia estadística obtenida con una frecuencia de MN/500 CB.

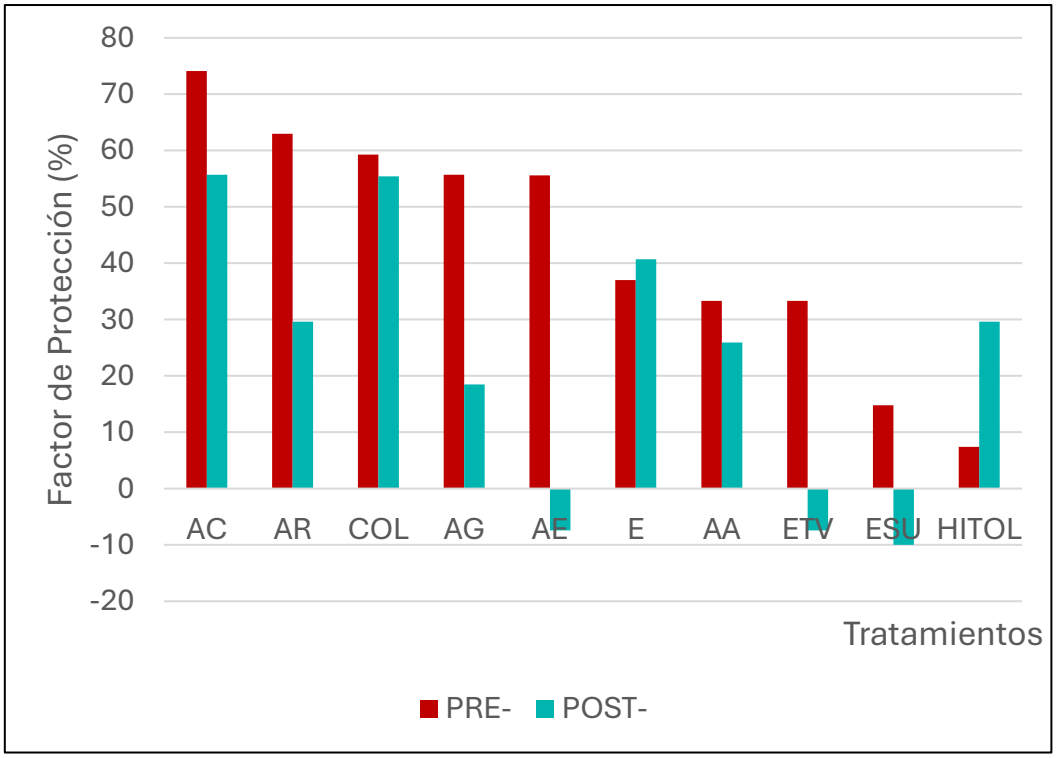

Figura 1. Factor de protección de las sustancias estudiadas antes y después de la irradiación.

En los tratamientos administrados antes de la irradiación γ, la capacidad de protección de mayor a menor según la frecuencia del MN fue:

AC = AR = COL = AG = AE = AG = E ($p<0,001$) > AA = ETV ($p<0,01$) > HITOL = ESU = control irradiado

La influencia de los tratamientos añadidos después de la exposición a radiación γ en la aparición de MN en linfocitos humanos irradiados fue menor que en el grupo anterior debido

AC = COL = E ($p<0,001$) > AR = EA = AA = HITOL ($p<0,05$) > AG = ETV = ESU = control irradiado

a que se obtuvo un número mayor de MN. De manera que, la capacidad radioprotectora, de mayor a menor según la frecuencia de MN fue:

De igual forma, el factor de protección nos permitió obtener la capacidad protectora de cada sustancia (administración antes de la irradiación + administración después de la irradiación), sumando el efecto obtenido en ambos tratamientos. Así, el orden de mayor a menor capacidad antimutagénica se puede establecer como:

AC > COL > AR > E > AG > AA > AE > HITOL

Nuestros resultados muestran que el porcentaje de protección es mayor en los tratamientos añadidos antes que en aquellos administrados después de la radiación. También se encontró que las sustancias hidrosolubles perdieron más capacidad protectora que las sustancias liposolubles cuando se administraron después de la exposición a la radiación γ.

DISCUSIÓN

La absorción de la radiación ionizante de cualquier tipo o calidad se produce a través de trazas de partículas. En el caso de la radiación penetrante, estas trazas surgen de forma estocástica en el tejido expuesto, la energía depositada origina una multitud de ionizaciones y excitaciones en las que las moléculas de agua están siempre implicadas, causando, al menos, dos tipos de alteraciones moleculares: por efectos directos estocásticos o impredecibles sobre gran parte de los constituyentes moleculares de las células y la matriz extracelular; y por una serie de especies moleculares siguientes a la hidrólisis del agua inducida por la radiación, denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO)[4].

Actualmente, la capacidad de las distintas sustancias para prevenir el daño genotóxico y su capacidad antimutagénica, se mide en términos de producción de estas ERO[1–11]. Está aceptado de forma uniforme que las ERO generadas endógenamente y aquellas que surgen de la deposición de energía de la radiación ionizante son similares, aunque no necesariamente idénticas. Ambas tienen una vida útil corta y pueden perpetuarse a través de reacciones secundarias, por ejemplo, con ácidos grasos poliinsaturados, que pueden causar reacciones bioquímicas terciarias. La principal diferencia entre las ERO metabólicas y las generadas por la radiación ionizante radica en la frecuencia de su aparición y su compartimentación. En una célula de mamífero, las ERO se producen de manera constante y abundante mediante diferentes reacciones, con pequeñas ráfagas que ocurren, generalmente, a intervalos de tiempo frecuentes y cambiantes, en parte como respuesta a ciertas interacciones ligando -

receptor. Una red de enzimas antioxidantes mantiene una concentración de ERO en estado estacionario homeostático en las células dentro de un rango fisiológico. Es probable que las ráfagas de ERO inducidas por la radiación sean mayores que las pequeñas descargas producidas por el metabolismo. Las primeras tienden a ser descargas de ERO suprabasales y ocurren a una velocidad que depende de la tasa de dosis, y su tamaño depende de la calidad de la radiación [4].

Las principales ERO responsables de los procesos de oxidación celular son las siguientes: anión superóxido ($O2^{\bar{}}$), radical hidroxilo (OH) y radicales peroxilo ($R^{\bar{}}OO$). Estas ROS se forman por un mecanismo electrónico secuencial, por medio del cual el oxígeno molecular da lugar, sucesivamente, a un radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo[3, 9].

Las radiaciones ionizantes in vivo provocan una elevada generación de radicales hidroxilo, por escisión homolítica del agua corporal o del peróxido de hidrógeno endógeno (formado por reducción del anión superóxido) mediante dos mecanismos: los modelos de Haber-Weiss y Fenton. El radical hidroxilo es el más citotóxico de todos los descritos hasta ahora, con una vida media estimada de unos 10^{-9} segundos. La elevada reactividad de este radical implica una reacción inmediata en el lugar donde se genera [3, 6, 9]. Así, cuando la generación de radicales hidroxilo es masiva, como ocurre con la radiación γ, el efecto citotóxico aumenta por la interacción de estos radicales con las estructuras fosfolipídicas celulares, induciendo procesos de peroxidación y la generación de radicales lipoperoxi, pudiendo considerarse como una reacción retardada por la radiación ionizante [9, 12]. En estas condiciones de estrés oxidativo, cuando incluso los sistemas antioxidantes endógenos son defectuosos o insuficientes, se deben utilizar agentes exógenos con una importante capacidad de eliminación de radicales. Esta propiedad depende de una elevada reactividad frente a diferentes radicales y de un alto grado de estabilidad del radical intermedio formado y requiere que ambos (antioxidantes solubles en agua y liposolubles) estén relacionados a través de su estructura molecular, propiedades físicas y biodisponibilidad[9, 12, 13].

Dos ensayos citogenéticos basados en el aumento de la frecuencia de aparición de MN son las pruebas más comúnmente utilizadas para determinar la capacidad mutagénica de un agente genotóxico químico o físico: la prueba in vivo en hueso (médula) de ratón[14] y la prueba in vitro en linfocitos humanos irradiados con bloqueo citogenético[12]. A través de estos dos ensayos, se ha demostrado que el efecto protector de los compuestos puede establecerse a partir del grado en que reducen los niveles de MN producidos por la exposición a diferentes agentes genotóxicos, como la radiación ionizante, tal y como se realizó en este estudio[1–14].

Hemos utilizado el ensayo de MN para demostrar que las exploraciones de medicina nuclear diagnóstica no inducen lesiones genotóxicas[15], y también, para identificar el efecto mutagénico de dosis mayores que las utilizadas en tratamientos ablativos para el cáncer de tiroides o en exploraciones radiodiagnósticas complejas[16, 17].

Además, hemos utilizado el test de MN para evaluar la capacidad protectora de varios compuestos; describimos cómo algunos flavonoides puros (diosmina y rutina) y extractos polifenólicos muestran una mayor capacidad protectora que los radioprotectores tradicionales, por ejemplo, los compuestos sulfhidrilos e incluso la vitamina C, tanto frente a los rayos X in vivo[8, 9] como a la radiación γ in vitro[18]. Igualmente, describimos cómo esta capacidad protectora depende del grado de polimerización y solubilidad de las sustancias ensayadas, ya que ambas modifican su biodisponibilidad[13, 19]. Reflejando los hallazgos de otros autores[2, 3, 6], hemos observado que las sustancias antioxidantes contenidas en diferentes extractos polifenólicos de hoja de olivo (Olea europaea)[9] y de cítricos (citroflavonoides)[8, 18, 19] muestran un mayor poder protector cuando se administran solas.

Nuestros resultados también sugieren que el efecto antimutagénico es proporcional a la capacidad antioxidante[20], si bien es dependiente de las características de biodisponibilidad en el medio ensayado. Así, hemos observado que los flavan-3-oles son los que presentan mayor capacidad protectora de todos los polifenoles[8, 13, 20], mientras que otros flavonoides con mayor capacidad antineoplásica y antiproliferativa presentan una menor capacidad antimutagénica[21–23]. Continuando con la búsqueda de compuestos con mayor capacidad antioxidante, hemos descrito otras sustancias que presentan mayor capacidad genoprotectora con diferente estructura química, AR[12]. Sin embargo, el presente estudio demuestra que las sustancias estudiadas en el tratamiento post irradiación γ no siguen los criterios mencionados anteriormente, siendo su capacidad protectora menor que cuando se utilizan en el tratamiento pre irradiación, subrayando la importancia del momento de la administración con respecto a la exposición a radiaciones ionizantes.

Por ello, los resultados obtenidos en cuanto al factor de protección ofrecido por los diferentes tratamientos administrados pre y post irradiación sugieren la probable existencia de diferentes mecanismos radioprotectores en cada caso. En los tratamientos administrados antes de la radiación γ, los efectos radioprotectores (actividad antimutagénica) de los fenólicos se basan, teóricamente, tal y como se mencionó anteriormente, en la capacidad de eliminación del anión superóxido ($O2^{\cdot}$) y, especialmente, del radical hidroxilo (OH), que se genera masivamente durante la irradiación γ. De hecho, de acuerdo con las consideraciones estructurales mencionadas anteriormente, la actividad antimutagénica de los compuestos

analizados como tratamientos de pre irradiación γ es consistente con sus propiedades antioxidantes y actividades específicas como eliminadores de radicales libres.

Cuando los fenólicos se agregaron después del tratamiento de irradiación γ, las únicas ERO presentes en las células, de acuerdo con la vida media del anión superóxido y los radicales hidroxilo, eran radicales lipoperoxi ($R\bar{}OO$), que son responsables del daño oxidativo cromosómico continuo. Además, la radiación ionizante aumenta la secreción de enzima lisosomal y la liberación de ácido araquidónico de las membranas a través de las actividades de lipooxigenasa, ciclooxigenasa y fosfolipasa, aumentando la respuesta inflamatoria celular. En estas complejas condiciones de estrés oxidativo, es muy difícil determinar los elementos estructurales responsables de los datos experimentales obtenidos para la actividad antimutagénica de diferentes tratamientos administrados después de la exposición a radiación ionizante[9, 12].

De acuerdo con nuestros resultados, Sarma y Kesavan[5] informaron que el a-tocoferol proporcionó, sistemáticamente, una radioprotección más alta que el ácido ascórbico en los tratamientos pre y post radiación. El efecto protector observado se ha explicado por la eliminación de radicales libres oxidantes pero, dado que ambas vitaminas están presentes en el sistema durante la exposición a agentes clastogénicos (antes de la irradiación), su función en la acción protectora observada cuando las vitaminas se administran después es bastante cuestionable.

Aunque los autores citados anteriormente atribuyen el efecto radioprotector al aumento de la actividad del sistema inmune inducido por la vitamina E, también sugieren que son necesarios estudios para dilucidar el posible mecanismo por el cual los radicales peroxilo generados in vitro son reparados de manera más eficiente por el α-tocoferol que, por el ácido ascórbico, caracterizado por proteger las membranas liposomales contra la peroxidación lipídica inducida por la radiación. Otros autores también han considerado que esta reducción en los radicales peroxilo generados por la radiación sugiere que podría estar operando algún tipo de mecanismo protector[1, 6, 7].

Nuestros resultados muestran que esta vía de eliminación de radicales lipoperoxilo es cuantitativamente mayor cuando los compuestos antioxidantes se administran inmediatamente después de la exposición a la radiación ionizante.

La distinción entre actividades antirradicales (frente a anión superóxido y radicales hidroxilo) y antilipoperoxidantes (frente a radicales lipoperoxi) propuesta por Pincemail et al[24] parece razonable, según los datos obtenidos en los modelos pre y post-radiación γ y podría explicar el diferente comportamiento de los compuestos ensayados en términos de los procesos

lipídicos peroxidativos. La actividad antilipoperoxidante de los fenólicos y flavonoides depende de manera compleja de varios factores, entre ellos la naturaleza del sustrato lipídico susceptible a la oxidación, las condiciones de funcionamiento de la célula e incluso el método utilizado para evaluar este potencial. Los resultados obtenidos muestran que los únicos compuestos que muestran una capacidad radioprotectora-antimutagénica significativa son los compuestos liposolubles (AC, COL y E).

Las sustancias que estudiamos en este trabajo son antioxidantes que se han consumido en la dieta durante varias décadas y, dentro de ciertos rangos de dosis, no se ha reportado ninguna toxicidad[3, 4]. Varios autores han propuesto que una combinación de antioxidantes dietéticos podría ser útil para proteger los tejidos normales contra el daño por radiación, sin importar cuán pequeño sea. Las cantidades de antioxidantes individuales incluidas en la mezcla dependerán de las dosis diagnósticas de radiación aplicadas y de su biodisponibilidad, liposolubilidad y concentración, ya que algunos de ellos pueden mostrar actividad prooxidante, aumentando el daño inducido por la radiación ionizante[6, 2, 3].

Sin embargo, los efectos de los suplementos antioxidantes en oncología pueden ser diferentes e incluso tóxicos. Aunque algunos estudios han sugerido que los antioxidantes pueden proteger los tejidos normales del daño inducido por la quimioterapia o la radiación, otros han afirmado que los antioxidantes suplementarios durante la quimioterapia y la radioterapia deben desaconsejarse porque pueden proteger al tumor[25].

Según Prasad[3], es necesario realizar un estudio clínico para evaluar el valor radioprotector de los antioxidantes entre los pacientes que reciben radiación diagnóstica, utilizando medidas contra el estrés oxidativo y daño cromosómico, aunque es poco probable que estas sustancias naturales aisladas se promocionen comercialmente porque no se pueden patentar.

En conclusión, ninguna estructura química explica la propiedad de ciertos compuestos para prevenir los efectos mutagénicos de la radiación ionizante. La capacidad antioxidante parece determinar el grado de protección de los compuestos administrados antes de la radiación. Sin embargo, hemos demostrado que la liposolubilidad del compuesto proporciona mayor protección si se administra inmediatamente después de la radiación ionizante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baliga MS, Jagetia GC, Venkatesh P, Reddy R, Ulloor JN. Radioprotective effect of abana, a polyherbal drug following total body irradiation. Br J Radiol 2004;77:1027–35.

2. Prasad KN, Cole WC, Haase GM. Radiation protection in humans: extending the concept of as low as reasonably achievable (ALARA) from dose to biological damage. Br J Radiol 2004;77:97–9.
3. Prasad KN. Rationale for using multiple antioxidants in protecting humans against low doses of ionizing radiation. Br J Radiol 2005;78:485–92.
4. Feinendegen LE. Significance of basic and clinical research in radiation medicine: challenges for the future. Br J Radiol 2005;27:185–95.
5. Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of vitamin C and E against c-ray-induced chromosomal damage in mouse. Int J Radiat Biol 1993;63:759–64.
6. Abraham SK, Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of chorogenic acid, curcumin and beta-carotene against gamma-radiation-induced in vivo chromosomal damage. Mutat Res 1993;303:109–12.
7. Sarma L, Devasagayan TPA, Mohan H, Mittal JP, Kesavan PC. Mechanism of protection by buthionine sulphoximine against gamma-ray-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of mouse bone marrow. Int J Radiat Biol 1996;69:633–43.
8. Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuño A, et al. 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 Agr Food Chem 2000;48:1738–45.
9. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M. 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 2002;5:125–35.
10. Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Res 1985;147:29–36.
11. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Technical Reports Series no. 405. Vienna, Austria. IAEA, 2001.
12. 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 gamma-rays. J Agr Food Chem 2006;54:2064–8.

13. Castillo J, Benavente-García O, Del Ban˜ o MJ, Lorente J, Alcaraz M, Dato MJ. 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 2001;4:117–123.
14. Schmid W. The micronucleus test. Mutation Res 1975;31:9–15.
15. Navarro JL, Alcaraz M, Gómez-Moraga A, Vicente V, Canteras M. Absence of chromosomic and genotoxic damage from the radiation dose administered in scintigraphic examinations. Rev Esp Med Nucl 2004;23:174–82.
16. Alcaraz M, Go´mez-Moraga A, Dato MJ, Navarro JL, Canteras M. Efecto genotóxico inducido por la exposición a rayos X durante exploraciones complejas de radiodiagnóstico médico. Oncología 2002;25:159–68.
17. Serna A, Alcaraz M, Navarro JL, Acevedo C, Vicente V, Canteras M. Biological dosimetry and Bayesian analysis of chromosomal damage in thyroid cancer patients. Radiat Prot Dosimetry 2008;129:372–80.
18. Benavente-Garcı´a O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M, Yánez J, Martínez C, et al. Antiproliferative activity of several phenolic compounds against melanoma cell lines. Agroo FOOD industries hi-tech 2005;16:30–4.
19. Castillo J, Piedad M, Marchante C, del Ban˜ o MJ, Lorente J, Benavente García O, et al. Citroflavonoids and Flavon-3-ols. High radioprotective capacity and prospects for health. Nutrafoods 2002;1:27–39.
20. Benavente-Garcia O, Castillo J, Marín F, Ortuño A, del Rio JA. Uses and properties of citrus flavonoids. J Agr Food Chem 1997;45:4505–15.
21. Martínez-Conesa C, Vicente V, Yañez MJ, Alcaraz M, Canteras M, Benavente-García O, et al. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. J Agr Food Chem 2005;53:6791–7.
22. Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-García O, Canteras M, et al. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. Nutr Cancer 2004;49:191–9.
23. Benavente-García O, Castillo J, Alcaraz M, Vicente V, del Rio JA, Ortunño A. Beneficial actino of citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. Curr Cancer Drug Targets 2007;7:3325–34.
24. Pincemail J, Deby C, Lion Y, Braguet P, Hans P, Drien K, et al. Role of flavonoids in lipoperoxidation and radical reactions. "In: Flavonoids and Bioflavonoids" (Farkas

L, Gabor M, Kallay F, eds.) Proceedings of the 7th Hungarian Bioflavonoid Symposium, Szeged, Hungary Elsevier Science Publishers, New York, 1986:423–36.

25. Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A, Blumberg JB. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? J Natl Cancer Inst 2008;100:773–83.