



universidad
de león

Departamento de Ciencias Biomédicas

Área de Fisiología

**EFFECTOS DE LA QUERCETINA SOBRE LAS
ALTERACIONES EN EL COMPORTAMIENTO Y ESTRÉS
OXIDATIVO INDUCIDAS POR RAYOS X EN RATAS**



*Memoria que presenta la Licenciada Raquel Marina Hernández para la
obtención del grado de Doctor por la Universidad de León*

León, 2013



UNIVERSIDAD DE LEÓN

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Dres. Dña. M^a Francisca González Sevilla y D. Juan Pablo Barrio Lera, Directores de la Tesis Doctoral: “Efectos de la quercetina sobre las alteraciones en el comportamiento y estrés oxidativo inducidos por rayos X en ratas” realizada por la Licenciada Dña. Raquel Marina Hernández, en el Departamento de Ciencias Biomédicas, autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León, a ____ de _____ de 2013.

Los Directores de la Tesis

Fdo.: Dra. M^a Francisca González Sevilla

Fdo.: Dr. Juan Pablo Barrio Lera



UNIVERSIDAD DE LEÓN

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

**(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y Norma 7ª de las
Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día _____ de _____ de 2013, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: "Efectos de la quercetina sobre las alteraciones en el comportamiento y estrés oxidativo inducidos por rayos X en ratas", dirigida por los Dres. Dña. M^a Francisca González Sevilla y D. Juan Pablo Barrio Lera y presentada por Dña. Raquel Marina Hernández:

Lo que firmo para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a _____ de _____ de 2013.

Vº Bº DIRECTOR DPTO.

SECRETARIA DPTO.

Fdo.: Dr. Juan José García Viéitez

Fdo.: Dra. Pilar Sánchez Collado

A mis padres

“Nunca desistas de tus sueños, sigue las señales”

El Alquimista, Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer constar mi agradecimiento a todas las personas que, de forma directa o indirecta, han colaborado en la realización de esta Tesis:

A los Doctores Dña. M^a Francisca González Sevilla y D. Juan Pablo Barrio Lera, directores de esta Tesis Doctoral, gracias por vuestra total colaboración, por haber confiado en mí y por la ayuda que me habéis ofrecido en cada momento que la he necesitado.

A todos los miembros del Departamento de Ciencias Biomédicas, por su amabilidad y su total disponibilidad.

A Bea y a Irene por su gran ayuda y colaboración en la parte experimental de esta Tesis Doctoral.

Al resto de miembros del IBIOMED, Vicky, Susana, Javi, Maiara, Paula, Rodri, Sandra, Nané, Daniela, Carolina, y en especial a Sara, mi gran compañera y amiga con la que empecé esta aventura, por todos los buenos y algún que otro mal momento que hemos pasado, pero siempre juntas, y porque dijimos que acabaríamos fuera como fuese y así ha sido.

A toda mi familia y sobre todo a mis padres, porque sin su apoyo y ayuda me habría sido imposible la realización de esta Tesis.

A todos mis amigos, tanto de Soria como de León, y en especial a Carmen, Cris y Asier, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, y por los que nos quedan por pasar.

A todos, gracias.

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos

Publicaciones:

González P., Andrade E.R., Soares F.A., Marina R. y Barrio J.P. "Flavonoides como radioprotectores: Evidencias y mecanismos de acción". *Fisiología. Boletín informativo de la SECF* 2011; 13: 11-17

Marina R., Costilla, S.M., Rodríguez J.R, Fernández C.L., Ferreras M.C., González P., Barrio J.P. "Experimental study about the effects of quercetin on the organic and cognitive dysfunction induced by ionizing radiation". *Trauma* (en prensa)

Marina R., González P., Costilla C., Ferreras M.C., Barrio J.P. "Changes in liver antioxidant system by quercetin supplementation in X-irradiated rats". *Free radical biology and medicine* (en prensa)

Comunicaciones a congresos:

Marina R., González P., Barrio J.P. "Effect of quercetin on the short-term impairment of learning induced by X-rays in Wistar rats. Nonlinear regression analysis of Morris water maze latencies". 8th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research. *Proceedings of Measuring Behavior 2012*: 420-423, Agosto 2012, Utrecht, Holanda

Marina R., González P., Barrio J.P. "Effect of quercetin on the short and long-term oxidative stress induced by whole-body X-irradiation of Wistar rats". Joint FEPS & Spanish Physiological Society Scientific Congress, *Federation of European Physiological Societies (FEPS)*, Septiembre 2012, Santiago de Compostela

Índice

1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1	INTRODUCCIÓN	1
1.2	OBJETIVOS	5
1.2.1	Objetivo general	6
1.2.2	Objetivos específicos:	6
2	ANTECEDENTES	7
2.1	RADIACIÓN	7
2.1.1	Definición y conceptos	7
2.1.2	Tipos de Radiación	8
2.1.2.1	Radiaciones corpusculares	8
2.1.2.2	Radiaciones electromagnéticas	8
2.1.2.2.1	Rayos X	10
2.1.2.2.2	Rayos γ	11
2.1.2.3	Radiaciones no ionizantes	12
2.1.2.4	Radiaciones ionizantes	12
2.1.3	Efectos generales de la radiación ionizante	14
2.1.3.1	Efectos a corto plazo	17
2.1.3.2	Efectos a largo plazo	17
2.1.4	Efectos específicos de la radiación ionizante	19
2.1.4.1	Alteraciones sobre el hígado	21
2.1.4.2	Alteraciones del comportamiento y el aprendizaje	22
2.1.4.3	Alteraciones sobre parámetros sanguíneos	24
2.1.4.4	Efectos cancerígenos	26
2.1.5	Síndrome de radiación aguda (ARS)	27
2.1.6	Aplicaciones de la radiación: Radioterapia	28
2.2	COMPORTAMIENTO Y APRENDIZAJE ANIMAL	30
2.2.1	Introducción	30
2.2.2	Estructuras encefálicas relacionadas con el aprendizaje	33
2.2.2.1	Corteza retrosplenial	34
2.2.2.2	Hipocampo	35
2.2.2.3	Cerebelo	41
2.2.2.4	Núcleo estriado	42
2.2.3	Evolución del comportamiento y del aprendizaje	42
2.2.4	Comportamiento ingestivo	44

2.2.5	Efectos de la radiación sobre el comportamiento y el aprendizaje ...	46
2.3	ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES	49
2.3.1	Estrés oxidativo.....	49
2.3.2	Defensas antioxidantes.....	52
2.3.2.1	El glutatión.....	52
2.3.2.2	Enzimas antioxidantes	56
2.3.2.2.1	Catalasa	56
2.3.2.2.2	Glutatión Peroxidasa	58
2.3.2.2.3	Superóxido dismutasa	60
2.3.2.2.4	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1	62
2.3.2.3	Factor de Transcripción Nrf2.....	65
2.3.3	Radiación ionizante y estrés oxidativo	69
2.3.3.1	Efectos primarios de la radiación ionizante.....	70
2.3.3.1.1	Formación de radicales libres.....	70
2.3.3.1.2	Cascada de señalización celular inducida por la radiación.....	72
2.3.3.1.3	Especies reactivas de oxígeno y homeostasis celular.....	73
2.4	AGENTES RADIOPROTECTORES	79
2.4.1	Introducción.....	79
2.4.2	Flavonoides.....	81
2.4.2.1	Estructura y tipos de flavonoides	81
2.4.2.2	Funciones de los flavonoides.....	83
2.4.3	Quercetina.....	86
2.4.3.1	Principales acciones de la quercetina.....	89
2.4.4	Flavonoides y radiación ionizante	90
2.4.4.1	Reparación de daños en el ADN.....	92
2.4.4.2	Actividad antioxidante y neutralizadora de radicales libres	94
2.4.5	Acciones sinérgicas de los flavonoides.....	96
2.4.6	Consideraciones sobre la radioprotección por flavonoides.....	98
3	MATERIAL Y MÉTODOS	101
3.1	ÁMBITO DE TRABAJO.....	101
3.2	ANIMALES.....	101
3.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	101
3.3.1	Grupos Experimentales.....	101
3.3.2	Tratamientos experimentales.....	102
3.3.2.1	Administración de quercetina.....	102
3.3.2.2	Irradiación experimental con rayos X.....	103
3.3.3	Experimentos	103
3.3.3.1	Experimento 1. Análisis comportamental pre-irradiación.....	103

3.3.3.2	Experimento 2. Análisis comportamental post-irradiación	103
3.3.3.3	Experimento 3. Análisis de la ingestión de agua y alimento	104
3.4	PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA LA RECOGIDA DE MUESTRAS	104
3.5	SOLUCIONES UTILIZADAS	105
3.6	APARATOS UTILIZADOS	106
3.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	108
3.7.1	Análisis por resonancia magnética	108
3.7.2	Análisis histopatológico.	111
3.7.3	Análisis comportamental	111
3.7.3.1	Análisis de motilidad, actividad exploratoria y ansiedad	111
3.7.3.2	Análisis de aprendizaje y memoria espacial.....	113
3.7.3.3	Análisis de la ingestión de agua y alimento.....	116
3.7.4	Determinaciones en sangre.....	116
3.7.5	Determinaciones en hígado.....	116
3.7.5.1	Obtención de homogenado total	116
3.7.5.2	Obtención de la fracción citosólica	117
3.7.5.3	Obtención de extractos nucleares	117
3.7.5.4	Concentración de proteínas.....	118
3.7.5.5	Concentración de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico.....	119
3.7.5.6	Cuantificación de la expresión de proteínas (CAT, SOD, NQO1, Nrf2, Keap1)	119
3.7.6	Tratamiento estadístico	123
4	RESULTADOS	125
4.1	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS CORPORALES	125
4.2	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS DE DAÑO ORGÁNICO. RESONANCIA MAGNÉTICA.....	127
4.3	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS DE DAÑO ORGÁNICO. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	129
4.3.1	Médula ósea	129
4.3.2	Médula espinal	131
4.3.3	Hipocampo	133
4.3.4	Hígado	135
4.4	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS SANGUÍNEOS	137
4.5	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE EL COMPORTAMIENTO	141
4.5.1	Experimento 1. Efectos comportamentales pre-irradiación	141

4.5.1.1	Comportamiento exploratorio (prueba de open field)	142
4.5.1.1.1	Frecuencia de acceso.....	142
4.5.1.1.2	Duración de la estancia	146
4.5.1.1.3	Distancia total recorrida.....	150
4.5.1.2	Comportamiento cognitivo (prueba de Morris).....	154
4.5.2	Experimento 2. Efectos comportamentales post-irradiación	155
4.5.2.1	Comportamiento exploratorio (prueba de open field)	155
4.5.2.2	Comportamiento cognitivo (prueba de Morris).....	159
4.5.2.2.1	Observaciones a los 7 días	159
4.5.2.2.2	Observaciones a los 30 días	159
4.5.3	Experimento 3. Efectos sobre la ingestión de agua y alimento	161
4.6	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO	163
4.6.1	Peroxidación lipídica	163
4.6.2	Expresión de catalasa.....	164
4.6.3	Expresión de SOD-Cu/Zn	166
4.6.4	Expresión de NQO1	168
4.6.5	Expresión del factor de transcripción Nrf2	170
4.6.6	Expresión de la proteína Keap1	172
5	DISCUSIÓN	175
5.1	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS CORPORALES	176
5.2	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS DE DAÑO ORGÁNICO. RESONANCIA MAGNÉTICA.....	179
5.3	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS DE DAÑO ORGÁNICO. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	181
5.4	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE PARÁMETROS SANGUÍNEOS.....	184
5.5	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE EL COMPORTAMIENTO	189
5.5.1	Efectos sobre el comportamiento exploratorio.....	189
5.5.2	Efectos sobre el comportamiento cognitivo	195
5.5.3	Efectos sobre la ingestión de agua y alimento.....	199
5.6	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN Y LA QUERCETINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO	200
6	CONCLUSIONES	207
7	BIBLIOGRAFÍA	211

Índice de figuras

Figura 2-1. Espectro electromagnético	9
Figura 2-2. Generación de Rayos X.....	10
Figura 2-3. Clasificación de las radiaciones en función de su poder de penetración.....	11
Figura 2-4. Efectos directos e indirectos de la radiación ionizante sobre macromoléculas.	16
Figura 2-5. Efectos de la radiación ionizante.....	18
Figura 2-6. Efectos biológicos directos e indirectos más frecuentes de la radiación ionizante	21
Figura 2-7. Regiones del encéfalo de la rata implicadas en el aprendizaje cognitivo.	33
Figura 2-8. Principales estructuras cognitivas en el cerebro del ratón (<i>Brain Explorer 2, Allen Institute for Brain Science</i>).....	34
Figura 2-9. Sección transversal y eje septotemporal del hipocampo de la rata mostrando su estructura zonal.....	35
Figura 2-10. Principales conexiones del hipocampo en el cerebro humano.....	36
Figura 2-11. Glutación (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina).....	53
Figura 2-12. Estructura química del glutación	54
Figura 2-13. Ciclo de óxido-reducción del glutación.....	55
Figura 2-14. Regulación de la transcripción de Nrf2.....	68
Figura 2-15. EROs y ERNs y su sistema de detoxificación.....	72
Figura 2-16. EROs y la regulación de la proliferación celular.....	76
Figura 2-17. Flavonoides. Estructura básica.....	82
Figura 2-18. Tipos de flavonoides.....	83
Figura 2-19. Estructura que confiere capacidad antioxidante a los flavonoides.....	84
Figura 2-20. Estructura química de la quercetina	87
Figura 3-1. Esquema representativo de los experimentos realizados y la administración de sustancias a los animales para el estudio de los efectos de la irradiación con rayos X a los 7 y a los 30 días	104
Figura 3-2. Esquema del open field y divisiones zonales.....	112
Figura 3-3. Esquema del laberinto de Morris incluyendo divisiones zonales.....	114
Figura 4-1. Evolución del peso corporal en los 4 grupos experimentales hasta los 30 días post-irradiación.....	127
Figura 4-2. Secuencia T2* eco de gradiente en plano coronal de cerebro en una rata después de 15 días de ser irradiada.....	128

Figura 4-3. Secuencia T2* eco de gradiente en plano axial de cerebro en una rata después de 15 días de ser irradiada.	129
Figura 4-4. Sección transversal de médula ósea cervical de una rata control, sacrificada a los 7 días post-irradiación.	130
Figura 4-5. Sección transversal de médula ósea cervical de una rata irradiada sin tratamiento, sacrificada a los 7 días post-irradiación.	130
Figura 4-6. Sección transversal de médula ósea cervical de una rata irradiada suplementada con quercetina, sacrificada a los 7 días post-irradiación.	131
Figura 4-7. Sección transversal de médula espinal de una rata control, sacrificada a los 30 días post-irradiación.	132
Figura 4-8. Sección transversal de médula espinal de una rata irradiada no suplementada con quercetina, sacrificada a los 30 días post-irradiación.	132
Figura 4-9. Sección sagital del hipocampo de una rata control, sacrificada a los 7 días.	133
Figura 4-10. Sección sagital del hipocampo de una rata irradiada no suplementada con quercetina sacrificada a los 7 días post-irradiación.	134
Figura 4-11. Sección sagital a través del hipocampo de una rata irradiada no suplementada con quercetina sacrificada a los 30 días post-irradiación.	134
Figura 4-12. Sección del hígado de una rata control sacrificada a los 7 días post-irradiación.	135
Figura 4-13. Sección del hígado en ratas irradiadas no suplementadas con quercetina sacrificadas a los 7 días post-irradiación.	136
Figura 4-14. Sección del hígado de una rata irradiada no suplementada con quercetina sacrificada a los 30 días post-irradiación.	136
Figura 4-15. Recuento de eritrocitos en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.	137
Figura 4-16. Valor hematócrito en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.	138
Figura 4-17. Concentración de hemoglobina en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.	139
Figura 4-18. Número de leucocitos en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.	140
Figura 4-19. Número de plaquetas en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.	141
Figura 4-20. Frecuencia de acceso en esquinas, lados y centro de los animales durante los días previos a la irradiación y los días posteriores a la misma.	142
Figura 4-21. Frecuencia de acceso media por minuto a las zonas del open field durante los días anterior y posterior a la irradiación.	143
Figura 4-22. Frecuencia de acceso de los animales a esquinas, lados y centro del open field en cada minuto durante los tres días posteriores a la irradiación.	145

Figura 4-23. Duración total de la estancia en esquinas, lados y centro de los animales durante los días previos a la irradiación y los días posteriores a la misma.....	146
Figura 4-24. Duración media por minuto de la estancia en las zonas del open field durante los días anterior y posterior a la irradiación.	147
Figura 4-25. Duración de la estancia de los animales en esquinas, lados y centro del open field en cada minuto durante los tres días posteriores a la irradiación.....	149
Figura 4-26. Distancia total (cm) recorrida en esquinas, lados y centro de los animales durante los días previos a la irradiación y los días posteriores a la misma.....	151
Figura 4-27. Distancia media recorrida por minuto en las zonas del open field durante los días anterior y posterior a la irradiación.	152
Figura 4-28. Distancia (cm) recorrida por los animales en esquinas, lados y centro del open field en cada minuto durante los tres días posteriores a la irradiación.....	153
Figura 4-29. Tiempo de latencia (s) invertido en encontrar la plataforma de escape en el test de Morris durante los 4 días previos a la irradiación y los 3 días posteriores a la misma.	154
Figura 4-30. Frecuencia de acceso en esquinas, lados y centro de los animales durante los días posteriores a la irradiación.....	156
Figura 4-31. Duración total de la estancia en esquinas, lados y centro de los animales durante los días posteriores a la irradiación.	157
Figura 4-32. Distancia total recorrida en esquinas, lados y centro de los animales durante los días posteriores a la irradiación.	158
Figura 4-33. Tiempo de latencia (s) invertido en encontrar la plataforma de escape en el test de Morris durante los días inmediatamente posteriores a la irradiación.....	159
Figura 4-34. Tiempo de latencia (s) invertido en encontrar la plataforma de escape en el test de Morris a partir del día 25 post- irradiación.....	160
Figura 4-35. Ingestión diaria de alimento durante los días previos y posteriores a la irradiación.....	161
Figura 4-36. Ingestión diaria de agua durante los días previos y posteriores a la irradiación.....	162
Figura 4-37. Excreción de heces durante los días previos y posteriores a la irradiación.....	162
Figura 4-38. Excreción de orina durante los días previos y posteriores a la irradiación.	163
Figura 4-39. Concentración hepática citosólica de TBARS, expresada como equivalentes de malondialdehído (MDA), en los diferentes grupos experimentales.	164
Figura 4-40. Expresión de la proteína catalasa en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.	165
Figura 4-41. Expresión de la proteína SOD citosólica en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.	167
Figura 4-42. Expresión de la proteína NQO1 en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.	169

Figura 4-43. Expresión nuclear de Nrf2 en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.....	171
Figura 4-44. Expresión de la proteína Keap1 en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.	173

Índice de Tablas

Tabla 2-1. Clasificación de los tipos de radiación en función del tipo de energía que se transmite y de su frecuencia de radiación.....	13
Tabla 2-2. Flavonoides con actividad radiomodificadora. Tomado de González y cols. ³⁰⁴	86
Tabla 3-1. Protocolo de carga de las muestras en placa de 90 pocillos por el método Bradford.....	118
Tabla 4-1. Peso corporal, hepático y del cerebro en los grupos experimentales a los 7 días post-irradiación. Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas.....	125
Tabla 4-2. Peso corporal, hepático y del cerebro en los grupos experimentales a los 30 días post-irradiación. Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas.....	126
Tabla 4-3. Parámetros de regresión lineal segmentada (ver 3.7.3.2, pág.113) obtenidos para el ajuste de los tiempos de latencia hasta alcanzar la plataforma de escape durante los cuatro días previos a la irradiación y los tres días posteriores a la misma representados en la Figura 4-29.	155
Tabla 4-4. Parámetros de regresión no lineal a una curva de disminución exponencial (ver 3.7.3.2, pág.113) obtenidos para el ajuste de los tiempos de latencia hasta alcanzar la plataforma de escape durante seis días posteriores a la irradiación representados en la Figura 4-33.	160

Abreviaturas:

ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ARS	Síndrome de radiación aguda (<i>Acute Radiation Syndrome</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i>
CAT	Catalasa
CGS	Sistema cegesimal
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CoQ	Coenzima Q
CRS	Corteza retrosplenial
Cul3	Complejo E3 ubiquitina ligasa basado en Cullin 3 (<i>Cullin3-based E3-ligase ubiquitination complex</i>)
DW	Densidad de protones
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ETC	Cadena de transporte de electrones
FADH	Flavín adenín dinucleótido
FLAIR	Recuperación de la inversión atenuada por líquidos (<i>Fluid attenuated inversión recovery</i>)
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Gy	Gray
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IRM	Imagen por resonancia magnética
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (<i>Kelch-like ECH-associated protein1</i>)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LET	Transferencia de energía lineal

Maf	Fibrosarcoma aponeurótico muscular <i>(Muscle aponeurotic fibrosarcoma)</i>
MDA	Ácido malondialdehído
MN	Micronúcleo
MNPCE	Eritrocito policromático micronucleado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Factor nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2 <i>(Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)</i>
NSC	Células madre neuronales
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH ⁻	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
Prx1	Peroxirredoxina 1
QQ	Metiluro orto-quinona/quinona de quercetina
RILD	Enfermedad hepática inducida por radiación <i>(Radiation induced liver disease)</i>
RO ₂ ⁻	Radical peróxido
ROOH	Hidroperóxidos
SH	Grupo sulfhidrilo
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
STIR	Recuperación de la inversión a tiempo corto <i>(Short time inversión recovery)</i>
SVZ	Zona subventricular
T	Tesla
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TNFα	Factor de necrosis tumoral α

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

La exposición a radiación ionizante es un fenómeno habitual en la sociedad moderna, tanto en el ámbito ocupacional como en aplicaciones terapéuticas. Los efectos nocivos de la radiación ionizante inciden principalmente en el material genético, bien de forma directa generando roturas de una o ambas cadenas del ADN, aberraciones cromosómicas y mutaciones, y también de forma indirecta a través de la inducción de daños oxidativos¹.

Los efectos agudos de la exposición del organismo a la radiación ionizante incluyen entre otros inmunosupresión, pérdida de células hematopoyéticas y alteraciones en numerosos tejidos (renal, pulmonar, hepático, nervioso)². El hígado es un órgano particularmente sensible a la radiación, pudiendo sufrir fallo hepático y hepatitis inducida por radiación.

Una crisis hematológica puede conducir a una mayor probabilidad de aparición de infecciones, hemorragias y dificultad para la cicatrización, además de una temprana leucocitopenia. El síndrome hematopoyético es especialmente importante en exposiciones (parciales o de cuerpo entero) a radiación ionizante que supere 1 Gy. La irradiación de la médula ósea y células progenitoras provoca muerte celular dosis-dependiente a escala exponencial³.

La irradiación empleada en la terapéutica radical o en el tratamiento paliativo de los tumores o malformaciones vasculares del sistema nervioso central (SNC) presenta un alto riesgo de causar lesiones en los tejidos neurales perilesionales sanos y también al radiar zonas cercanas al sistema nervioso⁴. Los daños producidos por la irradiación del SNC se consideran el principal factor que limita el empleo de este tipo de tratamiento en radioterapia, ya que existe una íntima asociación entre el grado de las alteraciones producidas y factores como la dosis empleada y la duración del tratamiento radioterapéutico.

Las alteraciones producidas por la radiación en tejido cerebral y en la médula ósea pueden aparecer de forma inmediata o tardía y son fácilmente detectables en imágenes obtenidas con resonancia magnética (IRM). Existe amplia experiencia clínica en la utilización de la resonancia magnética como método diagnóstico en la detección de los efectos en sistema nervioso central de la radiación empleada en el tratamiento de tumores de cabeza y cuello, y de los cambios de señal en la médula ósea de los cuerpos vertebrales radiados, por muerte del tejido hematopoyético y reemplazamiento graso.

Se han efectuado investigaciones que destacan la importancia de las alteraciones inducidas por la radiación ionizante en el hipocampo, donde se forman neuronas a lo largo de toda la vida, representando el soporte esencial de la memoria y el aprendizaje⁵. Se sabe que la radiación ionizante impide el aprendizaje por suprimir la neurogénesis en el hipocampo, pero se desconoce en gran medida el efecto de las radiaciones ionizantes sobre las alteraciones funcionales inducidas en el sistema nervioso del adulto⁶ y del mismo modo existe poca información sobre el curso temporal de las alteraciones comportamentales asociadas con la irradiación⁷. La comparación de los efectos comportamentales a corto y a largo plazo con alteraciones neurológicas en modelos animales de irradiación experimental podría aportar claves importantes a considerar en la prevención de efectos secundarios en radioterapia.

La búsqueda de agentes químicos que sean capaces de proteger al ser humano de los efectos negativos de la radiación ionizante es una cuestión fundamental de la radiobiología⁸. El aumento de estrés oxidativo asociado a la radiación experimental constituye la base para uno de los enfoques de radioprotección frente al daño a tejidos sanos inducido por la radioterapia¹. Las moléculas con características de inactivación (*scavenging*) de radicales libres son potenciales agentes radioprotectores, y en este sentido la amifostina (ácido S-2-(3-amino-propilamino-etilfosforotioico)) se utiliza en oncología aun con los inconvenientes de efectos secundarios graves y elevado coste⁹. Para evitar las desventajas de compuestos radioprotectores sintéticos existe un interés creciente en la identificación de compuestos radiomodificadores que tengan la

capacidad de minimizar los efectos de la radiación, y la literatura presenta multitud de evidencias acerca de los efectos de alimentos ricos en flavonoides y otros polifenoles en la mitigación del estrés oxidativo.

La investigación biomédica es cada vez más certera en dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales intervienen los compuestos bioactivos presentes en estos derivados. Nuestro grupo ha demostrado el papel radiomodificador del mosto de uvas tintas procedentes de cultivo orgánico frente a los daños ocasionados por radiación X a dosis subletales^{10,11}, y uno de los componentes bioactivos principales de este producto, la quercetina, ha demostrado poseer propiedades radiomodificadoras en ratones sometidos a radiación gamma¹².

La quercetina ejerce efectos antioxidantes a través de varios mecanismos de protección, entre ellos inactivando especies reactivas de oxígeno, impidiendo su formación mediante metales de transición o interactuando con glutatión^{11,13,14}, además de estimular la desubiquitinización del factor Nrf2 que regula la expresión de diversas enzimas antioxidantes¹⁵. Nrf2 es un factor de transcripción implicado en las respuestas celulares al estrés oxidativo y xenobióticos. En ausencia de estrés, Nrf2 está unido al inhibidor Keap1 en el citoplasma, que funciona como sensor de oxidantes. La acción de los prooxidantes sobre Keap1 activa el Nrf2, el cual pasa al núcleo celular y se une a elementos de respuesta antioxidante (AREs) en el genoma, activando la transcripción de genes de enzimas antioxidantes¹⁶. A pesar de que se conoce desde hace tiempo la activación de AREs por agentes inductores de estrés oxidativo como especies reactivas de oxígeno, radiación ultravioleta, citoquinas o metales pesados¹⁷, sólo recientemente se ha relacionado la activación de Nrf2 con los efectos de la radiación ionizante¹⁸.

La quercetina presenta además significativa actividad antiinflamatoria¹⁹, mejora las complicaciones pulmonares de la cirrosis²⁰ y es capaz de inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis en varios tipos de células cancerosas^{21,22}. Sin embargo, existen evidencias de una relación entre la concentración de quercetina y el efecto observado, dado que a concentraciones inferiores a 10 µM la quercetina parece ejercer efectos

antioxidantes mientras que a concentraciones superiores a 50 μM el efecto predominante parece ser pro-apoptótico^{23,24}. Debido a esto cabe plantearse la importancia del efecto antioxidante de la quercetina respecto a su efecto pro-apoptótico en la terapia antitumoral, dado que *a priori* no puede descartarse un posible conflicto entre su potencial efecto radiomodificador a través de la estimulación del sistema antioxidante y su efecto antitumoral mediado por la inducción de apoptosis. Puesto que no se conocen completamente los mecanismos responsables de la detección celular de la producción de radicales libres inducidos por la radiación y la consiguiente activación de vías de señalización y expresión¹, así como el modo en que el estatus redox influye en la actividad Nrf2²⁵, investigar la expresión de Nrf2 en relación a los cambios en estatus antioxidante inducidos por la radiación y la suplementación puede aportar datos significativos en relación a la potencial utilización terapéutica de la quercetina como agente radiomodificador sin comprometer la eficiencia de la radioterapia. Es de destacar asimismo que la mayor parte de estudios sobre el efecto radiomodificador de la quercetina se han efectuado en líneas celulares tanto normales como cancerosas, con pocos trabajos *in vivo*¹².

La quercetina es uno de los flavonoides más abundantes de la dieta humana, habiendo sido publicados valores de ingesta diaria de entre 6 y 31 mg/día^{26,27}. La mayor parte de la quercetina aparece en los alimentos en forma de glucósidos que son hidrolizados por la flora intestinal²⁸. Se ha indicado que el consumo diario de 100 g de grosellas negras y otras bayas (cuya concentración de quercetina puede superar los 140 mg/kg) puede inducir valores plasmáticos de quercetina de hasta 25 $\mu\text{g/L}$ (0,074 μM)²⁹. En este sentido, la administración intragástrica de 2 y 10 mg de quercetina por 200 g de peso corporal en ratas indujo una concentración plasmática de metabolitos de quercetina (sulfatos y glucurónidos) de entre 9,6 y 69 μM tras la primera hora y entre 4,2 y 19,3 μM trascurridas 6 horas desde su administración³⁰. Además, se ha descrito una importante diferencia en biodisponibilidad de derivados de la quercetina dependiendo de la forma de administración, obteniéndose menores valores plasmáticos con administración intragástrica que mediante suplementación en la dieta³¹. Esta variación en la biodisponibilidad de la quercetina y sus metabolitos, unida a las evidencias de una dependencia del

efecto fisiológico respecto del rango de concentración utilizado, hace necesario estudiar cuidadosamente tanto las dosis administradas, como la ventana temporal de administración de la quercetina respecto de la aplicación de la radiación.

En un reciente estudio comparando la actividad radiomodificadora de la quercetina y el propóleo en ratones irradiados de forma única con 4 Gy de radiación gamma¹², la administración intraperitoneal de 100 mg/kg/día de quercetina durante 3 días pre-irradiación pudo contrarrestar la leucopenia inducida por los rayos gamma, no siendo así cuando la administración se realizó durante los 3 días siguientes a la irradiación. Lamentablemente, en este estudio no se efectuaron mediciones de los valores plasmáticos de quercetina alcanzados, pero los resultados proporcionan información indirecta respecto a la importancia de definir la ventana temporal del tratamiento radiomodificador con quercetina, posiblemente relacionada no solamente con su bien definido efecto antioxidante sino también con su efecto inductor de genes de enzimas antioxidantes.

1.2 Objetivos

En base a todas las razones expuestas, parece apropiado abordar un estudio *in vivo* del efecto radiomodificador de la quercetina para contribuir a definir su potencial aplicación a la radioterapia, incluyendo como variable a considerar el intervalo de tiempo transcurrido desde la administración de radiación. Debido a los efectos deletéreos de la radiación ionizante sobre el sistema nervioso y el hígado, entre otros, es interesante llevar a cabo estudios sobre el efecto radiomodificador relativos al comportamiento y la fisiología en modelos animales, así como evaluar las posibles lesiones inducidas mediante técnicas de imagen utilizadas en radiología y radioterapia.

Por este motivo, la presente memoria de Tesis Doctoral refleja una serie de experimentos diseñados para determinar los efectos radiomodificadores de la administración intragástrica de quercetina siguiendo una serie de etapas que incluyen: 1) evaluación de las alteraciones orgánicas inducidas en los tejidos

nervioso y hepático, 2) ensayos comportamentales que evalúen los cambios en motilidad, cognición, ansiedad e ingestión de agua y alimento, así como 3) análisis de extractos de tejido hepático para evaluar la modificación de la actividad del sistema antioxidante por la irradiación experimental con rayos X en ratas Wistar macho suplementadas o no con quercetina.

1.2.1 Objetivo general

Evaluación del efecto radiomodificador, a lo largo del tiempo, de la quercetina administrada a ratas Wistar macho antes y después de la irradiación a cuerpo entero con una dosis subletal de rayos X.

1.2.2 Objetivos específicos:

1. Determinación, mediante técnicas de imagen por resonancia magnética (IRM), de las alteraciones en encéfalo y médula espinal, así como en médula ósea de los cuerpos vertebrales, inducidas en ratas Wistar macho por la irradiación experimental con rayos X a dosis subletal y evaluación de su posible reversión por la administración de quercetina.
2. Determinación de parámetros relativos al comportamiento exploratorio, cognitivo e ingestivo en ratas Wistar macho expuestas a irradiación experimental con rayos X, así como la evaluación de sus posibles alteraciones inducidas por la suplementación con quercetina.
3. Análisis del efecto de la irradiación experimental con rayos X y de la suplementación con quercetina sobre parámetros corporales, hematológicos y tisulares en ratas Wistar macho.
4. Análisis del efecto de la irradiación experimental con rayos X y de la suplementación con quercetina sobre el daño oxidativo inducido en hígado a través de la determinación de indicadores de estrés oxidativo, de la expresión de enzimas antioxidantes y de la activación del factor de transcripción Nrf2 y su inhibidor Keap1.

2 ANTECEDENTES

2.1 Radiación

2.1.1 Definición y conceptos

El término "radiación" representa en su concepción básica la transferencia de energía desde una fuente a otra. Este proceso depende de la capacidad de penetración de la onda que se transmite y de las posibilidades de propagación de la energía.

Las ondas y las partículas presentan muchas características en común, y la radiación suele producirse predominantemente en una de las dos formas. Por lo tanto, las radiaciones son formas de energía susceptibles de poder transmitirse bajo dos modalidades: radiaciones particuladas o corpusculares, constituidas por partículas como electrones, protones o neutrones, y radiaciones electromagnéticas, cuando lo que se transmite son fotones. A su vez, estas últimas pueden dividirse en ionizantes y no ionizantes.

Los efectos de la radiación sobre órganos o tejidos se deben a la transferencia de energía a través de la materia en estudio mediante la formación de átomos ionizados de naturaleza inestable en el tejido diana, generando una serie de eventos. Los efectos nocivos que se producen en los sistemas biológicos como consecuencia de estas radiaciones, pueden ser directos, debido a la interacción de la radiación con macromoléculas, o indirectos, debido a los productos liberados durante la interacción entre la radiación y el agua de los sistemas ³².

El sistema internacional de medidas para la radiación utiliza como unidad de radiación absorbida al gray (Gy), que equivale a la energía absorbida por kilogramo de sustancia irradiada. Un Gy equivale a 100 rads, unidad de medida del sistema CGS que se empezó a utilizar en 1953.

2.1.2 Tipos de Radiación

2.1.2.1 Radiaciones corpusculares

Las radiaciones corpusculares están relacionadas directamente con el movimiento de *electrones*, *protones* y *neutrones*, partículas presentes en los átomos de forma natural. Estas radiaciones son características del fenómeno de la *radioactividad*, en la que se emiten dos tipos de partículas:

- *Radiación α* : Es emitida por partículas alfa, constituidas por dos protones y dos neutrones. La principal característica es que al ser partículas muy pesadas y con doble carga positiva, interactúan con casi cualquier partícula que se encuentren, causando numerosas ionizaciones en una distancia corta. Por lo tanto, se trata de una radiación poco penetrante que podría ser detenida por barreras de poco espesor como (por ejemplo, un folio), pero, sin embargo, no son inofensivas, ya que pueden actuar en el lugar donde se depositan, ya sea por sedimentación o por inhalación.
- *Radiación β* : Es emitida por partículas beta, las cuales presentan carga negativa y una masa muy pequeña, y por ello reaccionan con menor frecuencia con la materia que las partículas alfa, pero su poder de penetración es casi 100 veces mayor, pudiendo atravesar superficies y tejidos. Podrían ser frenadas por barreras de varios metros de aire, varios centímetros de agua, o una lámina de aluminio.

2.1.2.2 Radiaciones electromagnéticas

Este tipo de radiación se caracteriza por la combinación de campos eléctricos y magnéticos que se transportan a través del espacio propagando energía entre dos lugares o incluso en el vacío, es decir que no necesitan un medio material para propagarse. La radiación electromagnética puede ordenarse en un *espectro electromagnético* que se extiende desde ondas de

frecuencias muy elevadas (correspondiendo a longitudes de onda pequeñas) hasta frecuencias muy bajas (longitudes de onda elevadas).

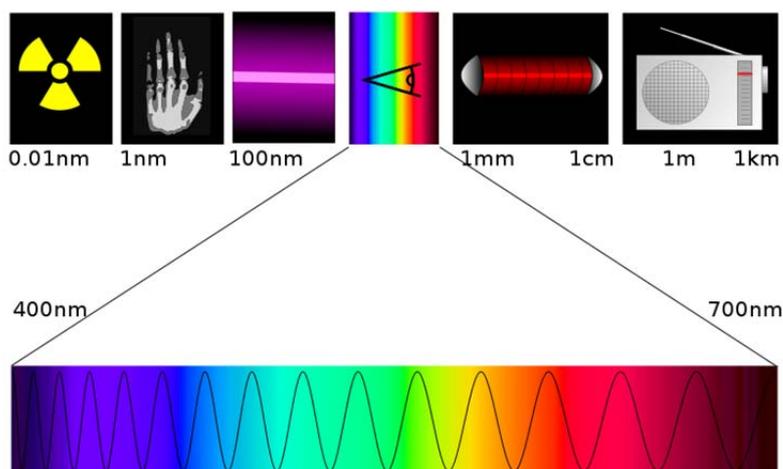


Figura 2-1. Espectro electromagnético.

Adaptado de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spectre.svg>

Por orden creciente de longitud de onda, el espectro electromagnético está compuesto por:

- Rayos gamma (γ)
- Rayos X
- Radiación ultravioleta
- Luz visible
- Rayos infrarrojos
- Microondas
- Ondas de radio o radiofrecuencias

En experimentos con sistemas biológicos y en la mayoría de las aplicaciones clínicas, las radiaciones más utilizadas son los rayos X y los rayos γ , dos formas de radiación electromagnética con propiedades similares. La principal característica de estas radiaciones es la elevada energía que poseen, y por lo tanto su gran capacidad para la expulsión de uno o más electrones

orbitales de los átomos con los que interactúa. Las radiaciones electromagnéticas se distinguen principalmente por la forma en la que se producen.

2.1.2.2.1 Rayos X

Los rayos X se originan a partir de interacciones entre electrones. Son producidos en un tubo de rayos X como producto de la desaceleración rápida de electrones muy energéticos al chocar con un blanco metálico. El cátodo es un filamento caliente de tungsteno y el ánodo es un bloque de cobre en el cual está inmerso el blanco. De esta manera la energía de los electrones es transformada en gran parte en energía térmica. Los electrones que se generan en el cátodo son enfocados hacia un punto en el blanco (normalmente con una inclinación de 45°) y como producto de la colisión se forman los rayos X.

Aunque a menudo los rayos X tienen una energía inferior a la de los rayos γ , ésta no es la principal diferencia, ya que se pueden producir rayos X con energías mucho más elevadas que la de los rayos γ procedentes de la desintegración radiactiva. Los aparatos como el betatrón se emplean para producir rayos X muy energéticos, de longitud de onda menor que la de los rayos γ emitidos por elementos naturalmente radiactivos ¹.

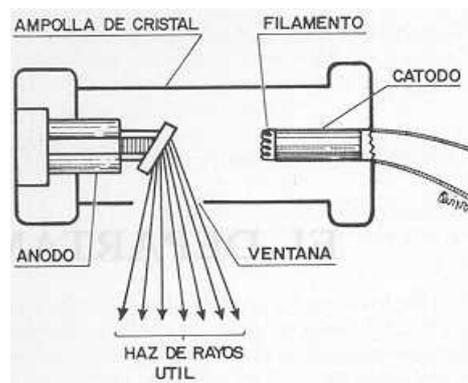


Figura 2-2. Generación de Rayos X.

Adaptado de <http://radiologiauaa.wordpress.com/>

2.1.2.2.2 Rayos γ

Los rayos γ son un tipo de radiación electromagnética formada por fotones, producida generalmente por elementos radioactivos o procesos subatómicos. Debido a su alta energía, los rayos γ constituyen un tipo de radiación ionizante capaz de penetrar en la materia más profundamente que la radiación α o la radiación β . Por la misma razón pueden causar graves daños al núcleo celular, por lo que pueden ser empleados para esterilizar equipos médicos y alimentos.

Los rayos γ no poseen carga ni masa, y por tanto su emisión no conlleva a cambios en su estructura. Cuando interactúan con la materia y colisionan con las capas externas de los átomos con los que se cruzan, provocan la pérdida de una cantidad de energía radiante, de ahí que puedan atravesar grandes distancias. Por lo tanto, se diferencian de los rayos X en su origen, debido a que estos últimos se producen a nivel extranuclear, por fenómenos de frenado electrónico ¹.

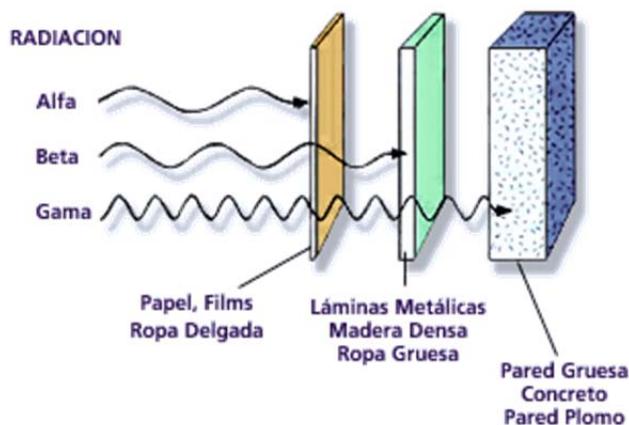


Figura 2-3. Clasificación de las radiaciones en función de su poder de penetración.

Adaptado de http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/buenos_aires/radiacion/tipos.htm

2.1.2.3 Radiaciones no ionizantes

Las radiaciones no ionizantes son aquellas radiaciones que no son capaces de extraer electrones de la materia con la que interactúan, provocando a lo sumo excitaciones electrónicas.

En esta categoría pueden destacarse las radiaciones de microondas, infrarrojas, visibles, ultravioletas y láser, caracterizadas por poseer una baja frecuencia de radiación y longitudes de onda dentro del espectro electromagnético.

2.1.2.4 Radiaciones ionizantes

La radiación ionizante, ya sea electromagnética o particulada, es aquella con energía, longitud de onda y frecuencia tales que al interactuar con un medio le transfieren energía suficiente para desligar un electrón de su átomo. En el instante en que el electrón sale desprendido, se produce un fenómeno llamado ionización. Por lo tanto, la ionización es el proceso de formación de un par de iones, el negativo o electrón liberado, y el positivo, es decir, el átomo al que se le elimina el electrón ³³.

La **radiación ionizante indirecta** es producida por partículas sin carga. El tipo más común es la radiación electromagnética (rayos X y rayos γ), que serán generados por fotones de alta energía.

La **radiación ionizante directa** consta de partículas cargadas (electrones, protones, partículas α o iones pesados), susceptibles de interactuar con la materia de manera que podrán atraer o repeler electrones de átomos y moléculas en función de sus cargas. Entre las moléculas diana de la radiación ionizante directa se encuentran el oxígeno (O_2) y el agua (H_2O).

Entre estos tipos de radiación, la que vamos a destacar y con la que nosotros hemos trabajado, es la **radiación X**.

Los *rayos X* son radiaciones electromagnéticas capaces de atravesar cuerpos opacos, y lo único que los distingue de las demás radiaciones

electromagnéticas es su elevada longitud de onda. Los rayos X se forman a partir de fenómenos extranucleares, a nivel de la órbita electrónica, fundamentalmente por desaceleración de electrones, e interaccionan con la materia a través de estos electrones.

La exposición a las dosis bajas de rayos X a las que el ser humano puede encontrarse habitualmente no es perjudicial. En cambio, la exposición a dosis elevadas de rayos X puede producir daños graves tales como quemaduras de la piel, caída del cabello, defectos de nacimiento, cáncer, retraso mental y muerte. Por tanto, la exposición a radiación ionizante puede tener resultados como la mutagénesis o la muerte celular, y las manifestaciones clínicas dependerán de las dosis administradas y del área del cuerpo afectada ³⁴.

Por lo tanto, una clasificación general de la radiación en función de su naturaleza y efectos sería la siguiente:

RADIACIONES IONIZANTES	Rayos α Rayos β Protones Neutrones	CORPUSCULARES
	Rayos X Rayos γ	ELECTROMAGNÉTICAS
RADIACIONES NO IONIZANTES	Radiofrecuencia Microondas Infrarrojos Visibles Ultravioleta	

Tabla 2-1. Clasificación de los tipos de radiación en función del tipo de energía que se transmite y de su frecuencia de radiación.

Se pueden clasificar las fuentes de emisión de radiación ionizante en naturales y artificiales. El 70% de la radiación a la que el ser humano se ve expuesto diariamente, generalmente proviene de fuentes naturales que no pueden ser evitadas. La mayor parte de estas fuentes se pueden encontrar en el aire, los alimentos, en el espacio y en la corteza terrestre, como por ejemplo

los rayos cósmicos o la lluvia radioactiva. En cuanto a las artificiales, provienen de la multiplicidad de dispositivos tecnológicos utilizados en la sociedad ya sea para aplicaciones médicas o industriales, como máquinas de rayos X, centrales nucleares y aplicaciones energéticas.

Por otra parte, la exposición a la radiación puede ser heterogénea en términos de tipo, cantidad y calidad de la dosis, dependiendo del tipo de fuente de radiación y la ubicación del sujeto irradiado.

2.1.3 Efectos generales de la radiación ionizante

La exposición total del organismo a una radiación ionizante puede causar, tanto en animales como en humanos, disfunciones orgánicas que en último término están relacionadas directamente con un aumento del estrés oxidativo debido al incremento en la producción de especies reactivas procedentes de la ionización de moléculas ³⁵.

El blanco o destino primordial de la radiación dentro de la célula es el material genético, provocando roturas en la doble cadena de ADN, las cuales, si no se reparan, supondrán en último término la pérdida celular. Entre otros, también aparecen cambios a nivel de las vías de transducción de señales, y alteraciones en las mitocondrias, en el proceso de apoptosis y en el ciclo celular. Parte de estos cambios se producen tanto en respuesta al daño en el ADN, como en mitocondrias y membranas celulares, que también desembocan en la destrucción celular ³⁶.

Por lo tanto, los daños que se originan estarán relacionados con la sensibilidad de las células expuestas, pudiéndose diferenciar otros síndromes secundarios relacionados con el síndrome de radiación aguda (ARS, *Acute Radiation Syndrome*), que trataremos más adelante ³⁷.

A nivel del SNC, las lesiones se centran en el cerebro y en la médula espinal, situación que podría tener importantes consecuencias clínicas. Estudios de investigación han demostrado la aparición de cambios transitorios rápidos y frecuentes, inducidos por la radiación, en el comportamiento tanto de

roedores como de humanos expuestos a dosis efectivas comprendidas entre 3 y 7 Gy³⁸.

Existe una gran cantidad de evidencias de que la respuesta del SNC tras la radioterapia sigue un proceso de interacción continuo y dinámico³⁹. Debido a su localización anatómica, el SNC se ve afectado por la dosis de radiación en el tratamiento de tumores localizados en la cabeza, cuello, fracción torácica y parte superior abdominal³⁹. En el caso de las ratas, disminuía la aversión al gusto condicionada después de 3 días tras una exposición a una dosis de 3 Gy de protones⁴⁰, y la actividad locomotora disminuía tras dos semanas de una exposición con protones a una dosis de 4 Gy⁷. En la radioterapia en humanos, se ha encontrado disfunción cognitiva transcurridas tan sólo unas horas después de la exposición a una dosis de radiación igual o menor a 10 Gy⁷.

Los efectos biológicos como consecuencia de una radiación ionizante están atribuidos a cambios químicos inducidos en las moléculas, debido a una absorción de energía. La exposición de tejidos a una radiación con suficiente energía, provoca la ionización de moléculas y por tanto un aumento en la formación de especies reactivas caracterizadas por contener uno o más electrones desapareados en su orbital atómico más externo. Estas especies alteradas químicamente se conocen como *radicales libres*, y son lo suficientemente reactivas como para cambiar la estructura y alterar la función de las moléculas biológicas que se encuentren en sus proximidades⁴¹.

Cuando este grupo de radicales se superpone sobre la hélice de ADN las hebras serán dañadas, provocando dobles roturas que serán altamente citotóxicas y que estarán relacionadas con alteraciones en la función y muerte celular, como efectos de la radiación ionizante. Estas lesiones en el ADN resultantes de la radiación ionizante tienen lugar en un periodo de 10 ms^{42,43}.

Por lo tanto, es obvio el gran interés en la búsqueda de agentes protectores contra los daños moleculares debidos a la radiación ionizante, y en concreto en lo referente a las moléculas que puedan reducir las lesiones del ADN debido a los *clusters*, ya que este daño podría dar lugar a la aparición de cáncer⁴¹.

En resumen, las consecuencias fisiopatológicas de la radiación se centran en un mal funcionamiento celular debido a la formación de especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno (EROs y ERNs), que se originan cuando la radiación ionizante penetra en los tejidos vivos. El resultado final será la disfunción y eventual muerte celular, ya que interactúan con macromoléculas de vital importancia como son el ADN, proteínas o componentes de las membranas celulares ^{36,44,45}.

Sin embargo, los efectos directos e indirectos de la radiación inician asimismo una serie de vías de señalización bioquímicas que podrían reparar los daños producidos, o culminar en constantes cambios fisiológicos, o llegar a la muerte celular ⁴⁶.

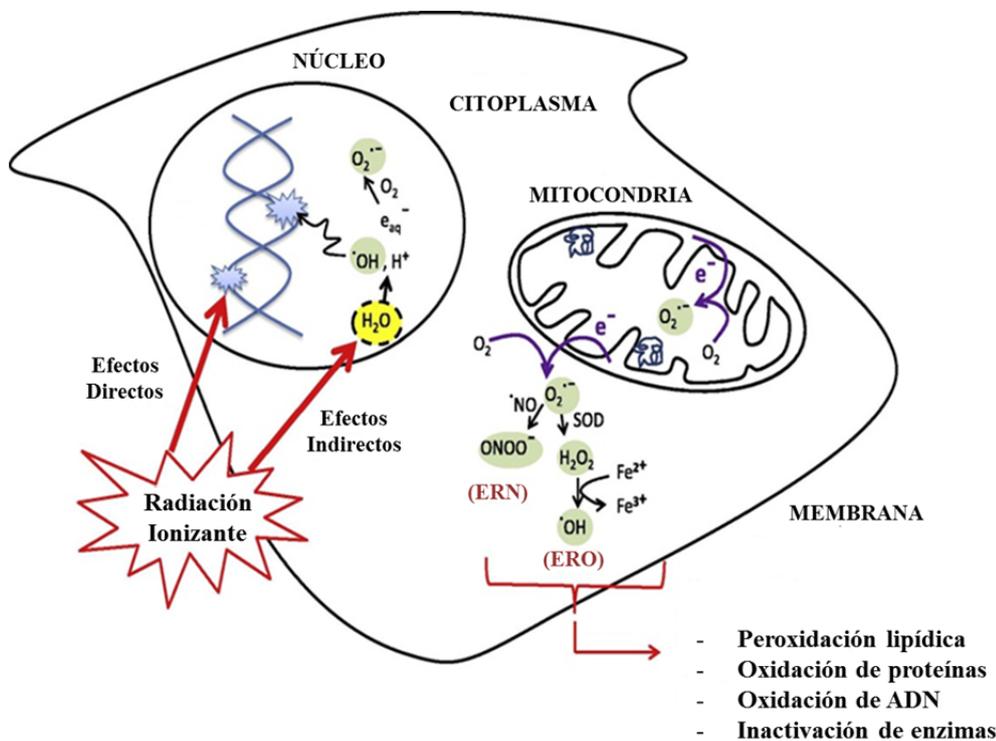


Figura 2-4. Efectos directos e indirectos de la radiación ionizante sobre macromoléculas.

Imagen modificada de Azzam y cols. ⁴⁷

La absorción de radiación ionizante a través de las células vivas altera de una forma directa las estructuras atómicas, provocando cambios químicos y biológicos; de forma indirecta, a través de la radiólisis del agua celular, la generación de especies químicas reactivas mediante la estimulación de

oxidasas y de la óxido nítrico sintasa. La radiación ionizante también podría afectar a las funciones mitocondriales de una manera significativa, contribuyendo así a las alteraciones en lípidos, proteínas, ADN nuclear y ADN mitocondrial (Figura 2-4) ⁴⁸.

Se cree que las modificaciones bioquímicas tempranas que ocurren a lo largo de un corto periodo de tiempo desde la exposición, son las responsables de la mayoría de los efectos de la radiación ionizante en células de mamíferos. Sin embargo, las consecuencias de los cambios oxidativos podrían comenzar a aparecer durante días o incluso meses después de la exposición inicial a la radiación debido a la continua generación de EROs y ERNs ⁴⁹.

2.1.3.1 Efectos a corto plazo

Los efectos agudos de la exposición a radiación ionizante principalmente incluyen la supresión inmune, disminución de células hematopoyéticas, daño en las mucosas, e importantes daños potenciales a nivel de pulmón, hígado, riñones y sistema nervioso central, que serán considerados más adelante ⁵⁰.

El hígado juega un papel esencial en la radiosensibilidad, y como consecuencia de su estructura funcional es capaz de soportar elevadas dosis de radiación, siempre y cuando se trate de una radiación parcial. De lo contrario, la irradiación total del órgano dará lugar a un fallo en los hepatocitos y a otras enfermedades relacionadas (RILD, "*Radiation Induced Liver Disease*"), como podría ser la hepatitis ⁴⁵.

2.1.3.2 Efectos a largo plazo

De manera general, los efectos biológicos de una exposición a radiación que más preocupan a la sociedad son los posibles daños genéticos y la aparición de cáncer. En el caso de daño genético en seres humanos, no se ha demostrado ningún caso de enfermedad hereditaria causada por una exposición a radiación. Por el contrario, en el caso de cáncer se ha comprobado la aparición de ciertos tipos de esta enfermedad, algunos años después de la irradiación con dosis altas, superiores a los 100 rads (10 Gy). Se

podría pensar que los efectos tardíos producidos por dosis bajas de radiación se conocen bien, ya que un alto porcentaje de individuos están continuamente expuestos a estas fuentes naturales. Sin embargo, los efectos causados por dosis inferiores a 0,1 Gy son imposibles de diferenciar de las frecuencias espontáneas o de las que son originadas por factores químicos o virales. Esta falta de conocimiento ocasiona que la sociedad reciba una información incompleta, e incluso errónea.

Los daños celulares generados podrían adquirírselos las células vecinas, y por tanto aparecen también en la progenie. Existe una amplia evidencia que la exposición de poblaciones celulares a radiaciones ionizantes, va a suponer importantes cambios biológicos tanto en las células radiadas como en vecinas no radiadas, lo cual pasará a siguientes generaciones ⁵¹⁻⁵³.

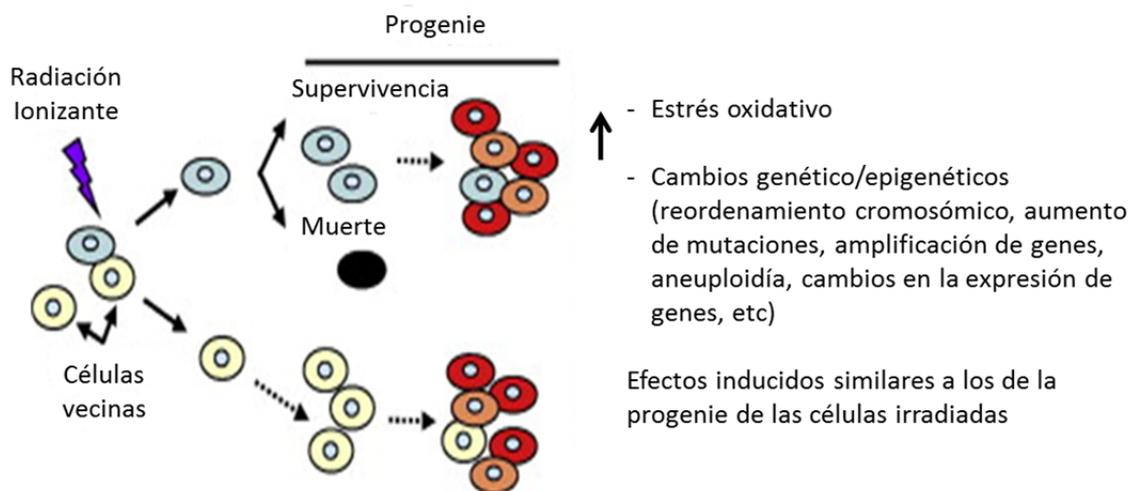


Figura 2-5. Efectos de la radiación ionizante.

Adaptado de Azzam y cols. ⁴⁷

La radiación ionizante induce efectos tanto en las células a las que puede ir dirigida como en las células circundantes. Tras la exposición a la radiación la comunicación de moléculas inductoras de estrés desde las células irradiadas propaga los efectos, entre ellos el estrés oxidativo, a las células vecinas y a su

progenie. Los efectos inducidos de este modo podrían ser de naturaleza similar a los observados en la progenie de células irradiadas (Figura 2-5)⁴⁸.

Los cambios a largo plazo de la radiación incluyen disfunción, fibrosis y cáncer en un amplio rango de órganos y tejidos. Los recuentos sanguíneos pueden ayudar a gestionar el proceso de toma de decisiones desde el punto de vista clínico. El síndrome hematopoyético es significativamente importante frente a exposiciones parciales o totales del cuerpo, en una dosis superior a 1 Gy. La irradiación de las células madre de médula ósea y de sus células progenitoras, supone un aumento exponencial en la muerte celular. Tras una dosis de radiación ionizante total de 2 o 3 Gy, los progenitores hematopoyéticos presentan una capacidad limitada para dividirse durante el proceso mitótico³⁶.

Después de esta exposición podría darse una decadencia hematológica pudiendo dar lugar a predisposición a la infección, sangrado y dificultad en la cicatrización de heridas, entre otros. Otro de los fenómenos que se produce tras la radiación es la disminución del recuento linfocitario. En un estudio realizado en nuestro laboratorio sobre ratas, se comprobó que se produce una disminución del 50% en el recuento absoluto de linfocitos durante las primeras 24 horas tras la radiación con 6 Gy, seguido por un descenso aún más acusado durante las siguientes 48 horas¹⁰.

2.1.4 Efectos específicos de la radiación ionizante

En el caso de los tejidos, las células maduras que no están en división son relativamente radiorresistentes, pero las que se dividen dentro de un tejido son radiosensibles, por lo que la irradiación intensa puede matar un número suficiente de células para que el tejido se atrofie. La rapidez de esta atrofia depende de la dinámica de la población celular dentro del tejido afectado, es decir, en órganos caracterizados por un recambio celular lento, como el hígado y el endotelio vascular, el proceso es típicamente mucho más lento que en órganos caracterizados por un recambio celular rápido, como la médula ósea, la epidermis y la mucosa intestinal. Por otra parte, también influye el volumen de tejido irradiado ya que si es bastante pequeño, o si la dosis se acumula con

la lentitud suficiente, la gravedad de la lesión puede reducirse notablemente por la proliferación compensatoria de las células supervivientes⁵⁴. Se ha comprobado que la exposición a dosis bajas de radiación ionizante causa una mayor cantidad de estrés oxidativo que durante los procesos metabólicos normales del organismo⁵⁵.

Cuando la radiación ionizante penetra en los tejidos vivos, se genera un gran número de radicales libres reactivos, que pueden reaccionar con macromoléculas de vital importancia como es el ADN, proteínas o componentes de membrana, dando como resultado final un daño celular, disfunción y muerte. El daño en el ADN es el factor más importante en la muerte celular⁴⁴.

La radiación γ puede ser absorbida directamente por el ADN, provocando la ionización de pares de bases y de la glucosa, en un mecanismo descrito como efectos directos de la formación de daños simples y en tándem en el ADN. También pueden inducirse lesiones en el ADN de tipo de entrecruzamientos o roturas, los cuales, si no se reparan de manera correcta, podrán ser las lesiones más importantes en la inducción de anomalías cromosómicas, mutaciones en genes y cáncer.

Sin embargo, se estima que aproximadamente un 65% de los daños en el ADN se debe a los efectos indirectos procedentes de la formación de radicales libres, como los radicales OH^\cdot , que se generan a partir de la radiólisis de las moléculas de agua que se encuentran alrededor, y que posteriormente atacarán al ADN. Los daños en el ADN se acompañan de alteraciones en la división celular, muerte celular, depleción del "pool" de células, disfunción de los sistemas, y, siempre que la dosis de radiación sea alta, el organismo podría morir⁵⁶.

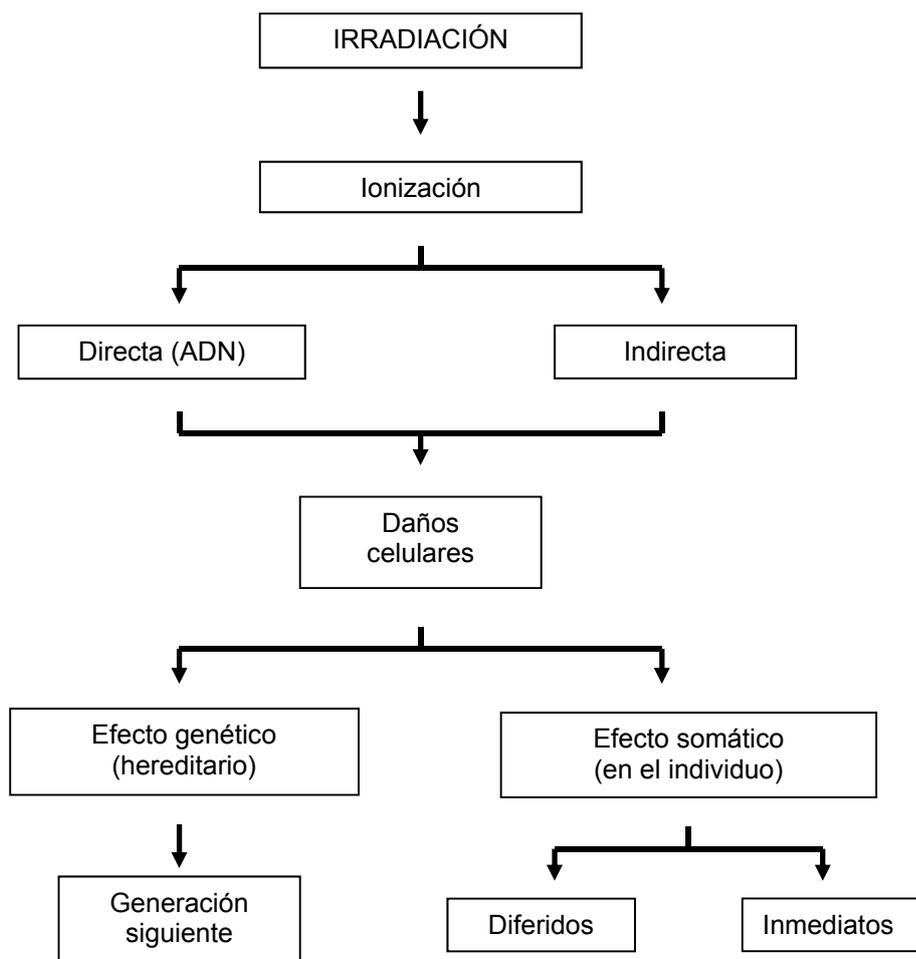


Figura 2-6. Efectos biológicos directos e indirectos más frecuentes de la radiación ionizante

Aunque las células y los tejidos poseen sistemas endógenos capaces de la detoxificación y eliminación de productos procedentes de la radiólisis del agua, al aumentar las EROs tras la exposición a irradiación, estos sistemas endógenos no son capaces de proteger a las células de los efectos tan peligrosos que provocan los radicales libres. Finalmente, tanto dosis de radiación altas como bajas son susceptibles de provocar efectos a largo plazo como disfunción y fibrosis en un amplio rango de órganos y tejidos, pudiendo desembocar en cáncer ⁵⁷.

2.1.4.1 Alteraciones sobre el hígado

El hígado es el segundo órgano más grande del organismo y desempeña un papel clave en las diferentes funciones metabólicas y de síntesis. Su

funcionamiento es esencial para la vida del organismo por sus importantes funciones de eliminación de productos tóxicos, síntesis y almacenamiento de nutrientes y su participación en la digestión de alimentos por la producción de bilis.

El hígado es un órgano muy importante en cuanto a los efectos biológicos de la radiación. Como consecuencia de su estructura funcional y de otras características, el hígado es capaz de hacer frente a altas dosis de radiación, siempre y cuando se trate de una irradiación parcial. De lo contrario la irradiación total del órgano conducirá a una insuficiencia hepatocitaria, y finalmente a la inducción de enfermedades como la hepatitis⁵⁰.

Aparte de los daños genéticos, la peroxidación lipídica también es considerada uno de los eventos inducidos por la radiación ionizante. Esta peroxidación se ha visto que aumenta en las mitocondrias del tejido hepático conforme lo hace la dosis de radiación administrada⁵⁸. Los daños más característicos que aparecen se localizan a nivel de las membranas celulares, y supondrán una inactivación de proteínas o la generación de daños en el ADN que pueden conducir posteriormente a la muerte celular.

2.1.4.2 Alteraciones del comportamiento y el aprendizaje

La circunvolución dentada o giro dentado (*gyrus dentatus*) del hipocampo es una de las regiones del cerebro de los mamíferos que continúa produciendo neuronas en edad adulta. Dentro del hipocampo, las funciones relativas a la memoria están asociadas con las principales células que participan en su formación: células piramidales y células granulares del giro dentado. Las células granulares de nueva formación se producen a partir de células madre o precursoras de neuronas que son mitóticamente activas en la zona subgranular. Esta producción de nuevas células se presenta en el mamífero adulto⁵⁹.

Por lo tanto, el hipocampo se considera un lugar importante para la neurogénesis, y hay estudios que demuestran que este proceso disminuye tras la irradiación tanto en ratas como en ratones⁶⁰. La exposición neuronal a la

radiación podría inducir un amplio rango de consecuencias funcionales, incluido el deterioro cognitivo. Aunque la patogenia de esta disfunción no es clara, se indica que las células precursoras de las neuronas del hipocampo podrían estar relacionadas.

Cualquier agente que dañe estas células precursoras, como la radiación ionizante, puede tener un importante impacto sobre la neurogénesis y sobre las funciones cognitivas específicas asociadas con el hipocampo. La radiación ionizante será capaz de generar radicales libres y especies reactivas de oxígeno en las células, rompiendo el balance vital del organismo entre agentes oxidantes y antioxidantes⁶¹. El aumento de la susceptibilidad al estrés oxidativo como efecto a largo plazo, y la respuesta inflamatoria son factores que contribuyen a los déficits neuroquímicos y conductuales que se verán reflejados en el proceso normal de envejecimiento, así como en la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

El grupo de trabajo de Manda, en 2008, realizó un estudio en ratones a los que se les sometía a una exposición a radiación ionizante de 1,5 Gy. Se observó una disminución de la memoria espacial y un aumento significativo del estrés oxidativo a nivel del cerebelo y del córtex frontal de los ratones irradiados, frente a los ratones control que no recibían radiación⁵⁹.

La mayoría de los cambios sobre el comportamiento inducidos por radiación aparecen rápidamente y suelen ser transitorios. Por ejemplo, en el ser humano aparecen síntomas de fatiga y debilidad tras una exposición a rayos X de dosis baja (1 Gy). Sin embargo, un día después de la exposición a una dosis de 5 Gy aparecen problemas a nivel de memoria y desorientación en el aprendizaje. En el caso de pacientes sometidos a radioterapia, bajo unas dosis de 10 Gy, las funciones cognitivas se degradan en un periodo de horas⁷.

El papel del cerebelo en el aprendizaje espacial también ha sido estudiado en modelos animales genética y no genéticamente lesionados, sometidos a la prueba de Morris para el estudio de las posibles alteraciones de su capacidad de memoria y aprendizaje. Los grupos experimentales del trabajo se dividían en: a) ratas con genes mutados, b) ratas con lesión a nivel de la

corteza cerebral o del núcleo dentado, y c) ratas a las que se eliminó un número determinado de células de Purkinje, confirmando finalmente la hipótesis de que cualquier daño en el cerebelo puede causar un déficit cognitivo independientemente del control motor. Los resultados de las ratas con lesión cerebral también confirman las alteraciones a nivel de memoria y del aprendizaje frente a este tipo de laberintos. Además, estos resultados relacionan los problemas de aprendizaje en ratas y ratones con las deficiencias en las funciones visual-espaciales en pacientes con atrofia cerebelosa. El déficit espacial puede estar atribuido a la alteración de la actividad metabólica relacionada con las vías cerebelosas⁶².

2.1.4.3 Alteraciones sobre parámetros sanguíneos

La médula ósea es un tejido ubicado en el interior de los huesos y se encarga de producir las células sanguíneas, tanto eritrocitos como leucocitos. La mayoría de los pacientes con cáncer reciben radioterapia que en ocasiones podrá tener efectos secundarios como es el síndrome de la insuficiencia de la médula ósea, como consecuencia de la irradiación de tejidos normales⁶³.

Las células hematopoyéticas de la médula ósea tienen una gran sensibilidad a la radiación y su depleción con una dosis baja es suficiente para causar granulocitopenia y trombocitopenia en un periodo de tres a cinco semanas. Si la dosis es mayor, estas disminuciones en el recuento de granulocitos y plaquetas pueden ser lo bastante graves para originar hemorragia o una infección mortal⁵⁵.

El sistema hematopoyético es uno de los órganos más sensibles a la radiación debido a su alto nivel de renovación celular. Una dosis baja de radiación aguda puede afectar y suprimir las células. Existe una relación entre la dosis y la circulación de células hematopoyéticas, inducida por la exposición a la radiación ionizante, ya que se produce una reducción en la producción y distribución de células por parte de la médula ósea, y un aumento en la apoptosis de las células maduras⁶⁴⁻⁶⁷.

Una dosis de radiación ionizante superior a 1 Gy en los seres humanos, supone un importante riesgo para la médula ósea y el sistema hematopoyético, y con el tiempo provocará alteraciones sobre la función inmune, un aumento de la susceptibilidad a la infección y variaciones sobre el proceso hemorrágico a nivel interno y externo. Por lo tanto, debido a este daño en las células progenitoras se va a dar un descenso tanto de glóbulos rojos nuevos como de glóbulos blancos, lo cual podremos apreciar unas semanas después de la exposición a radiación. El descenso en el número de plaquetas impedirá la coagulación sanguínea y en estas condiciones cualquier hemorragia podría resultar fatal. La escasez de células sanguíneas puede provocar como resultado final la muerte del individuo⁶⁸. La disminución en el recuento de plaquetas se dará por lo general de 5-10 días después de la exposición a una dosis de radiación ionizante leve o moderada. La duración de la trombocitopenia se relaciona directamente con la dosis de radiación ionizante y la utilización de plaquetas en los sitios de sangrado activo⁶⁹.

En un trabajo previo realizado por nuestro equipo en ratas observamos que tras la exposición a rayos X (6 Gy) se produce un descenso en el número de leucocitos durante las 6, 24, 48 horas y 16 días, sin embargo el descenso en el número de glóbulos rojos y plaquetas solamente se produce a los 16 días post-irradiación. La ingestión *ad libitum* de mosto de uva, durante una semana antes y 2 semanas después de la radiación, con rayos X indujo un aumento tanto de leucocitos como de eritrocitos¹⁰.

Cuando se observa el daño agudo causado por radiación en sangre periférica, manifestado por alteraciones en el recuento sanguíneo, se debe aislar a la persona irradiada para evitar infecciones, en caso necesario transfundir plaquetas y, para casos severos, el único tratamiento posible será el trasplante de médula ósea.

En un estudio realizado en el que la dosis de radiación gamma era de 2 a 4 Gy, se obtuvieron resultados relacionados con un aumento de concentración plasmática de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el grupo de ratas irradiadas, mientras que la cantidad sérica de albúmina,

globulinas totales o lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuían significativamente respecto al grupo control de ratas sin irradiar ⁷⁰.

Otros trabajos han estudiado la variación de determinados marcadores biológicos en función del tipo y la dosis de radiación administrada. En un estudio realizado en ratas sometidas a una dosis de radiación gamma de 6 Gy, se llegó a la conclusión de que parámetros como el peso corporal, el índice de glóbulos rojos y blancos, la concentración de hemoglobina, el porcentaje de hematocrito o el porcentaje de glutatión reducido (GSH), disminuían significativamente en las ratas irradiadas respecto a las ratas control ⁷¹.

2.1.4.4 Efectos cancerígenos

El potencial carcinogénico de la radiación ionizante fue reconocido poco después del descubrimiento de los rayos X por Roentgen en 1895. La primera constatación de la aparición de cáncer de piel fue publicada en 1902 y el primer caso de leucemia en trabajadores expuestos a la radiación fue informado en 1911, debido a las altas dosis de radiación a las que eran expuestos ⁷².

Tanto los tumores benignos como los malignos inducidos por la radiación no tienen ningún rasgo que les diferencie de los producidos por otras causas, y se caracterizan porque tardan mucho tiempo en manifestarse. Es más, el origen de estos tumores tiene lugar tras exposiciones a unas dosis de radiación relativamente alta, dependiendo a su vez, tanto del tipo de neoplasia originada, como el sexo o la edad de las personas expuestas.

Los efectos cancerígenos de la radiación y sus mecanismos moleculares no se conocen con exactitud, aunque se piensa que pueden ser parecidos a los de los compuestos químicos. Se sabe que en la mayoría de los casos se puede incluir activación de oncogenes y/o activación de genes supresores de tumores, aunque como ya hemos dicho ello dependerá de las condiciones en las que se da la exposición ⁷³.

2.1.5 Síndrome de radiación aguda (ARS)

El síndrome de radiación aguda (*acute radiation syndrome*, ARS), también conocido como enfermedad por radiación, es causado por la exposición de un cuerpo a una dosis alta de radiación ionizante en un corto periodo de tiempo. El tiempo que tarda en aparecer este síndrome depende de la dosis recibida, pero incluso a dosis muy bajas es capaz de causar enfermedad en cuestión de horas o días ⁷⁴.

Como ya hemos comentado, los daños que se originan estarán relacionados con la sensibilidad de las células expuestas, pudiéndose diferenciar al menos tres síndromes relacionados con el ARS: síndrome hematopoyético, síndrome gastrointestinal y síndrome neurovascular ^{36,37,75}.

Este síndrome se desarrolla después de la irradiación total o parcial de un cuerpo a una dosis relativamente alta (por encima de 1 Gy en los seres humanos). Las lesiones de tejidos normales inducidas por la radiación ionizante varían en función del órgano diana y del tipo de células. Entre los órganos y células con alta sensibilidad a la radiación destacamos la piel, el sistema hematopoyético, el intestino, las células germinales y el sistema vascular.

La exposición a radiaciones ionizantes causa daños al ADN, proteínas y lípidos en células de mamíferos, así como una mayor generación de EROs en mitocondrias. Esto conlleva la alteración de procesos como la detención del ciclo celular, la apoptosis, y el origen de respuestas relacionadas con el estrés oxidativo. Las roturas en el ADN de doble cadena son una lesión primaria letal inducida por este tipo de radiación. La respuesta celular al daño es compleja y se basa en la activación simultánea de un número de redes de señalización ⁷⁶.

La exposición a radiación aguda en un rango entre 1 y 8 Gy conduce a una disminución en el número de células sanguíneas ⁷⁷. En la franja más elevada de este rango, el recuento continúa disminuyendo debido a la desaparición de la médula ósea y sus células madre/progenitoras. Las células sanguíneas también disminuyen de número con dosis más bajas, hasta que las células precursoras sobrevivientes proliferan para restablecer la homeostasis.

Durante este período de disminución de las células de la médula ósea, los seres vivos presentan un mayor riesgo frente a infecciones y hemorragias ⁷⁸.

En comparación con el síndrome hematopoyético, el síndrome gastrointestinal es inducido por una dosis de irradiación superior. En este caso la barrera gastrointestinal estará dañada a causa de deshidratación y aumento de bacterias, debido a las grandes cantidades de agua y electrolitos perdidos del cuerpo. Esta infección oportunista puede traducirse en sepsis, la principal causa de mortalidad durante las primeras fases de la radiación inducida por el síndrome hematopoyético, debido a un bajo recuento de neutrófilos y un aumento de la translocación bacteriana a través de la mucosa gastrointestinal. Esto puede complicarse por la existencia de trombocitopenia y la hemorragia resultante, así como los fallos del sistema inmunológico que resultan de la apoptosis de los linfocitos y linfopoyesis disminuida ⁶⁴.

Además de las intervenciones terapéuticas y de diagnóstico, la exposición a dosis subletales de radiación para la población también puede darse en situaciones como accidentes radiológicos o ataques terroristas ^{79,80}.

Dependiendo de la exposición, el área y la dosis recibida, la exposición a radiación va suponer una serie de efectos nocivos, incluyendo ARS, en el periodo inmediatamente posterior a la radiación ⁸¹. En resumen, el ARS se define perfectamente en función de la dosis de radiación que va a afectar a órganos y principalmente a tejidos que contienen células que proliferan rápidamente ^{36,82}.

2.1.6 Aplicaciones de la radiación: Radioterapia

Las aplicaciones de las radiaciones ionizantes pueden englobarse en dos campos: en el ámbito industrial, para producción de energía, conocer la composición de determinados materiales o para la esterilización de alimentos, y en el ámbito médico para estudios diagnósticos así como investigación de las funciones normales y patológicas del organismo (radiología, radioterapia y medicina nuclear).

Las diferencias en el comportamiento y en la biología de determinadas especies en relación con los seres humanos, son factores que inevitablemente afectan al tiempo de exposición, así como al umbral de la dosis aplicada. Por otra parte, la distribución de dosis en el tiempo (dependiendo del tipo de radiación) también puede ser diferente, y por lo tanto se debe tener en cuenta las posibles implicaciones y limitaciones que deben considerarse a la hora de extrapolar las técnicas a los seres humanos ⁸³.

También es necesario el desarrollo de nuevos fármacos y metodologías para el estudio de tratamientos que presenten una amplia gama de posibilidades, y poco a poco poder conocer las lesiones inducidas por la radiación. De la misma manera, existe la necesidad de desarrollar métodos rápidos y precisos para guiar las decisiones clínicas de los tratamientos, y para saber la cantidad exacta de radiación que hay que aplicar a los individuos ^{83,84}.

La elección de modelos animales adecuados, así como de un número suficiente de animales para la experimentación, supone un factor limitante a la hora del desarrollo de agentes radioprotectores y terapéuticos mejorados que contribuyan a prevenir las lesiones provocadas por la radiación.

El desarrollo de modelos animales para la evaluación de este daño causado por la radiación, debe considerar los efectos de la edad, el género, la supresión inmune, y la aparición de infecciones y lesiones combinadas. Muchos autores han administrado vía intraperitoneal las sustancias utilizadas para el tratamiento, ya que es un procedimiento muy sencillo y la exposición al compuesto se maximiza. Sin embargo, es probable que sólo sean aceptables las administraciones por vía oral, subcutánea e intramuscular para la dosificación humana. En el ratón comúnmente se prefiere la administración vía subcutánea, debido a la falta de puntos de inyección intramuscular, mientras que en primates no humanos la vía intramuscular es más fácil de acceder ⁸⁵.

El principio básico de la radioterapia es causar suficiente daño a las células cancerosas como para provocar su muerte, y a la vez que los tejidos sanos sufran el menor daño posible. Sin embargo, la radiación causa daños inevitables a las células normales debido a efectos secundarios adversos. El

grado de estos efectos secundarios dependerá de la dosis de radiación ionizante aplicada y de la sensibilidad de los órganos irradiados⁸⁵. Por otra parte, el uso de radiación de partículas cargadas para tratar el cáncer y las enfermedades no malignas del sistema nervioso central representa una necesidad adicional para la comprensión de las consecuencias del comportamiento de la exposición a la radiación^{39,86}.

Por lo tanto, los efectos de la radiación ionizante sobre individuos sanos, depende de la tasa y de la dosis total de radiación a la que han sido expuestos. Como habíamos indicado, una dosis alta en general es perjudicial para el organismo, pudiendo provocar apoptosis, daños en el ADN y transformación de células sanas en células cancerosas. Sin embargo, una exposición a bajas dosis de rayos X o radiación γ (menor a 0.2 Gy), puede llegar a ser beneficioso para organismos vivos y se manifiesta mediante un aumento en la respuesta adaptativa, estimulación de las funciones inmunológicas, la prevención y cura de enfermedades y en general una prolongación de la vida⁸⁷. La prevención o el tratamiento con radioterapia, mejora la calidad de vida e incrementa la posibilidad de curación del cáncer mediante la intensificación de las terapias.

En resumen, estos numerosos usos de la radiación ionizante y de los materiales radiactivos pueden ayudar a la sociedad de múltiples maneras. Pero siempre se deben sopesar los beneficios de cada uso con sus riesgos, de manera que los beneficios siempre deben superar a los riesgos cuando se trate de utilizar la radiación ionizante³⁴.

2.2 Comportamiento y aprendizaje animal

2.2.1 Introducción

El comportamiento animal puede definirse como el “conjunto de procesos observables por medio de los cuales un animal responde a los cambios percibidos del estado interno de su cuerpo o de su entorno”⁸⁸. El término inglés *behaviour* (o *behavior* en su variante americana) denota en español los dos conceptos de comportamiento y conducta. Esta duplicidad ha motivado la existencia de controversias acerca del significado de ambos términos, que en

muchos casos se utilizan indistintamente, si bien al hablar de conducta podríamos en psicología humana estar refiriéndonos a un determinado conjunto de comportamientos ^{89,90}.

En la presente memoria utilizaremos exclusivamente el término comportamiento.

Denominamos aprendizaje a los procesos de adquisición, mantenimiento y cambio del comportamiento de un animal como resultado de las experiencias a lo largo de su vida ⁹¹.

El análisis experimental del comportamiento intenta controlar y alterar los factores que afectan al comportamiento a fin de comprender la regulación del mismo. Su aplicación se basa en un enfoque integral cuyo principal objetivo es el descubrimiento de los principios que gobiernan el comportamiento, y así poder controlar los factores que lo determinan.

En el caso del análisis del comportamiento es importante tener en cuenta las relaciones de éste con el medio ambiente, y así poder estudiar cómo el organismo modifica su comportamiento para satisfacer las demandas. Se denomina condicionamiento al aprendizaje de nuevas formas de comportamiento que surgen en un animal ante los cambios que se producen en su entorno ⁹².

La principal función del sistema nervioso es la integración de señales aferentes para posibilitar la emisión de señales eferentes que expresen finalmente los diferentes comportamientos del animal. Por lo tanto, el principal objetivo de los trabajos de neurociencia que estudian el comportamiento de animales de laboratorio es la comprensión del cómo los procesos moleculares del sistema nervioso han llegado a originar un determinado comportamiento, y de cómo los cambios en estos procesos pueden llegar a originar diferencias en el comportamiento.

Con el objeto de limitar el ámbito de esta introducción al análisis experimental del comportamiento, los tipos de comportamiento analizados en la rata en la presente memoria han sido dos: a) comportamiento motor, esto es, la

actividad general locomotora y exploratoria, y b) comportamiento cognitivo, relacionado con la memoria y el aprendizaje.

Diferentes estudios han demostrado que el comportamiento cognitivo y motor en la rata de laboratorio son esenciales para la supervivencia. La rata es un excelente modelo para el estudio del comportamiento y de las estructuras cerebrales que rigen el aprendizaje ⁹².

El aprendizaje es un mecanismo que permite la adaptación del comportamiento a los cambios temporales del medio ambiente de forma flexible y rápida. Sin embargo, existen restricciones específicas de la especie con relación a las capacidades de aprendizaje. Una de estas restricciones está relacionada con los estímulos que el animal puede percibir. Los estudios demuestran que ciertos estímulos provocan un determinado comportamiento en la especie, incluso sin la existencia de experiencia previa ⁹³.

El conocimiento de la neurobiología del aprendizaje y de la memoria ha sido de gran interés y objeto de muchos estudios desde hace ya varias décadas. Por lo general se suele dividir el aprendizaje en asociativo y observacional. En los últimos años se han realizado grandes avances en los estudios sobre las bases neuronales del aprendizaje asociativo, aunque sigue habiendo muchas dudas. Aprendizaje y memoria son dos procesos muy relacionados entre sí, y además presentes en muchos otros mecanismos cerebrales, pudiendo originar cambios adaptativos en el comportamiento de los organismos. Cuanto más irregular y cambiante es el entorno que rodea al animal más plástico debe ser el comportamiento, de manera que cuanto más capacidad de plasticidad y cambio tenga el sistema nervioso de un organismo, más posibilidad de aprendizaje tendrá. Esta plasticidad es reflejo a su vez de la que caracteriza a las neuronas y al sistema nervioso de los organismos. Por tanto, el aprendizaje puede considerarse como un cambio en el sistema nervioso que resulta de la experiencia y que origina cambios duraderos en la conducta de los organismos ⁹⁴.

2.2.2 Estructuras encefálicas relacionadas con el aprendizaje

Existe acuerdo en que el soporte principal de la memoria como base para el aprendizaje y la manifestación del comportamiento cognitivo se encuentra en tres lugares clave localizados en el diencefalo: hipocampo, corteza prefrontal y corteza retrosplenial⁹⁵. La mayoría de las publicaciones que describen el papel del diencefalo medial en la memoria resaltan la importancia de las aferencias que llegan a esta región, procedentes del hipocampo.

En esta introducción destacaremos a continuación aquellas estructuras neurales asociadas al comportamiento cognitivo, como son la corteza retrosplenial y el hipocampo⁹⁶, junto con estructuras más relacionadas con el comportamiento motor, como el cerebelo y los ganglios basales, en particular el núcleo estriado⁹⁷.

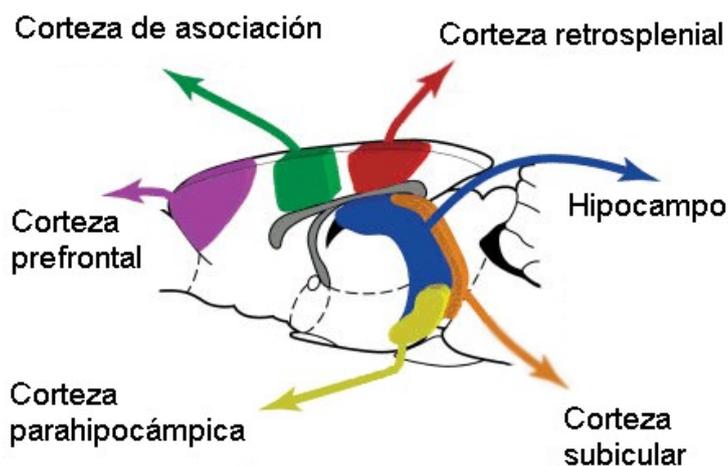


Figura 2-7. Regiones del encéfalo de la ratona implicadas en el aprendizaje cognitivo.

Adaptado de Vann y cols.⁹⁵.

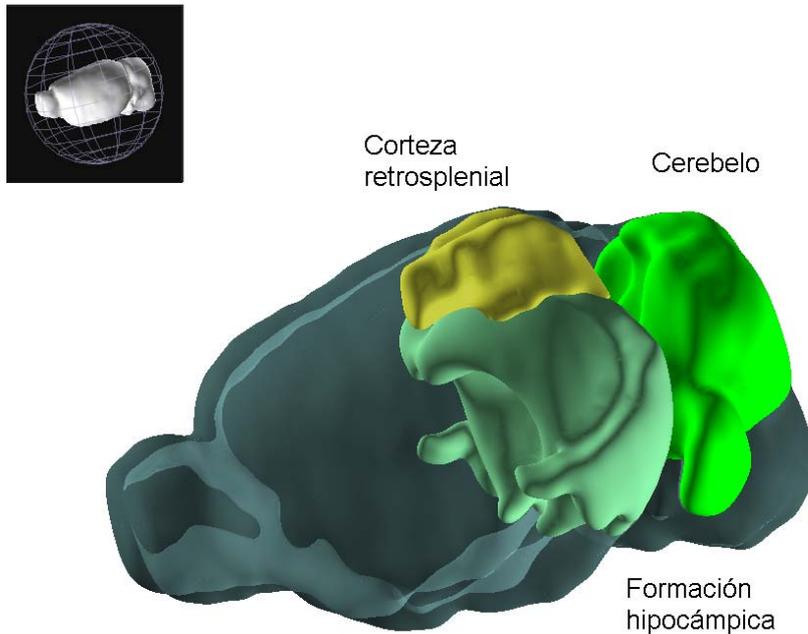


Figura 2-8. Principales estructuras cognitivas en el cerebro del ratón (*Brain Explorer 2, Allen Institute for Brain Science*).

2.2.2.1 Corteza retrosplenial

La corteza retrosplenial (CRS) representa la región más caudal de la corteza cingulada que rodea al cuerpo caloso en primates, pero en roedores comprende toda la corteza cingulada posterior. La CRS está relativamente poco investigada, pero su papel se relaciona con las funciones cognitivas. Pacientes con lesiones en esta región presentan desorientación topográfica y deficiencias de aprendizaje⁹⁸. La CRS es uno de los componentes de la red neuronal por defecto, un sistema interconectado de regiones cerebrales responsable de gran parte de las actividades desarrolladas por la mente que se encuentra activo no sólo durante el recuerdo sino también mientras el individuo efectúa tareas internas como ensoñación, previsión del futuro, o comprobación de emociones⁹⁹. En la rata, las lesiones de la CRS impiden la ejecución de tareas de memoria espacial, memoria de trabajo allocéntrica, memoria egocéntrica y tareas en las que los animales deben detectar si una

determinada disposición espacial es nueva o familiar¹⁰⁰. En relación al aprendizaje y memoria espacial, las funciones de la CRS se solapan en gran medida con la corteza hipocámpica-parahipocámpica. La presencia de las llamadas células de dirección en la CRS, células implicadas en la navegación, apoya el papel de la CRS en la cognición espacial¹⁰¹. Estas células se activan cuando la cabeza del animal apunta en una dirección determinada, y se encuentran también en la región parahipocámpica, en particular en el presubículo, subículo y corteza entorrinal, que presentan conexiones recíprocas con la CRS y reciben entradas desde la zona CA1 del hipocampo. La CRS recibe asimismo información directa desde el subículo y la zona CA1^{102,103}.

2.2.2.2 Hipocampo

El hipocampo (Figura 2-9) es una estructura cerebral que pertenece al sistema límbico y se encuentra bajo el lóbulo temporal medial, por debajo del tálamo, a cada lado del cerebro. En ocasiones se agrupa a otras estructuras adyacentes, incluyendo el giro dentado, el subículo y la corteza entorrinal.

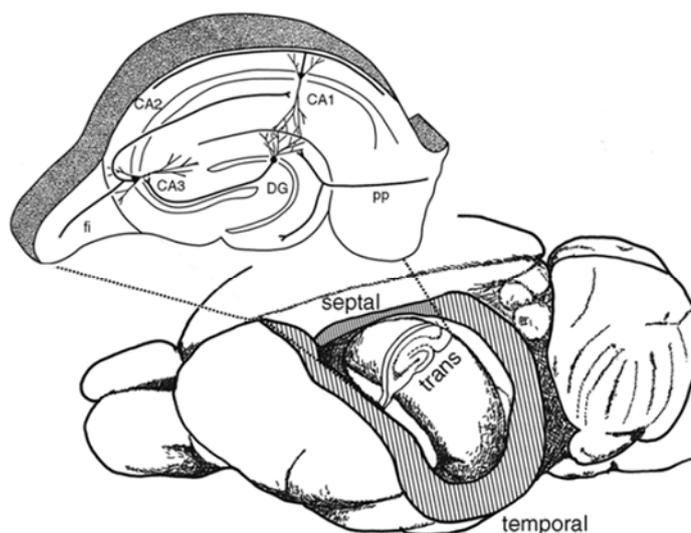


Figura 2-9. Sección transversal y eje septotemporal del hipocampo de la rata mostrando su estructura zonal.

Adaptado de Andersen y cols.¹⁰⁴

Las funciones del hipocampo se asocian a la consolidación de la memoria y el aprendizaje. El hipocampo es la estructura fundamental de la memoria explícita, es decir la que se adquiere a través de las experiencias vividas, lo cual se fundamenta en la plasticidad que presentan sus neuronas.

La comprensión de los mecanismos a través de los cuales la formación del hipocampo influye sobre la memoria, depende de la información detallada sobre el flujo de información sensorial que hay a través, en el exterior y en el interior de las diferentes partes que conforman esta región cerebral ¹⁰⁵. En la Figura 2-10 se representan las principales conexiones del hipocampo en el cerebro humano. Las conexiones aferentes (flechas rojas) de la circunvolución del cíngulo y de la amígdala convergen en la corteza entorrinal (circunvolución parahipocámpica) y conectan con el hipocampo mediante un circuito polisináptico (flechas negras) desde el dentado hasta el subículo, con salidas de vuelta a la corteza entorrinal. Las conexiones eferentes (flechas discontinuas) se efectúan principalmente a través del fórnix hacia el núcleo anterior del tálamo, núcleos septales y cuerpo mamilar.

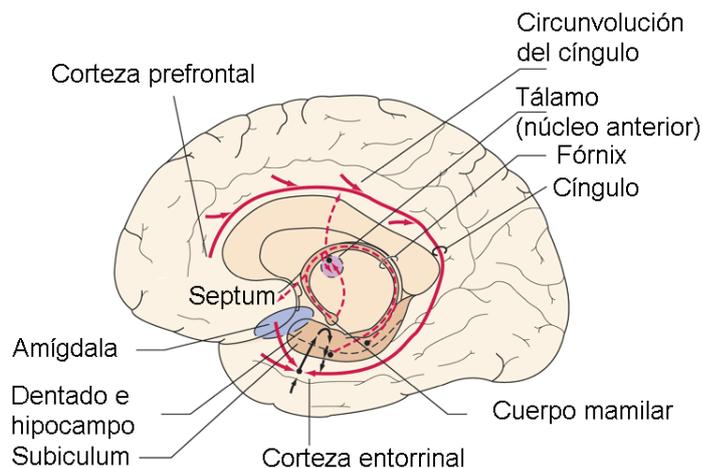


Figura 2-10. Principales conexiones del hipocampo en el cerebro humano.

Adaptado de Kasper y cols. ¹⁰⁶.

Se ha comprobado que en el ser humano, el sistema hipocámpico se asocia a la memoria episódica y a la espacial, de tal manera que un daño en

esta zona supondrá problemas para el individuo a la hora de ubicar un objeto en un ambiente dado ⁶⁰.

El hipocampo puede funcionar como una vía para la memoria, a través de la cual los nuevos recuerdos deben pasar antes de su almacenamiento permanente en el cerebro. Una lesión bilateral del hipocampo puede resultar en una amnesia anterógrada es decir, la pérdida de la capacidad para formar nuevos recuerdos, aunque los recuerdos antiguos permanecen estables.

Una lesión en el hipocampo produce amnesia anterógrada, es decir, de los acontecimientos que tienen lugar después de la lesión, afectando así a los recuerdos de hechos específicos, pero no afecta al aprendizaje de nuevas capacidades o habilidades.

La exposición del organismo a agentes exógenos, tales como las radiaciones ionizantes, podría tener un impacto sobre la tasa de población de células del hipocampo y en última instancia sobre las funciones cognitivas asociadas con el mismo. La radiación ionizante actualmente utilizada en la radioterapia puede resultar en lesiones significativas en determinadas estructuras cerebrales, aunque las neuronas postmitóticas del SNC adulto tradicionalmente se ha venido considerando que no tienen un papel principal en la patogénesis de la radiación ¹⁰⁷.

Las neuronas y glía del hipocampo se forman prenatalmente por división de las células de la capa neuroepitelial, también llamada zona germinal ventricular, inmediatamente adyacente al ventrículo lateral.

Sin embargo, las células granulares del giro dentado se forman por división de células germinales que emigran desde la capa neuroepitelio hasta el primordio del giro dentado a través de la fimbria ya desarrollada, donde proliferan y generan las células granulares. Durante la etapa prenatal, la capa neuroepitelial va disminuyendo hasta desaparecer. Postnatalmente, las células proliferantes están localizadas en la zona subpial, zona subgranular, e hilus del giro dentado. En animales adultos permanece la zona subgranular como fuente de producción de células granulares, aunque de forma reducida.

El giro dentado de la rata posee aproximadamente 600.000 células granulares. Estas pequeñas neuronas se generan durante un periodo prolongado que va desde el día 14 de gestación hasta unos días después de la segunda semana postnatal. La mayoría de las células pasan a través de su última fase de síntesis de ADN en el periodo postnatal y, justo en el pico del periodo de generación de células (entre el quinto y séptimo día posterior al nacimiento), se forman más de 50.000 células granulares al día.

El estudio final de la localización de las células granulares las sitúa en tres etapas diferentes del gradiente morfogénico del giro dentado. Las células de la lámina dorsal tienden a formarse antes que los de la ventral, las células de las porciones más caudales se generan antes que las de porciones caudales; y las regiones de neuronas más superficiales del estrato granuloso se forman antes que las que se localizan más profundamente ¹⁰⁸.

Se ha podido observar que la neurogénesis en el cerebro adulto está regulada de manera positiva o negativa por diferentes mecanismos. Existen factores tanto internos (expresión de genes, moléculas, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores) como externos (estímulos ambientales y farmacológicos) que participarán en esta regulación de la neurogénesis.

En los mamíferos, el SNC genera nuevas neuronas durante toda la vida. La mayoría de estas neuronas, células granulares y perigranulares, se originan en la zona subventricular del cerebro que recubre los ventrículos laterales, y progresan a través de la vía migratoria rostral hacia el bulbo olfatorio.

Se han identificado dos grandes regiones de neurogénesis en el cerebro postnatal: una es la ya citada zona subventricular del ventrículo lateral anterior y la otra es la zona subgranular, una zona de la capa de las células granulares en el giro dentado del hipocampo ¹⁰⁹.

Se ha demostrado que la formación del hipocampo es esencial para que tenga lugar el aprendizaje, en diferentes especies de roedores. También se comprobó que ante determinados efectos adversos, como puede ser la radioterapia, tiene lugar un descenso de la neurogénesis en el hipocampo que

será dependiente de la dosis que se aplique. Un ambiente favorable, así como ejercicio y aprendizaje de nuevas actividades o habilidades, mejoran la neurogénesis en el cerebro de ratas y ratones. De esta manera, las nuevas neuronas generadas en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo participarán en el procesamiento de memoria.

Sin embargo, el papel de la neurogénesis del hipocampo adulto sobre el aprendizaje y la memoria sigue siendo una controversia. Se han estudiado muchos aspectos como el rendimiento de la memoria de trabajo, el aprendizaje contextual y el aprendizaje o memoria espacial. Por ejemplo, la irradiación experimental en ratones provoca una inhibición del deterioro de la neurogénesis en actividades de reconocimiento de lugares que no se observa en actividades de memoria espacial como es el laberinto de Morris ⁶⁰.

El deterioro cognitivo se atribuye principalmente a una disminución en la capacidad de aprender y memorizar nuevas tareas y nueva información. Estudios en modelos animales sugieren que este déficit podría ir asociado a una disminución en la proliferación y supervivencia de las células granulares del hipocampo. Se comprobó que, tras la irradiación total del cerebro de ratas con una dosis de radiación de 0 a 30 Gy, los deterioros de la memoria asociativa debidos a la irradiación dependen del hipocampo, de manera que va acompañado de una disminución en la neurogénesis de las células granulares, las cuales podrían estar implicadas en el normal funcionamiento de la memoria ¹¹⁰.

En el caso de pacientes adultos, se observó que después de tratamientos con quimioterapia y radioterapia craneal, aparecen frecuentemente déficits neurocognitivos y cambios olfativos. Estas alteraciones podrían deberse al daño producido en las células madre neuronales (NSC) de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular que revisten los ventrículos laterales del cerebro anterior. En mamíferos adultos, las NSC están continuamente generando nuevas neuronas, que son reclutadas al giro dentado y al bulbo olfatorio ¹¹¹.

El déficit en la memoria espacial se comprobó mediante un estudio de seguimiento en ratones transgénicos a los que se les interrumpía la neurogénesis. Sin embargo, la relevancia funcional de la neurogénesis adulta en el olfato, sigue sin estar clara. Algunos estudios han sugerido que estas nuevas neuronas no son necesarias para el olfato, mientras que otros autores las relacionan con una serie de funciones olfativas.

Estas controversias pueden resultar de la utilización de diferentes técnicas de ablación, que afectan tanto a regiones del giro dentado como del bulbo olfatorio. Para asignar determinadas funciones de comportamiento para cada sistema neurogénico, existen técnicas precisas que interrumpen la neurogénesis adulta en áreas específicas del cerebro. La irradiación focal de la zona subventricular conduce a una pérdida de determinados tipos celulares, que va a depender de la dosis administrada. Se realizó un estudio en ratones adultos a los que se les interrumpía esta formación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio pero sin afectar al resto del cerebro ni al cuerpo, observando que no era necesario un reclutamiento continuo de las neuronas neoformadas para los test de cualquiera de las funciones olfatorias, excepto para la memoria olfativa a largo plazo que se vería afectada por esta irradiación de la zona subventricular de los ratones ¹¹¹.

El envejecimiento está relacionado con deterioro del aprendizaje espacial ^{112,113}, y esta reflexión de deterioro cognitivo se ha atribuido a una deficiente codificación de la información por parte de las neuronas del hipocampo. Para analizar cómo se procesa la información espacial, los investigadores han registrado las células del hipocampo cuando una rata se comporta libremente ocupando determinados lugares en un entorno. La codificación espacial de estas células se altera en las ratas de edad más avanzada, en cuanto a una serie de parámetros experimentales ¹¹⁴. Estas anomalías están relacionadas con el grado de deterioro del aprendizaje espacial ¹¹⁵.

2.2.2.3 Cerebelo

El cerebelo es, después del cerebro, la porción más grande del encéfalo. Consta de dos hemisferios cerebelosos y una parte intermedia denominada vermis.

Actúa de manera inconsciente en la regulación de la coordinación de la actividad muscular, el mantenimiento del tono muscular y la conservación del equilibrio, de manera que compara la actividad de la corteza motora con la información propioceptiva que recibe de músculos, tendones y articulaciones ¹¹⁶.

También el cerebelo envía información a la corteza cerebral motora para inhibir la musculatura antagonista y estimular los músculos agonistas, permitiendo hacer más fluidos y precisos los movimientos voluntarios. Otra función en la que participa el cerebelo es el mantenimiento del equilibrio y posición del cuerpo, por las conexiones que mantiene con el sistema vestibular y por las modificaciones que puede realizar del tono muscular.

Sin embargo, en los últimos años, en los resultados obtenidos en diversos estudios clínicos, neuroanatómicos y de neuroimagen funcional, se ha demostrado que el cerebelo en el ser humano también tiene una relevante función en el procesamiento emocional y cognitivo. Además, las alteraciones observadas en la estructura y conexión del cerebelo, proporciona nuevos conocimientos para una mejor comprensión de la fisiopatología de diversos trastornos mentales ¹¹⁶.

Recientemente se han identificado rutas entre los núcleos dentados del cerebelo y la corteza cerebral rostral a través del tálamo, circuitos que sugieren una función del cerebelo en el funcionamiento motor a nivel frontal y prefrontal. La alteración de la morfología y conectividad del cerebelo, en particular estas proyecciones cerebelotálamo-corticales, se ha visto implicada en alteraciones motivacionales y cognitivas en la rata, reduciendo la motivación en el condicionamiento operante y el comportamiento exploratorio ¹¹⁷.

2.2.2.4 Núcleo estriado

El núcleo estriado está formado por tres estructuras: caudado, putamen y globo pálido, y su función, al igual que el cerebelo, está relacionada con la regulación del movimiento corporal.

El estriado se reconoce como la principal vía de entrada de información hacia los ganglios basales, que forman parte de un sistema funcional mayor constituido por el núcleo estriado, el subtálamo y la sustancia negra. Por lo tanto, una lesión en cualquiera de estas estructuras puede provocar alteraciones en el control del movimiento.

La dopamina es una catecolamina y monoamina que actúa como neurotransmisor del sistema nervioso central, cuya función principal se relaciona con el aprendizaje por recompensa¹¹⁸. En un trabajo realizado con ratas en el que se estudió fluorimétricamente la cantidad de dopamina que había en el cuerpo estriado de ratas expuestas a una radiación X de 6,5 y 8,5 Gy, se observó que, independientemente de la dosis administrada, la radiación ionizante causaba un agotamiento significativo en el estriado de estos animales^{119,120}.

2.2.3 Evolución del comportamiento y del aprendizaje

El aprendizaje es un mecanismo por el cual un ser vivo modifica su conducta y adquiere una nueva secuencia de comportamiento, como proceso adaptativo a las condiciones que le rodean. Junto a las fuerzas selectivas de la evolución, el aprendizaje constituye el modo principal de adaptación de los seres vivos.

Por definición, no hay aprendizaje sin memoria ni memoria sin aprendizaje, aunque este último sea de naturaleza elemental. Aprendizaje y memoria son dos procesos estrechamente ligados y además están presentes en muchos otros procesos cerebrales, como la percepción sensorial, las emociones o el lenguaje, por lo que los especialistas tienen dificultades para referirse a alguno de ellos sin independencia del otro o para discernir su presencia o participación específica en una función cerebral o conductual¹²¹.

En función del tipo de estrategia de comportamiento que un organismo utilice a la hora de aprender algo, es posible diferenciar dos tipos de memoria:

- *Memoria implícita (procedimental)*, es aquella que radica en las mismas regiones cerebrales que procesan la información sensorial y motora. Es un tipo de memoria rígida e inconsciente, que almacena información sobre estrategias que nos permiten interactuar con el medio ambiente, pero siempre de una forma involuntaria.
- *Memoria explícita (declarativa)*, también conocida como la memoria de las experiencias vividas. A diferencia de la anterior, es un tipo de memoria consciente y flexible que se va a expresar en diferentes situaciones y contextos. En este caso, va a estar relacionada directamente con el sistema del hipocampo, y se basa en la información que haya almacenada en la corteza y en otras regiones cerebrales, sobre hechos ya realizados. El ejemplo más característico de este tipo de memoria, es la memoria de trabajo ¹²¹.

Muchos tipos de aprendizaje y memoria comienzan siendo conscientes y explícitos para acabar convirtiéndose, con la práctica repetida de su contenido, en pura conducta o memoria implícita.

El comportamiento de un animal está estrechamente ligado a la supervivencia y a la reproducción, que están influenciados a su vez por la experiencia adquirida y regulados por determinados procesos fisiológicos. Sin embargo, debido a la adaptabilidad y flexibilidad del organismo, el control fisiológico de estos procesos podrá modificarse a través de las experiencias vividas durante la vida del individuo. Por lo tanto, la importancia de esta modificación dependerá de dicha capacidad de flexibilidad ¹²².

La adolescencia es una etapa crítica para el desarrollo de la madurez a nivel emocional y de diversas formas de la psicopatología. También está asociada a un periodo de adaptación social, confusión emocional, impulsividad

y estrés. Los cambios que ocurren en el cerebro durante la adolescencia, pueden sentar las bases para la maduración hacia unos comportamientos normales de adaptación, como el inicio de unas formas anormales de comportamiento ¹²³.

El núcleo posterior basolateral de la amígdala controla el miedo y la ansiedad, y es importante a nivel emocional en los procesos cognitivos. La corteza prefrontal medial, interviene en el comportamiento emocional, en la atención y en la motivación a nivel cortical. El desarrollo de la conectividad entre estas dos regiones corticolímbicas contribuye a una mayor integración de la emoción y la cognición durante el período postnatal. Por lo tanto, teniendo en cuenta el papel reconocido de la amígdala en la mediación del comportamiento emocional, esta conectividad puede ser el andamio del desarrollo de la cognición y el comportamiento emocional ^{124,125}.

2.2.4 Comportamiento ingestivo

Uno de los aspectos más importantes y complejos del comportamiento de los roedores es la capacidad para localizar los alimentos y, en el caso del medio natural, evitar a los depredadores. Por lo tanto, deberán aprender las relaciones entre los estímulos que los rodean. Cuando estos animales evitan cualquier tipo de estímulo aversivo, implica una serie de asociaciones entre diversos estímulos que será relativamente simple. Sin embargo, en los casos de adquisición de una memoria espacial las asociaciones entre los estímulos son mucho más complejas.

Por lo tanto, la capacidad de memoria espacial en los roedores es una habilidad de supervivencia muy importante desde el punto de vista de ubicación y disponibilidad de alimento ^{126,127}.

La ingestión de alimento como actividad habitual de los seres vivos implica la puesta en juego de una serie de conductas encaminadas al establecimiento de unas condiciones internas apropiadas para la supervivencia en tanto que el alimento es fuente de energía y fuente de materias primas para la construcción, mantenimiento y ampliación del complejo entramado orgánico

del animal. Podemos definir el comportamiento ingestivo como el conjunto de actos que realiza un animal conducentes al desarrollo de una serie de pautas que posibilitan el reparto de la alimentación diaria en una serie de episodios o comidas con una determinada ritmicidad ¹²⁸.

La comida se ha propuesto como unidad fisiológicamente importante para el estudio de la ingestión de alimento, pero el comportamiento ingestivo puede describirse también en términos de unidades microestructurales más pequeñas como pueden ser los bocados, mordiscos o lametadas ¹²⁹. Sin embargo, la mayor parte de los estudios sobre comportamiento ingestivo intentan profundizar en los mecanismos de inicio, mantenimiento y terminación de las comidas. En este sentido, los investigadores registran una serie de actividades ingestivas a lo largo del tiempo (pauta de ingestión), y posteriormente se efectúa la clasificación de las actividades en grupos, cada uno de los cuales constituye una comida, separados por intervalos de tiempo en los que no se realiza ingestión (intervalos entre comidas). Estos intervalos entre comidas son grandes en comparación con los intervalos entre las actividades que constituyen cada grupo (intervalos dentro de la comida).

Por lo general no se incluye la bebida en las definiciones de comida para roedores. Más del 73% de la ingestión de agua en la rata tiene lugar en etapas efectuadas unos 10 minutos antes o después de las comidas, lo que ha llevado a la consideración conjunta de la ingestión de agua y alimento sólido como determinantes reales de las comidas ¹³⁰.

El cerebro controla el comportamiento ingestivo al integrar una serie de señales relativas al entorno interno y externo del animal. Las respuestas cerebrales asociadas con la estimulación sensorial (vista, olfato, gusto), distensión gástrica, hormonas gastrointestinales y el consumo de alimentos son materia de investigación continua, pero son pocos los estudios que relacionan respuestas cerebrales y comportamiento ingestivo. Los circuitos nerviosos subyacentes al comportamiento ingestivo son principalmente genéricos, e incluyen circuitos relacionados con la recompensa, el autocontrol, el aprendizaje y la toma de decisiones. Estos circuitos límbicos y prefrontales

interactúan en el hipotálamo junto con factores relacionados con la detección de nutrientes y la regulación de la adiposidad corporal ¹³¹.

2.2.5 Efectos de la radiación sobre el comportamiento y el aprendizaje

Los efectos que causa la presencia de un posible daño cerebral y su posterior recuperación han sido y son objeto de estudio de muchos trabajos de investigación ^{132,133}.

Históricamente, se pensaba que los daños cerebrales producidos por la radiación aparecían con un considerable retraso, incluso meses o años, momento en el cual las células afectadas morirían. Sin embargo, actualmente esto está más claro, y se sabe que la respuesta del sistema nervioso a la radiación aparece tanto a largo como a corto plazo. Estudios de investigación demostraron que los daños por radiación en el sistema nervioso afectan de manera similar a otros tejidos ^{134,135}.

La susceptibilidad del sistema nervioso central a la exposición a radiación se atribuye a su extenso periodo de desarrollo, la vulnerabilidad de sus células neuronales, la actividad migratoria de muchas de sus células, su incapacidad para reemplazar las neuronas maduras y en general la complejidad de todo su sistema. Por lo tanto, los efectos de la radiación pueden ser debidos a la muerte de células gliales o de neuronas, la interrupción de la actividad migratoria, deterioro de la capacidad para establecer conexiones correctas entre las células y/o alteraciones en el desarrollo de las dendritas. Estos cambios estructurales se manifiestan como alteraciones en el comportamiento posteriores a la radiación. Cuando se comparan los periodos de desarrollo de diferentes especies de mamíferos, se puede observar que la sensibilidad a radiación (dosis dependiente) es notablemente similar en todas las especies ¹³⁶.

Tanto las alteraciones en la neurogénesis como en el rendimiento en tareas de comportamiento, implican una dependencia entre la dosis de radiación administrada y la disminución en las funciones del hipocampo.

Además, un tratamiento con una sola dosis de radiación pero de alta energía, va a producir una lesión aguda pronunciada que constará de la aparición de edemas e inflamaciones, y puede suponer una rápida evolución a necrosis de los tejidos normales circundantes del cerebro. La presencia de un lesión estructural adicional puede predisponer a este tejido a daños por alteración de la arquitectura tisular normal, inflamación y desarrollo de fibrosis¹³⁵. Por ejemplo, los tratamientos con radiación para malformaciones arteriovenosas presentan una incidencia de necrosis en un 10-20% de los pacientes tratados, lo que pondrá en peligro las estructuras cerebrales^{137,138}.

Si esta radiación ionizante se aplica durante la etapa de crecimiento del cerebro, podría interferir con su normal desarrollo en una variedad de formas, y alterar sus funciones. Las consecuencias podrían causar retraso en el crecimiento, efectos adversos sobre el desarrollo del cerebro, sobre la función cognitiva y causar una discapacidad intelectual en la edad adulta. Por lo tanto, la edad gestacional es un factor importante a tener en cuenta para determinar la naturaleza de la lesión por radiación, ocasionada en el proceso de desarrollo del cerebro^{139,140}.

En mamíferos, la exposición a radiación ionizante durante etapas prenatales produce importantes alteraciones en muchos tejidos diana. Se ha demostrado que la citoarquitectura y la funcionalidad de diferentes estructuras que intervienen en el desarrollo del SNC se ven afectadas por la exposición a rayos X^{136,141,142}.

Como ya hemos señalado anteriormente, el hipocampo juega un importante papel en el comportamiento, y cualquier daño que sufra va a ocasionar alteraciones sobre el mismo¹⁴³.

Se ha estudiado que la disminución de la neurogénesis en el hipocampo juega un importante papel en los efectos adversos del cerebro producidos por radiación, y aquella disminuirá de una manera dosis-dependiente de ésta¹⁴⁴. Además, el deterioro en el aprendizaje espacial también se encuentra relacionado con la disminución de la neurogénesis del hipocampo en esta región¹⁴⁵. Situaciones como un ambiente enriquecido, realización de ejercicio y

aprendizaje de nuevas tareas, se han demostrado que restablecen la neurogénesis normal en un estudio cerebral realizado en ratones y ratas ¹⁴⁶. Sin embargo, el papel de la neurogénesis del hipocampo adulto en el aprendizaje y en la memoria, todavía es una controversia. Se han estudiado algunos aspectos, incluyendo el rendimiento de la memoria de trabajo, el aprendizaje contextual y el aprendizaje espacial. Por ejemplo, la inhibición de la neurogénesis impide el rendimiento en tareas de reconocimiento de lugar dependientes del hipocampo ¹⁴⁷, pero esto no ocurre ante tareas de memoria espacial con referencias como el laberinto acuático de Morris ¹⁴⁸. Por lo tanto, no es fácil establecer una relación entre la neurogénesis en el hipocampo y el aprendizaje espacial ⁶⁰.

El deterioro cognitivo a largo plazo es una importante consecuencia a tener en cuenta tras la irradiación craneal terapéutica ⁷. En un estudio de investigación realizado en modelos animales, en el que se irradiaba el cerebro de ratas a bajas dosis, se vio que estos déficits cognitivos pueden estar asociados a la disminución en la proliferación de células granulares del hipocampo. Por lo tanto, se concluyó que la irradiación dañaba la memoria asociativa dependiente del hipocampo, y con esto la disminución de la neurogénesis de las células granulares, relacionada con la función normal del hipocampo ¹¹⁰.

El interés clínico por las consecuencias que pueda tener tanto una exposición total de un cuerpo a radiación (como es el caso de un accidente nuclear), como de una parcial, ha ido aumentando con los años. Como ya hemos visto anteriormente, una sola exposición a radiación ionizante a un amplio rango de dosis puede desencadenar el síndrome de radiación aguda (ARS) ¹⁴⁹, que tendrá como consecuencia general una disminución transitoria o permanente de la proliferación de las células madre o de las células progenitoras inmaduras, de determinados tejidos ¹⁵⁰. Un estudio con radiación ionizante realizado en cerebros adultos de ratón, confirmaba la aparición de un deterioro cognitivo que podía presentarse en diferentes grados, aunque las lesiones histológicas no eran tan evidentes. Estos déficits cognitivos estaban asociados, como en otros casos, a una inhibición de la neurogénesis en el

hipocampo de estos animales de experimentación^{150,151}. La tasa de neurogénesis resulta afectada por diferentes factores como la edad, la influencia genética, diferentes productos químicos y, como es este caso, por la radiación¹⁵⁰⁻¹⁵².

En resumen, el deterioro cognitivo se atribuye principalmente a una disminución en la capacidad de aprender y memorizar nuevas tareas y nueva información. La radiación induce cambios en la cognición frecuentemente manifestadas como deficiencias en las funciones de memoria y aprendizaje dependientes del hipocampo.

2.3 Estrés oxidativo y defensas antioxidantes

2.3.1 Estrés oxidativo

La oxidación es un proceso químico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación que llamamos reducción¹⁵³. Estas reacciones se les conoce como reacciones redox. La oxidación se encuentra presente en la naturaleza: el hierro es oxidado por el aire, al igual que la manzana cuando se corta y adquiere un color más oscuro, y los alimentos grasos, que cuando se oxidan se vuelven rancios.

Existen otros procesos oxidativos importantes como son la combustión, la respiración y la fotosíntesis en las plantas, ya que a través de las reacciones que se llevan a cabo en ellos, se genera la energía necesaria para que la vida exista. Sin embargo, en la respiración no sólo se obtiene energía, también se producen ciertas sustancias que son dañinas para el organismo. Como ya hemos dicho anteriormente, estas sustancias se denominan especies reactivas del oxígeno (EROs), moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos.

Un radical libre se define como un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados girando en sus orbitales más externos. Por dicha razón los radicales libres oxidan a las moléculas vecinas para así adquirir un equilibrio químico. Pero esas moléculas vecinas, al momento de ser oxidadas

por los radicales libres, se convierten en especies altamente reactivas en busca de electrones procedentes de otras moléculas vecinas, y es así como se genera una reacción en cadena capaz de destruir estructuras biológicas importantes ¹⁵⁴.

Nuestro organismo también genera de forma continua y como parte del metabolismo normal, estos intermediarios reactivos llamados radicales libres, radicales libres derivados del oxígeno, oxidantes, prooxidantes y especies reactivas basadas en el oxígeno (EROs) o el nitrógeno (ERNs).

Durante muchos años los radicales libres fueron considerados como especies químicas altamente reactivas perjudiciales para los tejidos y para los organismos, causando daños a otras moléculas, incluyendo biopolímeros como las proteínas y el ADN. El descubrimiento de la producción endógena de óxido nítrico (NO) en los sistemas de mamíferos y su participación en vías específicas de transducción de señales representa un paradigma importante que sugiere nuevas funciones en la comunicación celular y los procesos de señalización. Las EROs son moléculas capaces de provocar daños importantes en órganos y tejidos, y por tanto se encuentran entre los mediadores más ampliamente investigados de daño celular ¹⁵⁵.

El estrés oxidativo se desencadena por la pérdida del balance entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes, dando lugar a posibles daños en órganos y tejidos ¹⁵⁶. Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de reducir la carga global de EROs de un organismo mediante la inhibición del proceso oxidativo ¹⁵⁷.

La utilización del oxígeno por parte de los organismos constituye una paradoja biológica, ya que por un lado, los organismos aeróbicos necesitan el oxígeno para sobrevivir pero, por otro, el oxígeno puede ser muy tóxico.

Cualquier agente externo que dañe las células, como es en nuestro caso la radiación ionizante, podría tener un gran impacto sobre las mismas generando una gran cantidad de radicales libres y especies reactivas de oxígeno las cuales se sabe que pueden dañar seriamente estructuras biológicas de gran importancia en organismos vivos. Entre las principales

fuentes exógenas de radicales libres destacamos: la contaminación industrial, el humo del tabaco, la radiación ionizante, el ultrasonido y el campo magnético ¹⁵⁸. Por otro lado, también se generan estos intermediarios reactivos de forma continua y como parte del metabolismo normal en el organismo ¹⁵⁶. En cualquier caso, ante esta situación las células serán capaces de defenderse por si mismas contra las EROs mediante una serie de agentes antioxidantes, como son enzimas (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT)), glutatión reducido (GSH) y una gran variedad de tioles que eliminan estas sustancias ¹⁵⁹.

Las EROs se generan constantemente dentro de las células en cantidades bajas mediante reacciones enzimáticas y no enzimáticas, tales como: reacciones catalizadas por metales, activación de neutrófilos y macrófagos durante la inflamación, reacciones de transporte de electrones y otras mecanismos catalizados por mitocondrias ¹⁵⁵.

Como ya hemos dicho, el estrés oxidativo se desencadena por la pérdida del balance entre la producción de EROs y las defensas antioxidantes. Esta situación parece desempeñar un papel importante en el desarrollo de un elevado número de procesos patológicos, como la inflamación crónica, el envejecimiento, la neurodegeneración o el cáncer, y procesos de envejecimiento ¹⁵⁶.

Entre los radicales destacamos el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) o el óxido nítrico (NO), que implican átomos, iones y moléculas derivados de la reducción incompleta del oxígeno molecular, con uno o más electrones desapareados en el orbital más externo, con alta capacidad oxidante, y por tanto altamente reactivos. Cuando se generan en cantidades excesivas producen desnaturalización de proteínas, peroxidación lipídica, anomalías del ADN y una serie de alteraciones conocidas en su conjunto como estrés oxidativo.

La destoxificación de las EROs se realiza, como vamos a ver, por medio de sistemas no enzimáticos (glutatión, vitamina E, vitamina C, beta-caroteno,

polifenoles, etc.) y enzimáticos (superóxido-dismutasa, glutatión-peroxidasa, catalasa, etc.) que constituyen las defensas antioxidantes ¹⁵⁶.

2.3.2 Defensas antioxidantes

Los antioxidantes son agentes químicos que tienen la capacidad de reducir la carga global de las especies reactivas de un organismo mediante la inhibición del proceso oxidativo. Los antioxidantes protegen a las moléculas biológicas por diferentes mecanismos: 1) neutralizando las EROs, 2) disminuyendo la formación de EROs, 3) uniéndose a metales pesados que podrían ser usados para formar EROs más peligrosas, 4) reparando el daño cometido en los tejidos diana, y 5) destruyendo las moléculas dañadas y reparándolas por otras nuevas.

Pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción ¹⁶⁰. Así, los antioxidantes pueden disminuir el daño reaccionando directamente con el radical, indirectamente inhibiendo la actividad o expresión de enzimas, o bien estimulando la actividad de enzimas antioxidantes intracelulares.

Los mecanismos de defensa antioxidante incluyen varios componentes, tanto endógenos (propios del organismo) como exógenos (obtenidos de la dieta), que funcionan de forma interactiva para neutralizar los radicales libres. Refiriéndonos a los compuestos endógenos, las células de los mamíferos poseen un sistema de defensa antioxidante de naturaleza tanto enzimática (enzimas antioxidantes) como no enzimática (glutatión), a fin de mantener el equilibrio entre la producción y eliminación de las EROs ¹⁶¹.

2.3.2.1 El glutatión

Los sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos reaccionan con los radicales libres evitando el daño oxidativo de diversas moléculas. Son elementos principalmente exógenos, responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos. Estos compuestos, a diferencia de las enzimas, se consumen por oxidación al neutralizar radicales libres, por lo que

su reposición debe ser continua. El producto de la oxidación de ésta molécula puede ser reducido de nuevo por la acción de otros antioxidantes. Este tipo de mecanismo antioxidante se conoce en la literatura anglosajona con el nombre de *scavenging* y es capaz de detener o enlentecer la reacción en cadena que da lugar a la formación de radicales libres.

Dentro de los antioxidantes exógenos no enzimáticos más importantes diferenciamos la vitamina E, la vitamina C, el ácido deshidroascórbico, los carotenos, la taurina, minerales como selenio, zinc y manganeso y polifenoles como los flavonoides ¹⁶². Además, existen algunos componentes endógenos no enzimáticos presentes en una amplia gama de concentraciones en fluidos corporales y tejidos, tales como el glutatión o la ubiquinona mayormente presente dentro de las células, mientras que otros como el ácido úrico, se distribuyen más uniformemente a través del cuerpo. Otros componentes son la transferrina, lactoferrina, ferritina, ceruloplasmina, bilirrubina o hemoferritina ¹⁶³ que también ejercen un papel protector.

El glutatión es uno de los antioxidantes más conocidos. Es un tripéptido formado por L- γ -glutamil-L-cisteína-glicina. Se encuentra en las células de los organismos y defiende al cuerpo contra la oxidación y las toxinas mediante el proceso de detoxificación. En el cuerpo humano, desempeña varias funciones importantes:

- Neutraliza los radicales libres, y por lo tanto las protege frente al daño.
- Se une a las toxinas del hígado para que puedan ser excretadas.
- Es también un cofactor (activador) para muchas enzimas del cuerpo.

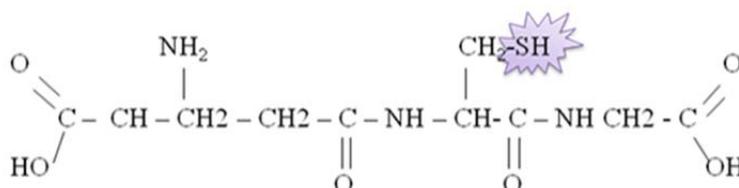


Figura 2-11. Glutatión (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina)

El glutatión está presente en el cuerpo humano en dos formas, su forma reducida (GSH) por lo cual es un potente antioxidante, y su forma oxidada (GSSG). El término glutatión es usado para referirse a todas estas diferentes estructuras del glutatión. Es sintetizado en el citosol y es precisamente en este compartimento celular donde se encuentra en una concentración más elevada (90%). Sin embargo, es transportado a otros compartimentos celulares como son la mitocondria (10%), el núcleo¹⁶⁴ o el retículo endoplasmático. El GSSG también es mantenido en el citosol y la relación GSSG/GSH es un buen marcador del estado de estrés oxidativo de un organismo¹⁶⁵.

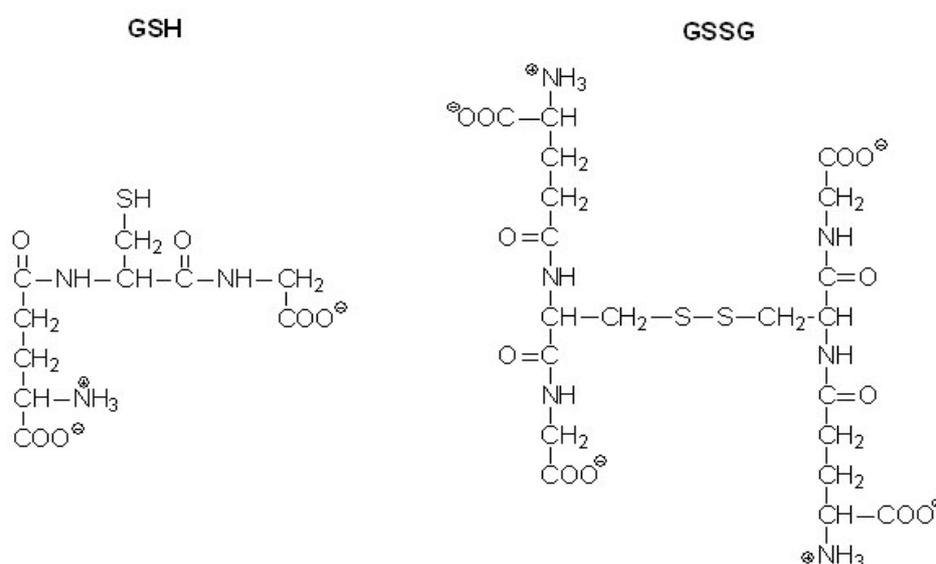


Figura 2-12. Estructura química del glutatión

Debido a la alta capacidad de intercambio de electrones de su grupo sulfhidrilo (-SH), se puede considerar que el GSH es un regulador fundamental del equilibrio redox de las células y se ha comprobado su participación fundamental en numerosas alteraciones degenerativas¹⁶⁶. Su capacidad antioxidante la realiza mediante la transformación cíclica de la forma tiol reducida (GSH) a una forma oxidada (GSSG), momento en el cual sus funciones antioxidantes desaparecen¹⁶⁵. Esta reacción la lleva a cabo la enzima glutatión-peroxidasa (GPx), la cual cataliza la reducción del H₂O₂ y otros peróxidos orgánicos, proceso de gran importancia en la protección de las membranas lipídicas frente a la oxidación. El hígado contiene altas

concentraciones de estas enzimas que reducen los distintos peróxidos utilizando el GSH como agente reductor, con lo que se transforma en GSSG. Diversas enzimas auxiliares contribuyen a través de la síntesis de GSH o de un ciclo redox a regenerar la forma reducida ¹⁶⁷. Entre ellas encontramos la enzima glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6PDH) que contribuye al sistema defensivo antioxidante al proporcionar NADPH para la actividad de la glutatión reductasa. Por otro lado, la regeneración del GSH está catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR), en presencia de NADPH. La relación intracelular GSSG/GSH se mantiene generalmente baja (menor de 1:10) por acción de esta enzima (Figura 2-13).

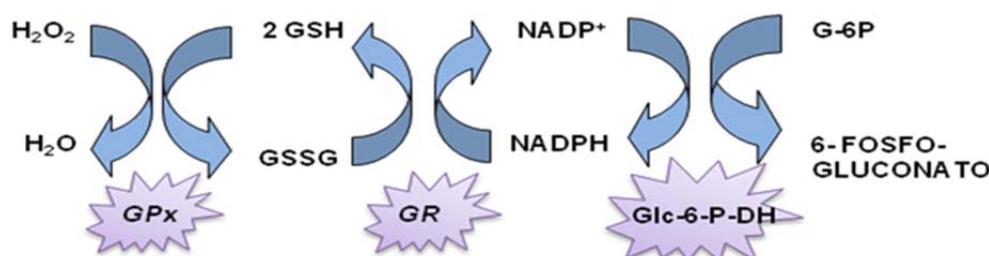


Figura 2-13. Ciclo de óxido-reducción del glutatión

El estrés oxidativo puede sobrepasar la capacidad de la célula de reducir el GSSG a GSH, dando lugar a una acumulación de GSSG en el citosol. Para proteger a la célula de un cambio en equilibrio redox, el GSSG puede ser exportado de forma activa fuera de la célula o reaccionar con un grupo sulfhidrilo de una proteína. Además, un estrés oxidativo grave hace disminuir las concentraciones intracelulares de GSH.

Por lo tanto, debido a su alta concentración y a su papel central en mantener el estado redox de la célula, el glutatión es uno de los antioxidantes celulares más importantes ¹⁶⁸.

En resumen, las principales funciones del GSH en el estrés oxidativo son: a) actuar como cofactor de numerosas enzimas detoxificadoras como son la GPx y la glutatión-S-transferasa (GST); b) participar en el transporte de

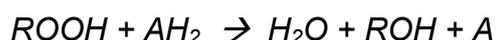
aminoácidos a través de la membrana plasmática; c) neutralizar directamente el radical OH^\cdot , el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y detoxificar el H_2O_2 y peróxidos lipídicos por la acción de la GPx; d) regenerar importantes antioxidantes como las vitaminas E y C devolviéndolos a su estado activo ¹⁶⁴.

2.3.2.2 Enzimas antioxidantes

En general las enzimas antioxidantes se encargan de mantener el sistema antioxidante y evitar esa pérdida del equilibrio de las EROs que provoca el estrés oxidativo ¹⁵⁷.

2.3.2.2.1 Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una ferrihemoenzima que posee cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y un grupo prostético de ferro-protoporfirina en cada monómero. Es una de las enzimas más eficientes, ya que no puede ser saturada por H_2O_2 a ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2 , para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior. Con dadores de H (metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles, etc.) presenta actividad peroxidasa.



En los animales, el H_2O_2 se detoxifica mediante las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular ¹⁶⁹. La conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular requiere la presencia de NADPH para la activación de los tetrámeros de la enzima. La principal fuente de NADPH es la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la primera reacción de la vía de las pentosas.

La actividad de la catalasa en animales y plantas se concentra en orgánulos subcelulares denominados peroxisomas. Los cloroplastos, las mitocondrias y el retículo endoplasmático contienen poca o prácticamente ninguna actividad catalasa. Por lo tanto, la actividad de la catalasa en homogeneizados de tejidos de animales y plantas tiene probablemente su origen en la ruptura de los peroxisomas durante la homogeneización. La mayoría de las células aeróbicas contienen catalasa, aunque organismos como *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, y las algas *Euglena* y *Gloeocapsa* y varios parásitos helmínticos no presentan esta enzima. En las células eucariotas han sido identificados dos tipos de catalasas, presentes en citosol y peroxisomas, codificadas por los genes *cat-t1* y *cat-a1*, respectivamente.

En los animales, la catalasa está presente en todos los órganos importantes del cuerpo, principalmente en el hígado. Debido a la falta de peroxisomas algunos órganos son más susceptibles a los daños por producción de especies reactivas del oxígeno, como el corazón, los pulmones y el cerebro.

En estos órganos, como mecanismo de defensa, puede ocurrir la difusión de peróxido de hidrógeno al torrente sanguíneo, donde reacciona con la CAT eritrocitaria. La enzima eritrocitaria es altamente específica y sólo tiene actividad para el peróxido de hidrógeno y los metil- y etil-hidroperóxidos.

La actividad de la catalasa tiene una cinética mucho más rápida que la de la glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno, lo que implica la desintoxicación de H_2O_2 cuando su concentración es alta, mientras que la glutatión peroxidasa actúa a bajas concentraciones de este sustrato. En los órganos que presentan una elevada actividad catalasa, como es el hígado, la concentración de peróxido de hidrógeno es ligeramente baja.

La disociación de la catalasa en subunidades se produce con facilidad en el almacenamiento y la congelación o la exposición a la acidosis o álcalis, causando la pérdida de actividad enzimática.

En humanos, el gen que codifica la catalasa se encuentra en el cromosoma 11. Las mutaciones en este gen pueden dar lugar a acatalasemia,

una enfermedad en la que el único problema clínico observado ha sido la mayor incidencia de úlceras en la boca. La aniridia, que es también resultado de la mutación en el cromosoma 11, da lugar a disminución de la actividad de la catalasa y se asocia con aumento de incidencia de retraso mental y un tipo de cáncer conocido como tumor de Wilms.

2.3.2.2.2 Glutación Peroxidasa

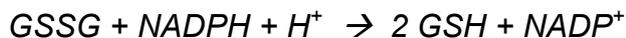
Las peroxidasas son enzimas que utilizan una variedad de agentes reductores celulares para inactivar peróxidos. Además de actuar sobre H_2O_2 , también neutralizan los peróxidos orgánicos, como los alquil-hidroperóxidos. Existen NADPH-peroxidasas (*Escherichia coli*), peroxidasas de citocromo (levaduras), ascorbato peroxidasa (plantas) y otras. En los mamíferos, las principales peroxidasas son glutación-dependientes. Hay enzimas especializadas que actúan sobre peróxidos específicos, por ejemplo, hidroperóxidos fosfolipídicos, y en determinados compartimentos celulares como citoplasma o mitocondrias, o asociadas a membranas. En las mitocondrias de mamíferos esta enzima constituye la principal defensa contra el H_2O_2 , ya que estos orgánulos, en general, no presentan actividad catalasa¹⁷⁰.

La GPx (EC 1.11.1.9) está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de selenio-cisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GPx comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos ($ROOH$ y H_2O_2) usando glutación reducido (GSH), y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo.



La relación entre glutación reducido y glutación oxidado (GSH/GSSG) es elevada en las células normales, debido a la existencia de un mecanismo para

reducir de nuevo el GSSG a GSH, reacción llevada a cabo por la glutatión reductasa:



El NADPH necesario para esta reacción es suministrado en los tejidos de animales y plantas a través de una serie de sistemas enzimáticos. Entre estos sistemas, el más conocido y más importantes es la vía de las pentosas fosfato, como se mencionó anteriormente. La enzima G6PD es responsable de mantener las concentraciones de NADPH adecuadas para reducir el glutatión oxidado.

Un suministro constante de NADPH es vital para la integridad de los eritrocitos. Se estima que aproximadamente 400 millones de personas tienen deficiencia de G6PD, la deficiencia enzimática humana más común. Los eritrocitos de los individuos con deficiencia de G6PD son particularmente susceptibles al daño oxidativo. Los eritrocitos maduros no presentan núcleo ni mecanismo de síntesis de proteínas, no siendo capaces de sintetizar nuevas moléculas de enzima para reemplazar a las degradadas y proveer de nuevos componentes a la membrana, lo que contribuye a explicar la gran sensibilidad de estas células a las lesiones de la membrana ¹⁷⁰.

Una función importante de la GPx en los eritrocitos es eliminar reductivamente H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos, que pueden dañar irreversiblemente la hemoglobina y efectuar ruptura del enlace C-C de los fosfolípidos presentes en las membranas celulares.

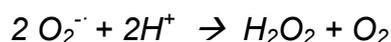
Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPx en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, la concentración de cada isoforma varía dependiendo del tipo de tejido. La GPx citosólica o mitocondrial (GPx-1) se encuentra predominantemente en eritrocitos, riñón e hígado. La GPx-2 citosólica (GPx-G1) y la GPx-3 extracelular (GPx-P) se detectan de forma escasa en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y riñón. La GPx-4 se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana y se expresa principalmente en células del epitelio renal y en los testículos. La

GPX-5, que es independiente de selenio, se expresa de forma específica en el epidídimo de ratón ¹⁷¹.

El ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos valores de estrés oxidativo, pero la catalasa es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo elevado. En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H₂O₂ es la GPx, ya que la catalasa presenta mucha menos afinidad por el H₂O₂ ¹⁷².

2.3.2.2.3 Superóxido dismutasa

Descubiertas en 1969 por McCord y Fridovich, las superóxido dismutasas (SOD) (EC 1.15.1.1) son metaloenzimas abundantes en las células aeróbicas y las enzimas antioxidantes más importantes. Su acción consiste en la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno, que es menos reactivo y puede ser degradado por enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa. La tasa de degradación no enzimática del superóxido es de aproximadamente $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que la tasa de la reacción catalizada por la SOD es de aproximadamente $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, la SOD es capaz de aumentar 10^4 veces la velocidad de la reacción de dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno a pH fisiológico ¹⁷³, conforme a la reacción:



En las células eucariotas existen varios tipos de isoenzimas SOD, a menudo confinadas en diferentes compartimentos celulares, y pueden contener cobre, zinc, hierro o manganeso en sus sitios activos.

Se han identificado cuatro clases de SOD: una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn, mientras que las demás presentan cofactores monoatómicos de Fe, Mn o Ni. SOD-Fe y SOD-Mn presentan homologías en cuanto a sus secuencias y estructura tridimensional. Además, poseen residuos quelantes idénticos en el sitio activo.

En humanos existen tres tipos de SOD: la SOD-Mn mitocondrial, la SOD-Cu/Zn citosólica y la SOD extracelular (EC-SOD):

- **SOD-Mn (SOD-2)** es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de Mn en cada subunidad. El átomo metálico cambia su estado de oxidación desde Mn (III) a Mn (II), volviendo de nuevo a Mn (III), durante los dos pasos que conllevan a la reacción de eliminación de $\text{O}_2^{\cdot -}$. Así pues, aunque el contenido de SOD-Mn en tejidos humanos es aproximadamente la mitad del contenido de SOD-Cu/Zn, la expresión de SOD-Mn es esencial para la supervivencia de la vida aerobia y el desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por las sustancias reactivas de oxígeno, y aparece en todos los tumores.
- **SOD-Cu/Zn (SOD-1)** posee dos subunidades idénticas de unos 32 kDa, aunque a elevadas concentraciones de proteína en *E. coli* se encontró una estructura monomérica. Cada subunidad contiene un *cluster* metálico, el sitio activo, constituido por un átomo de Cu y otro de Zn. Mientras que la SOD-Mn existe en todos los tumores, y la relación de actividades SOD-Cu-Zn/SOD-Mn no difiere de la encontrada en tejidos normales, los tumores poseen menos SOD-Cu/Zn que los tejidos metabólicamente más activos. Por otro lado, la Mn-SOD es esencial para la vida, mientras que la SOD-Cu/Zn no lo es ¹⁷⁴.
- La **SOD-3** o **ECSOD** depende también de cobre y zinc y ha sido la más recientemente caracterizada. Se trata de un tetrámero que contiene cobre y zinc y presenta un péptido señal que confina esta enzima exclusivamente al espacio extracelular. El papel que juega la SOD3 en diferentes estados fisiológicos está empezando a ser esclarecido. La gran cantidad de ECSOD en la córnea y la esclerótica puede estar relacionada con el riesgo de producción fotoquímica de superóxido en estos tejidos ¹⁷⁵.

El papel beneficioso y protector de la SOD ha sido demostrado en una variedad de patologías, tanto clínicas como preclínicas. El uso de orgoteina (SOD-Cu/Zn bovina) ha demostrado resultados prometedores en el tratamiento

de la artritis reumatoide y la osteoartritis, así como reducción de los efectos secundarios asociados con quimioterapia y radioterapia ¹⁷⁶. Las principales limitaciones de estos productos son su gran tamaño, que limita la permeabilidad celular, y su vida media corta, antigenicidad y alto coste.

Se han desarrollado un gran número de variantes SOD de bajo peso molecular para superar algunas de estas limitaciones. Las SOD también pueden ser generadas por síntesis recombinante, pudiendo ser administradas en forma natural. Su vida media en plasma se puede prolongar por conjugación con polietilenglicol o albúmina. Se estima que las SOD en *Escherichia coli* proporcionan alrededor del 95% de protección frente a objetivos susceptibles de ser atacados por $O_2^{\cdot-}$.

2.3.2.2.4 NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1

La NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 o NQO1 (EC 1.6.5.2, anteriormente EC 1.6.99.2) es una enzima antioxidante que cataliza la reducción de diversas quinonas hasta sus correspondientes hidroquinonas usando como donadores tanto NADH como NADPH ¹⁷⁷. Es una flavoenzima capaz de reducir quinonas a hidroquinonas a través de un mecanismo de 2 electrones ¹⁷⁸. NQO1 utiliza indistintamente NADPH o NADH como donador de electrones y es inhibida eficientemente por dicumarol ¹⁷⁹. La reducción obligada de 2 electrones tiene lugar a través de la transferencia de hidruros (H⁻) desde el NAD(P)H al FAD y desde el FADH₂ a la quinona, no generándose productos resultantes de la reducción por un electrón.

La capacidad de NQO1 para catalizar la reducción obligada de las quinonas a través de un mecanismo de dos electrones hasta las correspondientes hidroquinonas es esencial para su papel como antioxidante y en la citoprotección frente a sustancias tóxicas, ya que el mecanismo de reacción de dos electrones evita la generación de intermediarios semiquinónicos, los cuales son normalmente compuestos inestables con una elevada tendencia a reaccionar con el oxígeno para producir superóxido ¹⁸⁰.

NQO1 se encuentra presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos, variando su expresión y actividad de unos tejidos a otros y entre las diferentes

especies¹⁸⁰⁻¹⁸². Intracelularmente se encuentra localizada principalmente en el citosol, aunque una pequeña fracción se encuentra asociada a microsomas, mitocondrias, membrana plasmática y núcleo^{178,180,181,183,184}. La fracción de NQO1 asociada a membranas se incrementa ante situaciones de estrés oxidativo, lo cual podría potenciar la protección antioxidante de estas estructuras¹⁸⁵.

La expresión basal e inducida de NQO1 se regula principalmente por el factor de transcripción Nrf2, el cual se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) presente en el promotor del gen NQO1. La inducción de su expresión puede deberse a la acción de diversos genes defensivos en respuesta a situaciones de estrés mediada por xenobióticos, oxidantes, luz ultravioleta y radiaciones ionizantes¹⁸⁶. NQO1 forma parte de un mecanismo de defensa celular que implica la inducción coordinada de enzimas detoxificantes como glutatión S-transferasas, UDP-glucuronosil transferasas, etc^{180,181,187}.

Como se ha mencionado, el ARE es responsable de la expresión basal e inducible de NQO1¹⁸⁸, representando un elemento sensible al H₂O₂ y antioxidantes fenólicos que sufren reciclado redox. Esta sensibilidad del ARE a las EROs determina un papel importante en la transducción de señales involucradas en la respuesta de las células a situaciones de estrés oxidativo¹⁸⁹. Estudios realizados previamente indican que la regulación de la expresión de NQO1 mediada por ARE tiene lugar por las interacciones entre los factores de transcripción nucleares pertenecientes a la familia de proteínas bZip: Jun (c-Jun, Jun-B, Jun-D), c-Fos, Fra1, Nrf y Maf, entre otras, actuando como reguladores positivos o negativos. El papel de la proteína Nrf2 en la expresión de NQO1 in vivo se ha puesto de manifiesto en los estudios realizados con ratones mutantes Nrf2^{-/-} donde los valores constitutivos e inducibles de la oxidorreductasa fueron inferiores a los presentes en ratones Nrf2^{+/+}¹⁹⁰.

NQO1 desempeña funciones tanto antioxidantes como prooxidantes^{180,181,187}, además de participar en el mantenimiento del estado redox intracelular y en otras funciones que comentamos a continuación¹⁹¹.

El papel antioxidante de NQO1 radica en la capacidad que tiene para reducir quinonas, mediante la transferencia de dos electrones, generando hidroquinonas. A través de este mecanismo se evita la formación de semiquinonas y por lo tanto la generación de radicales superóxido ¹⁸⁰.

Diversos estudios asignan un papel a NQO1 en la protección antioxidante a través de la reducción de quinonas endógenas que, en su estado reducido, protegen del daño oxidativo. Concretamente en liposomas y hepatocitos de rata, cataliza la reducción de diversos análogos del Coenzima Q (CoQ) para la consecuente generación de ubiquinol ¹⁹². Además, ha sido indicado un papel adicional en el metabolismo del α -tocoferol, sugiriendo que NQO1 participa en el mantenimiento de los valores fisiológicos de este antioxidante a través de la reducción de α -tocoferonas ^{181,193}. Este papel de la enzima en la defensa antioxidante se pone de manifiesto en diversos análisis inmunohistoquímicos que muestran como la enzima se expresa en diferentes tejidos humanos en los que es necesaria una protección antioxidante ¹⁹⁴, así como en individuos que padecen Alzheimer, una enfermedad asociada a estados de estrés oxidativo, donde se ha detectado un incremento del número de neuronas que expresan NQO1. En definitiva, NQO1 juega un papel importante en la respuesta celular a estrés oxidativo, ya que las EROs inducen la expresión de la proteína NQO1, y esta inducción a su vez hace que disminuyan las EROs.

Diversos estudios realizados sobre la ausencia, sobreexpresión, o inhibición de NQO1 han asignado un papel a este enzima en el mantenimiento del estado redox intracelular. Así, en estudios realizados con ratones *knockout* para NQO1 se reveló que la pérdida de este gen alteraba el estado redox intracelular debido a la acumulación de NAD(P)H, que es sustrato de NQO1 ¹⁹¹. Debido a esta acumulación de NAD(P)H ocurría una reducción de los valores de la proteína p53 y un descenso en la apoptosis. El descenso en la apoptosis, por su parte causó hiperplasia de células mielocíticas en los ratones carentes de NQO1 ¹⁹⁵.

Aunque se han detectado valores elevados de NQO1 en algunas células tumorales, como por ejemplo en HeLa, la falta de NQO1 también está asociada con la carcinogénesis ¹⁹⁶. Los valores de NQO1 son muy elevados en los

tumores de la glándula adrenal, colon, pulmón, ovario, páncreas y tiroides¹⁹⁴. Por otra parte, NQO1 se encuentra a valores muy bajos o incluso nulos en células leucémicas mielocíticas HL-60, así como en algunas células de cáncer de mama, donde la falta de NQO1 constituye un factor de pronóstico negativo^{197,198}.

El análisis de los mecanismos relacionados con la mayor agresividad de las células cancerosas de mama que carecen de NQO1 reveló tanto funciones dependientes como independientes de p53. Sin embargo, en este último caso solo se estudiaron las funciones bien establecidas de NQO1 como antioxidante y en la regulación de la señalización dependiente de TNF α ¹⁹⁹. En ratones *knockout* para NQO1 se ha comprobado que la pérdida de la función de la proteína está asociada con un incremento en la susceptibilidad de presentar una variedad de tumores¹⁹⁵, estando dicha pérdida acompañada por una reducción de la concentración de p53¹⁹⁵ y cambios en NF- κ B²⁰⁰.

2.3.2.3 Factor de Transcripción Nrf2

El origen del factor Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) está relacionado con los estudios de la proteína NF-E2, que en el ratón contiene 373 aminoácidos y una aparente masa molecular de 45 kDa, por lo que a veces se le ha denominado p45. NF-E2 se expresa únicamente en células del tipo eritroide o megacariocitos. Se une a un lugar de reconocimiento parecido al de AP1 (GCTGAGTCA) y regula la expresión de genes de globina tejido específicos. NF-E2 funciona como un heterodímero junto con las proteínas Maf pequeñas.

Al intentar aislar al factor de transcripción de la región de control del *locus* del gene de β -globina, usando secuencias repetidas de NF/AP1 como sitio de reconocimiento en levaduras, se encontraron 2 proteínas muy similares a NF-E2, las cuales fueron denominadas como Nrf1 (66 kDa) y Nrf2 (68 kDa) y posteriormente se encontró un tercer factor, Nrf3²⁰¹.

Los Nrfs pertenecen a una familia de proteínas básicas con un característico *zipper* o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal. La

región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN, mientras que la región acídica al parecer se requiere para la activación transcripcional. Así mismo poseen una región homóloga a la proteína *cap'n'collar* (CNC) de *Drosophila*, altamente conservada entre las Nrfs, cuya función aún se desconoce.

Los factores de transcripción nucleares Nrf1 y Nrf2 relacionados con NF-E2 tienen un papel importante en la regulación de los genes antioxidantes y su inducción por agentes que incrementan el estrés oxidativo, entre ellos la radiación UV¹⁸⁶ y la radiación ionizante¹⁸. Estos factores nucleares, especialmente Nrf2, se unen a elementos de respuesta antioxidante (AREs) después de su heterodimerización en el núcleo con factores de transcripción que contienen dominios bZIP¹⁵. El ARE es una secuencia potenciadora de acción *cis* presente en la región promotora de muchas enzimas antioxidantes²⁰²⁻²⁰⁴.

La primera evidencia del papel de Nrf2 en la protección contra el estrés oxidativo proviene del estudio de Venugopal y Jaiswal en 1996²⁰⁵, en el que se demostró que la sobreexpresión del ADNc de Nrf1 y Nrf2 aumentaba la expresión e inducción de NQO1 en respuesta a antioxidantes y xenobióticos. Además los autores indicaron que Nrf1 y Nrf2 regulaban positivamente a ARE, mientras que c-Fos y Fra1 lo hacían de manera negativa.

El papel de Nrf2 se confirmó cuando se obtuvieron los primeros ratones genéticamente modificados y carentes de este factor (Nrf2^{-/-}). Los ratones Nrf2^{-/-} tuvieron un desarrollo aparentemente normal, por lo que se descartó que Nrf2 fuera esencial para la eritropoyesis murina, el crecimiento o el desarrollo. No obstante, estos ratones no podían inducir la expresión de los genes responsables de la detoxificación de agentes carcinogénicos y de protección contra el estrés oxidativo.

Estudios más recientes han demostrado que Nrf2 también contribuye a la actividad del proteasoma 26S, todo lo cual confirma la crítica participación de Nrf1 y Nrf2 en la protección contra el estrés oxidativo y los xenobióticos²⁰¹.

El factor de transcripción Nrf2 es capaz de regular la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes (catalasa y SODCu/Zn)²⁰¹ o de mediar la inducción de proteínas como la NAD(P)H:quinona-oxidorreductasa 1 (NQO1), la GST, la hemoxigenasa 1 o la peroxirredoxina 1 (Prx 1)²⁰⁶, las cuales serán cruciales para la protección de la célula contra la toxicidad electrófila, estrés oxidativo o la prevención de ciertas enfermedades²⁰⁷ mediante unión con una proteína citoplasmática llamada Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) y al citoesqueleto. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteasoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente es su distribución subcelular, más que en la síntesis *de novo*²⁰¹. En condiciones basales Nrf2 es regulado negativamente por Keap1 manteniéndolo en el citoplasma, lo que facilita la degradación de Nrf2 por el proteasoma. Ante una situación de estrés en la célula, tendrá lugar un cambio conformacional del complejo Nrf2-Keap1, y por lo tanto la disociación de Nrf2 el cual pasará al núcleo. Se cree que esta disociación puede tener lugar de dos formas: mediante la fosforilación de Nrf2, o mediante la unión de compuestos electrofílicos a los residuos de cisteína de Keap1²⁰⁸. En ambos casos, el resultado será la translocación de Nrf2 al núcleo. Una vez aquí, Nrf2 se unirá a un ARE que puede ser activado por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa. El resultado final es la transcripción de elementos antioxidantes para restaurar el balance oxidativo (Figura 2-14)²⁰⁷.

Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección frente a varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación entre otras²⁰¹.

En ausencia de agentes inductores de estrés oxidativo, Nrf2 se expresa pero se mantiene confinado en el citoplasma en forma ubiquitinizada y es posteriormente degradado, resultando una baja concentración general de Nrf2²⁰⁹. El confinamiento citoplasmático y ubiquitinación están mediados por la proteína Keap1, que une Nrf2 al complejo de ubiquitinación Cul3 (*Cullin3-based E3-ligase ubiquitination complex*)¹⁵. Todavía hay poca información sobre las vías de modificación de Keap1 que conducen a la regulación de la baja

ubiquitinación del Nrf2 pero se han probado varios compuestos que aumentan la concentración nuclear de Nrf2 y en consecuencia mejoran la expresión de enzimas antioxidantes. Después de la incubación de células HepG2 con un máximo de 40 μM de quercetina, Nrf2 resultó regulado al alza por regulación a la baja de su ubiquitinación y no por su separación de Keap1, puesto que esta proteína no resultaba ubiquitinizada y permanecía ligada a Nrf2²¹⁰. En respuesta al estrés oxidativo o electrofílico se ha propuesto una modulación tiol-dependiente de Keap1 de manera que Nrf2 pueda escapar de la represión por Keap1 y puede migrar al núcleo²¹¹.

La vía Keap1-Nrf2 ha sido más estudiada en relación con la radiación UVA y UVB, y se han propuesto varias sustancias fitoquímicas como radioprotectores UV, entre las que se encuentran alcaloides, carotenoides, isotiocianatos y flavonoides^{212,213}. Especialmente prometedor es el papel protector de la quercetina en la reducción de la apoptosis de queratinocitos inducida por radiación UVA y EROs al mismo tiempo que aumentan la expresión de Nrf2 y de genes antioxidantes²⁰⁷.

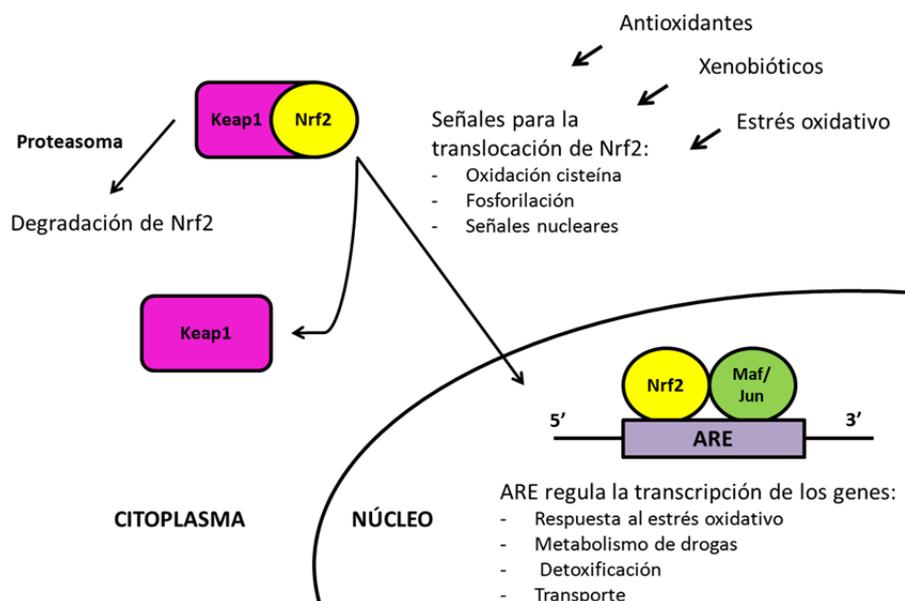


Figura 2-14. Regulación de la transcripción de Nrf2.

Adaptado de Aleksunes y cols.²¹⁴.

2.3.3 Radiación ionizante y estrés oxidativo

Como hemos mencionado en un capítulo anterior, la absorción de radiación ionizante a través de células vivas, puede perturbar directamente estructuras atómicas, produciendo cambios químicos y biológicos. También puede actuar de forma indirecta a través de la radiólisis del agua mediante la generación de especies reactivas que pueden dañar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos³⁶. De esta manera, los efectos directos e indirectos de la radiación inician una serie de vías de señalización tanto moleculares como bioquímicas, que podrían tanto reparar los daños producidos y culminar en constantes cambios fisiológicos, como llegar a la muerte celular⁴⁶.

Se cree que las modificaciones bioquímicas tempranas que ocurren en un corto periodo de tiempo desde la exposición, son las responsables de la mayoría de los efectos de la radiación ionizante en células de mamíferos. Sin embargo, los cambios oxidativos podrían comenzar a aparecer durante días o incluso meses después de la exposición inicial a la radiación debido a la continua generación de especies reactivas⁴⁹. Cabe destacar, que estos procesos no ocurren sólo en las células irradiadas sino que se transmitirá a la progenie^{46,215,216}, manifestándose como perturbaciones en el metabolismo oxidativo y un amplio rango de daños oxidativos, incluyendo carbonización de proteínas, peroxidación lipídica y aumento en el número de mutaciones genéticas espontáneas y transformaciones neoplásicas^{51,51}. La persistencia de estos efectos de estrés en las células de la progenie va a tener importantes implicaciones en cuanto a riesgos en la salud a largo plazo, incluyendo la posible aparición de cáncer seguido posteriormente de un tratamiento radioterapéutico²¹⁷⁻²¹⁹.

Evidencias recientes también sostienen la existencia de estrés oxidativo crónico en la progresión de enfermedades degenerativas y la lesión tardía de tejidos inducida por radiación^{46,220}.

Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos moleculares y bioquímicos que originan estrés oxidativo en células y tejidos tanto a corto como a largo plazo, representa un punto importante para las terapias dirigidas

a paliar estos efectos adversos de la radiación ionizante y posibilitar de este modo una mejoría de la salud.

2.3.3.1 Efectos primarios de la radiación ionizante

2.3.3.1.1 Formación de radicales libres

El agua es el principal componente de las células (80%), de manera que es importante una buena comprensión de la radiólisis del agua para entender los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes.

La absorción de radiación a través del agua supone la aparición de una serie de excitaciones e ionizaciones que permiten la generación de radicales libres que atacarán a moléculas de vital importancia. Estas especies reactivas generadas por radiólisis pueden ser electrones, OH^\cdot , H^\cdot , H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ ²²¹.

En sistemas biológicos, también se pueden formar radicales orgánicos (R^\cdot) que suelen reaccionar con rapidez con el O_2 para formar radicales peróxidos (RO_2^\cdot), que serán especies más oxidantes ²²². Estos son capaces de extraer H^\cdot de otras moléculas para formar hidroperóxidos (ROOH), reacción en la que se basa la peroxidación lipídica.

En este contexto, la progresión del daño celular producido por radiación probablemente implica continuas reacciones de peroxidaciones lipídicas que puede llegar a la inactivación de la proteína ^{49,223}.

La radiación ionizante también puede inducir la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en las células afectadas ²²⁴, situación que dará lugar a un aumento en la generación de óxido nítrico (NO). Aunque NO es químicamente inerte para los constituyentes celulares puede reaccionar con el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ ²²⁵ y formar el anión peroxinitrito (ONOO^-) con una constante de velocidad de catálisis mayor que la superóxido dismutasa (SOD), encargada de la dismutación de los $\text{O}_2^{\cdot-}$ ²²⁵. Al igual que los radicales hidroxilo (OH^\cdot), El radical ONOO^- también es altamente reactivo y capaz de atacar a una amplia gama de dianas celulares, incluyendo lípidos, tioles, proteínas y bases del ADN. Pero esta alta reactividad del radical ONOO^- va a suponer una baja

selectividad, una reactividad limitada con las moléculas vecinas y la incapacidad para actuar como mensajero celular.

Por el contrario, la menor reactividad de radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) les permite difundir del lugar de origen a una mayor distancia (los coeficientes de difusión de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\text{HO}_2^{\cdot-}$ son $2,3 \times 10^{-9}$, $1,75 \times 10^{-9}$ y $2,3 \times 10^{-9}$ respectivamente) ²²⁶. En presencia de iones metálicos redox, principalmente hierro y los iones de cobre, estas especies conducen a la producción de radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) a través de reacciones como Haber-Weiss y Fenton ²²⁷, que pueden potenciar el daño celular ²²⁸.

En resumen, la radiólisis del agua y la activación temprana de la enzima óxido nítrico sintasa supone una fuente importante de aumento de concentración de EROs/ERNs en células que han sido previamente irradiadas. Curiosamente, el rendimiento de estas especies va a ser en gran parte regulado en función de los diferentes tipos de radiación. De esta manera, ante un aumento en la transferencia de energía lineal (LET) se producirá un aumento en el rendimiento de los productos moleculares (H_2O_2), acompañado por la correspondiente disminución en el rendimiento de los radicales (como OH^{\cdot}). Por el contrario, $\text{O}_2^{\cdot-}$ (o $\text{HO}_2^{\cdot-}$) serán los radicales más abundantes que se generan con este tipo de energía ²²⁹. Evidentemente, el rendimiento de estos productos y sus concentraciones a lo largo de la trayectoria de las partículas de radiación, tendrán importantes consecuencias sobre la extensión y el daño que se produzca en el ADN ^{230,231}.

Los radicales libres podrán atacar al ADN provocando importantes alteraciones tales como roturas en las cadenas, daños en las bases, destrucción de azúcares, cruzamiento de enlaces (*crosslinks*) y disfunciones de telómeros ^{232,233}. Si estos daños no se reparan o se reparan incorrectamente, podría tener lugar la aparición de mutaciones, transformación neoplásica o incluso la muerte celular ²¹⁵.

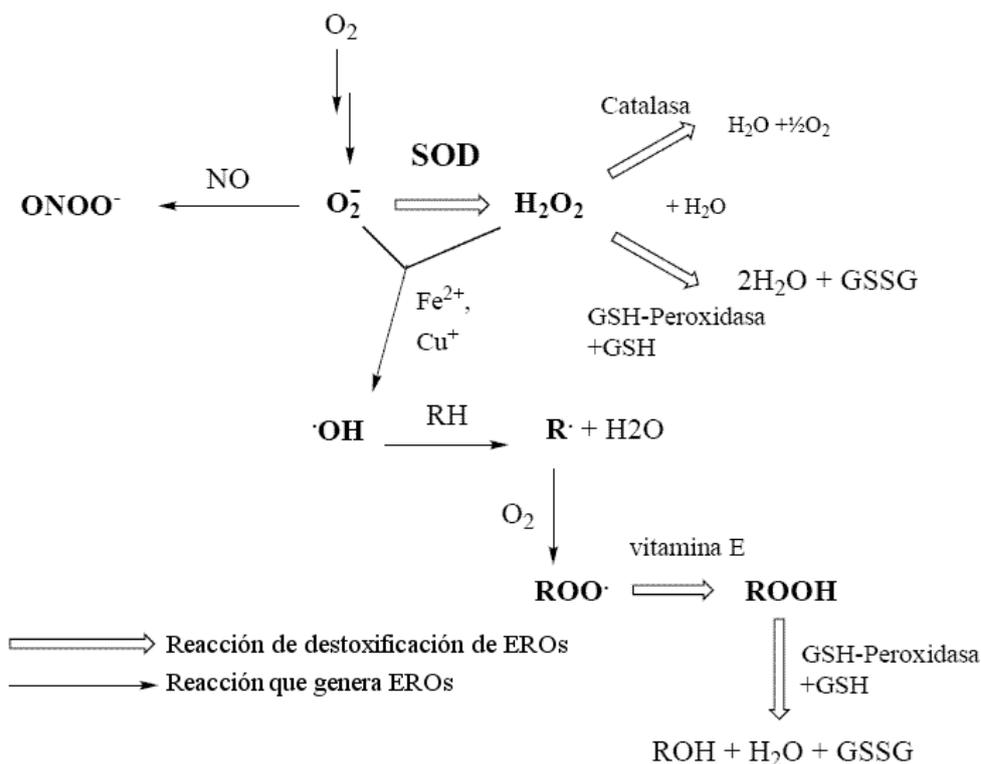


Figura 2-15. EROs y ERNs y su sistema de detoxificación.

Adaptada de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/da/Systeme_detox_ROS.GIF

2.3.3.1.2 Cascada de señalización celular inducida por la radiación

Como resultado de esta radiación se activarán las diferentes cascadas de señalización que responden a estas condiciones de estrés, como pueden ser las respuestas de adaptación que implican reparaciones en el ADN o la activación de las reacciones que llevan a cabo las enzimas antioxidantes que se desencadenarán tras una exposición a una dosis baja de LET (rayos X y γ). Estos mecanismos protectores podrían compensar esta situación de estrés, dando lugar a una respuesta estimuladora que potenciará el buen funcionamiento del organismo a largo plazo^{47,234}. No obstante, en el caso de las cascadas de señalización tanto basal como inducida, no muestran una mejora en cuanto al daño producido por la irradiación²³⁵.

Los daños celulares generados podrán ser intensos y por tanto pueden aparecer también en la progenie. La persistencia de estas perturbaciones en el metabolismo oxidativo del organismo, estarán asociadas con una respuesta

inflamatoria crónica^{215,236,237}. De aquí que el interés por la radioterapia²³⁸ y la protección contra la radiación²²⁰, sea un campo de creciente interés y objeto de muchas investigaciones²³⁹.

Las crecientes investigaciones indican que las células inflamatorias que circulan en la sangre de pacientes que han sido sometidos a una irradiación parcial de su cuerpo, originan daños en el ADN en lugares que están más distantes del punto diana donde ha sido recibida la radiación. Los macrófagos también segregan citoquinas²⁴⁰ que pueden perturbar funciones fisiológicas en las células vecinas. Por lo tanto, los efectos celulares generados debidos a la administración de una energía localizada, no pueden considerarse de manera independiente a los que aparezcan en las células que hay alrededor. Mientras que determinados cambios genéticos y epigenéticos tanto en células diana como en las circundantes podrán aparecer poco tiempo después de la exposición a radiación^{216,241}, otros requieren mucho más tiempo, incluso varias generaciones, para expresarse^{51,242}. En un estudio de investigación realizado con ratones a los que se les irradiaba el cuerpo en su totalidad, se observó que algunos de estos efectos (por ejemplo, la expresión de microARN) se detectaban unas horas después de la exposición a radiación y podían persistir durante días, semanas o incluso meses²⁴².

Por lo tanto, los cambios debido a una inflamación crónica inducida por radiación junto con las alteraciones en el metabolismo oxidativo, pueden conducir a la inestabilidad genómica de las células diana y las células vecinas²⁴³, lo que causará una serie de efectos graves para la salud incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer²⁴⁴.

2.3.3.1.3 Especies reactivas de oxígeno y homeostasis celular

Aunque el exceso en la formación de EROs producidas por la radiación ionizante es claramente perjudicial, las EROs intracelulares generadas bajo condiciones fisiológicas actúan como señales moleculares esenciales en la regulación de numerosos procesos celulares²⁴⁵. Por lo tanto, las funciones de homeostasis celular requieren un control estricto del ambiente redox⁴⁶. A bajas concentraciones de EROs, estos participan en vías de señalización para el

normal mantenimiento de las funciones celulares mediante la regulación de la expresión de determinados genes²⁴⁶, modulando las actividades de los canales iónicos, de intermediarios como segundos mensajeros en la transducción de señales²⁴⁷.

Las concentraciones de estas EROs dependen en gran medida de la disponibilidad de oxígeno celular²²⁸. La mayoría de los oxidantes y sus productos son metabolizados a través de diferentes enzimas y pequeñas moléculas antioxidantes²⁴⁸. Lo más probable es que las EROs que escapan de la defensa antioxidante participen en la regulación homeostática de la señalización redox²⁴⁹.

Existe un gran interés en el estudio de agentes exógenos que producen daños en el ADN, como es el caso de la radiación, y ello ha conducido a una mejora en la sensibilidad de los métodos analíticos que miden el daño por oxidación. Sin embargo, las mejoras en la sensibilidad de los métodos analíticos para medir estos daños oxidativos han puesto de manifiesto alteraciones en bases y nucleótidos en el ADN de células normales que no han estado expuestas a radiaciones ionizantes y otros mutágenos. Los análisis han demostrado que los procesos bioquímicos endógenos contribuyen en gran medida a las mutaciones en el genoma²⁵⁰.

La producción de EROs durante los procesos metabólicos de células normales (sobre todo O_2^- y H_2O_2) da lugar a una elevada tasa de eliminación de purinas y en menor parte de pirimidinas. La tasa de generación de estas alteraciones está estrechamente ligada a la tasa de metabolismo oxidativo, de manera que ante la presencia de un elevado consumo de oxígeno se aprecia un aumento en el rango de oxidación de bases en el ADN para diferentes especies. Un fallo en la reparación de estas bases oxidadas va a crear un riesgo de mutación en el proceso de replicación de ADN²⁵¹.

Las defensas actúan para intentar restablecer la integridad del ADN. En respuesta a estos daños, las células activan determinados puntos de control de su ciclo celular que dan tiempo a que esta maquinaria de defensa repare el ADN. Por ejemplo, la reparación de escisión de bases reconoce y repara

modificaciones espontáneas de bases en lugares específicos y en roturas simples de la cadena. Otras formas de reparación del ADN, incluyen la reparación de escisión de nucleótidos, genes de reparación, o reparaciones en roturas dobles de la cadena que reparan otros tipos de daños en el ADN ²⁵².

El espectro de generación de EROs durante y tras un corto periodo de tiempo post-irradiación, es similar a la producida por procesos metabólicos. Sin embargo, existen diferencias en la microdistribución (moléculas individuales y generación de EROs debidas a la radiación, frente a las moléculas individuales producidas mediante procesos endógenos), en el rendimiento relativo de productos específicos (principalmente $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 producidos en procesos endógenos, frente al OH^{\cdot} producido mediante el rendimiento más alto de las células irradiadas), y en el momento específico de la producción (liberación endógena crónica de EROs frente a la producción instantánea que se produce durante la radiación). Como resultado, mientras que el daño debido a la producción de EROs metabólicos se distribuye al azar en el ADN, los daños en el ADN inducidos por irradiación frecuentemente tienen lugar en los *clusters* ²⁵³.

Por lo tanto, para bajas dosis de radiación, el número total de alteraciones inducidas en el ADN es probablemente más pequeña que cuando se compara con el que se genera en los procesos endógenos del metabolismo ²⁵⁴.

A pesar de que la literatura le ha dado una mayor importancia a las funciones fisiológicas debidas a un aumento de EROs por encima de los valores normales, una menor cantidad de estos también pueden dar lugar a importantes cambios en las funciones celulares. Por ejemplo, la inhibición de la producción de superóxido a través de la NADP(H)-oxidasa (pero no el óxido nítrico generado por la óxido nítrico sintasa), da lugar a una fuerte parada del ciclo celular en la fase G1 (Figura 4-6). Es importante destacar que esta parada del ciclo puede atenuarse cuando las células tratadas con inhibidores de la NADP(H)-oxidasa, son expuestas simultáneamente a bajas dosis de rayos γ . Estos resultados sugieren que la generación de EROs debido a la exposición a rayos γ , sustituyen los efectos de las EROs generadas a través de la NADP(H)-oxidasa ⁴⁸.

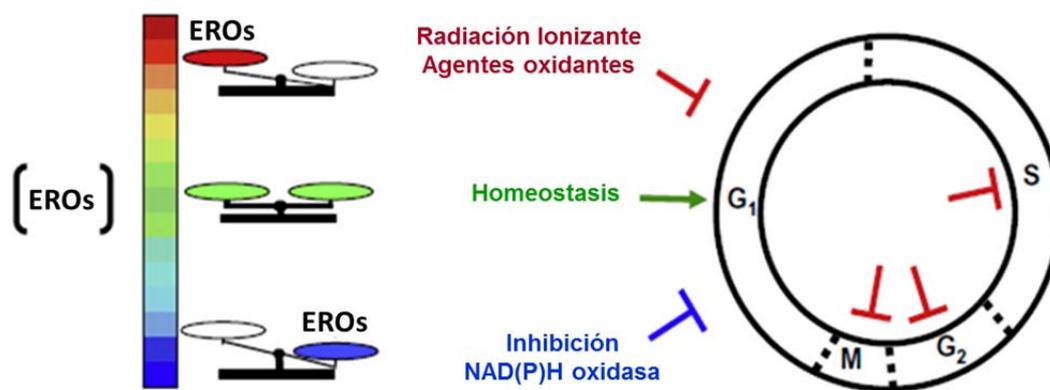


Figura 2-16. EROs y la regulación de la proliferación celular.

El aumento o disminución en los valores normales de EROs, pueden inducir paradas o retrasos en diferentes puntos del ciclo celular. Adaptado de Azzam y cols.⁴⁸

A menudo se plantea la pregunta de si las especies químicas y/o lesiones genéticas inducidas por la radiación ionizante son distintas o similares a las producidas por el metabolismo oxidativo normal. La habilidad de las EROs inducidas por radiación para reemplazar las EROs generadas por determinadas flavín-oxidasas (por ejemplo, la NADP(H)-oxidasa) con el objetivo de restablecer la progresión del ciclo celular, parece ser que es similar. Con esto se establece un fuerte vínculo entre los procesos metabólicos oxidativos y las funciones del ciclo celular²⁴⁵. Sin embargo, las consecuencias biológicas de la exposición a radiación son más severas que las resultantes del metabolismo celular normal. Esto indica que el daño producido por los radicales que aparecen como consecuencia de la ionización causada por la radiación, debe ser cualitativamente diferente al que se genera como consecuencia de la actividad del metabolismo normal. Una de las diferencias relacionadas con el daño producido por estos radicales libres debido a radiación, es que los mediadores del proceso de ionización producen grupos (*clusters*) de radicales en un volumen muy pequeño, y por lo tanto serán altamente perjudiciales²⁵⁵.

Desde un punto de vista médico, la parada del ciclo celular en la fase G1 debido a un entorno celular redox, ofrece un importante potencial terapéutico para el control de tumores. En particular, muchas células cancerosas muestran un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otras

especies oxidantes que están asociadas con la proliferación celular²⁵⁶. Por lo tanto, el enfoque de una inhibición en la producción basal de oxidantes mediante flavín-oxidasas, o en otras fases del ciclo en las cuales se produce un gran aumento de la proliferación celular en la mayoría de los tumores, podría ser una importante diana terapéutica para el tratamiento del cáncer²⁵⁷.

Este enfoque puede complementar la radioterapia de células cancerosas, que normalmente no estaban paradas en G1 después de la radiación²⁵⁸. La proliferación celular asociada a la presencia de estrés oxidativo también contribuye a otras patologías como enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y diabetes²⁵⁹. El restablecimiento de la regulación del ciclo celular mediante la manipulación del entorno celular redox, puede ayudar a mejorar algunos de estos trastornos²⁴⁵.

Una exposición celular a radiación ionizante, podría activar las oxidasas que generan EROs, modular antioxidantes y provocar alteraciones en actividades metabólicas en respuesta a esta situación oxidante. Entre la multitud de efectos que se inducen, la radiación ionizante podría atacar a las funciones mitocondriales por muchas razones. Una de ellas es que la mitocondria ocupa una importante fracción dentro del volumen celular (4-25% dependiendo de la célula)²⁶⁰, lo que le hace un blanco fácil para la radiación que pasa a través de la célula. Por otra parte y más importante aún, es que las mitocondrias consumen alrededor del 90% de oxígeno total del cuerpo y son la fuente más rica de EROs^{261,262}. Desvían aproximadamente del 1 al 5% de los electrones procedentes de la cadena respiratoria a la formación de radicales superóxido mediante una reducción dependiente de ubiquinona²⁶³.

Las disfunciones mitocondriales en células irradiadas podrían promover significativamente las perturbaciones en las reacciones de oxidación-reducción que determinan el entorno redox de la célula.

Las mitocondrias se consideran como los generadores de energía de la célula, produciendo ATP a través de la respiración aeróbica²⁶⁴. La respiración se considera la principal fuente de obtención de energía celular, e incluye procesos como ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs (TCA),

cadena de transporte de electrones (ETC), y la fosforilación oxidativa. El ciclo de Krebs tiene lugar en la matriz mitocondrial, y el metabolismo oxidativo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos se incluyen dentro del ciclo de Krebs para producir NADH y FADH₂. Estos intermediarios esenciales son ricos donadores de electrones que entran la ETC en la membrana mitocondrial interna para su uso y producción de ATP. La ETC está formada por cinco complejos proteicos (I-V) donde tienen lugar una serie de reacciones redox y el O₂ actúa como aceptor final de electrones reduciéndose a H₂O₂. Estos electrones son transferidos por parejas, con la expulsión de protones (H⁺) fuera de la matriz y dentro del espacio intermembrana, creándose un gradiente de protones que conducirá a la producción de ATP a través de una fosforilación oxidativa. La consecuencia de esta producción de energía es la generación de EROs ²⁶⁵.

La formación de EROs por la mitocondria juega un papel importante en múltiples cascadas de señales ²⁶⁶ y media la apoptosis ²⁶⁷. Un exceso de EROs podría causar mutaciones en el ADN mitocondrial, provocar daños o alterar la expresión de proteínas necesarias para funciones celulares necesarias y críticas para la mitocondria.

Se han valorado importantes criterios para examinar posibles disfunciones mitocondriales en células irradiadas y en su progenie. Por ejemplo, en las generaciones tempranas y tardías esta radiación produce EROs y ERNs que provocarán cambios en el número de copias del ADN mitocondrial, mutaciones y expresión de genes, autofagia, apoptosis, inducción de daños en el ADN nuclear, inestabilidad genómica, transformaciones neoplásicas, condiciones degenerativas, entre otros resultados ⁴⁸. También disfunciones sobre la importación de proteínas mitocondriales, unión de grandes complejos proteicos, oxidación de proteínas y actividad de enzimas tanto metabólicas como antioxidantes ^{51,268}.

Por lo tanto, y de una manera significativa, la persistencia de los efectos de la radiación que producen estas disfunciones mitocondriales en las células de la progenie, tendrán como consecuencia graves riesgos para la salud ⁴⁶.

2.4 Agentes radioprotectores

2.4.1 Introducción

Puesto que la exposición a la radiación puede producir importantes efectos secundarios no deseados, es importante tratar de mejorar o mitigar tales efectos mediante el uso de agentes radioprotectores o radiomodificadores. En general, un agente radioprotector ideal debe cumplir varios criterios, incluyendo la protección general contra los efectos de la radiación en la mayoría de los órganos, una fácil administración (oral, intramuscular), un perfil de baja toxicidad a largo plazo, buena estabilidad, y compatibilidad con otros fármacos que se administrasen simultáneamente. Pero la realidad es que ninguno de los extractos de los compuestos utilizados hasta la actualidad, ya sea sintético, natural o como mezcla de vegetales, cumplen con todos estos criterios.

Una primera línea de protección radiológica es la eliminación de los radicales libres que se encuentran en el entorno celular. Dado que los radicales libres tienen una duración muy corta, el objetivo de estos agentes es su presencia alrededor de la célula antes de que se generen los radicales libres, con el fin de neutralizar sus efectos nocivos. También podemos incluir en esta línea, los procesos encaminados a la mejora de la situación antioxidante de la célula.

Un segundo mecanismo de acción de los agentes radioprotectores consiste en la estimulación, proliferación y modificación de las funciones de las células madre, ya sean hematopoyéticas como inmunopoyéticas.

Y por último, una tercera vía, en este caso indirecta, sería la acción de estos agentes sobre las células tumorales de manera que se favorezca su eliminación y por tanto permanezcan sólo las células sanas. En este caso, la línea de investigación va a tener un enfoque terapéutico dirigido a la oncología, y en la actualidad sigue estudiándose²⁶⁹.

Los radioprotectores son agentes que reducen la toxicidad, la mutagenicidad y otros efectos biológicos de la radiación ionizante en los seres

vivos²⁷⁰. Son compuestos sintéticos o productos naturales administrados inmediatamente antes de la irradiación con el fin de reducir las lesiones causadas por las radiaciones ionizantes. Como resultado de la gran necesidad clínica de agentes radioprotectores eficaces, se ha puesto mucho esfuerzo dirigido al desarrollo y ensayo de radioprotectores menos tóxicos y más eficaces que pueden ser fácilmente auto-administrados⁸⁵.

Con la llegada de la era nuclear, el gobierno de Estados Unidos inició en los años 50 un programa con el objetivo de producir agentes químicos para proteger a los soldados frente un posible ataque nuclear. En 1979 mediante dicho programa ya se habían caracterizado alrededor de 4.000 compuestos²⁷¹. Los aminotioles fueron el primer grupo de compuestos identificados como potenciales radioprotectores. Del estudio de dichos compuestos, en especial de la cisteína, se derivaron las siguientes conclusiones:

La radioprotección se podía alcanzar con un compuesto que tuviera grupos aminos cargados positivamente y un grupo sulfhidrilo libre.

- La forma disulfúrica de estos compuestos no confería radioprotección.
- El compuesto debía de ser administrado antes de la irradiación para que estuviera presente en las células durante la misma.
- La magnitud de la protección era proporcional a la cantidad de compuesto administrado²⁷².

De todos los aminotioles ensayados, la amifostina (ácido S-2-(3-aminopropilamino)-etilfosforotioico) resultó ser el mejor candidato. Sin embargo, su uso militar se vio limitado por diferentes factores entre los que se encuentran los severos efectos colaterales tales como náuseas, vómitos e hipotensión, entre otros. Además la única ruta de administración efectiva era la inyección intravenosa, por lo que para alcanzar el máximo de eficiencia debía de ser administrada 30 minutos antes de la potencial exposición a la radiación. Todo lo anteriormente expuesto, unido al hallazgo de Yuhas y colaboradores en 1969, quienes demostraron que la amifostina podía ejercer una protección

diferencial entre tejido normal y tumoral, conllevó a su uso en la clínica donde sus efectos indeseables podían ser manejados ²⁷³.

Tanto la aplicación de radiaciones ionizantes en la práctica médica (por ejemplo, radioterapia y medicina nuclear) como la exposición accidental a la radiación (por ejemplo, en accidentes nucleares industriales), han permitido constatar que el desarrollo de una protección radiológica eficaz es una cuestión de gran importancia médica. Desde hace años, en medicina se han utilizado tradicionalmente extractos de origen vegetal para el tratamiento de múltiples síntomas, y un número no desdeñable de estas preparaciones se ha visto que presentan actividad radiomodificadora ²⁷⁴.

2.4.2 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos presentes en frutas, verduras, frutos secos, bebidas derivadas de materiales vegetales como el té y el vino, y en preparaciones de medicina tradicional a base de extractos vegetales. Pertenecen a una serie de antioxidantes funcionales, entre los que también se incluyen vitaminas, minerales y enzimas. Estos compuestos antioxidantes permiten reducir el grado de oxidación, lo que supondrá una mayor protección en el organismo contra las lesiones provocadas por la radiación ionizante.

Las fuentes alimenticias principales de los flavonoides son, entre otras, el té negro, la cebolla, la manzana, la pimienta negra (que contiene cerca de 4 g/kg de quercetina), y bebidas alcohólicas como vino y cerveza. No poseen las características de las vitaminas: no son aminos y conforman otro grupo químico, pero por su acción protectora y la imposibilidad del organismo humano de producirlos, merecen ser incorporados al grupo de los nutrientes esenciales ¹⁶².

2.4.2.1 Estructura y tipos de flavonoides

Todos ellos son fenilbenzopironas de bajo peso molecular que contienen dos anillos de benceno (A y B) unidos entre sí mediante un anillo heterocíclico

pirano o pirona (anillo C). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'.

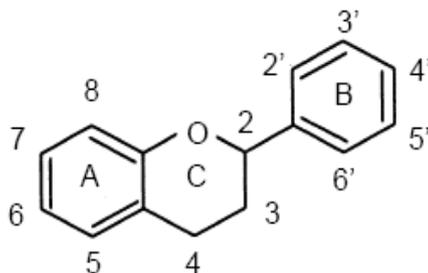


Figura 2-17. Flavonoides. Estructura básica.
Imagen obtenida de Martínez-Flórez y cols.¹⁶²

La estructura básica de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1) *Flavanos*, como la catequina, con un grupo -OH en la posición 3 del anillo C.

2) *Flavonoles*, representados por la quercetina y el kaempferol, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en la posición 3 del anillo C.

3) *Flavonas*, como la apigenina, que poseen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C y carecen del grupo -OH en la posición C3.

4) *Antocianidinas*, que tienen unido el grupo -OH en la posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

5) *Flavanonas*, como la taxifolina, que carecen del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C²⁷⁵.

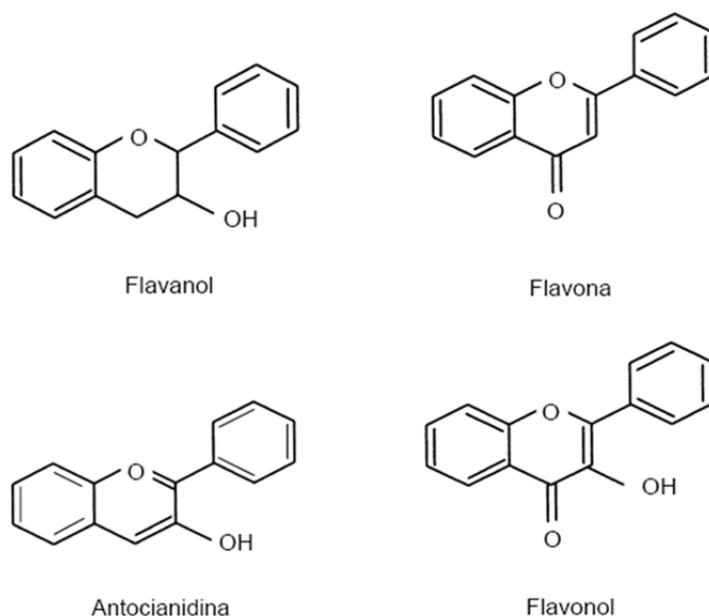


Figura 2-18. Tipos de flavonoides.
 Imagen obtenida de Martínez-Flórez y cols.¹⁶²

2.4.2.2 Funciones de los flavonoides

Los flavonoides se oxidan por radicales generando un radical más estable y menos reactivo. Esto es debido a la elevada reactividad del grupo -OH del flavonoide, y como resultado se formará un radical derivado del antioxidante que puede tener cierto grado de reactividad:



El mecanismo por el que ejercen su actividad antioxidante es la transferencia de electrones y su capacidad para quelar metales. Además, estas sustancias deben cumplir una serie de requisitos para ser consideradas antioxidantes:

- Deben proteger a los compuestos, incluso a bajas concentraciones, contra la oxidación o el daño por los radicales libres.

- El radical flavonoide formado (llamado radical aroxilo) debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva.

Los flavonoides son antioxidantes en virtud del número y posición de sus grupos hidroxilos fenólicos unidos a las estructuras de anillo²⁷⁶. Existen una serie de características estructurales que favorecen la capacidad antioxidante de los flavonoides (Figura 2-19). Estos criterios químicos son:

- Estructura O-dihidroxi en el anillo B que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble enlace 2-3, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C.

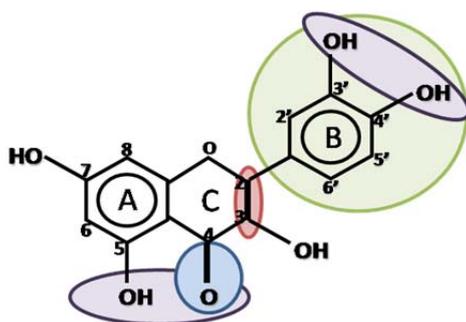


Figura 2-19. Estructura que confiere capacidad antioxidante a los flavonoides

Hay muchos estudios que sugieren que estos grupos hidroxilo de los flavonoides desempeñan un papel crítico en su actividad biológica. Por ejemplo, la cantidad de radicales hidroxilo en la molécula de los flavonoides es importante para sus efectos radiomodificadores²⁷⁷ y la activación de la caspasa-3²⁷⁸. También se ha indicado que las actividades biológicas de los flavonoides parecen estar relacionados con la estructura del anillo B (Figura 2-19)²⁷⁹. En la Tabla 2-2 se presenta un listado de las distintas especies de flavonoides cuyos efectos radiomodificadores han sido investigados.

Se han identificado más de 6.000 variedades de flavonoides de origen natural. Esta familia de compuestos se ha vuelto cada vez más popular en el ámbito biomédico debido a su notable espectro de las actividades bioquímicas y farmacológicas²⁸⁰. Los flavonoides tienen efectos sobre funciones celulares básicas como son el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis. A partir de estudios epidemiológicos, se ha sugerido que los flavonoides protegen contra diversas etapas del proceso del cáncer y están asociados con una menor incidencia de enfermedades coronarias²⁸¹.

La actividad de neutralización de los radicales libres de los flavonoides es la base de sus potentes efectos antioxidantes. También se ha demostrado que los flavonoides son capaces de ligar iones metálicos pesados, por ejemplo, hierro y cobre, que están implicados en reacciones tipo *Fenton*²⁸². Si bien se ha creído durante mucho tiempo que las acciones biológicas de los flavonoides se deben a su potencial antioxidante, en la actualidad no está claro si otros mecanismos de acción contribuyen a su efecto general o son incluso más importantes que sus propiedades de neutralización de radicales libres. Aunque algunos flavonoides, en efecto, actúan como poderosos antioxidantes, parece ser cierto que en altas concentraciones son capaces de generar especies reactivas de oxígeno por auto-oxidación y reciclaje de oxidorreducción^{23,283}.

Compuesto	Clase	Referencias
Apigenina	Flavona	Gupta y cols. 2002 ²⁸⁴ , Rithidech y cols. 2005 ²⁸⁵ , Wang y cols. 1999 ²⁷⁸ , van Rijn y van der Berg 1997 ²⁸⁶
Diosmina	Flavona	Benavente-García y cols. 2002 ²⁸⁷
Luteolina	Flavona	Shimoi y cols. 1994 ²⁷⁷
Orientina	Flavona	Shimoi y cols. 1994 ²⁷⁷ , Devi y cols. 1998 ²⁸⁸ , Ganasoundari y cols. 1998 ²⁸⁹ , Jagetia y Reddy 2002 ²⁹⁰
Swertisina	Flavona	Jankovic y cols. 2008 ²⁹¹
Vicenina	Flavona	Shimoi y cols. 1994 ²⁷⁷ , Devi y cols. 1998 ²⁸⁸ , Ganasoundari y cols. 1998 ²⁸⁹ , Jagetia y Reddy 2002 ²⁹⁰
Fisetina	Flavonol	Wätjen y cols. 2005 ²³
Kaempferol	Flavonol	Campbell y cols. 2006 ²⁹²
Morina	Flavonol	Parihar y cols. 2007 ²⁹³ , Maliar y cols. 2004 ²⁹⁴ , Arima y Danno 2002 ²⁹⁵ , Chen y cols. 1996 ²⁹⁶
Quercetina	Flavonol	Shimoi y cols. 1994 ²⁷⁷ , Devi y cols. 1998 ²⁸⁸ , Ganasoundari y cols. 1998 ²⁸⁹ , Jagetia y Reddy 2002 ²⁹⁰ , Wätjen y cols. 2005 ²³ , Campbell y cols. 2006 ²⁹²
Rutina	Flavonol	Shimoi y cols. 1994 ²⁷⁷ , Devi y cols. 1998 ²⁸⁸ , Ganasoundari y cols. 1998 ²⁸⁹ , Jagetia y Reddy 2002 ²⁹⁰ , Benavente-García y cols. 2002 ²⁸⁷
Troxerutina	Flavonol	Maurya y cols. 2004 ²⁹⁷
Catequina, Epicatequina	Flavanol	Hosseinimehr y cols. 2007 ⁸⁵ , Lee y cols. 2008 ²⁹⁸
Epigallocatequin galato	Flavanol	Lee y cols. 2008 ²⁹⁸
Hesperidina	Flavanona	Kalpna y cols. 2009 ²⁹⁹
Naringenina	Flavanona	Campbell y cols. 2006 ²⁹²
Naringina	Flavanona	Shimoi y cols. 1994 ²⁷⁷ , Devi y cols. 1998 ²⁸⁸ , Ganasoundari y cols. 1998 ²⁸⁹ , Jagetia y Reddy 2002 ²⁹⁰
Genisteína	Isoflavona	Shimoi y cols. 1994 ²⁷⁷ , van Rijn y van der Berg 1997 ²⁸⁶ , Landauer et al. 2003 ³⁰⁰ , Zhou y cols. 2005 ⁶⁵ , Davis y cols. 2008 ³⁰¹ , Day y cols. 2008 ³⁰² , Para y cols. 2009 ³⁰³

Tabla 2-2. Flavonoides con actividad radiomodificadora. Tomado de González y cols.³⁰⁴

2.4.3 Quercetina

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) es un ejemplo de los flavonoides que podemos encontrar en determinados alimentos como el brócoli o la manzana, y especialmente en las cebollas en su forma glucosídica³⁰⁵. De hecho, la mayor parte de la quercetina disponible en productos naturales se presenta en forma de derivados glucosídicos (quercetina 4'-glucósido, quercetina 3,4'-glucósido) que son absorbidos y, probablemente, transformados

en el interior del enterocito en la forma aglicona para producir metabolitos sulfatados y glucuronidados que llegan al hígado para sufrir nuevas transformaciones^{275,306}. Es uno de los flavonoides más ampliamente estudiados, y muestra una vida media de 3,5 horas en el ser humano, con un perfil farmacocinético que incluye la recirculación enterohepática.

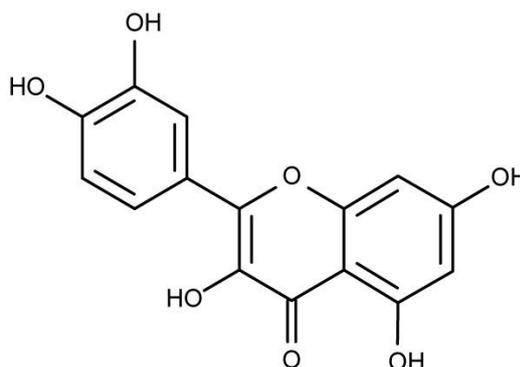


Figura 2-20. Estructura química de la quercetina

La quercetina es el flavonoide que mejor reúne los requisitos para ejercer una función antioxidante. Su capacidad antioxidante se presenta a un rango de concentraciones entre 0,25 a 10 μM ³⁰⁷. La función antioxidante de la quercetina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella, permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo³⁰⁷.

Las evidencias epidemiológicas han demostrado que una dieta rica en quercetina disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares y neoplásicas^{308,309}. Los efectos beneficiosos sobre la salud de la quercetina y de otros flavonoides han sido investigados en relación a sus actividades antioxidantes *in vivo*. El potencial antioxidativo de los flavonoides será diferente en función del número y posición de sus grupos hidroxilo libres dentro de la molécula³¹⁰.

Por la ingestión, los conjugados glucósidos de flavonoides son hidrolizados rápidamente cuando pasan a través del intestino delgado o mediante la actividad bacteriana en el colon, con el objetivo de generar las

agliconas correspondientes que serán metabolizadas a la forma glucuronidada o sulfatada. Alternativamente, el grupo 3'- o 4'-hidroxil en el anillo B fracción catecol, también puede ser metilado mediante la actividad de una catecol-O-metiltransferasa (COMT). Además, la regioselectividad de la conjugación de los grupos hidroxilo, se espera que puedan modular la actividad biológica de la quercetina. Se ha propuesto que la quercetina-3-glucurónido (Q3GA) y la quercetina-3'-sulfato, son los conjugados de quercetina más abundantes en el plasma de rata, donde la forma aglicona no ha sido detectada^{311,312}.

También se han estudiado las actividades fisiológicas de varios metabolitos de quercetina. Aunque se ha examinado la biodisponibilidad de la ingesta de quercetina en conejos, ratas, ratones y humanos, la contribución relativa de los diferentes tipos de conjugados a la actividad biológica *in vivo* aún no es muy clara³¹. Se piensa que el anillo B (Figura 2-17) es el principal responsable de la acción de *scavenging* de sus metabolitos *in vitro* sobre los radicales libres³¹².

En un estudio en ratas, se comprobó que los perfiles de los metabolitos de la quercetina en plasma y su capacidad antioxidante se veían significativamente afectados según el procedimiento de administración. La quercetina aglicona desaparece casi por completo en el plasma de la rata una hora después de su administración intragástrica, siendo sustituida por los derivados sulfato y glucurónido³⁰, pero los perfiles de metabolitos de quercetina son diferentes cuando se administran por vía intragástrica (50 mg/Kg de peso corporal) o suplementada en la dieta (1%)³¹. En consecuencia, aunque los enfoques de investigación *in vitro* permiten el esclarecimiento de los mecanismos moleculares de los efectos de los flavonoides, los datos generados deben ser validados en modelos animales y en último término en seres humanos. Por lo tanto, es necesario tener mucho cuidado al extrapolar los resultados de experimentos *in vitro* con los compuestos purificados hacia situaciones *in vivo*.

2.4.3.1 Principales acciones de la quercetina

Entre las funciones generales ya nombradas que presentan los flavonoides, la quercetina también se caracteriza por los siguientes efectos:

- Como ya hemos indicado, actúa directamente en el tracto intestinal, reduciendo así las reacciones a los alérgenos alimentarios. Por lo tanto, los beneficios para la salud han sido revisados con gran interés durante mucho tiempo, debido a que su baja absorción intestinal suponía una toma diaria de un alto número de cápsulas.
- Su actividad anticancerosa y la de todos los flavonoides ha sido y es objeto de muchos estudios de investigación.
- Protege a los riñones contra la citotoxicidad de ciertos medicamentos, como la ciclosporina.
- Por otra parte, la quercetina protege de la fotooxidación a la vitamina E en la membrana celular de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador.
- Inhibe enzimas como ciclooxigenasas o lipooxigenasas, reduciendo así la producción de los principales mediadores inflamatorios (prostaglandinas y leucotrienos). Por lo tanto, permite ser recomendada para muchas situaciones inflamatorias.
- Inhibe la producción de histamina, la cual es responsable de la mayoría de los síntomas asociados con las alergias. De esta manera, es capaz de estabilizar los valores de basófilos y mastocitos.
- En el hígado se ha descrito que la quercetina es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares, y

en estudios *in vitro* se ha comprobado que diversos flavonoides inhiben la expresión de la óxido nítrico sintetasa y la formación de óxido nítrico en macrófagos estimulados por LPS ¹⁶².

- A determinadas concentraciones aporta una protección eficaz de los linfocitos frente a la radiación, disminuyendo significativamente el daño genético inducido por el ácido tiobarbitúrico (TBARS), y el estado oxidativo mejora gracias a su potencial antioxidante ³¹³.
- Un estudio llevado a cabo en 1993 comprobó que un consumo elevado de quercetina durante 5 años redujo en más de un tercio el riesgo cardiovascular global. También se demostraron sus efectos anti-trombóticos y vasodilatadores ³⁰⁸.

2.4.4 Flavonoides y radiación ionizante

Entre los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos para la salud ejercidos por los flavonoides, se encuentran el efecto antioxidante, la quelación de metales, la inhibición enzimática y la regulación génica ³¹⁴. Si bien los flavonoides pueden ejercer su actividad antioxidante en múltiples sistemas biológicos, se ha de tener en cuenta que su distribución depende de su relativa hidrofiliidad/hidrofobicidad y de sus interacciones con determinadas macromoléculas ³¹⁵. Además, existen estudios *in vivo* que ponen de manifiesto una escasa biodisponibilidad de los flavonoides debido a su baja absorción y a que son metabolizados y excretados de forma rápida por el hígado haciendo que las dosis encontradas en los órganos sea escasa ³¹⁶. Las bacterias del colon juegan un papel importante en el metabolismo y absorción de los flavonoides y sus derivados no presentan necesariamente la misma actividad biológica que los compuestos originales ³¹⁷. Estos factores determinan la concentración local de los flavonoides lo que influye, entre otras características, en su capacidad de regular ciertos fenómenos celulares.

En relación con sus efectos sobre la salud, estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que los flavonoides presentan capacidad anti-inflamatoria ²⁸⁰, antioxidante, antialérgica y antiviral, hepatoprotectora, antitrombótica y

anticarcinogénica^{280,318,319} al actuar como inhibidores de diversos procesos relacionados con cancerígenos. Además, tienen efectos estrogénicos e inhiben numerosas enzimas como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y fosfolipasa A³¹⁹. Muchas de estas acciones se deben a su capacidad antioxidante *per se* o a su influencia en el estado redox intracelular³²⁰. Se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antimutagénicas, inhiben *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) relacionadas con enfermedades coronarias, y protegen al ADN del daño oxidativo que tiene graves consecuencias en algunos cánceres relacionados con la edad¹⁶⁰; además, inhiben la agregación plaquetaria^{321,322} e incluso actúan como intermediarios para la actuación de otros antioxidantes³²³. También se ha descrito que poseen actividad anti-VIH y que actúan como protectores frente a la peroxidación lipídica en los glóbulos rojos³²⁴.

Como se ha indicado anteriormente, los radioprotectores pueden ejercer su acción por uno o varios mecanismos. Estos son: supresión de la formación de especies reactivas, detoxificación de las especies inducidas por la radiación, estabilización del blanco y por reforzamiento de los sistemas de recuperación y reparación celular⁸:

- En la supresión de la formación de especies reactivas, algunos efectos farmacológicos resultan radioprotectores interfiriendo con la distribución de oxígeno en los tejidos irradiados mediante la inducción de hipoxia local en células y tejidos. Por ejemplo, el consumo químico o bioquímico del oxígeno puede ser uno de los mecanismos de los compuestos sulfhidrilos (RSH), los cuales sufren una reacción de oxidación con oxígeno molecular y de esta forma manifiestan radioprotección³²⁵.
- La eliminación o detoxificación de los radicales libres acuosos inducidos por la radiación, puede mitigar significativamente el daño producido por esta. Varios secuestradores de radicales libres como los RSH son conocidos por interactuar con los mismos y prevenir la muerte celular inducida por las radiaciones. Otro mecanismo de eliminación de los radicales libres lo constituye el incremento de las

enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa³²⁶. Los radioprotectores pueden además reaccionar con los radicales ácidos o con radicales biomoleculares donando átomos de hidrógeno para reparar la especie radical. También pueden interactuar con blancos celulares, como el ADN, formando disulfuros combinados y prevenir el daño por radiación, estabilizándolo. Varios aminotioles, como la cisteamina o el guanidoetildisulfuro, se unen al ADN y ofrecen radioprotección⁸.

- Por último, la recuperación celular o proceso de reparación es reforzado por algunos radioprotectores. El blanco celular más importante dañado por la radiación es el ADN. Las sustancias radioprotectoras endógenas han sido investigadas para conocer su papel en la recuperación celular producto de la radiación. Tal es el caso de los tioles como el glutatión, el cual puede estar involucrado en la reparación de las roturas de simple cadena del ADN⁸.

La literatura disponible sobre radioprotectores es muy amplia, y centra su clasificación en su mecanismo de acción dependiendo de su estructura molecular, su actividad terapéutica o su función metabólica³²⁷. En nuestro caso, y como ya hemos nombrado anteriormente, nos vamos a centrar en los radioprotectores de origen natural como es el caso de los flavonoides, haciendo especial énfasis sobre la quercetina.

2.4.4.1 Reparación de daños en el ADN

La radioprotección ofrecida por los flavonoides se ha investigado principalmente a través del uso de la prueba de micronúcleos (MN) para la actividad anticlastogénica y de proliferación celular. El ensayo de micronúcleos ha sido ampliamente utilizado para la detección de potencial carcinogénico y genotóxico de diferentes radiaciones ionizantes y productos químicos. El daño a los cromosomas se manifiesta como roturas en el ADN y aparición de fragmentos, en forma de pequeñas partículas similares a núcleos (micronúcleos) en el citoplasma de las células en rápida proliferación.

Una serie de flavonoides (genisteína, quercetina, luteolina) reducen la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos en la sangre periférica de los ratones irradiados²⁷⁷. Se ha demostrado que una única dosis intraperitoneal de hesperidina, una flavona glucosidada, a una dosis de 80 mg/Kg, 45 minutos antes de 2 Gy de irradiación γ , redujo la frecuencia de eritrocito policromáticos micronucleados (MNPCE). Los valores de MNPCE totales tras irradiación se vieron reducidos 2,85 veces en el grupo tratado con hesperidina en comparación con el control⁶⁶.

Los efectos de la pre-incubación de linfocitos con hesperidina 16,38 μ M durante 30 minutos antes de la irradiación (4Gy) mostraron una protección óptima al disminuir la frecuencia de MN, aberraciones dicéntricas y atributos cometas²⁹⁹. El tratamiento con genisteína (200 mg/Kg) aumentó significativamente la tasa de supervivencia a 30 días, de ratones expuestos a 9,5 Gy de radiación γ por ^{60}Co ³⁰⁰, y un estudio posterior demostró que la genisteína aumenta el estado quiescente en las células madre hematopoyéticas, mejorando por lo tanto la regeneración del sistema hematopoyético y el mantenimiento de la actividad de reparación del ADN tras los daños inducidos por la radiación³⁰¹. La formación de micronúcleos en los fibroblastos del pulmón y otros indicadores de daño pulmonar en ratones hembra resultaron asimismo disminuidos por una sola administración subcutánea de genisteína (200 mg/Kg) 24 horas antes de 7,75 Gy de radiación γ de cuerpo entero con ^{60}Co ³⁰². La genisteína también mostró efectos radioprotectores cuando se administró en la dieta (aproximadamente 10 mg/Kg) de ratones hembra seguido de nueve fracciones de 3,1 Gy de rayos X a lo largo de 30 días. No se apreciaron evidencias de protección de cáncer de pulmón por el tratamiento con genisteína a lo largo de 28 semanas después de la irradiación³⁰³.

El tratamiento de ratones con diferentes dosis de naringina antes de estar expuestos a 2 Gy de radiación γ por ^{60}Co dio como resultado una disminución significativa en la frecuencia de MNPCE en comparación con los animales irradiados no tratados²⁹⁰. Se obtuvieron resultados análogos tras la irradiación de rayos X en la médula ósea de ratones tratados previamente con diosmina y

rutina²⁸⁷. Otro flavonoide, la apigenina, promueve la detención del ciclo celular, y el mecanismo propuesto puede implicar su capacidad para inhibir la activación de NF- κ B²⁸⁴. En linfocitos humanos tratados con 25 μ g/mL de apigenina se detectó un notable retraso en la entrada de células en mitosis. Este efecto fue más evidente con la administración de una sola dosis de 2 Gy de radiación γ por ¹³⁷Co. Por el contrario, se apreció una disminución moderada en el bloqueo de la proliferación de citocinesis en células tratadas con concentraciones de 2,5, 5 y 10 μ g/mL de apigenina, con independencia de la exposición de rayos γ . Estas bajas concentraciones de apigenina también mostraron efectos protectores considerando la aparición de MN debido a la radiación, y especialmente la incorporación de apigenina a 10 μ g/mL indujo una significativa reducción del 32% en la frecuencia de MN²⁸⁵.

Se han realizado experimentos con diferentes concentraciones de quercetina y dosis de radiación en linfocitos humanos y ADN de plásmidos. El tratamiento previo de ADN de plásmidos con diferentes concentraciones de quercetina hizo disminuir progresivamente los efectos tóxicos de la radiación en este ADN, inhibiendo la aparición de roturas en las cadenas. La preincubación de linfocitos con quercetina antes de aplicar 4 Gy de radiación γ hizo reducir las frecuencias de MN de forma dosis-dependiente. La quercetina, a la concentración de 24 mM (8 μ g/mL), protegía eficazmente a los linfocitos de la radiación γ , disminuyendo significativamente el daño genético y el nivel de peroxidación lipídica inducido por la radiación, y mejorando su estado antioxidante³¹³.

2.4.4.2 Actividad antioxidante y neutralizadora de radicales libres

Se han comprobado los efectos de los flavonoides (orientina, vicenina, naringina, quercetina y rutina) frente a la genotoxicidad inducida por la radiación en células de médula ósea de ratón^{277,287-290}. La administración de dosis bajas de estos flavonoides antes de la exposición a radiación protege de manera significativa las células de médula ósea del ratón. El efecto protector de los flavonoides en ratones podría estar vinculado a su capacidad de neutralización directa de los radicales OH⁻^{277,287}.

Enzimas antioxidantes como la SOD, catalasa y glutatión peroxidasa son elementos clave en la protección de la exposición a radiación, y se requiere un balance enzimático apropiado para una máxima protección radiológica, ya sea a nivel celular o del organismo. La radiación induce el aumento de la concentración de la peroxidación de lípidos, que se acompañan por la disminución en la concentración de antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GPx) y no enzimáticos (GSH)^{299,328}. Cuando se trataron linfocitos con hesperidina antes de la exposición a la radiación, el valor de TBARS disminuyó al mismo tiempo que se incrementó el estado antioxidante tanto enzimático como no enzimático²⁹⁹. Además, la administración intragástrica de luteolina (10µg/mL) 2 horas antes de la irradiación (6Gy) suprimió la peroxidación lipídica en la médula ósea y en bazo de ratón, observándose también una tendencia hacia un efecto protector de la luteolina frente a la disminución de ácido ascórbico endógeno en la médula ósea de ratón después de irradiación γ (3Gy)³²⁹.

La morina [2-(2,4-dihidroxifenil)-3,5,7 trihidroxi-4 H-1-benzopirano-4-ona] es un flavonoide presente en muchas plantas y en la madera de *Chlorophora tinctori* como pigmento amarillento²⁹³. La morina actúa como antagonista de la tripsina²⁹⁴ para inhibir la activación de los receptores activados por proteínasa, lo que explica en parte su actividad radioprotectora. La morina bloquea TNF- α y las interleucinas en muchas condiciones fisiológicas que contribuyen a la radiotoxicidad²⁹³. También muestra actividad antibacteriana que puede contribuir a la actividad radiológica²⁹⁵. El pretratamiento con 100 mg/Kg de morina alteró la disminución de las enzimas SOD, GSH, glutatión S-transferasa y CAT inducida por la irradiación, manteniendo el índice esplénico próximo a la normalidad, iniciando unidades formadoras de colonias de bazo (CFU) endógenas e inhibiendo la producción de TNF- α e interleucinas, lo cual puede ser en parte responsable de su protección hematopoyética²⁹³. La radiación ionizante activa NF- κ B, la cascada Map quinasa y JNK²⁹⁶, factores que contribuyen significativamente a la radiotoxicidad. La morina inactiva la quinasa del ciclo celular cdc-2, y también tiene efectos pleiotrópicos sobre rutas de señalización por quinasa B, JNK y quinasa p38³³⁰.

La troxerutina es un flavonol de uso clínico para el tratamiento de trastornos venosos, y también protege el ADN celular y las biomembranas contra los efectos nocivos de la radiación gamma. La troxerutina 0,2 mM evitó la peroxidación lipídica en membranas microsomales y mitocondriales de hígado de rata con dosis de hasta 500 Gy *in vitro*. La administración intraperitoneal de troxerutina (175 mg/Kg de peso corporal) en ratones portadores de tumores en todo el cuerpo 1 hora antes de la irradiación gamma a 4 Gy, redujo significativamente la peroxidación lipídica inducida por la radiación en el hígado y el bazo, pero no hubo reducción de los tumores. La administración de troxerutina en animales con tumores protege al ADN celular frente a roturas de cadena inducidas por la radiación ²⁹⁷.

2.4.5 Acciones sinérgicas de los flavonoides

Se han propuesto una serie de extractos vegetales como agentes radiomodificadores ^{85,331} y muchos estudios se han centrado en los efectos biológicos de las especies químicas individuales constituyentes de estos extractos. Teniendo en cuenta la gran variedad de especies químicas y otros flavonoides presentes en los preparados naturales, no es realista achacar un efecto fisiológico global de un extracto vegetal a una sola especie molecular, al menos que un análisis químico detallado y pruebas individuales pudieran hacerlo posible. Esto se complica aún más por la acción sinérgica de estos componentes individuales.

A modo de ejemplo, el mosto tinto de uva ha demostrado inhibir la agregación plaquetaria y la producción de H₂O₂, al igual que una mezcla de quercetina y catequina en concentraciones similares a las observables en sangre después del consumo de vino ³³². El mosto tinto de uva (que incluye quercetina y rutina como principales flavonoides) mostró actividad radiomodificadora cuando fue ingerido voluntariamente por ratas *Wistar* macho sometidas a 6 Gy de rayos X a cuerpo entero ^{10,67} y 100 mg/Kg/día de extracto de semilla de uva (con polifenoles derivados de catequinas) administrado de forma intragástrica a ratas macho, fue capaz de restablecer, hasta valores similares a los controles no irradiados, la disminución de las actividades SOD,

CAT y GPx bajo 8 Gy de radiación gamma por ^{60}Co ³³³ o 5 Gy de radiación γ por ^{137}Co ³³⁴.

Las interacciones sinérgicas y antagónicas entre antioxidantes son muy conocidas en la industria alimentaria, en función tanto de la combinación de antioxidantes como de los sustratos oxidados. La quercetina y la rutina mostraron un claro efecto sinérgico sobre la oxidación de liposomas de fosfolípidos, mientras que quercetina y α -tocoferol resultaron sinérgicos sobre todo en emulsiones de linoleato ³³⁵. En líneas celulares tumorales de ratón y humanas se demostraron importantes efectos sinérgicos antiproliferativos cuando quercetina, kaempferol y naringenina (entre 12,5 y 50 μM) fueron incorporadas en tratamientos combinados ²⁹², al igual que por otra parte sucedió al aplicar extractos de manzana y quercetina-3-glucósido sobre células de cáncer de mama ³³⁶. De la misma forma, se ha estudiado la administración conjunta de galato de epigallocatequina 2,5 μM , genisteína y quercetina de forma individual o en combinación, en células humanas de cáncer de próstata, y se observó la supresión de manera sinérgica de la proliferación en los cultivos celulares suplementados con suero bovino fetal ³³⁷.

En un estudio destinado a evaluar los efectos de las fracciones radioprotectoras de *Gentianella austriaca* y algunos de sus componentes individuales, se determinó que las fracciones a base de metanol o éter, mostraron una mejor protección que los compuestos aislados en el tratamiento de linfocitos humanos después de la irradiación γ ²⁹¹.

Otro ejemplo de interacción sinérgica de flavonoides en radioprotección proviene de un estudio sobre la comparación del efecto del extracto de té verde y las catequinas individuales que figuran en ese extracto. Se irradiaron ratones con 12 Gy de radiación γ para el análisis de supervivencia de la cripta yeyunal, con 6,5 Gy para la formación de colonias endógenas del bazo, y con 2 Gy para la inducción de la apoptosis. Veinticuatro horas antes de la irradiación recibieron una única inyección intraperitoneal de 50 mg/Kg de peso corporal de extracto acuoso de té verde, o las especies individuales epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, galato de galocatequina,

catequina galato o una mezcla de todas ellas. Cada una de las catequinas individuales era un radioprotector mucho menos efectivo que lo que resultó ser la mezcla de flavonoides. Curiosamente, el extracto de té verde era un radioprotector casi tan eficaz como las catequinas individuales, pero menos que la mezcla ²⁹⁸.

2.4.6 Consideraciones sobre la radioprotección por flavonoides

Las mismas propiedades que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides determinan que puedan tener efectos prooxidantes, lo que puede implicar un potencial tóxico ³³⁸. Esto se debe a las características estructurales de algunos flavonoides, que presentan bajos potenciales de oxidación, que les permite reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} para sufrir una autooxidación o incluso involucrarse en un proceso de reciclaje redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes, lo que explica los efectos mutagénicos y genotóxicos de algunos flavonoides. La reacción de autooxidación comporta la formación del radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ que, por acción de la SOD, produce H_2O_2 que en la célula debe ser eliminado vía CAT o GPx. Si no se elimina puede producir, al reaccionar con el Fe^{2+} , iones $\text{OH}^{\cdot -}$ que son muy reactivos con las biomoléculas.

El carácter antioxidante o prooxidante viene determinado por la estabilidad redox del radical formado a partir del flavonoide original. Existen estudios que ponen de manifiesto que los flavonoides juegan un papel doble en la mutagénesis y carcinogénesis, dependiendo de la concentración de flavonoides y de las condiciones fisiológicas del organismo. Un exceso de flavonoides puede saturar el organismo provocando la formación de EROs, llegando incluso a dañar el ADN o enzimas asociadas a él ³³⁹. Los efectos que pueden provocar los flavonoides en condiciones prooxidantes son, entre otros, inducir apoptosis o producir citotoxicidad ²³ y suprimir la proliferación y crecimiento celular ^{340,341}, mientras que, como ya hemos dicho, en condiciones antiapoptóticas podrían conferir protección contra enfermedades degenerativas.

En cualquier caso, existen datos contradictorios en lo que se refiere a la toxicidad de ciertos flavonoides como se ha puesto de manifiesto en

numerosos estudios; así, estudios *in vitro* indican que la quercetina puede ser tóxica y otros *in vivo* señalan su posible efecto carcinogénico^{340,342}. Sin embargo, en otros estudios no relacionan a los flavonoides con una capacidad mutagénica, sino más bien como antimutagénicos, encontrando una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y el cáncer de pulmón³⁴³.

El metabolismo de los flavonoides, tanto al ser captados por los enterocitos como a nivel postabsorptivo, modifica en gran medida los valores plasmáticos de estos compuestos, lo que hace complicado relacionar los resultados de modelos animales *in vivo* y los estudios químicos y de cultivos de células *in vitro*, con el efecto radiomodificador de los flavonoides. Generalmente, se está de acuerdo en que los flavonoides conjugados manifiestan sus efectos antioxidantes en menor grado que sus formas aglicona, pero también se ha publicado que presentan efectos biológicos diferenciales³⁴⁴. La posibilidad de acciones diferentes para los derivados conjugados de los flavonoides se suma a la disparidad confirmada de sus acciones biológicas en función del rango de concentraciones aplicado^{23,283}.

También hay otra preocupación planteada por el destino de los flavonoides después de realizar sus acciones de protección. La neutralización de radicales libres implica la oxidación del agente neutralizante, y en el caso de la quercetina se forma metiluro orto-quinona/quinona de quercetina (QQ). La QQ es altamente reactiva frente a los tioles, y en un estado celular saludable reaccionará con el glutatión (GSH). Sin embargo, un eventual agotamiento del GSH hará a la célula más propensa al ataque de proteínas por QQ, lo cual llevaría a un déficit enzimático grave. En personas que manifiestan estrés oxidativo y son tratados con quercetina, la formación de la quercetina oxidada podría ser importante, y si los valores de GSH son bajos, estos individuos serían aún más susceptibles al daño causado por los productos de oxidación de la quercetina³⁴⁵.

En resumen, algunos flavonoides pueden producir efectos beneficiosos (relacionados con el estatus antioxidante y de prevención del cáncer) a concentraciones submicromolares que pueden conseguirse mediante una dieta rica en alimentos de origen vegetal, mientras que a concentraciones mayores

los flavonoides pueden producir algunos efectos pro-apoptóticos y/o inducir daño en el ADN mediado por topoisomerasa³⁴⁶. Mientras que los flavonoides muestran efectos radiomodificadores en modelos animales y en estudios celulares *in vitro*, todavía no se puede proporcionar ningún consejo inequívoco sobre su dosificación para usos prácticos, y se debe tener cuidado al extrapolar lo estudios moleculares *in vitro* con situaciones animales y clínicas *in vivo* que impliquen daños con radiaciones ionizantes en relación a la acción radiomodificadora de los flavonoides^{23,283}.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Ámbito de trabajo

Este trabajo de experimentación comenzó en el mes de Septiembre de 2010 y se ha desarrollado en el Área de Fisiología del Departamento de Ciencias Biomédicas, en el Animalario y en el Instituto de Biomedicina de la Universidad de León.

3.2 Animales

Para la realización de este trabajo se han utilizado ratas macho de la raza Wistar (Charles Rivers, Barcelona), con un peso aproximado de 200 gramos al inicio del estudio. Las ratas fueron mantenidas en el Animalario de la Universidad de León en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, con un ciclo de 12 horas de luz, alojadas en condiciones de mantenimiento en jaulas adyacentes con suministro *ad libitum* de agua y alimento. Los tratamientos experimentales fueron iniciados después de una semana de adaptación.

Todos los experimentos con los animales del laboratorio se realizaron según las pautas recogidas en la normativa 2010/63/EU del parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea del 22 de Septiembre de 2010 sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos.

3.3 Diseño experimental

3.3.1 Grupos Experimentales

Los animales fueron divididos en grupos de 8 ratas por grupo experimental, 2 tratamientos (control y exposición experimental con rayos X), 2 grupos según la administración (quercetina o propilenglicol, ver 3.3.2.1, pág.102) y 2 tiempos de análisis, a 7 días y 30 días. De este modo se asignó la siguiente nomenclatura:

-
- Grupos control: animales que no estuvieron expuestos a rayos X. A su vez fueron distribuidos en los subgrupos siguientes:
 - CS: animales control que recibieron propilenglicol (solvente para la quercetina) durante 10 días.
 - CQ: animales control que recibieron el tratamiento con solución de quercetina (ver 3.3.2.1, pág.102) durante 10 días.
 - Grupos irradiados: animales que fueron sometidos a una única irradiación de rayos X de cuerpo entero a una dosis de 6 Gy, durante un período de 15 minutos, asignados a los subgrupos:
 - RS: animales radiados que recibieron propilenglicol durante 10 días.
 - RQ: animales radiados que recibieron tratamiento con quercetina durante 10 días.
 - Para el análisis de resonancia magnética se utilizó otro lote de animales, divididos en los mismos grupos experimentales, con 3 animales por grupo. Estos animales fueron anestesiados mediante ketamina y medetomidina (ver 3.5, pág.105).

3.3.2 Tratamientos experimentales

3.3.2.1 Administración de quercetina

La administración de quercetina se realizó vía intragástrica a la dosis de 50 mg de quercetina por kg de peso corporal disuelta en propilenglicol. La elección de la concentración de quercetina se efectuó en base a la obtención de valores de metabolitos de quercetina en plasma que garantizasen un efecto antioxidante, similares a los obtenidos en estudios previos³¹. La administración se realizó durante los 4 días antes de la irradiación y los 6 días posteriores a la misma.

3.3.2.2 Irradiación experimental con rayos X

Los animales irradiados fueron sometidos a una única irradiación de rayos X de cuerpo entero a una dosis de 6 Gy, durante un período de 15 minutos, bajo anestesia inducida por pentobarbital (ver 3.5, pág.105). Los animales control siguieron el mismo tratamiento, salvo que no recibirán irradiación. La irradiación se llevó a cabo por personal cualificado del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León respetando la normativa vigente sobre funcionamiento y uso de equipos e instalaciones de rayos X.

Se efectuó periódicamente el seguimiento del posible sufrimiento y dolor de los animales tras la irradiación, para lo cual se siguieron las recomendaciones para la evaluación de los cambios de temperatura y comportamiento (postura, vocalizaciones, etc.) sugeridas por Morton y Griffiths³⁴⁷.

3.3.3 Experimentos

Se plantearon tres experimentos independientes, destinados a evaluar diferentes aspectos comportamentales y su modificación mediante la irradiación experimental con rayos X y la administración de quercetina.

3.3.3.1 Experimento 1. Análisis comportamental pre-irradiación

Se efectuaron observaciones comportamentales relativas a motilidad, actividad exploratoria y ansiedad (prueba de open field, ver 3.7.3.1), y aprendizaje y memoria espacial (prueba de Morris, ver 3.7.3.2) en animales no sometidos a irradiación hasta transcurridos 4 días después de comenzar las pruebas. Con ello se pretendió evaluar el efecto de la irradiación experimental con rayos X sobre el comportamiento ya iniciado.

3.3.3.2 Experimento 2. Análisis comportamental post-irradiación

Se efectuaron observaciones comportamentales relativas a motilidad, actividad exploratoria y ansiedad (prueba de open field, ver 3.7.3.1, pág. 111), y aprendizaje y memoria espacial (prueba de Morris, ver 3.7.3.2, pág. 113) en

animales sometidos a irradiación previamente al comienzo de las pruebas. Pretendimos evaluar el efecto de la irradiación experimental con rayos X sobre el inicio de las actividades comportamentales.

3.3.3.3 Experimento 3. Análisis de la ingestión de agua y alimento

En este experimento se efectuaron mediciones del consumo de agua y alimento, así como producción de heces y orina, en ratas macho mantenidas individualmente en jaulas metabólicas dotadas de sensores independientes para la medición del peso de agua y de alimento (ver 3.7.3.3, pág.116).

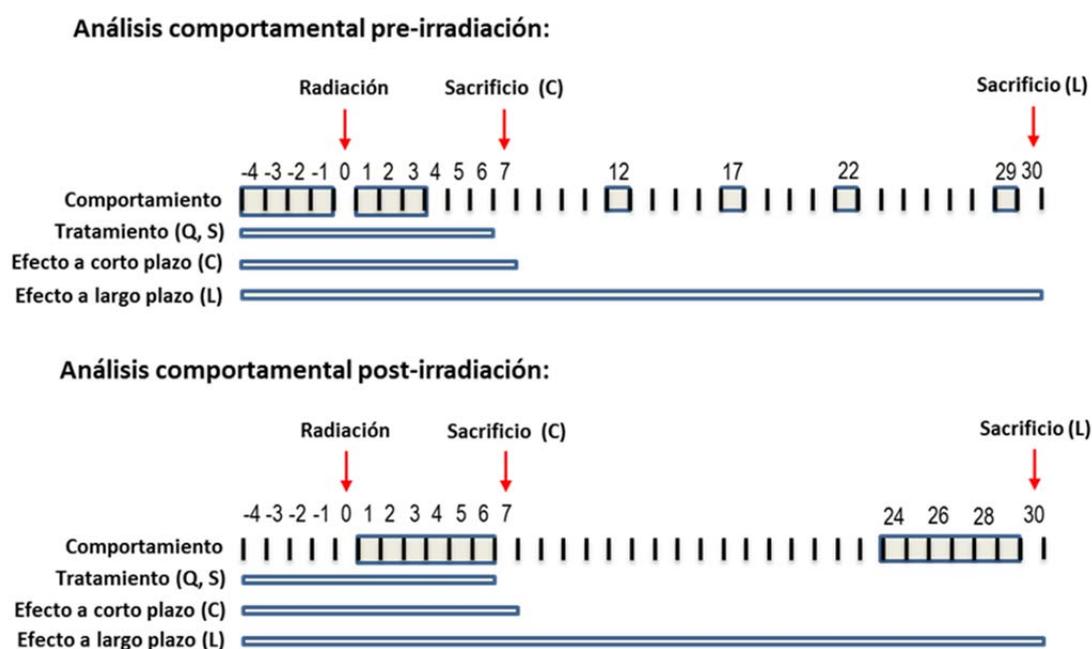


Figura 3-1. Esquema representativo de los experimentos realizados y la administración de sustancias a los animales para el estudio de los efectos de la irradiación con rayos X a los 7 y a los 30 días

3.4 Procedimiento quirúrgico para la recogida de muestras

El proceso se inició con el pesado del animal y la posterior anestesia por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (ver sección siguiente) a la dosis de 50 mg/Kg de peso corporal, disuelto en solución salina. Una vez anestesiado, el animal se fijó a una placa de quirófano, colocándose junto a una lámpara térmica que permitía mantener una temperatura corporal

constante aproximada de 37 °C, con el objetivo de evitar los efectos adversos de la hipotermia.

La intervención quirúrgica comenzó con la disección de la arteria carótida izquierda introduciendo en ella un catéter (0,5 x 0,9 mm, Braun Melsungen AG, Alemania) provisto de solución anticoagulante (heparina 0,05%) y se procedía a la exanguinación del animal a través de dicho catéter. Se recogió un volumen aproximado de 5 ml de sangre en cada rata, para el estudio de los parámetros sanguíneos.

Posteriormente el animal fue sacrificado y se extrajo el hígado y el cerebro, extrayendo a su vez cuerpos vertebrales a nivel cervical para obtener muestras de médula espinal y ósea. Parte de las muestras fueron fijadas inmediatamente en formol al 10% para los estudios histopatológicos. El resto de las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaron en un arcón a -80 °C hasta la realización de los diversos estudios moleculares.

3.5 Soluciones utilizadas

Heparina

Se utilizó heparina (5.000 U al 5%, Leo, Madrid) como anticoagulante, diluida al 1:100 con solución salina para obtener una concentración final de 0,05%.

Solución de anestesia para resonancia magnética

Se utilizaron ketamina (Imalgene® 1000, Laboratorios Merial, Barcelona) a la concentración de 100 mg/ml y medetomidina (Domton®, Orion Pharma, Espoo, Finlandia) a la concentración de 1 mg/ml. La solución de anestesia consistió en una mezcla de 0,5 ml de solución salina, 0,75 ml de medetomidina (1 mg/ml) y 0,75 ml de ketamina (100 mg/ml). Cada animal recibió por vía intraperitoneal 0,2 ml de esta mezcla por 100 g de peso corporal.

Pentobarbital

El pentobarbital sódico (Sigma-Aldrich Co., San Luis MO, USA) se disolvió en solución salina fisiológica en una concentración final de 6 mg/ml.

Propilenglicol

Se empleó propilenglicol (1,2-Propanodiol, grado ReagentPlus, 99%, Sigma-Aldrich) para la disolución de la quercetina.

Quercetina

La disolución final de quercetina (quercetina dihidrato, 97%, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Alemania) fue de 25 mg por ml de propilenglicol. Este volumen fue el mínimo requerido para conseguir la máxima concentración de quercetina en solución.

Solución salina fisiológica

Se preparó disolviendo cloruro sódico (Panreac, Madrid) en agua destilada hasta una concentración final de 154 mM.

3.6 Aparatos utilizados

Analizador de hematología

Diatron, modelo Abacus junior vet

Aparato de transferencia

Bio-Rad, Trans-blot SD

Autoclave

Raypa, modelo Sterilmatic

Balanzas de precisión

Sartorius, modelo R200D

Sartorius, modelo 2842

Baños termostáticos

Selecta, tipo 135925

Selecta, tipo Unitronic 320 OR

Selecta, tipo CE95

Cámaras de vídeo

Panasonic WV-CP470

Canon HV30

Centrífugas

Beckman Coulter, Microfuge 22R. Rotor Sealed Lid, 24 x 0,2 ml
Beckman, modelo XL-100 K Ultracentrifuge. Rotor 70.1 Ti
Du pont, Sorvall RC-5B Superspeed Centrifuge. Rotor SS-34
Eppendorf, modelo Centrifuge 5415R
Jouan, modelo BR 3.11. Rotor S-4
Sigma Laborzentrifugen 3K12

Cubetas de electroforesis horizontal

Serva, Blue Marine 100
Bio-Rad, Sub-cell GT

Equipo de resonancia magnética

General Electric Sigma HDX 3.0 T. Antena de muñeca Wrist Mayo Clinic.

Espectrofotómetros

Milton Roy, modelo Spectronic 1201
Hitachi, modelo U-2000

Fuentes de alimentación para electroforesis

Bio-Rad, modelo 200/2
Savant instruments, modelo HV 1000.

Granatario

Sartorius, modelo 1216 MP

Homogeneizador

Kinemática AG, modelo Polytron

Laberinto de Morris

Recipiente circular de fibra de vidrio, de color negro, con dimensiones de 120 cm de diámetro y 60 cm de altura.

Lector de placas

Titertek, modelo Multiscan Plus MK II

Material de cirugía

Agujas, bisturís, cánulas, catéteres, pinzas, suturas, tijeras, etc.

Material de laboratorio de carácter general

Agitadores de tubos, arcones congeladores, dispensadores automáticos, frigoríficos, micropipetas automáticas, ordenadores, pipetas, etc.

Open field

Recipiente de 100 cm de largo y ancho y 50 cm de altura, con base y paredes de color negro.

pHmetros:

Crison, modelo 2001

Meteor, modelo 991 A

Resonancia magnética

Genesis Sigma (General Electric Medical Systems, Milwaukee WI, USA)

Sistema de análisis del comportamiento

Ethovision 3.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda)

Sistema de registro de ingestión de agua y alimento

TSE Drinking/Feeding monitor, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Alemania

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Análisis por resonancia magnética

La técnica de imagen por resonancia magnética (IRM), también conocida como tomografía por resonancia magnética (TRM) es una técnica no invasiva que utiliza el fenómeno de la resonancia magnética para obtener información sobre la estructura y composición del cuerpo a analizar. Esta información es procesada por ordenadores y transformada en imágenes del interior de lo que se ha analizado.

En esta técnica no se emplea radiación ionizante, sino campos magnéticos, para alinear la magnetización nuclear, usualmente de átomos de

hidrógeno del agua en el cuerpo. Se utilizan campos de radiofrecuencia para alterar el alineamiento de esa magnetización, causando que los núcleos de hidrógeno produzcan un campo magnético rotacional detectable por el escáner. Esa señal puede ser manipulada con adicionales campos magnéticos y así construir con más información imágenes del cuerpo ³⁴⁸.

Los equipos de IRM permiten obtener información sobre la distribución de los átomos en el cuerpo humano utilizando el fenómeno de resonancia magnética. La base de funcionamiento de la resonancia magnética consiste en la generación de un campo electromagnético (0,5 a 1,5 teslas) mediante el empleo de un imán de gran tamaño y la emisión de ondas de radio por parte de un escáner; las ondas de radio y el campo electromagnético excitan a los núcleos de los átomos de hidrógeno de los tejidos a estudiar, provocando que se alineen unos con otros básicamente en dos direcciones, paralela (los vectores apuntan en el mismo sentido) y anti-paralela (apuntan en sentidos opuestos). La intensidad del campo y el momento magnético del núcleo determinan la frecuencia de resonancia de los núcleos, así como la proporción de núcleos que se encuentran cada uno de los dos estados. Cuando la radiación electromagnética deja de emitirse, los núcleos se liberan y regresan a su posición inicial, liberando energía en forma de ondas de radio que serán recogidas por el escáner y enviadas a un ordenador para su procesamiento en forma de imagen radiológica para su estudio posterior.

Para obtener imágenes de IMR el sujeto se coloca bajo un intenso campo magnético estático, cuya energía provoca la excitación de protones. Tras esta excitación, los protones vuelven a un estado relajado a través de dos procesos de relajación característicos, la relajación T1 (relajación longitudinal) y la relajación T2 (relajación spin-spin). Durante la relajación se registran las señales procedentes de la magnetización de los protones, y los distintos tejidos presentan distintas combinaciones de velocidades de relajación T1 y T2. El contraste o variación de intensidades de señal en las imágenes IMR se describe como ponderación T1, ponderación T2 o ponderación de densidad de protones (DW). La localización espacial de cada elemento de la imagen (pixel) se determina por la aplicación de campos magnéticos en gradiente, que alteran

los campos magnéticos del sujeto de derecha a izquierda, del extremo anterior al posterior, y de la parte inferior a la superior. Estos gradientes producen cambios sistemáticos en la frecuencia de la señal detectada según la posición de los tejidos en la imagen, y se utilizan transformaciones de Fourier para descomponer los patrones de interferencia en frecuencias individuales a fin de llevar a cabo la localización espacial.

Los tejidos con bajos tiempos de relajación en secuencias ponderadas en T1 presentan una elevada intensidad de señal, y aparecen brillantes o blancos en IMR (por ejemplo, tejido adiposo). El agua, por el contrario, tiene un tiempo de relajación en T1 largo, y aparece oscura en estas secuencias. La intensidad de la señal de los tejidos en secuencias ponderadas en T2 depende de la pérdida de coherencia de fase de los protones que giran. Los tejidos que pierden esta coherencia lentamente presentan tiempos de relajación T2 prolongados y manifiestan mayor intensidad de señal (son más blancos) que los tejidos que pierden la coherencia de fase más rápidamente. El agua es un material típico que presenta un prolongado tiempo de relajación T2, de tal modo que los procesos patológicos que implican un aumento de agua (por ejemplo, edema) producirán imágenes IMR más oscuras en ponderación T1 y más claras en ponderación T2. Otras formas de obtención de imágenes IMR utilizan la recuperación de la inversión atenuada de líquido (*fluid attenuated inversión recovery*, FLAIR) o la recuperación de la inversión tau corta (STIR). El hipocampo, por ejemplo, aparece más brillante que otras áreas cerebrales en secuencias FLAIR, mientras que el edema en médula espinal se aprecia mejor con imágenes STIR ³⁴⁹.

Tanto los animales suplementados con quercetina como los grupos control, fueron sometidos a una exploración de resonancia magnética previamente a la radiación. Se efectuó el registro de las alteraciones de señal inducidas por la radiación experimental en encéfalo, médula espinal, y médula ósea de los cuerpos vertebrales, mediante resonancia magnética de 3 Teslas, a los 2, 7, 15 y 30 días post-irradiación. obteniendo imágenes en planos sagitales de cráneo y columna en secuencias ponderadas en T1, T2 y STIR y del cráneo en planos coronales en secuencias ponderadas en T1, T2, FLAIR y

DW. También se estudiaron secuencias T2 SE (eco de espín, *spin echo*) y T2* GE (secuencia ponderada de eco de gradiente, *weighted gradient echo*). En las secuencias SE se emplean pulsos de radiofrecuencia en ángulos de enfoque de 90° y de reenfoque de 180°, mientras que las secuencias GE utilizan ángulos de enfoque diferentes de 90° y carecen de pulso de radiofrecuencia de reenfoque a 180°³⁵⁰.

Para los análisis de resonancia magnética, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y medetomidina (ver 3.5, pág.105) durante 1-2 h. Para mantener el equilibrio de fluidos se inyectaron 12,5 ml de solución salina al 0,9% por cada hora de anestesia previa.

3.7.2 Análisis histopatológico.

Para los estudios de microscopía óptica se utilizaron muestras de hígado, encéfalo, médula espinal, y médula ósea de los cuerpos vertebrales fijadas en formol al 10%. Tras su deshidratación e inclusión en parafina se procedió a la obtención de cortes seriados de 4 µm de grosor, mediante la utilización de un microtomo de rotación, con adaptador para cassettes y cuchillas recambiables. Para el estudio histopatológico se empleó la técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) y se realizaron fotomicrografías en un microscopio *Olympus Provis AX-70* (Olympus Corp. Tokio, Japón) con una cámara digital *Nikon DMX 1200*.

3.7.3 Análisis comportamental

3.7.3.1 Análisis de motilidad, actividad exploratoria y ansiedad

Se utilizó un campo abierto (*open field*) de dimensiones 100x100 cm y 50 cm de altura, dividido en 9 zonas cuadradas iguales. Cada animal, sin entrenamiento previo, se situó en el centro del campo y se permitió su libre movimiento durante 5 min. Una cámara situada a una altura de 1,5 m sobre el campo registró el movimiento, y fueron evaluados los siguientes parámetros comportamentales mediante el software *Ethovision 3.0* de Noldus: frecuencia

de zonas cruzadas por el animal, duración de la estancia en cada zona (en segundos) y distancia total recorrida en cada zona (en cm).

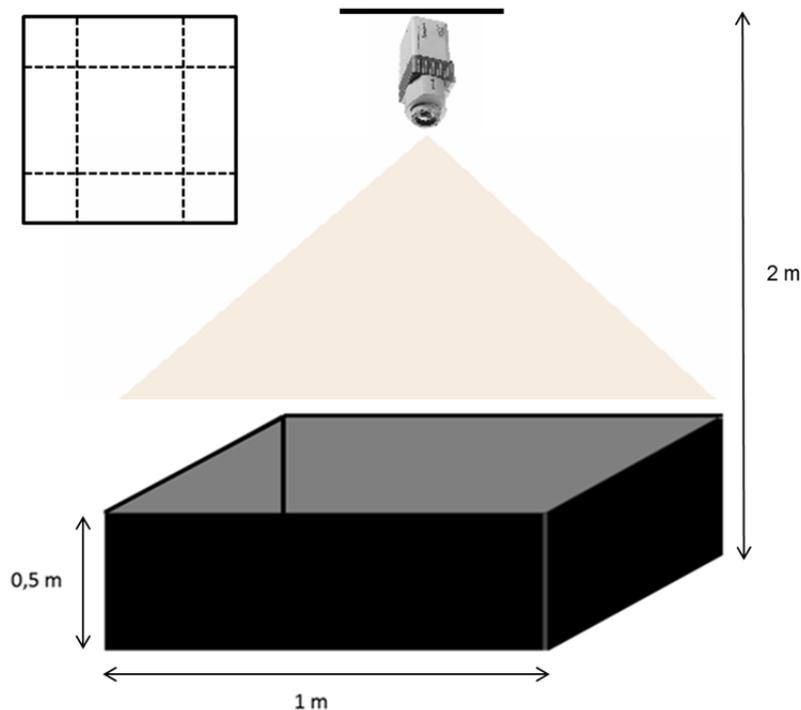


Figura 3-2. Esquema del open field y divisiones zonales.

Ethovision fue configurado para registrar secuencialmente los movimientos de cada animal en una región (*arena*) dividida a efectos de análisis de forma virtual en cuatro esquinas de 20x20 cm y un centro de 40x40 cm que delimitaban a su vez cuatro zonas (lados) de 20x40cm (Figura 3-2). Cada registro (*track*) comenzaba sincronizado con la colocación del animal en el centro del open field, y transcurrido el tiempo establecido se detenía el registro automáticamente. Los distintos grupos experimentales fueron aleatorizados en sucesivos días de registro comportamental, a fin de evitar posibles efectos del orden de secuencia temporal en los resultados.

El análisis estadístico de los parámetros comportamentales se efectuó sobre los valores medios evaluados por Ethovision para cada parámetro en cada sesión, exportados hacia archivos CSV que fueron utilizados para elaborar una única tabla de valores en Statistica 8, incluyendo variables

independientes (fecha, número de registro, número de animal, grupo experimental, zona) y variables dependientes (frecuencia de acceso, duración de estancia y distancia total recorrida).

3.7.3.2 Análisis de aprendizaje y memoria espacial

Se usó un recipiente circular negro de 120 cm de diámetro y 60 cm de altura ("laberinto de Morris"), lleno de agua a 23 °C. El recipiente estaba provisto de una plataforma de escape circular del mismo color, de 15 cm de diámetro, situada 2 cm bajo la superficie del agua en el centro de un cuadrante específico del recipiente. Los animales fueron entrenados antes de la irradiación, nadando durante 1 minuto desde el borde de cada uno de los cuadrantes, con el fin de que las ratas no se aprendieran un único camino de llegada.

En el experimento pre-irradiación (ver 3.3.3.1, pág.103) se registró el tiempo necesario para encontrar la plataforma durante 4 días consecutivos antes de la irradiación, y durante los 3 días posteriores a la irradiación. En el experimento post-irradiación (ver 3.3.3.2, pág.103) se registró el tiempo necesario para encontrar la plataforma durante 6 días consecutivos a partir del día siguiente a la irradiación experimental.

En todos los casos se efectuaron cuatro sesiones de registro por día (una desde cada cuadrante). La plataforma de escape permaneció visible solamente durante el primer día de introducción a la prueba de Morris, y en caso de que el animal no llegara a la plataforma durante el tiempo designado (60 segundos), fue guiado hacia ella, permaneciendo allí 15 segundos. Durante el resto de las pruebas la plataforma permaneció sumergida. Una serie de pistas visuales de alto contraste en la periferia de la habitación de registro posibilitaron el aprendizaje de la posición de la plataforma de escape.

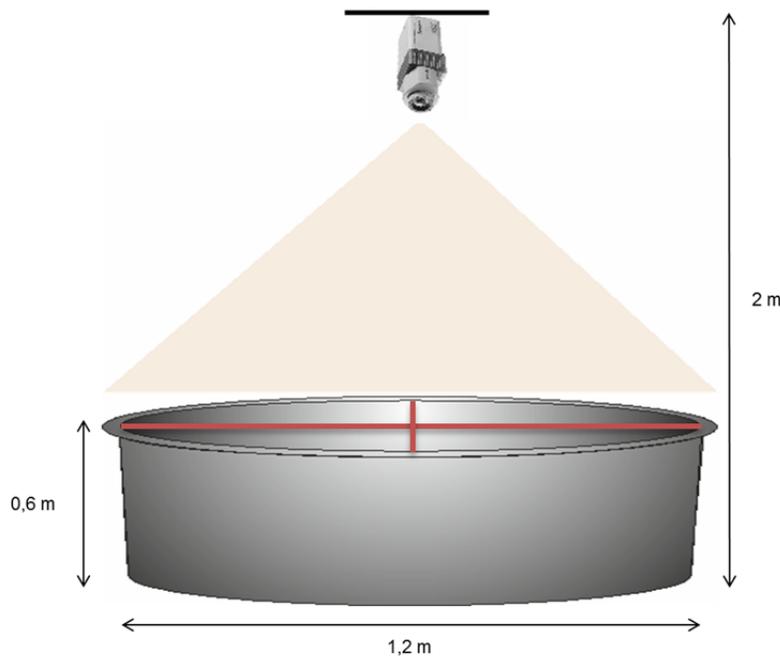


Figura 3-3. Esquema del laberinto de Morris incluyendo divisiones zonales.

El registro y análisis de la actividad de los animales intentando salir del agua fue efectuado por Ethovision 3.0. El software fue configurado para registrar secuencialmente los movimientos de cada animal en una región circular (*arena*), coincidente con el perímetro interno del recipiente, dividida a efectos de análisis de forma virtual en cuatro sectores y una zona de 15 cm de diámetro (P1) que se correspondía con la posición de la plataforma de escape (Figura 3-3). Cada registro (*track*) comenzaba sincronizado con la incorporación del animal al agua desde el borde de uno de los sectores. Transcurrido el tiempo establecido se detenía el registro automáticamente. Los distintos grupos experimentales fueron aleatorizados en sucesivos días de registro comportamental, a fin de evitar posibles efectos del orden de secuencia temporal en los resultados.

El análisis estadístico de los parámetros comportamentales se efectuó sobre los valores medios evaluados por Ethovision para cada parámetro en cada sesión, exportados hacia archivos CSV que fueron utilizados para elaborar una única tabla de valores en Statistica 8, incluyendo como variables independientes fecha, número de registro, número de animal, grupo

experimental y zona, y como variable dependiente el tiempo de latencia hasta alcanzar la plataforma P1.

Los datos sobre aprendizaje utilizando el test de Morris (tiempos de latencia) fueron analizados asimismo utilizando ajustes de regresión no lineal a ecuaciones lineales segmentadas (experimento pre-irradiación, ver 3.3.3.1, pág.103) y ecuaciones de disminución exponencial (experimento post-irradiación, ver 3.3.3.2, pág.103).

La regresión lineal segmentada trata de ajustar una línea a todos los puntos de latencia L cuyo día d sea menor que un valor predeterminado d_0 , y una segunda línea a todos los puntos con d mayor que d_0 , asegurando que las dos líneas se cruzan en d_0 . El modelo de ajuste lineal segmentado fue elaborado utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego CA, USA)³⁵¹ siguiendo las reglas siguientes:

$$L_1 = \text{intercepto}_1 + \text{pendiente}_1 * d$$

$$L \text{ para } d_0 = \text{pendiente}_1 * d_0 + \text{intercepto}_1$$

$$L_2 = L \text{ para } d_0 + \text{pendiente}_2 * (d - d_0)$$

$$L = SI(d < d_0, L_1, L_2)$$

Se empleó también una restricción impuesta de tal modo que el tiempo de cruce d_0 fuese superior a 4 días, es decir, la primera línea debería incluir los datos correspondientes a los cuatro primeros días sin irradiación, y la segunda línea los datos de latencia en las sesiones posteriores a la irradiación.

El ajuste por regresión no lineal a una curva de disminución exponencial³⁵¹ pretende estimar los parámetros de la ecuación:

$$L = (L_0 - \text{plateau}) * \exp(-K * d) + \text{plateau}$$

En esta ecuación, el valor *plateau* representa el tiempo mínimo de latencia hasta alcanzar la plataforma de escape, estando por tanto directamente relacionado con el aprendizaje espacial. La constante K representa en nuestro caso la velocidad de aprendizaje.

3.7.3.3 *Análisis de la ingestión de agua y alimento*

Los animales fueron aclimatados a jaulas metabólicas durante una semana después de transcurridos 7 días tras su llegada al animalario. Se efectuó el seguimiento del consumo de agua y alimento en cada uno de los grupos experimentales así como la producción de heces y orina una semana antes y después de la irradiación experimental con rayos X, dependiendo de su tiempo de sacrificio. Periódicamente se realizó el pesado de los animales, y la cantidad de alimento y agua ingerida fue registrada diariamente mediante el sistema de registro semiautomático de la ingestión perteneciente al Laboratorio de Conducta de la Universidad de León (TSE drinking/feeding monitor, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Alemania), capaz de realizar el seguimiento de la ingestión en ocho jaulas metabólicas. Siendo el número total de jaulas insuficiente para efectuar el seguimiento de todos los grupos de animales, se efectuaron tandas sucesivas con animales control e irradiados, de modo que al finalizar cada una de ellas pudieran efectuarse el sacrificio y los análisis. Cada tanda contenía dos representantes de cada grupo experimental (ver 3.3.1, pág.101).

3.7.4 *Determinaciones en sangre*

En el laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León se analizaron los siguientes parámetros: recuento leucocitario, recuento eritrocitario, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, recuento plaquetario y volumen plaquetario medio.

3.7.5 *Determinaciones en hígado*

3.7.5.1 *Obtención de homogenado total*

Se homogenizaron 0,2 g de hígado en 1 ml de tampón RIPA (Tris HCl 50 mM pH=7,4, KCl 150 mM, deoxicolato sódico 0,5%, NP-40 0,1%, SDS 0,1%). Antes de utilizarlo se añadieron inhibidores de proteasas (PhosStop, Roche Pharma S.A., Madrid) y de fosfatasa (Complete Mini, EDTA-free, Roche), una pastilla de cada inhibidor por cada 10 ml de tampón.

Una vez homogenizado, se dejó en hielo 30 min y se congeló inmediatamente a -80 °C hasta las posteriores determinaciones analíticas.

3.7.5.2 Obtención de la fracción citosólica

A partir de los homogenados totales, se llevó a cabo una centrifugación durante 1 hora a 4 °C y 17.500 xg. El sobrenadante, considerado como la fracción citosólica, fue mantenido, y el precipitado fue desechado.

3.7.5.3 Obtención de extractos nucleares

Inicialmente se prepararon los tampones necesarios para la extracción:

- Tampón A: 10 mM HEPES-NaOH (pH= 7,9), 1,5 mM MgCl₂ y 10 mM KCl. El volumen total se dividió en partes iguales: con 0,1% de NP-40 (Calbiochem-Novabiochem Co., San Diego CA, USA) y sin NP-40. Tras su preparación, ambos tampones A fueron autoclavados.
- Tampón B: 20 mM HEPES-NaOH (pH=7,9) 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂ y 0,2 mM EDTA pH=8. Este tampón fue filtrado (Millipore, 0,20 µm).

Al igual que en la obtención de homogenado total, antes de su uso se añadieron inhibidores de proteasas (PhosStop, Roche Pharma S.A., Madrid) y de fosfatasa (Complete Mini, EDTA-free, Roche) (en ambos casos una pastilla por cada 10 ml de tampón).

Método:

Se pesó 0,1 g de tejido y se homogeneizó con 1,5 ml de tampón A con 0,1% NP-40. Tras un periodo de 15 minutos en hielo, el homogeneizado fue centrifugado durante 10 minutos a 4 °C y 1000 g, desechando el sobrenadante.

El precipitado fue resuspendido con 1,5 ml de tampón A sin NP-40, agitando en vórtex y centrifugado nuevamente durante 10 minutos a 4 °C y 1000 g, desechando asimismo el sobrenadante.

A continuación, el precipitado fue resuspendido en 50 µl de tampón B, pasando el contenido a tubos eppendorf autoclavados. Tras un período de 30 minutos en hielo, se centrifugó durante 15-30 minutos a 4 °C y 14.000 g.

El sobrenadante, que se corresponde con los extractos nucleares, fue recogido y congelado a -80 °C para posteriores determinaciones analíticas.

3.7.5.4 Concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford ³⁵².

Fundamento:

El Coomassie Brilliant Blue es un pigmento del tipo trifenilmetano aniónico, que se une de forma no covalente a los residuos de lisina de las proteínas. El método Bradford depende de la unión cuantitativa del colorante, el Coomassie Brilliant Blue, a una proteína desconocida y al comparar esta unión a las diferentes cantidades de una proteína estándar, generalmente albúmina sérica bovina (BSA), diseñada para cuantificar de 1 a 10 µg de proteína.

Método:

Se preparó una recta patrón con diversas cantidades de agua y del estándar BSA diluido (BSA de Pierce, 0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA). Tanto las muestras de la recta patrón como los extractos a determinar fueron incorporados por triplicado a las placas de análisis, de manera que cada placa utilizada (96 pocillos) pudieran ser cuantificadas hasta 24 muestras (Tabla 3-1).

Blanco	Blanco	Blanco	M1	M1	M1	M9	M9	M9	M17	M17	M17
A1	A1	A1	M2	M2	M2	M10	M10	M10	M18	M18	M18
A2	A2	A2	M3	M3	M3	M11	M11	M11	M19	M19	M19
A3	A3	A3	M4	M4	M4	M12	M12	M12	M20	M20	M20
A4	A4	A4	M5	M5	M5	M13	M13	M13	M21	M21	M21
A5	A5	A5	M6	M6	M6	M14	M14	M14	M22	M22	M22
A6	A6	A6	M7	M7	M7	M15	M15	M15	M23	M23	M23
A7	A7	A7	M8	M8	M8	M16	M16	M16	M24	M24	M24

Tabla 3-1. Protocolo de carga de las muestras en placa de 96 pocillos por el método Bradford

Cada placa de análisis se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias a 595 nm en un lector de placas, obteniendo de esta manera la concentración de proteína en cada una de las muestras.

3.7.5.5 Concentración de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico

Fundamento:

La determinación de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se realizó según el método descrito por Wills³⁵³. Se analizó la intensidad de la peroxidación lipídica mediante la cuantificación de los aldehídos formados por degradación de hidroperóxidos, incluyendo el malondialdehído (MDA) que se utilizó como estándar.

Método:

Se incubó, durante 30 minutos a 90 °C, la siguiente mezcla reactiva:

- 1 ml de homogenado fresco (0,5 g de hígado + 1,5 ml tampón fosfato 0,1 M pH 7,4)
- 2 ml de una solución compuesta por ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido clorhídrico (0,25 N).

Dicha mezcla se enfrió en hielo y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Se determinó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm. Para la realización del blanco se sustituyó la muestra por tampón fosfato (0,1 M pH 7,4). Para el cálculo de la concentración de MDA se utilizó una curva patrón de MDA (1-4 nmol/ml), con un coeficiente de extinción molar de $1,55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7.5.6 Cuantificación de la expresión de proteínas (CAT, SOD, NQO1, Nrf2, Keap1)

La determinación de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot utilizando el sistema de Laemmli³⁵⁴.

Método:

Tras la obtención de los homogenados celulares y la posterior determinación de la concentración de proteínas, se tomaron 100 µg de proteína de cada muestra para su análisis. En todos los casos se completó el volumen con agua hasta 75 µL y se añadieron 25 µL adicionales de tampón de carga (sacarosa 0,27 M, SDS 0,27 M, β-mercaptoetanol 2,8 M, azul de bromofenol 1,4 mM y Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) y se incubó durante 3 minutos a 100 °C.

a) Electroforesis

A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 9-12% en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM pH 8,8) utilizando el sistema Mini Protean (Bio-Rad). Dicha electroforesis se realizó en un gel discontinuo con dos zonas diferenciadas: *Running* (en la zona inferior) y *Stacking* (en la zona superior). En la zona de *Stacking* se concentra la muestra mediante isotacoforesis, mientras que en la zona de *Running* se produce la separación de los diversos componentes proteicos de cada muestra.

Para la realización del gel *Running* se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- 1,8 - 2,4 ml de mezcla acrilamida/bis acrilamida 29:1 (Bio-Rad).
- 2-2,6 ml de H₂O milliQ.
- 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.
- 60 µL de SDS al 10% (Bio-Rad).
- 30 µL de persulfato amónico (APS) al 10% (Bio-Rad).
- 3 µL de TEMED (Bio-Rad).

Tras la preparación de esta parte del gel, la mezcla se introdujo entre los cristales con objeto de que polimerizase en la zona inferior.

A continuación se procedió a realizar la mezcla de la parte concentradora (*Stacking*) del gel, que se realizó con un porcentaje de acrilamida del 4%. Para ello se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- 0,4 mL de mezcla acrilamida/bis acrilamida.
- 2 mL de H₂O milliQ.
- 3,3 mL de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.
- 33,3 µL de SDS al 10%.
- 16,7 µL de APS al 10%.
- 3,3 µL de TEMED.

Una vez preparada, la mezcla fue aplicada entre los cristales, encima de la parte separadora (*Running*) del gel, y a continuación se introdujo el peine para que se formasen los pocillos del gel en los cuales se procedió a cargar las muestras. La cantidad estándar utilizada de cada una de las proteínas fue de 30 µg.

Las proteínas estudiadas fueron catalasa, SOD Cu/Zn, NQO1, el factor de transcripción Nrf2 y su inhibidor Keap1.

b) Transferencia

Una vez separadas mediante electroforesis las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad), con objeto de fijarlas a este soporte favoreciendo su exposición a los anticuerpos. Para dicha transferencia, una vez extraído el gel, éste se equilibró en el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M, y metanol 20%).

La transferencia se realizó a 100 V durante 100 minutos, mediante la técnica de transferencia húmeda. A continuación, la membrana donde se hallaban fijadas las proteínas transferidas, se incubó durante una hora en solución de bloqueo conteniendo 2,5% leche en polvo desnatada en PBS-Tween (NaCl 0,14 M, KH₂PO₄ 1,4 mM, NaHPO₄ 8 mM, KCl 2,7 mM, Tween-20 0,05%) a temperatura ambiente.

c) Incubación con anticuerpo primario

Posteriormente, se incubó la membrana durante 24 h con anticuerpos específicos para cada proteína objeto de análisis (anti-catalasa, anti-SOD Cu/Zn, anti-NQO1, anti-Nrf2 y anti-Keap1) (Sta. Cruz Biotechnology, EE.UU), disueltos en leche preparada en PBS-Tween. Transcurrido ese tiempo se lavó durante 1 hora con PBS-Tween (que era renovado cada 10 minutos).

d) Incubación con el anticuerpo secundario

A continuación, se incubó durante 60 minutos con un anticuerpo secundario, anti-inmunoglobulina de conejo, unido a peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*, HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), disuelto en leche y PBS Tween en una dilución final de 1:5.000. Transcurrido el tiempo indicado se volvió a lavar durante 1 hora con PBS-Tween (que era renovado cada 10 minutos).

e) Revelado

La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial ECL (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.) exponiendo la membrana durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente se introdujo en un cassette radiográfico junto con una película de alta sensibilidad (Fujifilm Super RX, Fuji, Tokio, Japón), durante tiempos variables de entre 1 - 30 minutos.

Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando para ello el programa Scion Image 4.02 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE.UU.).

Con objeto de verificar que se había cargado la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel, las membranas se lavaron en tampón de deshibridación (glicina 0,2 M, 3 mM SDS, 1% Tween-20 pH 2,2) durante 10 minutos, 2 lavados de 10 min en PBS, y 2 lavados de 5 min en PBS-Tween. A continuación se bloquearon durante 1 hora en leche al 2,5% disuelta en PBS-Tween para posteriormente cuantificar la proteína *housekeeping* gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), de 36kDa.

3.7.6 Tratamiento estadístico

Para la expresión de los resultados se calculó el valor de la media y el error estándar de la media (E.E.M).

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó el test de análisis de varianza (ANOVA). Además, en aquellos grupos donde aparecieron diferencias significativas se realizó, posteriormente, el test de Newman-Keuls.

Para el tratamiento de los datos y para el análisis estadístico de los mismos se utilizó el programa Statistica 8.0 para Windows (Statsoft, Tulsa, USA), mientras que para su representación gráfica se utilizaron el programa anteriormente citado y Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros corporales

En las tablas 4-1 y 4-2 quedan reflejados el peso corporal, hepático y del cerebro en los diferentes grupos experimentales. El peso corporal se determinó cada 2 días y el reflejado en las tablas corresponde al peso al inicio y al final de los experimentos. El peso hepático y del cerebro se realizó después del sacrificio de los animales tanto en el grupo de animales analizados a los 7 como los 30 días post-irradiación.

No hubo diferencias significativas en los pesos del hígado y del cerebro entre los diferentes grupos experimentales. No obstante, en el peso corporal se observó un descenso en todos los animales radiados, tanto en el grupo RS como en el RQ, en el grupo de 7 días post-irradiación. También se observa un descenso no significativo en el peso del cerebro en los animales irradiados.

Grupo	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Hígado (g)	Cerebro (g)	Pérdida de peso (g) (2 días post-irradiación)
CS	248,2±15,9	320,3±7,1	11,9±0,9	2,00±0,10	-
CQ	247,1±14,3	324,6±7,3	11,2±1,2	2,02±0,04	-
RS	235,7±12,4	294,9±8,0	11,4±1,6	1,86±0,16	7,52±0,79
RQ	232,5±12,3	293,5±4,1	12,1±1,0	1,96±0,07	3,13±0,91

Tabla 4-1. Peso corporal, hepático y del cerebro en los grupos experimentales a los 7 días post-irradiación. Valores medios ± E.E.M. de 8-10 ratas.

Grupo	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Hígado (g)	Cerebro (g)	Pérdida de peso (g) (5 días post-irradiación)
CS	228,5±7,6	352,3±8,7	12,5±1,4	2,02±0,10	-
CQ	228,3±6,5	368,4±11,5	13,1±2,0	1,98±0,07	-
RS	261,2±5,5	344,0±5,8	12,3±1,3	1,92±0,12	13,16±1,71
RQ	257,8±6,5	332,7±6,7	12,4±1,4	1,98±0,10	6,88±1,06

Tabla 4-2. Peso corporal, hepático y del cerebro en los grupos experimentales a los 30 días post-irradiación. Valores medios ± E.E.M. de 8-10 ratas.

Tras el seguimiento del peso corporal a lo largo de los días desde la llegada de los animales al animalario, pudimos observar que la pérdida media de peso corporal, medida tanto a los 2 días como a los 5 días post-irradiación, experimentada por las ratas no suplementadas que sufrieron irradiación a cuerpo entero de 6 Gy (grupo RS), fue aproximadamente el doble que la pérdida acaecida en las ratas suplementadas oralmente con quercetina (grupo RQ) (Tabla 4-1 y Tabla 4-2).

En la evolución del peso corporal (Figura 4-1), observamos un aumento progresivo en todos los grupos de animales hasta el día de la irradiación, a partir del cual se observa un descenso en la velocidad de crecimiento en los animales control, coincidiendo con la anestesia de los animales. En los animales irradiados se observa un descenso en el peso corporal, mayor en los animales irradiados y no suplementados con quercetina. Después del día 20 se recupera el peso en todos los grupos experimentales, siendo menor la recuperación del peso en todos los animales irradiados, tratados o no con quercetina.

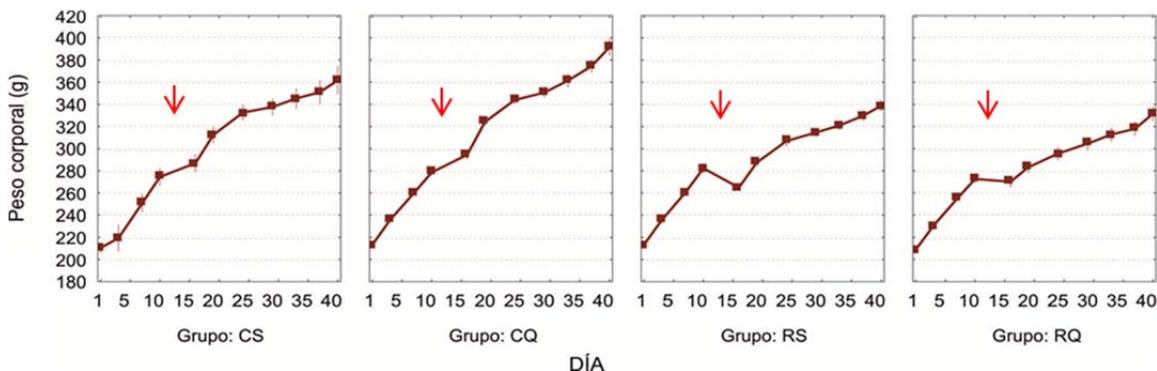


Figura 4-1. Evolución del peso corporal en los 4 grupos experimentales hasta los 30 días post-irradiación.

La irradiación experimental se realizó en el día 10 desde la llegada de los animales.

4.2 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros de daño orgánico. Resonancia magnética

Tanto los animales suplementados con quercetina como los grupos control, fueron sometidos a una exploración de resonancia magnética realizada previamente a la radiación. Se efectuó el registro de las alteraciones de señal inducidas por la radiación experimental en encéfalo, médula espinal, y médula ósea de los cuerpos vertebrales, mediante resonancia magnética de 3 Teslas, a los 2, 7, 15, 20 y 30 días post-irradiación, obteniendo imágenes de cerebro en secuencias axial y coronal T2 SE y T2* GE y de médula espinal y médula ósea en secuencias sagital T1 y axiales T2 SE y T2* GE.

No se observó evidencia de gliosis, edema, ni hemorragias durante las dos primeras semanas. El único cambio es un aumento de señal en secuencias T1 de las vértebras como consecuencia de la radiación de la médula ósea. No se apreciaron diferencias entre los dos grupos de ratas irradiadas, RS y RQ.

En las imágenes obtenidas por resonancia realizadas a partir de los 15 días después de la irradiación es posible distinguir algún foco aislado puntiforme y sutil de microhemorragias, identificados en secuencia T2* GE, quizá algo más llamativos en la ratas irradiadas sin quercetina.

En la Figura 4-2 se muestra una imagen de resonancia magnética correspondiente al cerebro en secuencia T2* GE en plano coronal de una rata después de 15 días de ser irradiada sin tratamiento con quercetina (A) y con quercetina (B). Se aprecia un foco puntiforme aislado de baja señal localizado en hemisferio cerebral derecho que podría corresponder con un microsangrado. En la Figura 4-2B, que corresponde a una rata irradiada y tratada con quercetina, no se observan microsangrados.

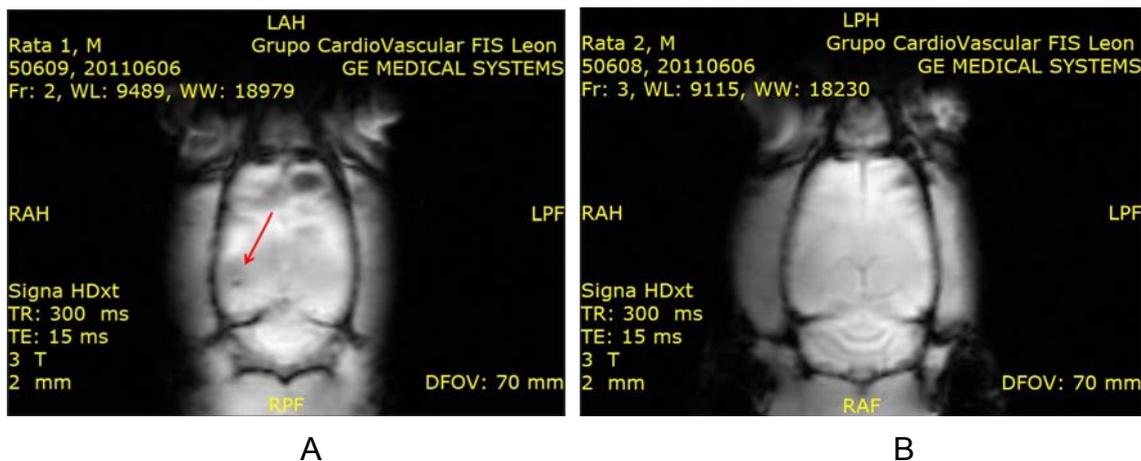


Figura 4-2. Secuencia T2* eco de gradiente en plano coronal de cerebro en una rata después de 15 días de ser irradiada.

A) sin suplementación con quercetina. B) suplementada con quercetina.

También se aprecia un foco puntiforme aislado de baja señal localizado en el hemisferio cerebeloso izquierdo, sugestivo de microsangrado, en una rata irradiada sin suplementación (Figura 4-3A). En la Figura 4-3B, correspondiente a una rata irradiada y tratada con quercetina, no se observan microsangrados.

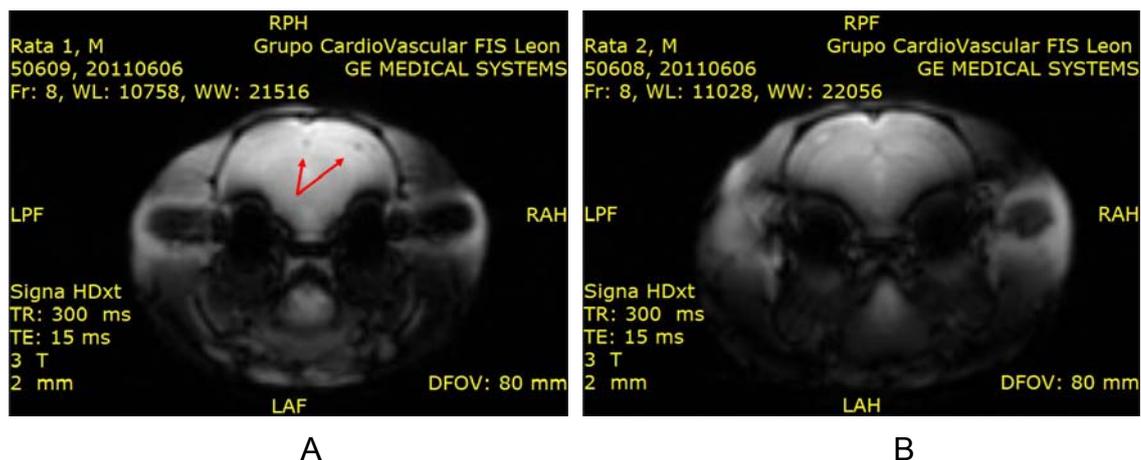


Figura 4-3. Secuencia T2* eco de gradiente en plano axial de cerebro en una rata después de 15 días de ser irradiada.

A) sin suplementación con quercetina. B) suplementada con quercetina.

4.3 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros de daño orgánico. Análisis histopatológico

En general, el examen histopatológico de las muestras de ratas irradiadas sin suplementación con quercetina revela alteraciones significativas en los tejidos estudiados.

4.3.1 Médula ósea

Observamos en médula ósea del grupo de animales control características de una médula ósea roja activa con abundantes células de las series eritroide y mieloide y megacariocitos (Figura 4-4), pero en las ratas irradiadas a los 7 días post-irradiación se observó menor densidad celular y sustitución de células hematopoyéticas por adipocitos, y por tanto una disminución en la capacidad hematopoyética (Figura 4-5). Estas alteraciones fueron menos evidentes a los 30 días post-irradiación. La quercetina mejoró levemente las alteraciones originadas por la radiación (Figura 4-6).

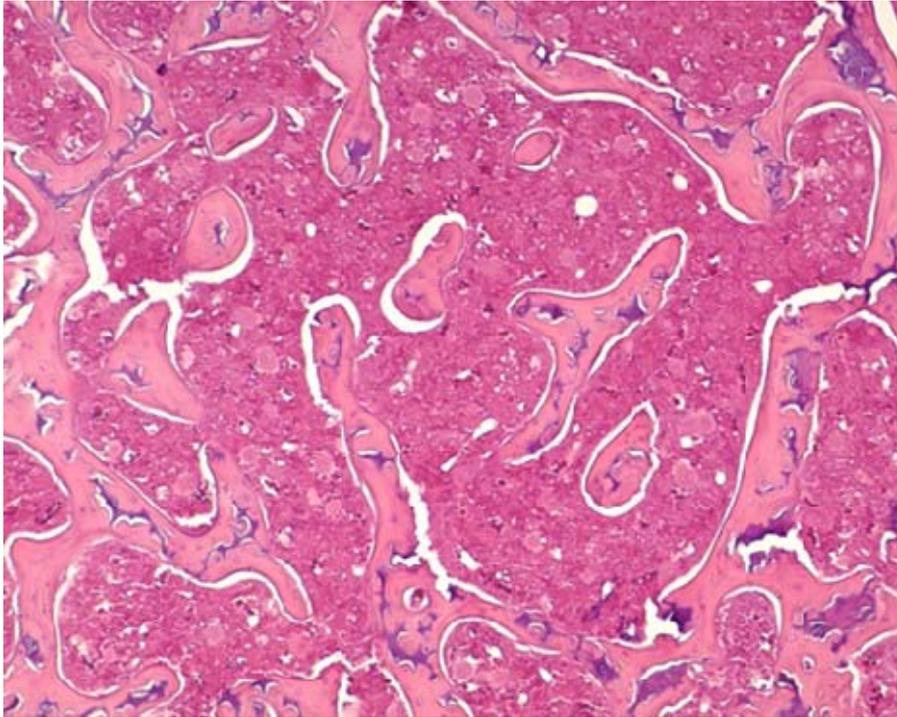


Figura 4-4. Sección transversal de médula ósea cervical de una rata control, sacrificada a los 7 días post-irradiación.
Hematoxilina-Eosina. 20X

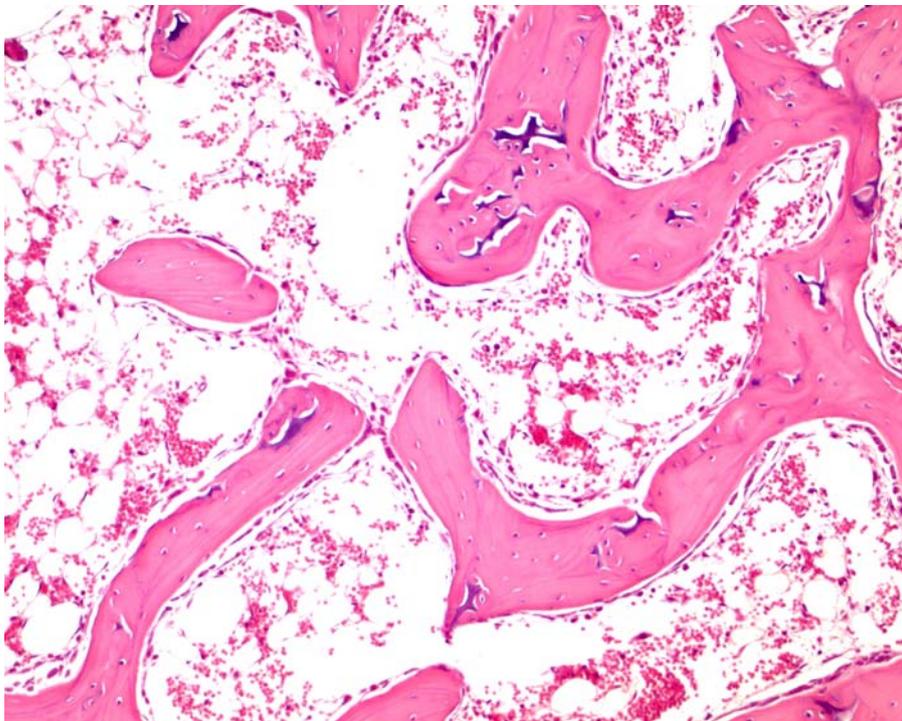


Figura 4-5. Sección transversal de médula ósea cervical de una rata irradiada sin tratamiento, sacrificada a los 7 días post-irradiación.
Hematoxilina-Eosina. 20X

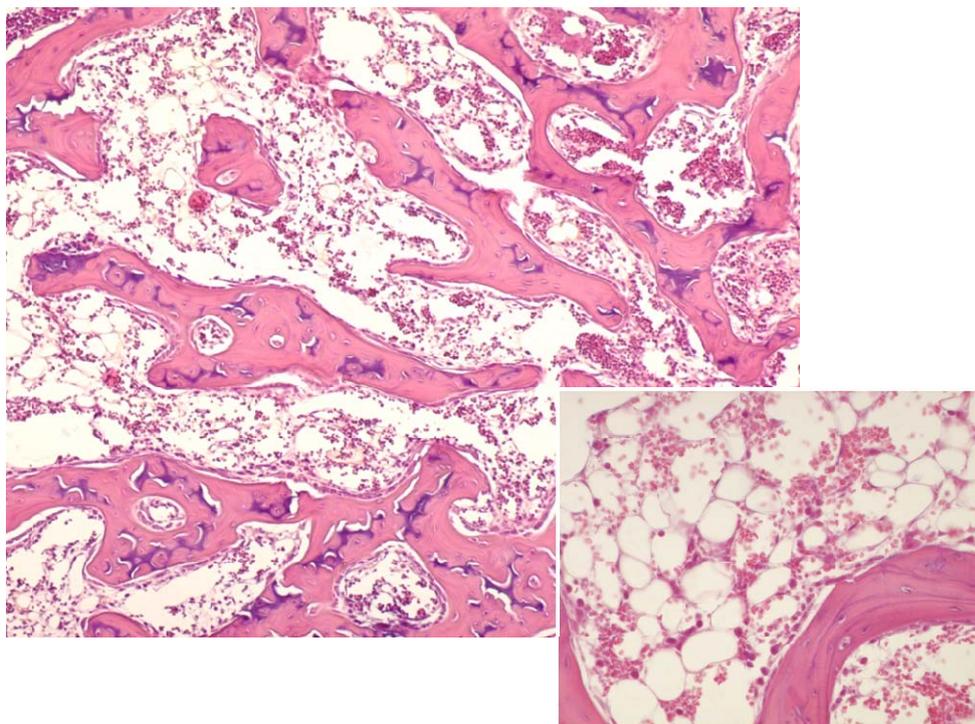


Figura 4-6. Sección transversal de médula ósea cervical de una rata irradiada suplementada con quercetina, sacrificada a los 7 días post-irradiación.

En el cuadro inferior observamos una foto detallada de la presencia de adipocitos y menor número de células hematopoyéticas (100X). Hematoxilina-Eosina. 20X

4.3.2 Médula espinal

En la médula espinal se observó ligera espongiosis a los 7 días post-irradiación tanto en los animales tratados como en los no tratados con quercetina. A los 30 días post-irradiación en los animales sin tratar se observaron alteraciones vasculares: congestión y hemorragia en meninges, sustancia gris y sustancia blanca de la médula espinal y conducto ependimario (Figura 4-8), no siendo evidentes estas hemorragias en los animales a los que se les administró quercetina.

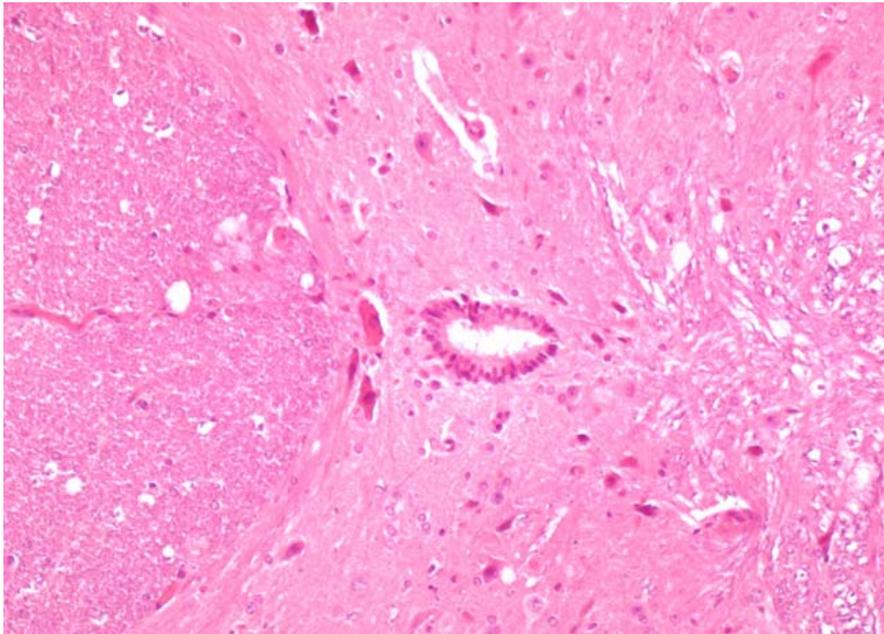


Figura 4-7. Sección transversal de médula espinal de una rata control, sacrificada a los 30 días post-irradiación.
Hematoxilina-Eosina. 42X

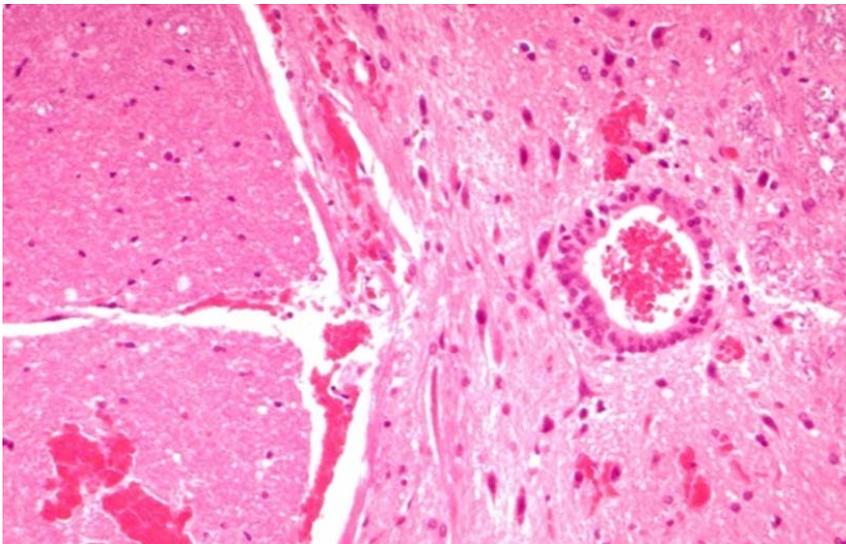


Figura 4-8. Sección transversal de médula espinal de una rata irradiada no suplementada con quercetina, sacrificada a los 30 días post-irradiación.
Hematoxilina-Eosina. 42X

4.3.3 Hipocampo

En la Figura 4-9 se muestra una sección sagital del hipocampo de una rata control. En el hipocampo y áreas próximas al tercer ventrículo de los animales irradiados sin tratamiento, observamos numerosas neuronas con picnosis. También aparecen congestión y hemorragia así como infiltrados focales de células mononucleadas en meninges a los 7 días post-irradiación (Figura 4-10) y edema perivascular a los 30 días post-irradiación (Figura 4-11). Estas alteraciones no se observaron en los animales suplementados con quercetina.

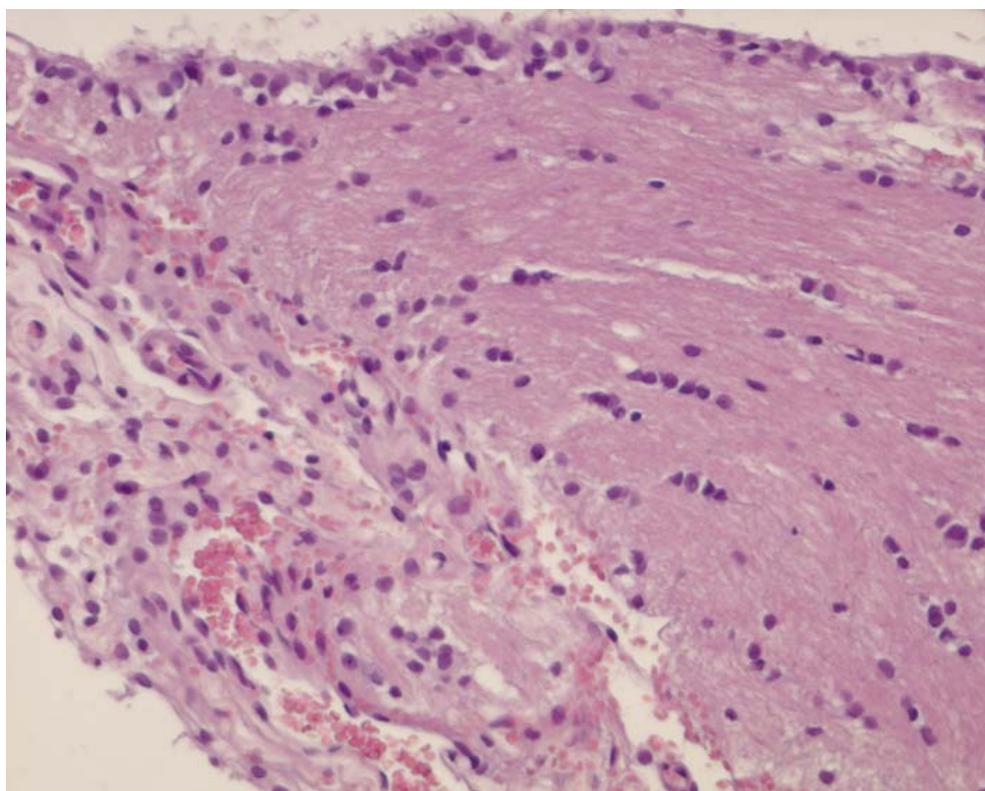


Figura 4-9. Sección sagital del hipocampo de una rata control, sacrificada a los 7 días.
Hematoxilina-Eosina. 50X.

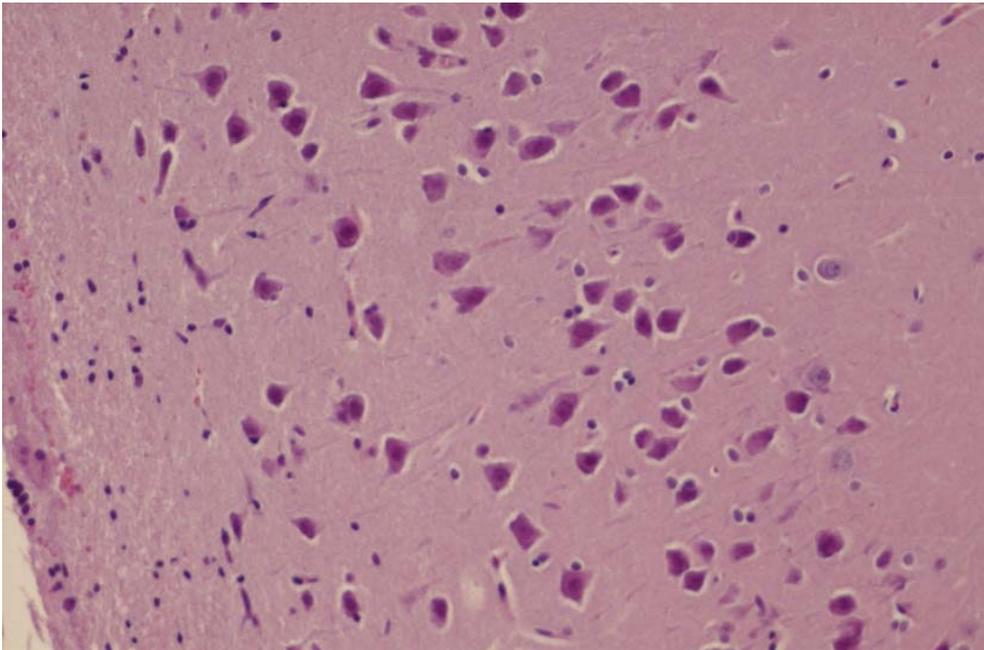


Figura 4-10. Sección sagital del hipocampo de una rata irradiada no suplementada con quercetina sacrificada a los 7 días post-irradiación.
Hematoxilina-Eosina. 37X.

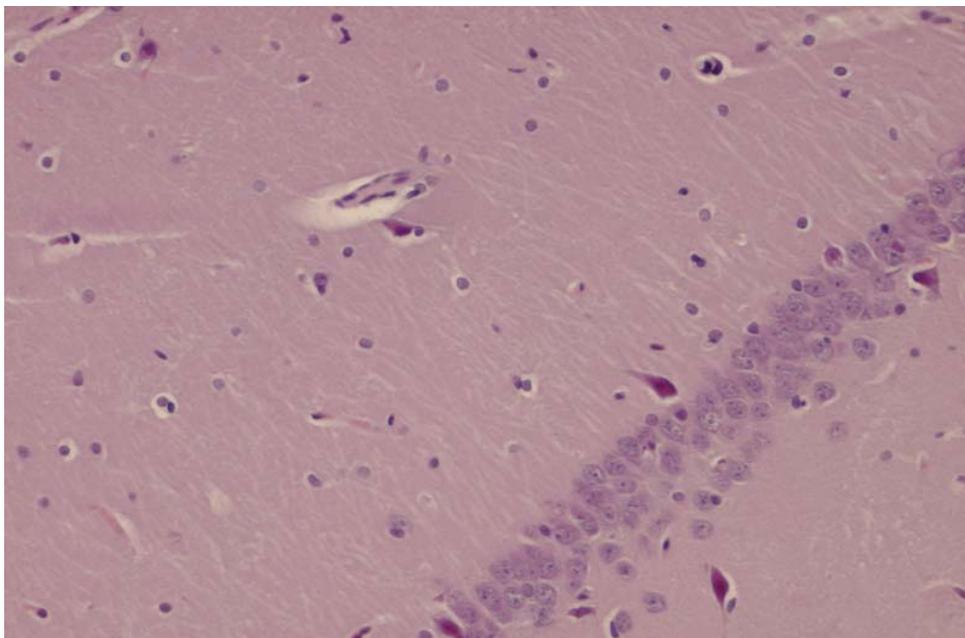


Figura 4-11. Sección sagital a través del hipocampo de una rata irradiada no suplementada con quercetina sacrificada a los 30 días post-irradiación.
Hematoxilina-Eosina. 37X.

4.3.4 Hígado

En la Figura 4-12 se muestra una sección del hígado de una rata control. No se observaron lesiones relevantes en los animales irradiados a los 7 días post-irradiación, excepto la presencia de discretos infiltrados portales constituidos principalmente por linfocitos. Asimismo, el citoplasma de algunos hepatocitos aparecía vacuolizado de forma difusa y con el núcleo en posición central, imagen compatible con posible trastorno del metabolismo hídrico o degeneración glucogénica (Figura 4-13). A los 30 días post-irradiación, los animales sin tratar presentaron también infiltrados portales esporádicos de linfocitos y macrófagos. Los hepatocitos, principalmente de áreas periportales, mostraron inclusiones ovoides citoplasmáticas posiblemente de naturaleza proteica (gotas hialinas o cuerpos de Mallory) (Figura 4-14). La quercetina no mejora las leves alteraciones observadas en los animales irradiados.

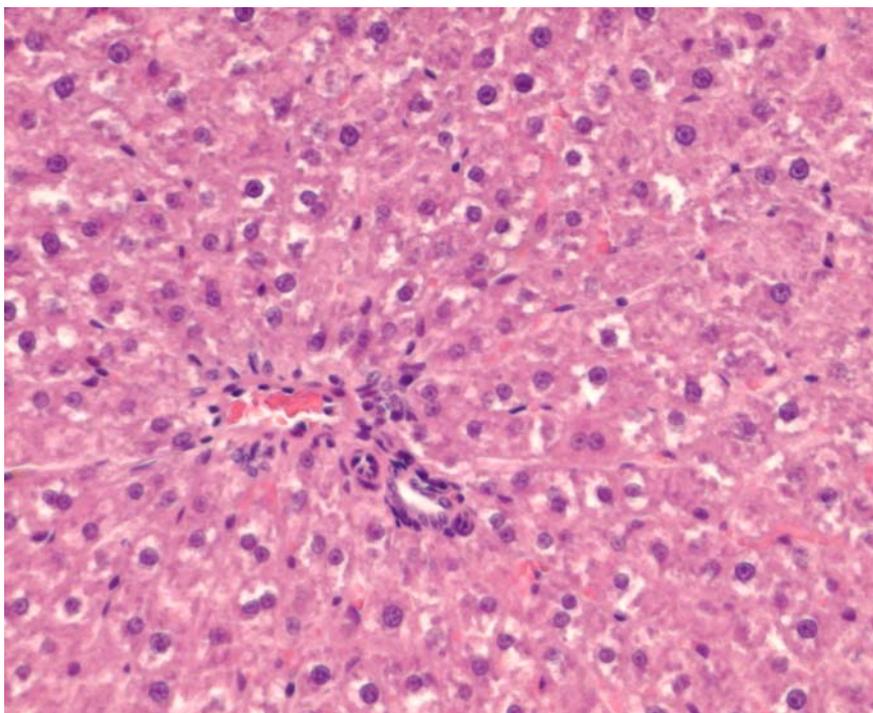


Figura 4-12. Sección del hígado de una rata control sacrificada a los 7 días post-irradiación. Hematoxilina-Eosina. 50,1X.

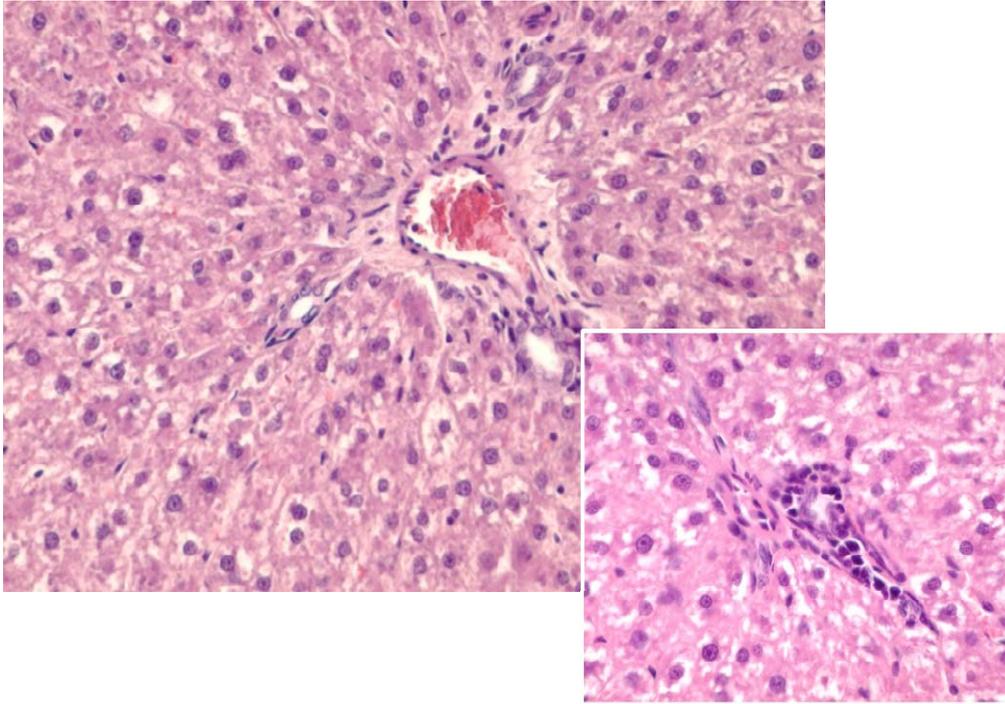


Figura 4-13. Sección del hígado en ratas irradiadas no suplementadas con quercetina sacrificadas a los 7 días post-irradiación.

En el cuadro inferior se muestra infiltración portal con linfocitos. Hematoxilina-Eosina. 50X.

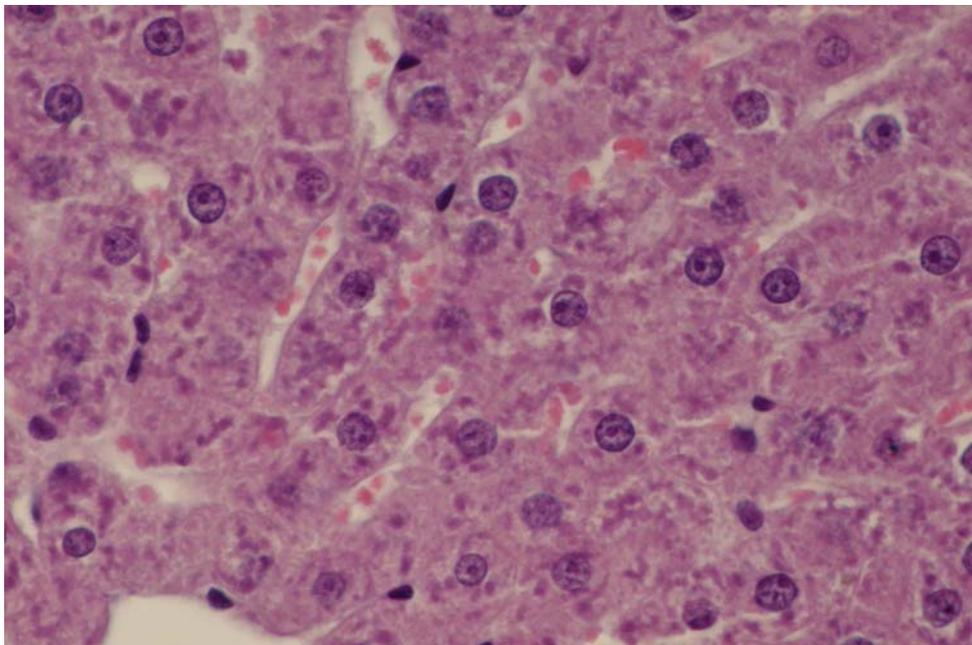


Figura 4-14. Sección del hígado de una rata irradiada no suplementada con quercetina sacrificada a los 30 días post-irradiación.

Hematoxilina-Eosina. 100X.

4.4 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros sanguíneos

En las Figuras 4-15 a 4-19 se muestran los datos correspondientes al recuento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como valor hematócrito y concentración de hemoglobina, respectivamente en los diferentes grupos experimentales.

Como se observa en la Figura 4-15, el recuento eritrocitario disminuye significativamente en los animales irradiados tanto a los 7 como a los 30 días post-irradiación, con independencia del tratamiento con quercetina.

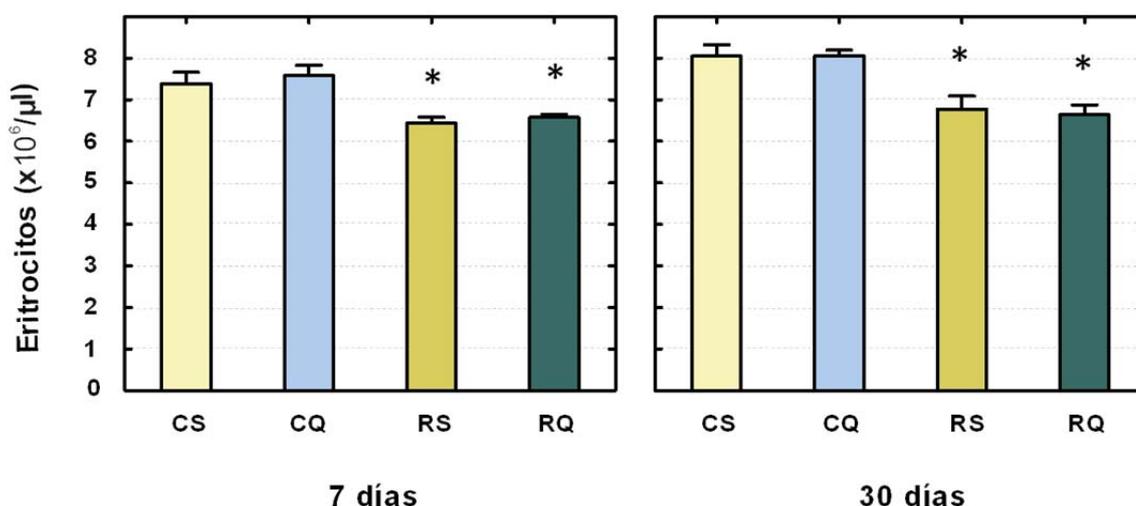


Figura 4-15. Recuento de eritrocitos en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.

Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas. * $p < 0,05$ respecto a CS.

A los 7 días de la irradiación el valor hematocrito disminuye significativamente en los animales irradiados en relación a los animales control. El descenso es ligeramente menor en los animales irradiados tratados con quercetina. En el experimento a largo plazo el valor hematocrito se ha recuperado en los animales irradiados, no presentando diferencias con los grupos control (Figura 4-16).

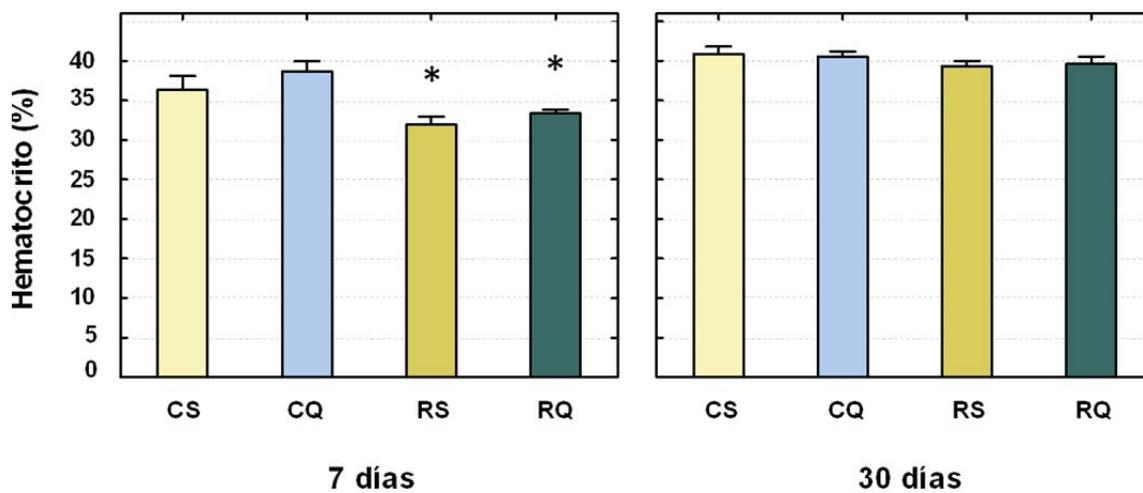


Figura 4-16. Valor hematocrito en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.

Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas. * $p < 0,05$ respecto a CS.

En la Figura 4-17 se muestran los valores de concentración de hemoglobina donde se observa, de forma similar a lo que sucede con el valor hematócrito, un descenso significativo en los grupos irradiados, tanto tratados como no tratados con quercetina, después de 7 días tras la irradiación. Estos valores se recuperan a los 30 días post-irradiación.

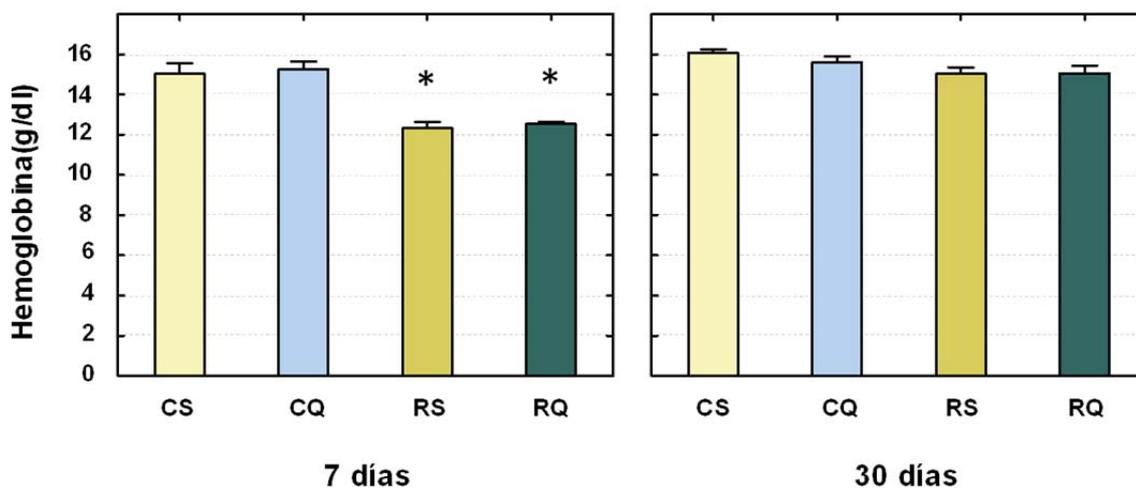


Figura 4-17. Concentración de hemoglobina en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.

Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas. * $p < 0,05$ respecto a CS.

En la Figura 4-18 se puede apreciar un descenso significativo muy acusado en el recuento de leucocitos en los animales transcurridos 7 días tras ser irradiados. Puede apreciarse a los 30 días post-irradiación que los animales no tratados con quercetina recuperan casi en su totalidad el número de leucocitos, siendo este efecto más acusado en los animales irradiados y tratados con quercetina.

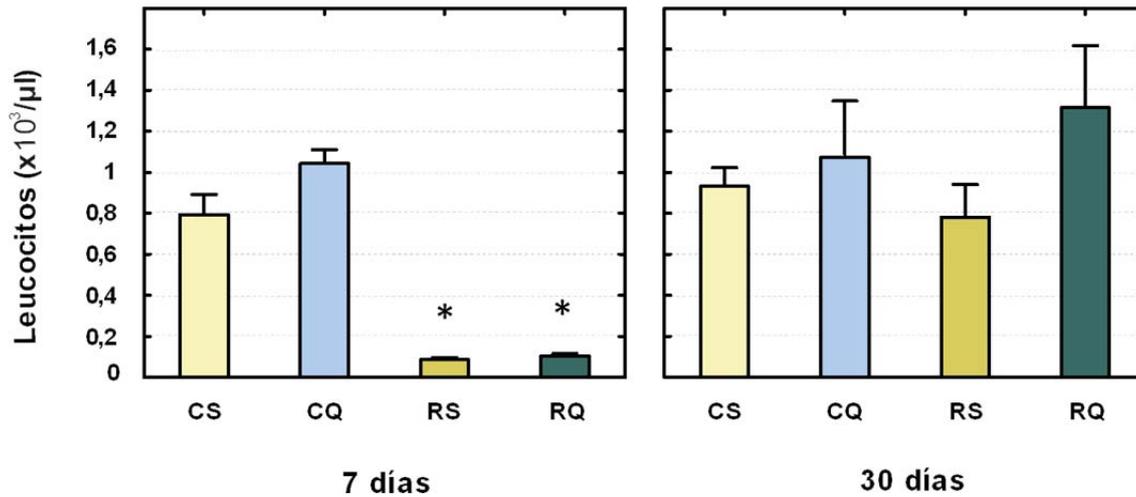


Figura 4-18. Número de leucocitos en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.

Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas. * $p < 0,05$ respecto a CS.

En cuanto al recuento de plaquetas, podemos apreciar que estos corpúsculos prácticamente desaparecen del plasma a los 7 días post-irradiación en los animales irradiados tanto en los animales tratados como en los no tratados con quercetina. A los 30 días post-irradiación el número de plaquetas en los animales irradiados es similar al de los animales control. La quercetina no parece ejercer ningún efecto sobre el recuento plaquetario (Figura 4-19).

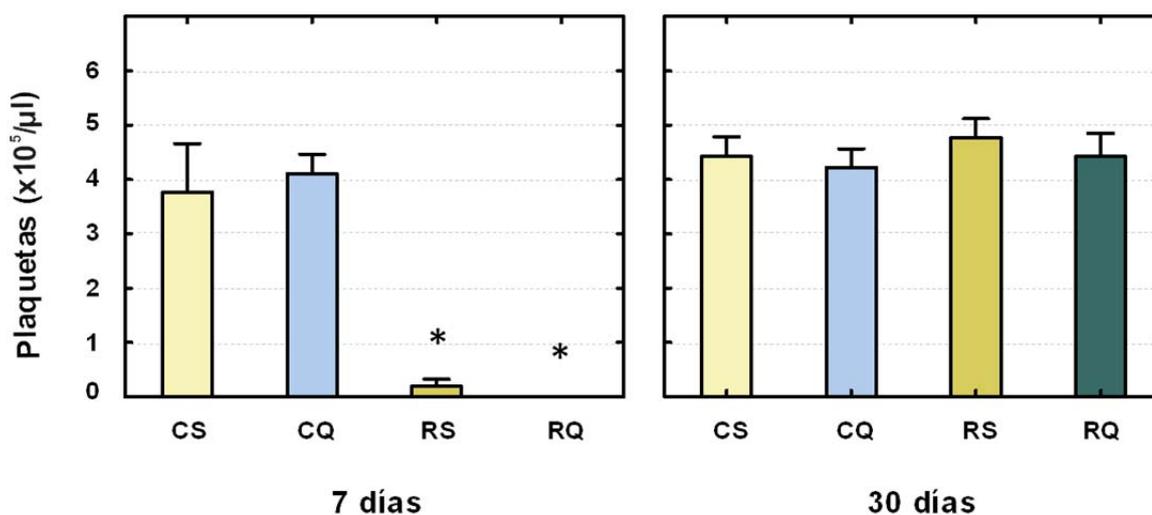


Figura 4-19. Número de plaquetas en los diferentes grupos experimentales a los 7 y 30 días post-irradiación.

Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas. * $p < 0,05$ respecto a CS.

4.5 Efectos de la radiación y la quercetina sobre el comportamiento

4.5.1 Experimento 1. Efectos comportamentales pre-irradiación

En el experimento 1 analizamos el comportamiento exploratorio y cognitivo de los animales durante cuatro días antes de ser irradiados, y el efecto de la irradiación posterior sobre los parámetros comportamentales registrados.

4.5.1.1 Comportamiento exploratorio (prueba de open field)

4.5.1.1.1 Frecuencia de acceso

En la Figura 4-20 se recoge la frecuencia de acceso de los animales a las distintas zonas del *open field* durante los cuatro días anteriores a la irradiación y los tres días posteriores a la misma, incluyendo además los tres días analizados a más largo plazo (14, 19 y 29 días post-irradiación). No se observan cambios aparentes en la frecuencia de acceso de los animales a los lados y a las esquinas. En ambas zonas, los controles con y sin quercetina también tienden a la bajada en la frecuencia en los días previos a la anestesia. Tras la misma, la frecuencia aumenta con tendencia a recuperarse, aunque en el grupo control con quercetina esté menos marcado.

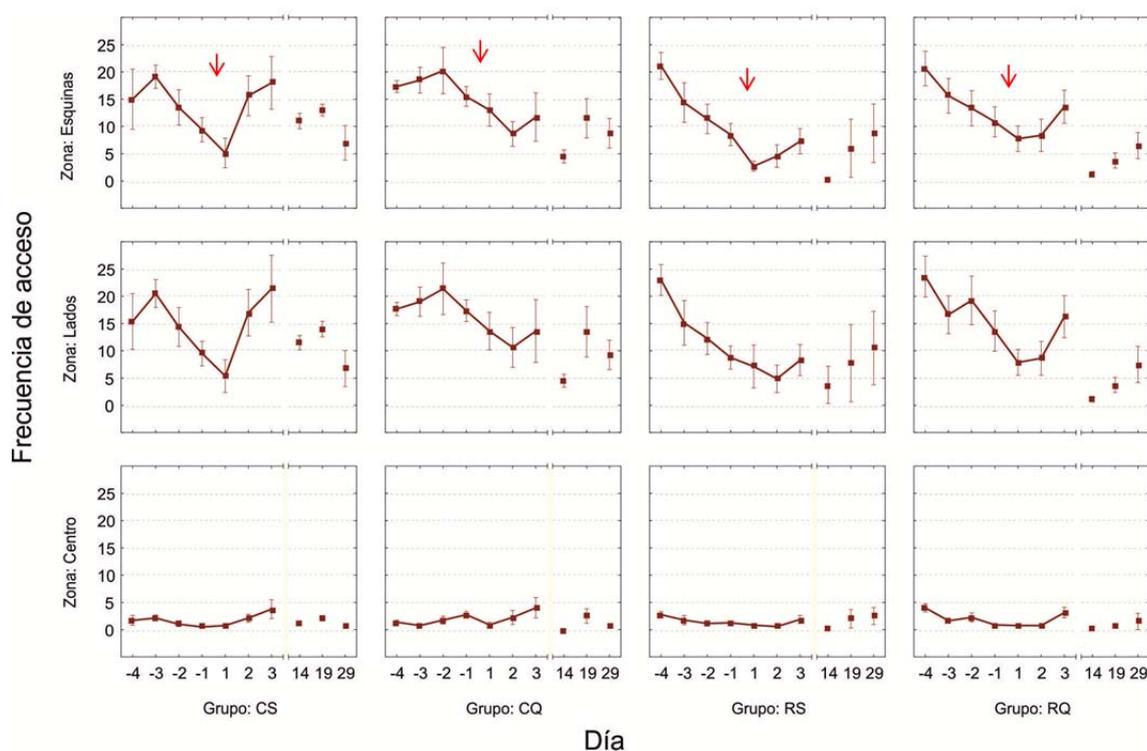


Figura 4-20. Frecuencia de acceso en esquinas, lados y centro de los animales durante los días previos a la irradiación y los días posteriores a la misma.

Valores medios \pm EEM. N=8-10

En los animales irradiados sin tratamiento, también observamos un descenso de la frecuencia de acceso a las zonas en los días previos a la

radiación. Sin embargo tras la misma, observamos que la recuperación es menor a la de los controles. Esta situación se revierte en los animales irradiados tratados con quercetina (Figura 4-20).

A fin de comparar la respuesta inmediata de los animales a la irradiación se efectuó un análisis de varianza de medidas repetidas con los datos comportamentales relativos a la frecuencia de acceso a cada zona, obtenidos los días anterior y posterior a la irradiación para cada uno de los cinco minutos que duraba la sesión en el open field. Fueron considerados factores independientes el grupo y el día y como factor de medidas repetidas el minuto en la sesión. La Figura 4-21 permite apreciar que la frecuencia de acceso por minuto es superior en los animales control suplementados con quercetina que en los animales control no suplementados. Existe además una disminución no significativa de la frecuencia de acceso por minuto en todos los animales al día siguiente a la irradiación.

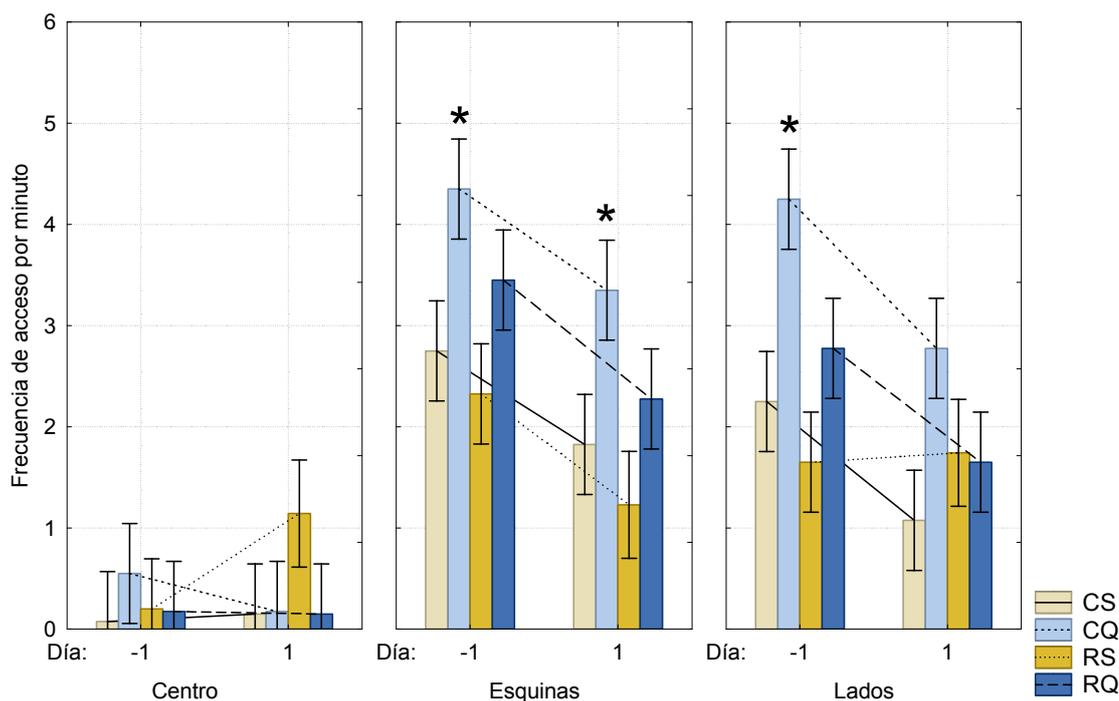


Figura 4-21. Frecuencia de acceso media por minuto a las zonas del open field durante los días anterior y posterior a la irradiación.

Medias \pm E.E.M. N=8-10. * $p < 0,05$ respecto a CS.

Se efectuó el análisis de la frecuencia de acceso a las zonas durante cada uno de los cinco minutos de duración de cada sesión en el open field, en un intento de obtener información acerca del grado de habituación de los animales al mismo una vez sufrida la irradiación experimental. La representación 3D de estos datos (Figura 4-22) permite observar en el grupo control un aumento progresivo en la frecuencia de acceso a esquinas y lados a lo largo de los tres días post-irradiación, junto con su disminución desde el minuto 1 hasta el minuto 5 de la sesión. Este comportamiento no se aprecia en los animales irradiados.

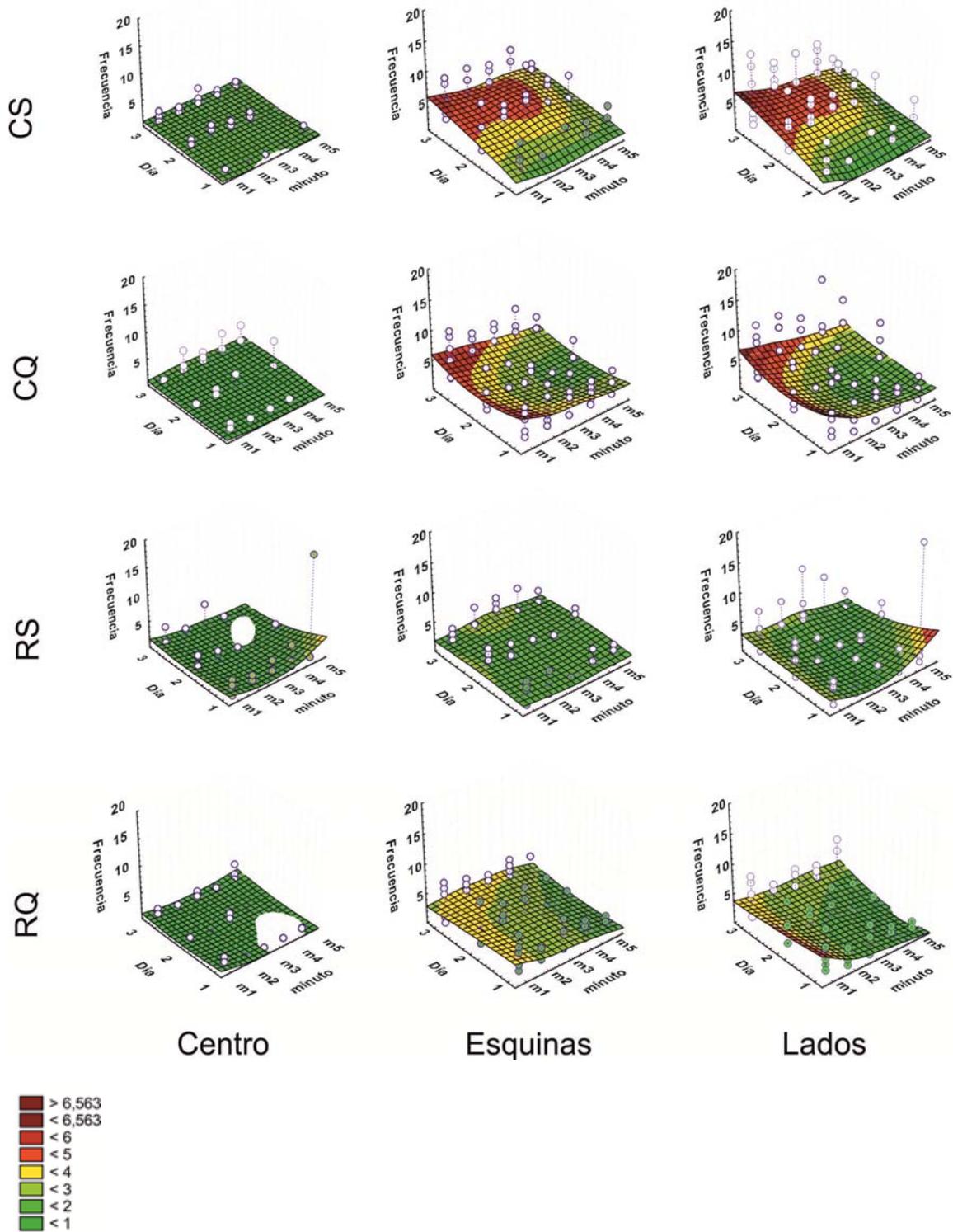


Figura 4-22. Frecuencia de acceso de los animales a esquinas, lados y centro del open field en cada minuto durante los tres días posteriores a la irradiación.

Datos individuales ajustados a superficies mediante suavizado por spline bicúbico. N=8-10.

4.5.1.1.2 Duración de la estancia

La Figura 4-23 permite apreciar la duración de la estancia de los animales en las distintas zonas del open field durante los cuatro días anteriores a la irradiación y los tres días posteriores a la misma, incluyendo además los tres días analizados a más largo plazo (14, 19 y 29 días post-irradiación). En los días previos a la irradiación de los animales, podemos observar la ausencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales en cuanto a la duración de la estancia en los lados y las esquinas (Figura 4-23). Puede observarse una disminución de la duración de la estancia en esquinas y lados en los tres días siguientes a la irradiación en ratas CS y CQ, junto con una tendencia al aumento de la estancia en el centro. Por el contrario, la duración en esquinas, lados y centro no cambia en las ratas irradiadas sin quercetina, situación que parece revertirse tras suplementación con quercetina.

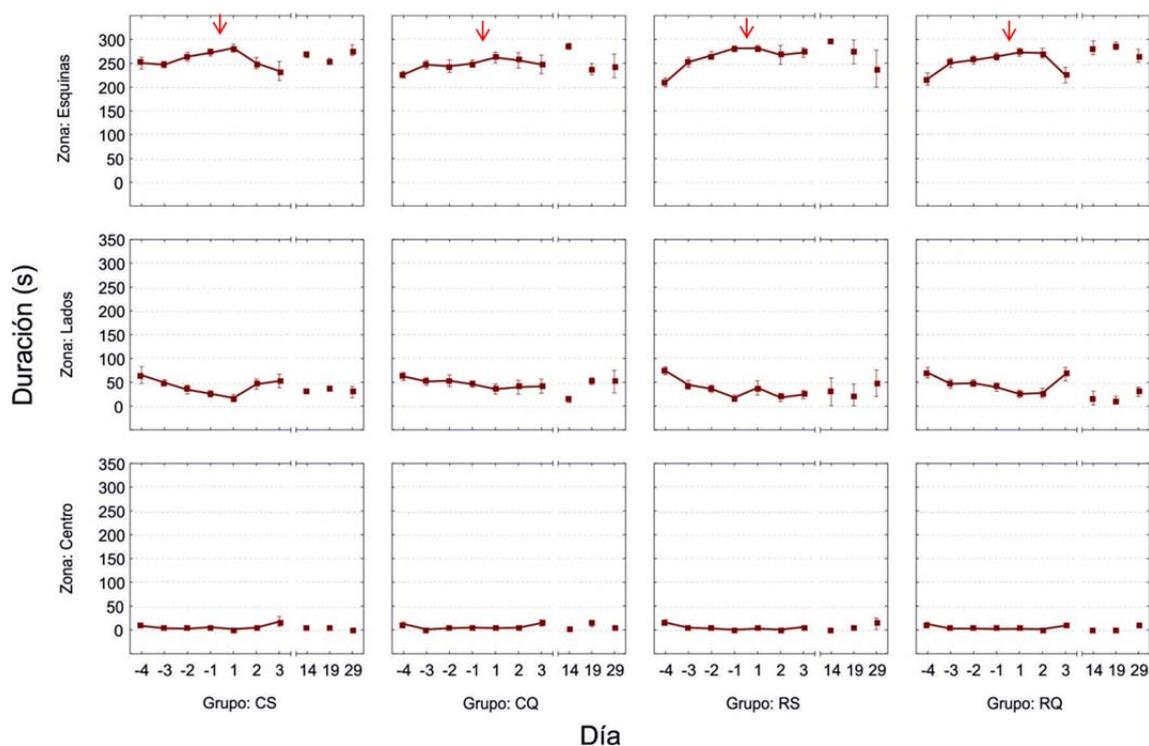


Figura 4-23. Duración total de la estancia en esquinas, lados y centro de los animales durante los días previos a la irradiación y los días posteriores a la misma.

Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

A fin de comparar la respuesta inmediata de los animales a la irradiación se efectuó un análisis de varianza de medidas repetidas con los datos comportamentales relativos a la duración de la estancia en cada zona del open field, obtenidos los días anterior y posterior a la irradiación, para cada uno de los cinco minutos que duraba la sesión en el open field. Fueron considerados factores independientes el grupo y el día y como factor de medidas repetidas el minuto en la sesión. La Figura 4-24 permite apreciar que la duración de la estancia por minuto en las esquinas disminuyó significativamente el día siguiente a la irradiación en los animales del grupo RS, tanto en relación con el grupo control CS como respecto al día previo a la irradiación en el mismo grupo experimental. Asimismo, la duración de la estancia de los animales RS en el centro del open field aumentó al día siguiente a su irradiación.

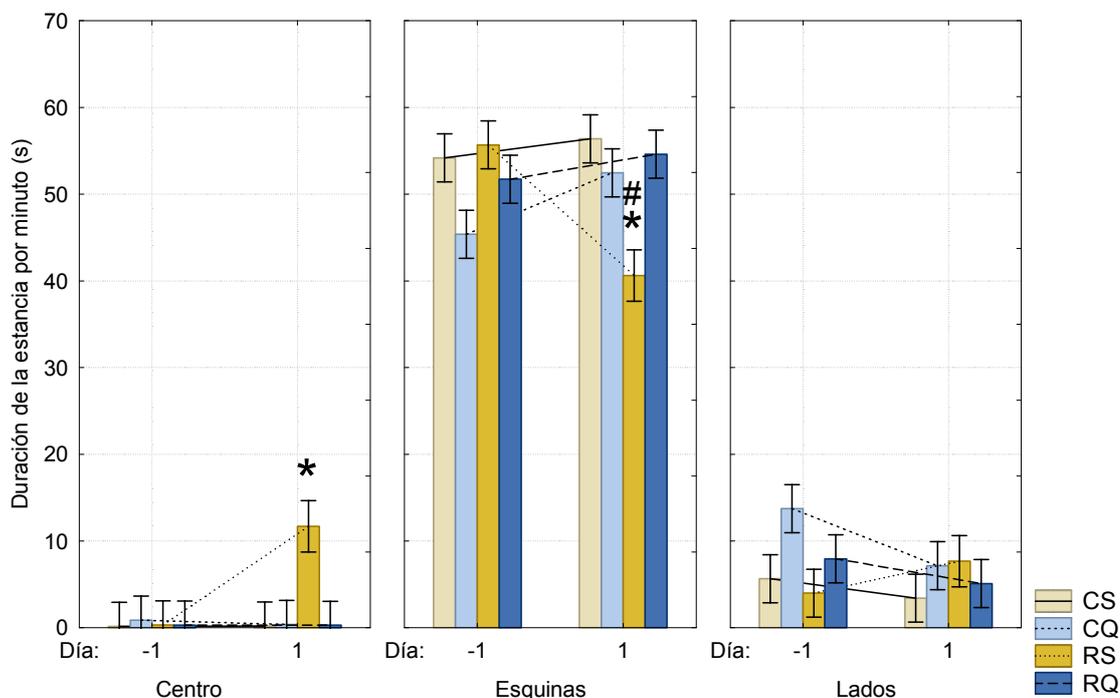


Figura 4-24. Duración media por minuto de la estancia en las zonas del open field durante los días anterior y posterior a la irradiación.

Medias \pm E.E.M. N=8-10. * $p < 0,05$ respecto a CS. # $p < 0,05$ respecto al día anterior a la irradiación

Se efectuó el análisis de la duración de la estancia en las zonas durante cada uno de los cinco minutos de duración de cada sesión en el open field, en un intento de obtener información acerca del grado de habituación de los animales al mismo una vez sufrida la irradiación experimental. La representación 3D de estos datos (Figura 4-25) no permite observar diferencias entre los distintos grupos experimentales en relación a este parámetro a lo largo de los tres días siguientes a la irradiación, a excepción del grupo RS donde se produce un aumento en la estancia en el centro del open field del minuto 1 al minuto 3, que no obstante va disminuyendo desde el día 1 al día 3 post-irradiación.

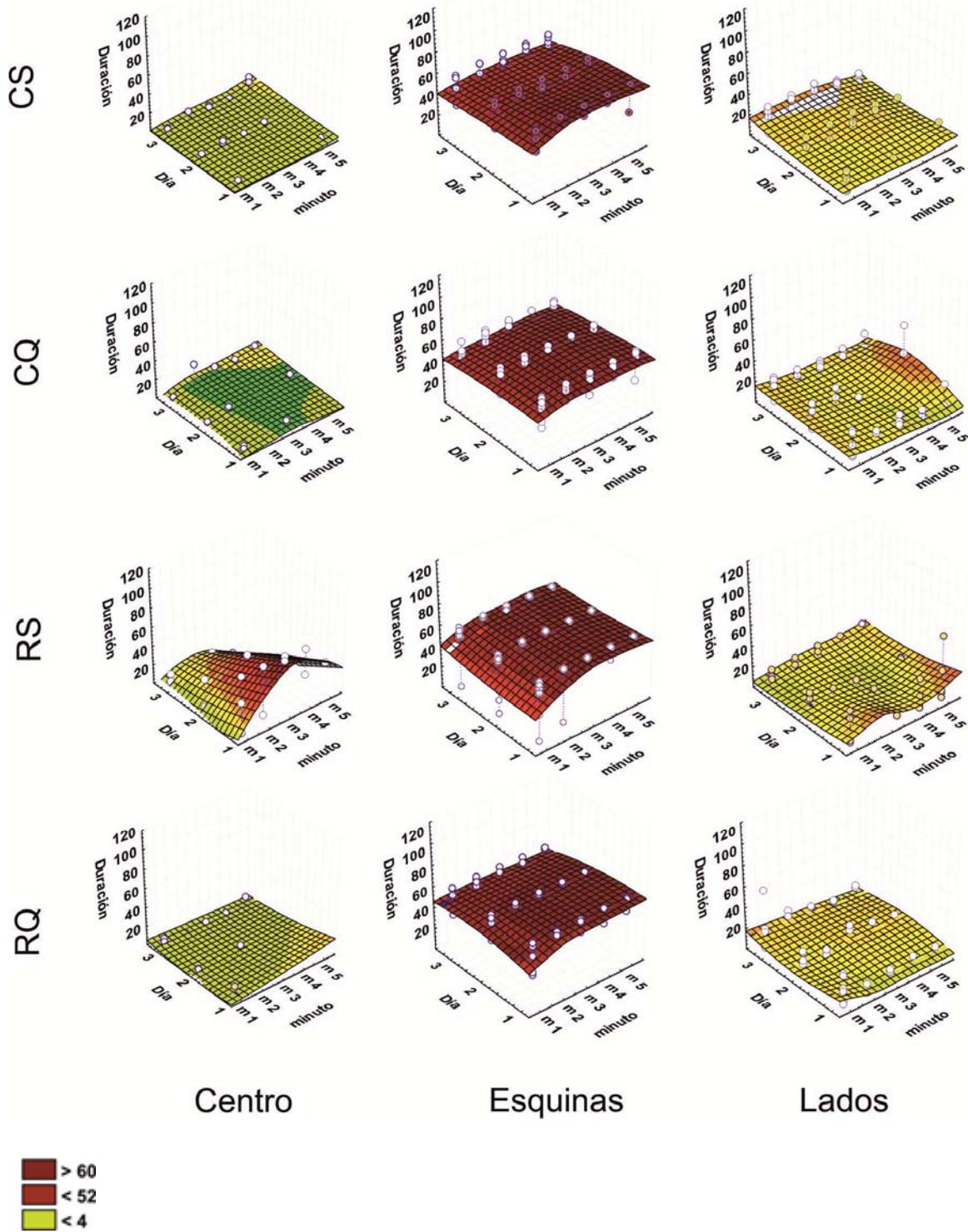


Figura 4-25. Duración de la estancia de los animales en esquinas, lados y centro del open field en cada minuto durante los tres días posteriores a la irradiación.

Datos individuales ajustados a superficies mediante suavizado por spline bicúbico. N=8-10.

4.5.1.1.3 *Distancia total recorrida*

La Figura 4-26 representa la distancia total recorrida por los animales en las distintas zonas del open field durante los cuatro días anteriores a la irradiación y los tres días posteriores a la misma, incluyendo además los tres días analizados a más largo plazo (14, 19 y 29 días post-irradiación). En general no se aprecian cambios aparentes en la distancia total recorrida por los animales, entre las zonas definidas como lados y esquinas. Los controles con o sin tratamiento presentan una tendencia a la disminución de la distancia recorrida en los lados durante los días previos a la anestesia. Tras la misma, la distancia total recorrida tiende a ir en aumento, aunque en el grupo control con quercetina esta tendencia es menos marcada.

Los animales irradiados sin tratamiento también presentan un descenso de la distancia total recorrida en los días previos a la radiación, pero tras la misma, observamos que la recuperación es menor que la de los controles. Esta situación se revierte en los animales irradiados tratados con quercetina, aunque no es significativo frente a los animales irradiados no tratados (Figura 4-26).

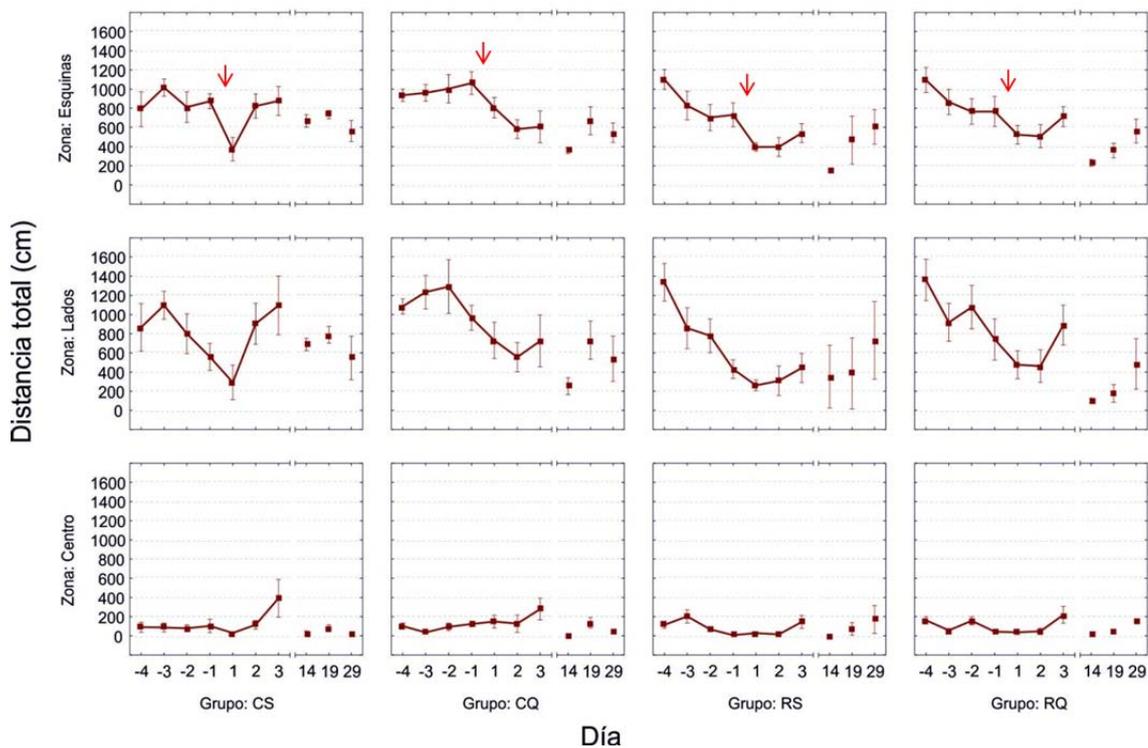


Figura 4-26. Distancia total (cm) recorrida en esquinas, lados y centro de los animales durante los días previos a la irradiación y los días posteriores a la misma.

Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

A fin de comparar la respuesta inmediata de los animales a la irradiación se efectuó un análisis de varianza de medidas repetidas con los datos comportamentales obtenidos los días anterior y posterior a la irradiación, relativos a la distancia recorrida en cada zona del open field para cada uno de los cinco minutos que duraba la sesión en el open field. Fueron considerados factores independientes el grupo y el día y como factor de medidas repetidas el minuto en la sesión. La Figura 4-27 permite apreciar que la distancia recorrida en cada minuto en las esquinas aumentó significativamente en los animales del grupo CQ respecto al CS al día siguiente a su anestesia, y de modo similar se observa en el grupo CQ un aumento en la distancia recorrida en lados tanto antes como después de la anestesia respecto al grupo CS.

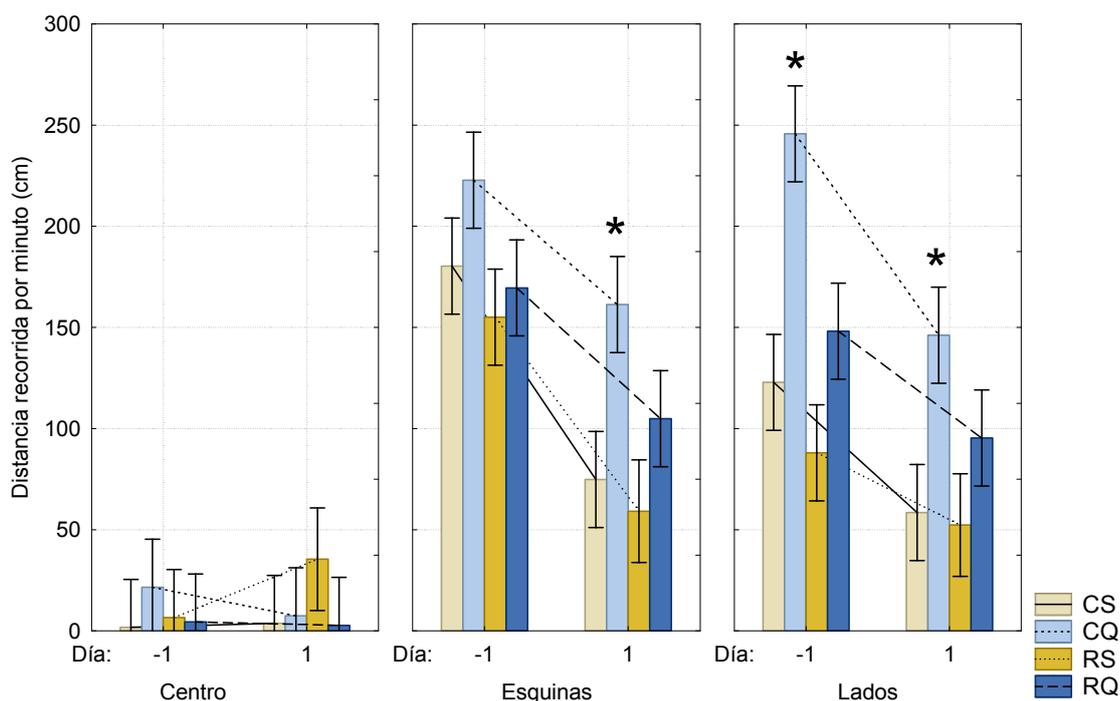


Figura 4-27. Distancia media recorrida por minuto en las zonas del open field durante los días anterior y posterior a la irradiación.

Medias \pm E.E.M. N=8-10. * $p < 0,05$ respecto a CS.

Se efectuó el análisis de la distancia recorrida en las zonas durante cada uno de los cinco minutos de duración de cada sesión en el open field, en un intento de obtener información acerca del grado de habituación de los animales al mismo una vez sufrida la irradiación experimental. La representación 3D de estos datos (Figura 4-28) no permite observar pautas diferenciales entre los distintos grupos experimentales.

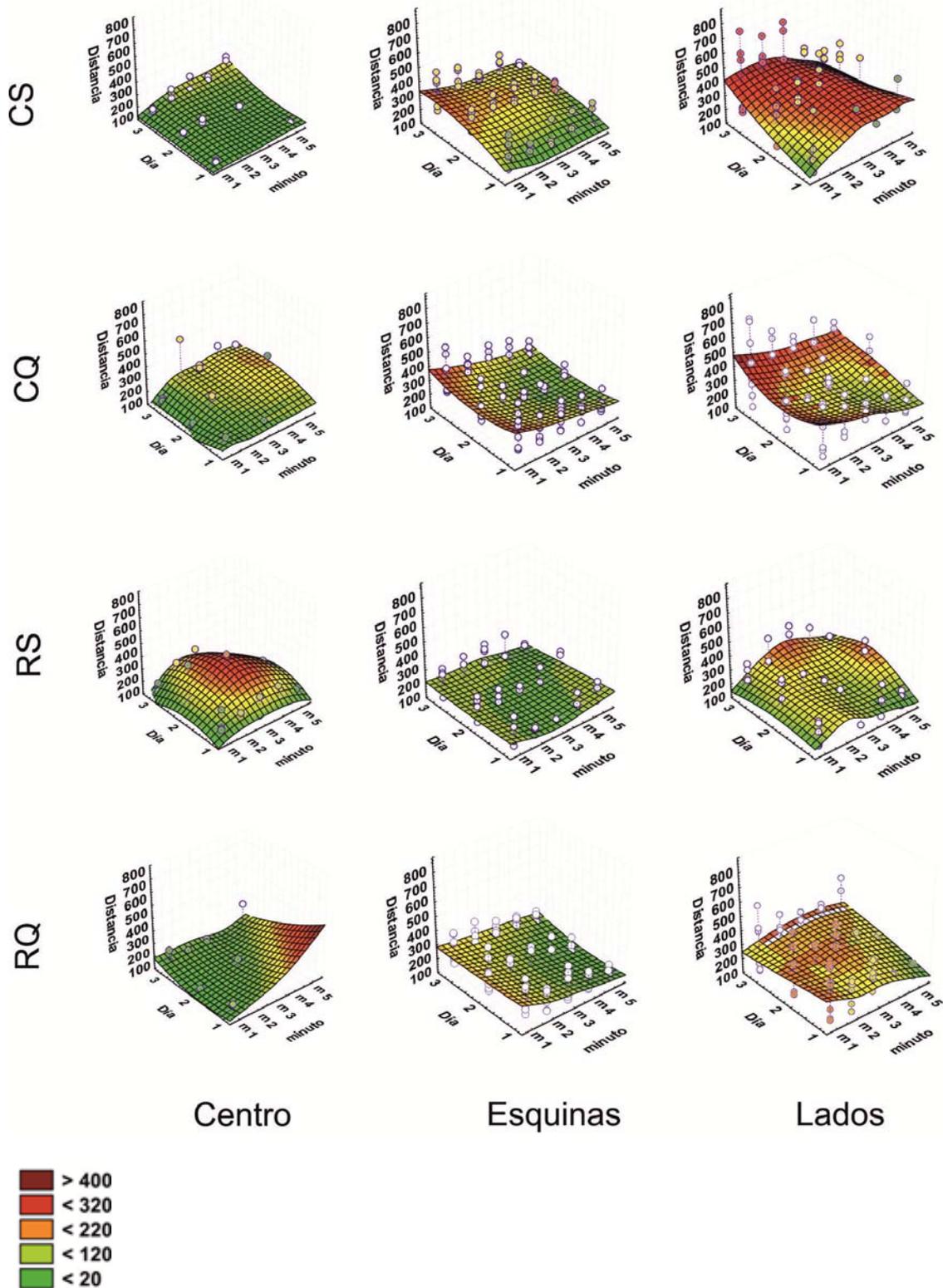


Figura 4-28. Distancia (cm) recorrida por los animales en esquinas, lados y centro del open field en cada minuto durante los tres días posteriores a la irradiación.

Datos individuales ajustados a superficies mediante suavizado por spline bicúbico. N=8-10.

4.5.1.2 Comportamiento cognitivo (prueba de Morris)

Podemos observar en la Figura 4-29 que durante los días previos a la anestesia o irradiación de los animales, todos los grupos experimentales siguen una misma tendencia hacia el descenso del tiempo de latencia hasta encontrar la plataforma de escape en el laberinto de Morris, ya que la pendiente del segmento correspondiente en el análisis de regresión lineal fragmentada no indica diferencias significativas. En el caso de los grupos control, a partir del día de la anestesia podemos observar que los animales tratados con quercetina presentan un ligero descenso de la latencia frente a los controles sin tratar. Sin embargo, en los grupos irradiados observamos un efecto adverso de la irradiación en ambos casos, aunque no estadísticamente significativo (Tabla 4-3), con una pendiente más baja, en los días posteriores a la irradiación. Los animales irradiados tratados con quercetina presentan una ligera tendencia a una recuperación más temprana en relación con el grupo irradiado sin tratamiento (Figura 4-29).

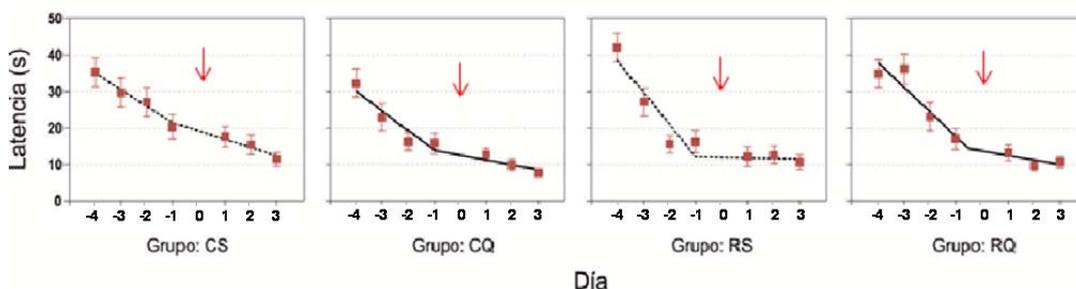


Figura 4-29. Tiempo de latencia (s) invertido en encontrar la plataforma de escape en el test de Morris durante los 4 días previos a la irradiación y los 3 días posteriores a la misma.

Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

Regresión lineal segmentada	CS	CQ	RS	RQ
<i>Valores del mejor ajuste \pm E.E.M.</i>				
Intercepto1	39,7 \pm 1,8	35,6 \pm 4,0	47,3 \pm 6,8	44,5 \pm 4,4
Pendiente1	-4,55 \pm 0,81	-5,40 \pm 1,78	-8,77 \pm 3,03	-6,66 \pm 1,62
t0	~ 4,000	~ 4,000	~ 4,000	4,5 \pm 1,4
Pendiente2	-2,25 \pm 0,69	-1,34 \pm 1,52	-0,17 \pm 2,58	-1,24 \pm 2,56
<i>Intervalos de confianza al 95%</i>				
Intercepto1	33,8 a 45,5	22,8 a 48,3	25,6 a 69,0	30,3 a 58,6
Pendiente1	-7,14 a -1,97	-11,06 a 0,26	-18,40 a 0,85	-11,81 a -1,50
t0				4,0 a 9,0
Pendiente2	-4,45 a -0,04	-6,17 a 3,50	-8,38 a 8,04	-9,40 a 6,91
<i>Bondad de ajuste</i>				
Grados de libertad	3	3	3	3
R ²	0,9889	0,9454	0,9133	0,9463
Suma de cuadrados	4,811	23,15	66,90	39,39
Sy.x	1,266	2,778	4,722	3,623
<i>Restricciones</i>				
t0	t0 > 4,00	t0 > 4,00	t0 > 4,00	t0 > 4,00

Tabla 4-3. Parámetros de regresión lineal segmentada (ver 3.7.3.2, pág.113) obtenidos para el ajuste de los tiempos de latencia hasta alcanzar la plataforma de escape durante los cuatro días previos a la irradiación y los tres días posteriores a la misma representados en la Figura 4-29.

4.5.2 Experimento 2. Efectos comportamentales post-irradiación

En el experimento 2 se analizó el efecto de la radiación sobre el inicio del comportamiento exploratorio y cognitivo. Se registraron parámetros comportamentales en ratas al día siguiente de sufrir la irradiación experimental.

4.5.2.1 Comportamiento exploratorio (prueba de open field)

Los resultados obtenidos sobre la frecuencia de acceso a cada zona son diferentes en los distintos grupos considerando la anestesia y la radiación recibidas. Los animales control recién anestesiados presentan bajas frecuencias de acceso a lados y esquinas, que aumentan conforme pasan los días. Sin embargo, en los animales control analizados transcurridos 25 días, se aprecia una tendencia a la disminución de la frecuencia de acceso a lados y esquinas. Los animales control tratados con quercetina presentan una mayor frecuencia de acceso a esquinas y lados tras la anestesia, sin que ésta tienda a

aumentar como en los animales del grupo CS. Es de destacar el aumento de la frecuencia de acceso al centro en el grupo CQ a lo largo de los cinco días siguientes a la anestesia. En los animales CQ analizados a los 25 días se observa una tendencia a la disminución de la frecuencia de acceso a lados y esquinas de modo similar a los animales del grupo CS.

En el estudio de los datos obtenidos a partir del día siguiente a la irradiación, se observa que los animales irradiados presentan una menor frecuencia de acceso a las zonas experimentales respecto a los controles, situación que se revierte con el paso del tiempo llegando a valores similares a los de los grupos control. Sin embargo, a los 25 días tras la irradiación las frecuencias de acceso a esquinas y lados son superiores a las encontradas inmediatamente después de la radiación. No observamos diferencias destacables en los animales irradiados tratados con quercetina (Figura 4-30).

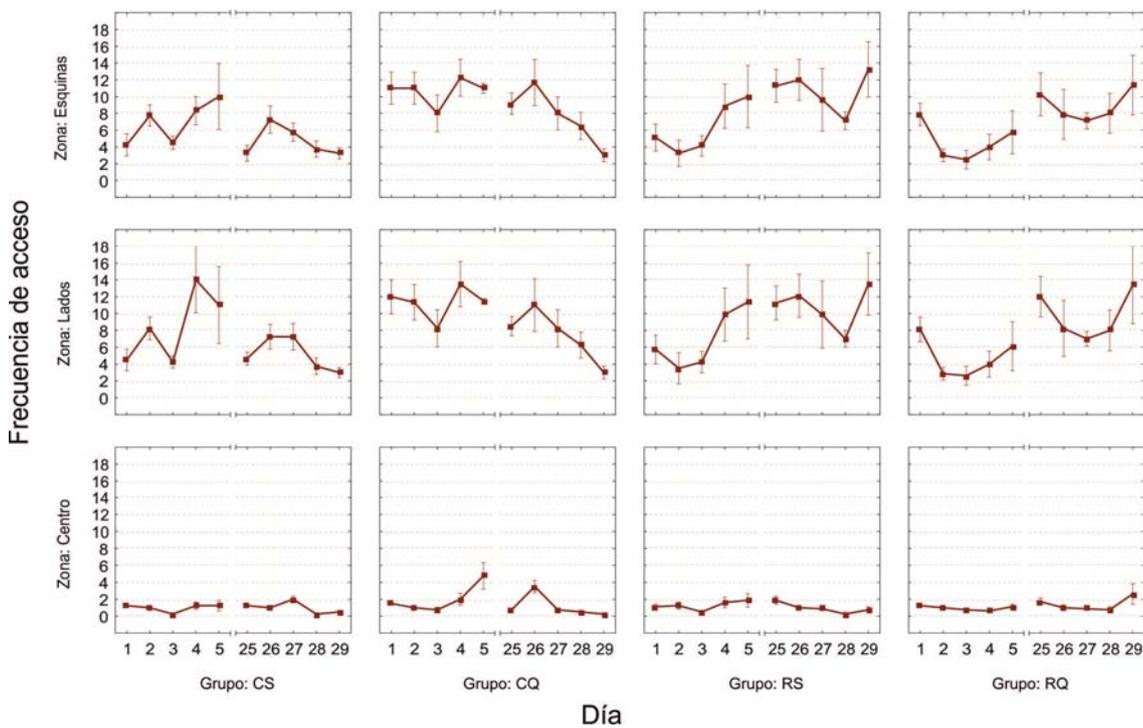


Figura 4-30. Frecuencia de acceso en esquinas, lados y centro de los animales durante los días posteriores a la irradiación. Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

Se observa en la Figura 4-31 que en el estudio a corto plazo, en general, no observamos diferencias notables entre los grupos experimentales en cuanto a la duración total de los animales en cada zona experimental. En cuanto al tiempo de permanencia en las esquinas, el grupo control manifiesta un ligero descenso tras la administración de la anestesia, situación que no se observa en los controles tratados y por lo tanto podríamos relacionarlo con un posible efecto beneficioso de la quercetina. En el caso de los animales irradiados ya sean tratados o no con quercetina, tampoco observamos grandes diferencias respecto a los controles. Sin embargo, cuando el estudio fue realizado a partir de los 25 días tras la irradiación, observamos que la duración en los lados de los animales irradiados tiende a disminuir mientras que aumenta en las esquinas, lo que podría explicarse por una habituación debida al paso del tiempo. El tratamiento de estos animales con quercetina no modifica esta situación.

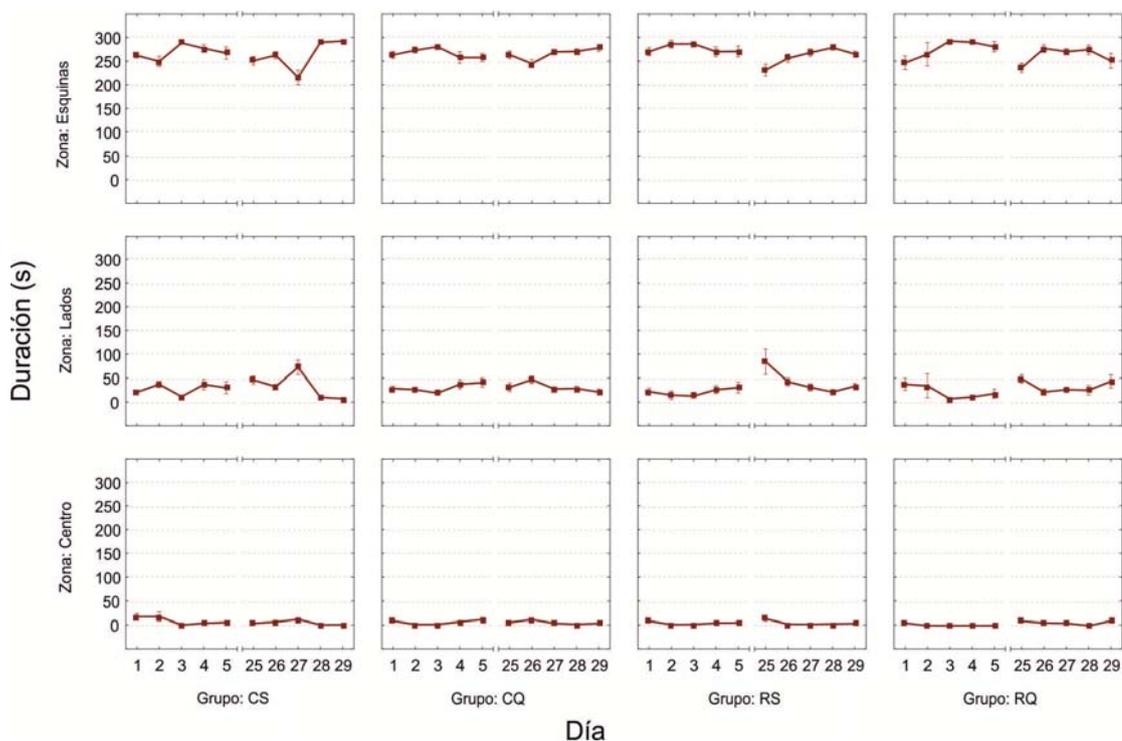


Figura 4-31. Duración total de la estancia en esquinas, lados y centro de los animales durante los días posteriores a la irradiación. Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

Respecto a la distancia total recorrida en las diferentes zonas del *open field*, observamos resultados similares a los obtenidos para la frecuencia de acceso (Figura 4-30). Los animales control recién anestesiados recorren una menor distancia en lados y esquinas, que aumenta conforme pasan los días. Sin embargo, en los animales control analizados transcurridos 25 días, se aprecia una tendencia a la disminución de distancia recorrida en lados y esquinas. Los animales control tratados con quercetina presentan una mayor distancia recorrida en lados y esquinas tras la anestesia, sin que ésta tienda a aumentar como en los animales del grupo CS. Asimismo, la distancia recorrida en el centro por los animales del grupo CQ aumenta a lo largo de los cinco días siguientes a la anestesia. En los animales CQ analizados a los 25 días se observa una tendencia a la disminución de la distancia en lados y esquinas de modo similar a los animales del grupo CS.

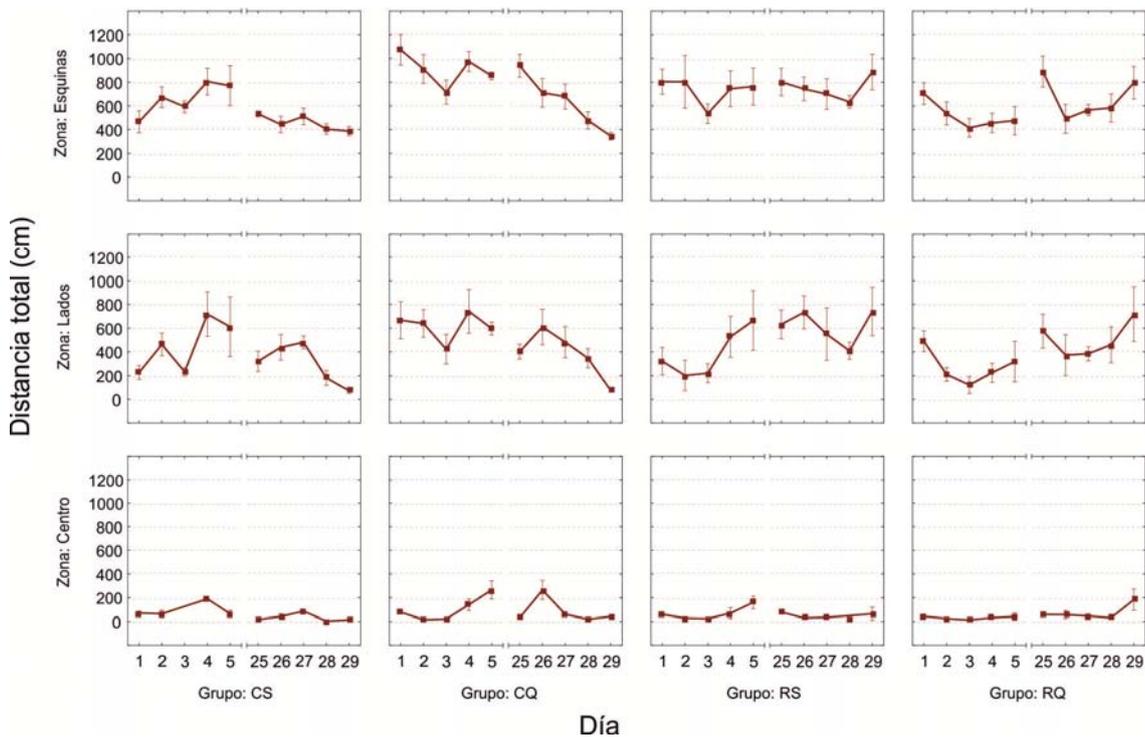


Figura 4-32. Distancia total recorrida en esquinas, lados y centro de los animales durante los días posteriores a la irradiación. Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

4.5.2.2 Comportamiento cognitivo (prueba de Morris)

4.5.2.2.1 Observaciones a los 7 días

La Figura 4-33 presenta la evolución del aprendizaje en la prueba de Morris para los animales de los distintos grupos experimentales durante los seis días siguientes a su anestesia y/o irradiación, junto con la curva de ajuste a una ecuación de disminución exponencial (ver 3.7.3.2, pág.113). Los parámetros estadísticos del ajuste aparecen en la Tabla 4-4. Tras la administración de rayos X podemos observar un aumento de la latencia en los animales irradiados (RS y RQ) respecto a los grupos controles, es decir que tardaban más en encontrar la plataforma de escape. Conforme transcurren los días, la latencia disminuye en todos los casos debido al aprendizaje de los animales. Esta situación también está presente en el grupo RS pero es no tan clara como en el grupo RQ, en cual se observa que los animales tratados con quercetina presentan una velocidad de aprendizaje más rápida que los RS llegando a alcanzar valores de latencia similares a los de los controles (Figura 4-33).

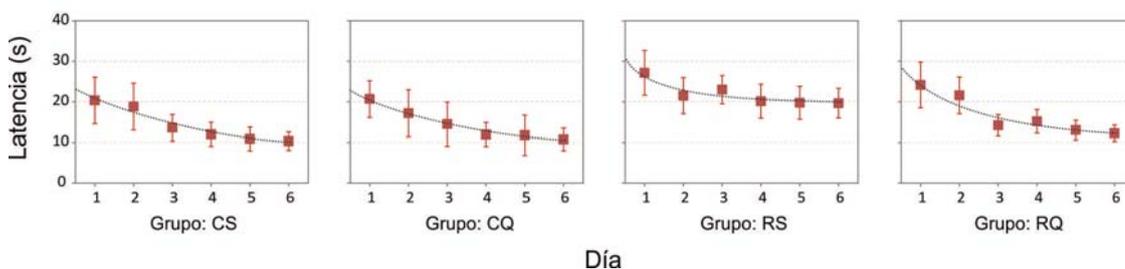


Figura 4-33. Tiempo de latencia (s) invertido en encontrar la plataforma de escape en el test de Morris durante los días inmediatamente posteriores a la irradiación.

Valores medios \pm E.E.M. Ajuste no lineal a una curva de disminución exponencial. N=8-10.

4.5.2.2.2 Observaciones a los 30 días

En el caso del estudio a largo plazo, las diferencias en el tiempo de latencia entre los grupos experimentales no son tan claras. Sí es posible observar un claro descenso de ésta a lo largo de los días indicativo, como en el caso anterior, del aprendizaje de los animales. Sin embargo no se aprecian

diferencias entre los grupos irradiados respecto a los controles, ni entre los irradiados sometidos o no al tratamiento con quercetina (Figura 4-34).

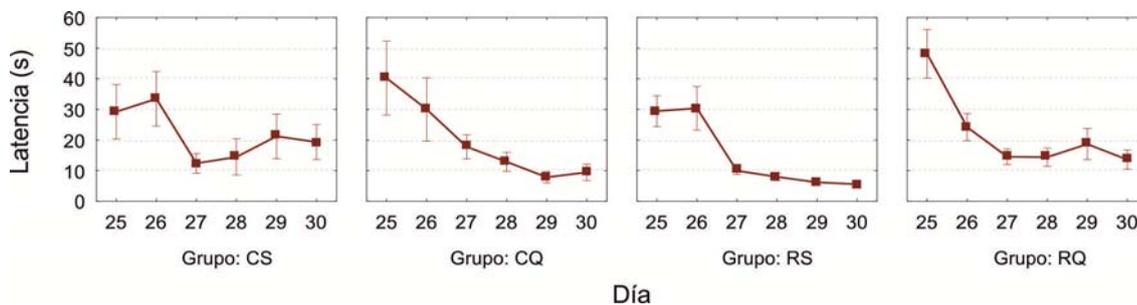


Figura 4-34. Tiempo de latencia (s) invertido en encontrar la plataforma de escape en el test de Morris a partir del día 25 post- irradiación.
Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

Disminución exponencial	CS	CQ	RS	RQ
<i>Valores del mejor ajuste \pm E.E.M.</i>				
t0	45,2 \pm 11,1	49,3 \pm 12,8	43,7 \pm 25,3	43,7 \pm 13,9
Plateau	9,01 \pm 6,20	9,01 \pm 5,83	15,37 \pm 2,98	9,82 \pm 3,26
K	0,47 \pm 0,31	0,48 \pm 0,29	0,87 \pm 0,86	0,64 \pm 0,38
Half Life	1,484	1,444	0,7967	1,081
Tau	2,141	2,083	1,149	1,560
Span	36,21 \pm 7,94	40,26 \pm 9,70	28,33 \pm 23,62	33,84 \pm 11,93
<i>Intervalos de confianza al 95%</i>				
t0	23,51 a 66,95	24,12 a 74,42	-5,96 a 93,34	16,50 a 70,82
Plateau	-3,13 a 21,16	-2,42 a 20,44	9,53 a 21,20	3,43 a 16,21
K	0,0 a 1,08	0,0 a 1,04	0,0 a 2,56	0,0 a 1,38
Span	20,66 a 51,77	21,25 a 59,27	-17,96 a 74,62	10,45 a 57,23
<i>Bondad de ajuste</i>				
Grados de libertad	142	131	169	180
R ²	0,1690	0,1791	0,04705	0,1201
Suma de cuadrados	38705	30914	62572	44548
Sy.x	16,51	15,36	19,24	15,73

Tabla 4-4. Parámetros de regresión no lineal a una curva de disminución exponencial (ver 3.7.3.2, pág.113) obtenidos para el ajuste de los tiempos de latencia hasta alcanzar la plataforma de escape durante seis días posteriores a la irradiación representados en la Figura 4-33.

4.5.3 Experimento 3. Efectos sobre la ingestión de agua y alimento

Respecto al seguimiento del comportamiento ingestivo de los animales, podemos observar un descenso significativo en la cantidad de alimento ingerido durante los días 1, 3, 4 y 5 siguientes a la irradiación y que se revierte con el paso del tiempo en ambos grupos (RS y RQ), sin diferencias en los animales tratados con quercetina. Esta situación es significativamente diferente considerando los dos grupos control, los cuales presentan una ingestión de alimento con una tendencia más constante a lo largo de los días (Figura 4-35).

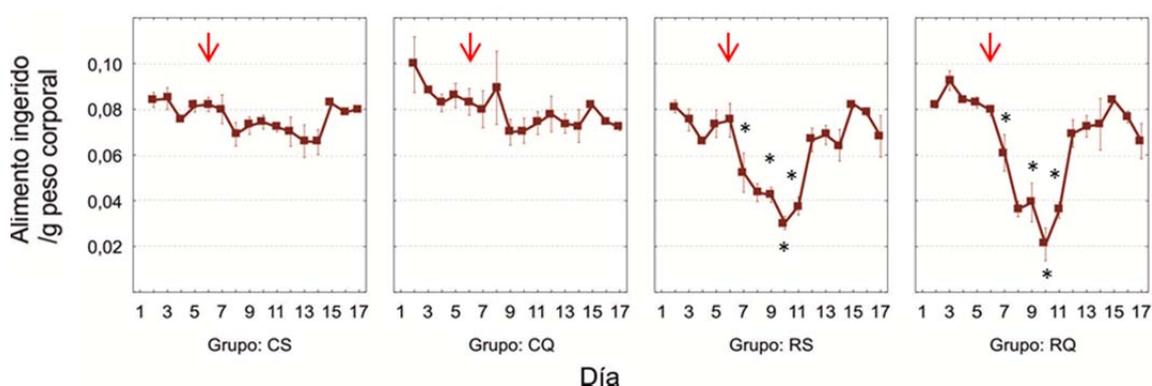


Figura 4-35. Ingestión diaria de alimento durante los días previos y posteriores a la irradiación. Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

En el caso del agua ingerida, la situación es la inversa, es decir, los grupos irradiados presentan un aumento de ingestión de agua respecto a los grupos control durante los días consecutivos a la irradiación, de forma significativa en el día 2 post-irradiación, para disminuir hasta valores iniciales transcurridos cinco días. En este caso, tampoco observamos diferencias significativas entre los grupos irradiados tratados o no con quercetina, pero sí una tendencia a un descenso en los controles, que podría deberse a la anestesia a la que fueron sometidos (Figura 4-36).

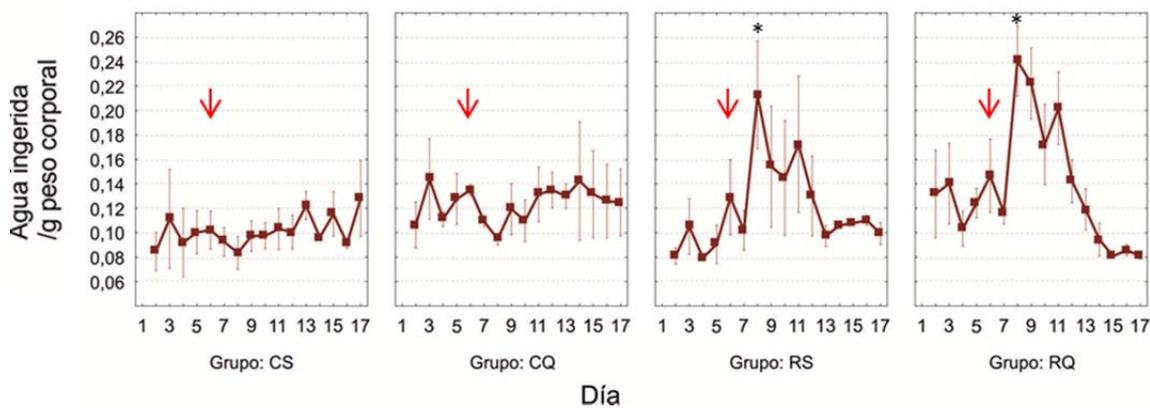


Figura 4-36. Ingestión diaria de agua durante los días previos y posteriores a la irradiación.
Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

La excreción de heces está correlacionada con la cantidad de alimento ingerido. Por lo tanto, también observamos un claro descenso durante los días sucesivos a la administración de la correspondiente radiación y que se revierte con el paso del tiempo en ambos grupos (RS y RQ), sin diferencias en los animales tratados con quercetina. Esta situación es significativamente diferente respecto a los dos grupos control (Figura 4-37).

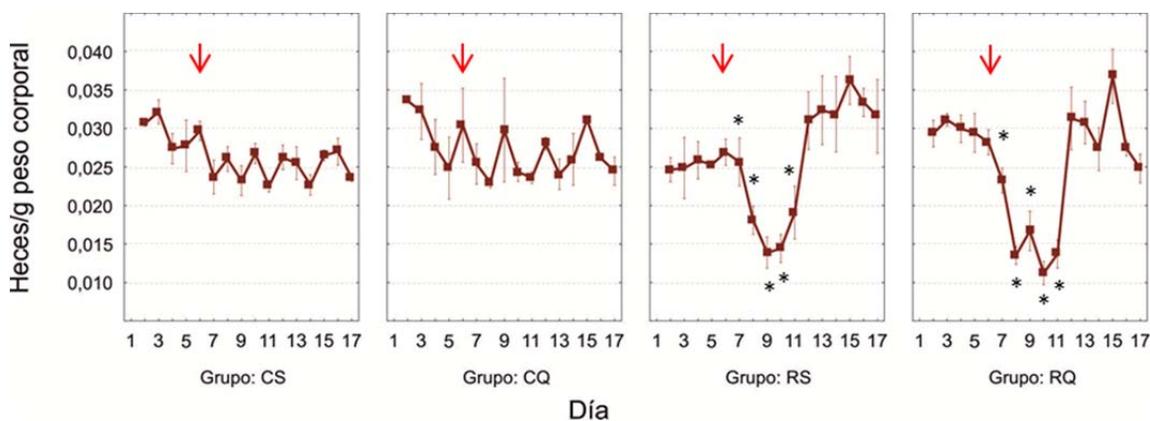


Figura 4-37. Excreción de heces durante los días previos y posteriores a la irradiación.
Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

Los valores de excreción de orina están correlacionados en este caso con el agua ingerida. Observamos un aumento respecto a los grupos control en los días consecutivos a la irradiación, de forma significativa el día 2 post-

irradiación, que se revierte con el paso del tiempo en ambos grupos, sin diferencias en los animales tratados con quercetina (Figura 4-38).

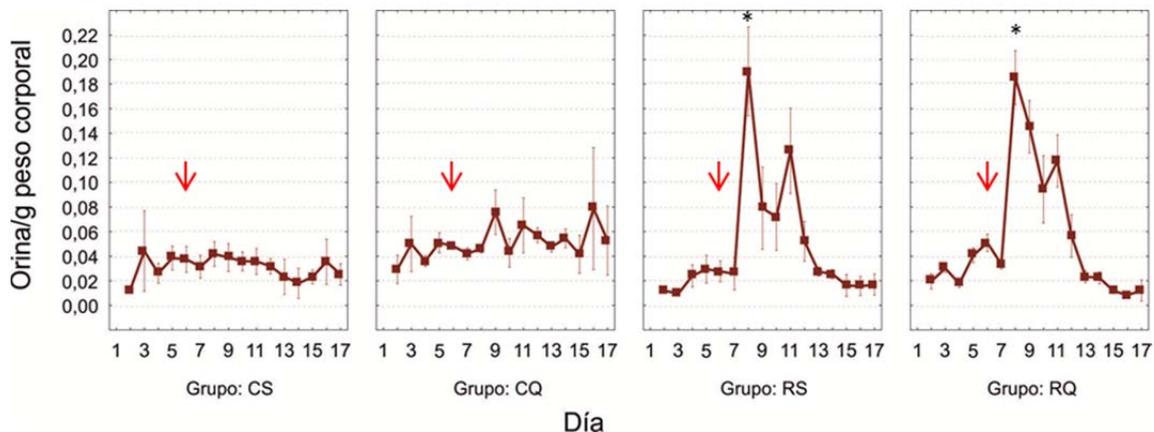


Figura 4-38. Excreción de orina durante los días previos y posteriores a la irradiación. Valores medios \pm E.E.M. N=8-10.

4.6 Efectos de la radiación y la quercetina sobre el estrés oxidativo

4.6.1 Peroxidación lipídica

Como ya comentamos anteriormente, el análisis de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un procedimiento para la determinación del grado de peroxidación lipídica como indicador de la presencia de estrés oxidativo.

En nuestro estudio tanto a 7 como a 30 días post-irradiación, podemos observar un aumento significativo del estrés oxidativo en los grupos radiados respecto a los controles. En el caso de los animales irradiados y tratados con quercetina, estos valores se revierten aunque no llegan a los valores obtenidos en los animales controles (Figura 4-39).

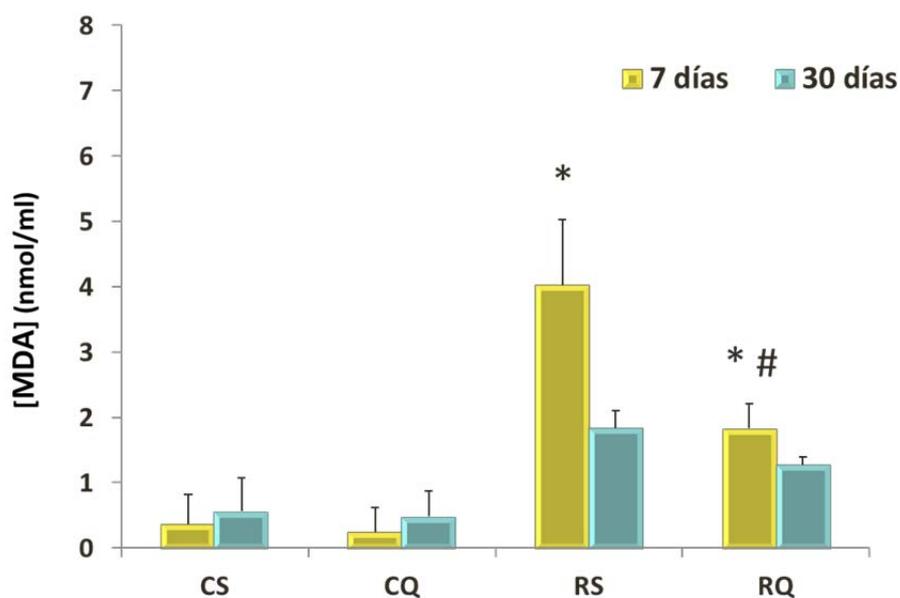


Figura 4-39. Concentración hepática citosólica de TBARS, expresada como equivalentes de malondialdehído (MDA), en los diferentes grupos experimentales.

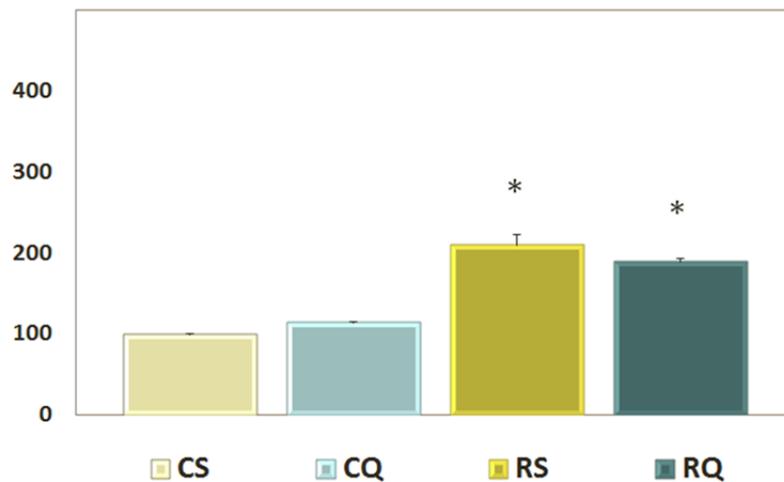
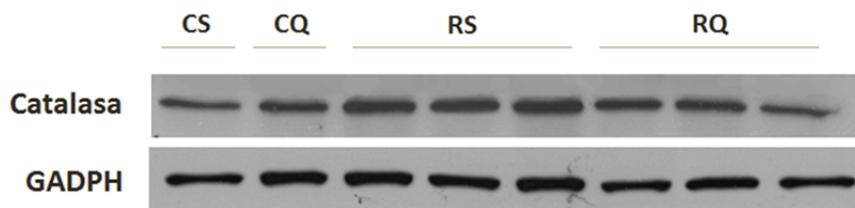
Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 ratas. * $p > 0,05$ respecto a CS. # $p < 0,05$ respecto a RS.

4.6.2 Expresión de catalasa

La catalasa es una de las enzimas más eficientes que está presente en el citosol de las células, encargada de la detoxificación del H_2O_2 y lo convierte en oxígeno molecular y agua antes de que pueda salir de la célula, aportando así una tolerancia al estrés oxidativo.

En el estudio de los efectos a 7 días post-irradiación se produce un aumento significativo de la expresión de la enzima del 53 % en el grupo radiado sin tratar y del 47% en el tratado con quercetina, pero sin diferencias significativas entre ambos. Por el contrario, en el estudio a los 30 días no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales. Por lo tanto, no observamos efectos beneficiosos de la quercetina (Figura 4-40).

a) 7 días:



b) 30 días:

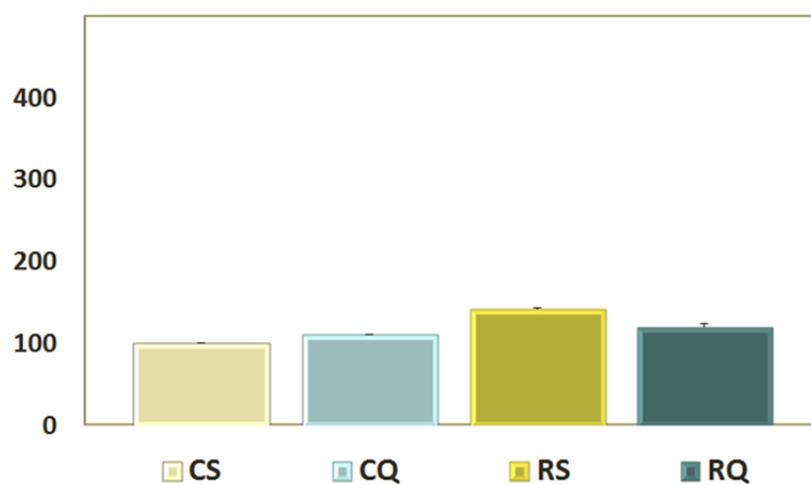
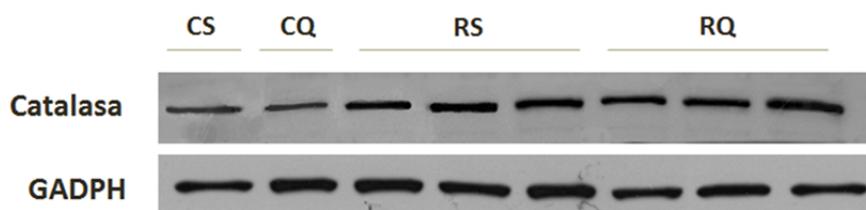


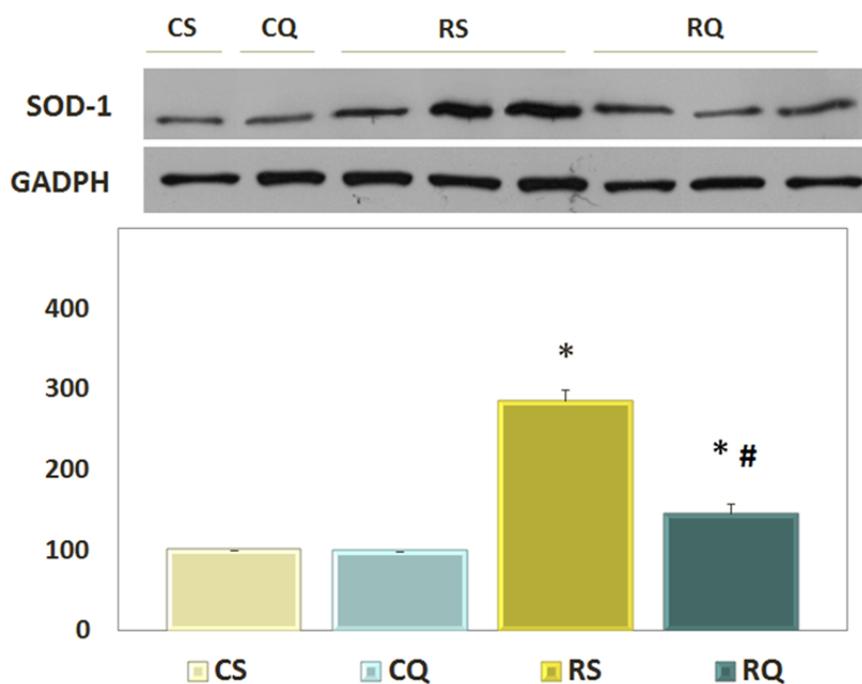
Figura 4-40. Expresión de la proteína catalasa en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.

El panel superior muestra Western Blot representativo de 1-3 animales por cada grupo experimental. El panel inferior muestra los cambios porcentuales de los distintos grupos de animales. Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 animales. * $p < 0,05$ respecto a CS.

4.6.3 Expresión de SOD-Cu/Zn

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es la encargada de catalizar la reacción de reducción de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) generando peróxido de hidrógeno, el cual puede ser transformado a su vez por las actividades catalasa o glutatión peroxidasa. Sobre esta enzima, tanto los efectos de la radiación como de la quercetina son similares tanto en el estudio a 7 como a 30 días post-irradiación. Observamos un aumento significativo de la expresión de la SOD-Cu/Zn en todos los grupos de animales irradiados (RS y RQ) respecto a los grupos control. Sin embargo, cuando los animales radiados son tratados con quercetina los valores de expresión de la enzima disminuyen hasta valores más próximos a los grupos control (Figura 4-41).

a) 7 días:



b) 30 días:

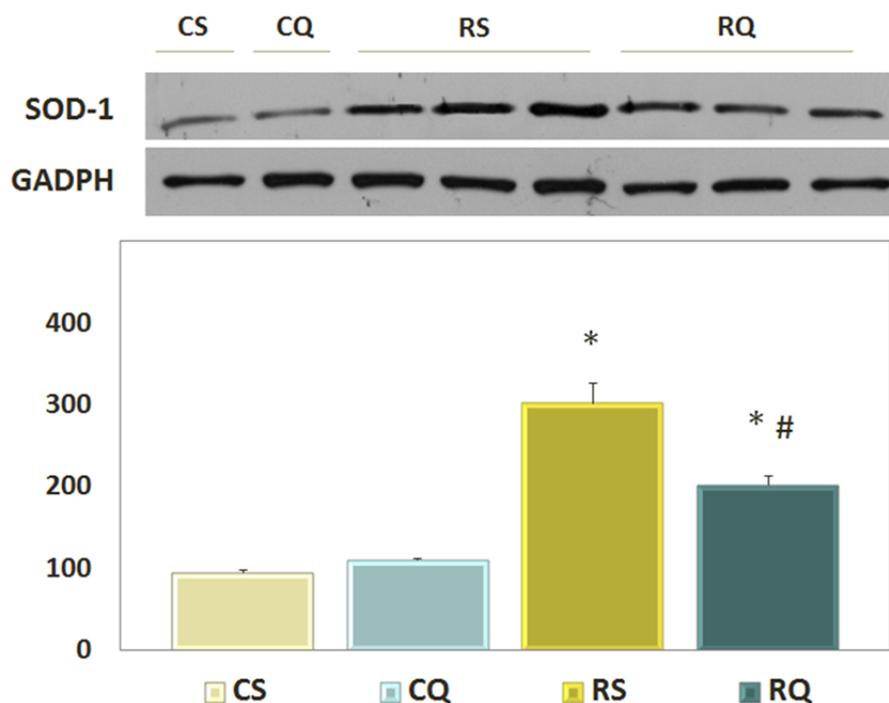


Figura 4-41. Expresión de la proteína SOD citosólica en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.

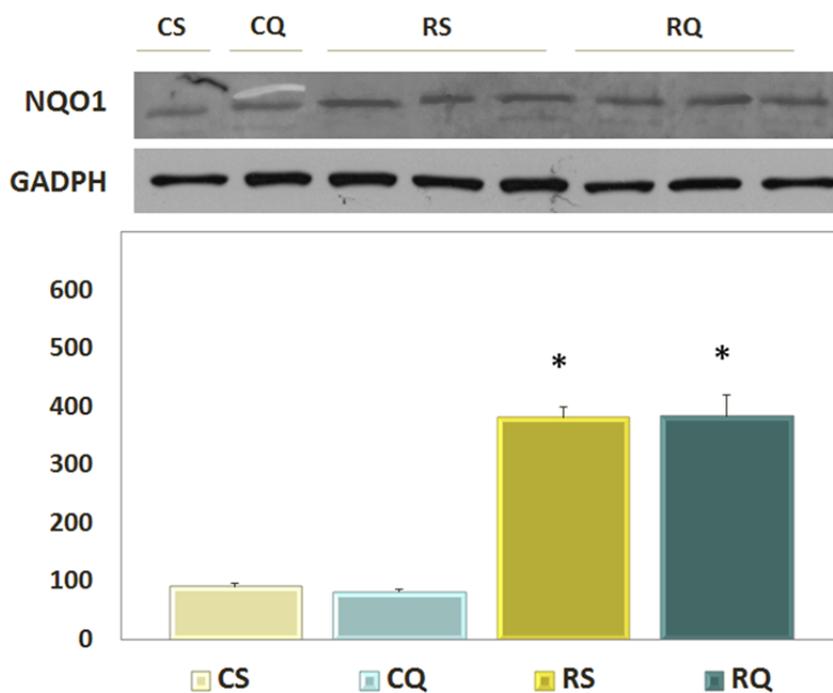
El panel superior muestra Western Blot representativo de 1-3 animales por cada grupo experimental. El panel inferior muestra los cambios porcentuales de los distintos grupos de animales. Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 animales. * $p < 0,05$ respecto a CS. # $p < 0,05$ respecto a RS.

4.6.4 Expresión de NQO1

La NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1) es una flavoenzima capaz de reducir quinonas a hidroquinonas a través de un mecanismo de 2 electrones, utiliza indistintamente NADPH o NADH como dador de electrones, acción esencial para su papel como antioxidante y en la citoprotección frente a sustancias tóxicas.

En ambos estudios, tanto a 7 como a 30 días post-irradiación, observamos un aumento significativo en la expresión de NQO1 en los grupos de animales irradiados respecto a los controles, lo que supone que esta enzima está actuando ante una situación de estrés oxidativo. Esta tendencia se manifiesta de manera más clara en los animales en estudio a los 7 días donde el aumento se corresponde a un 58% en el grupo sin tratar y un 45% en el tratado con quercetina respecto al grupo control, sin diferencias significativas entre ambos (Figura 4-42).

a) 7 días:



b) 30 días:

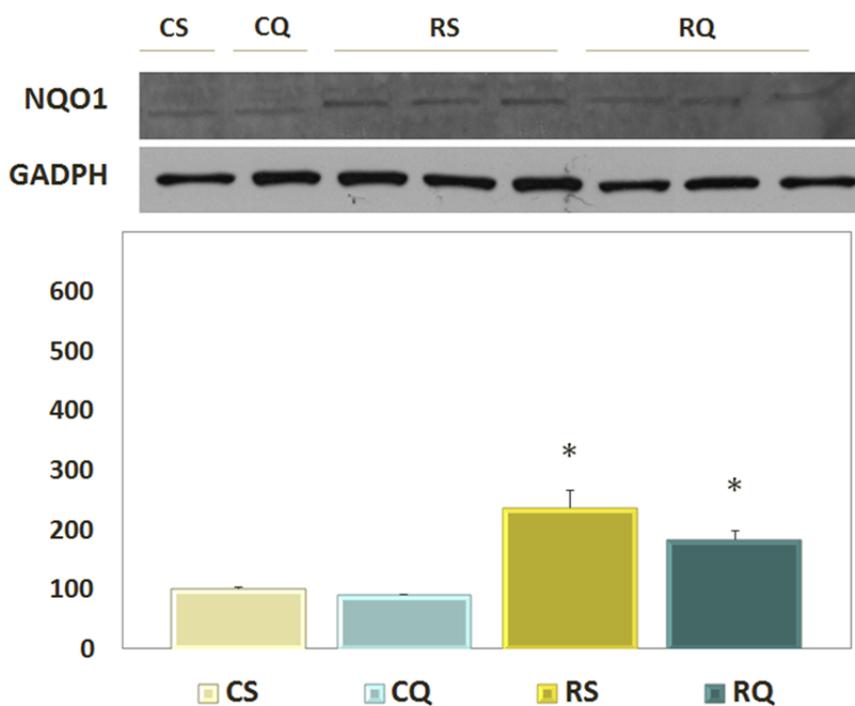


Figura 4-42. Expresión de la proteína NQO1 en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.

El panel superior muestra Western Blot representativo de 1-3 animales por cada grupo experimental. El panel inferior muestra los cambios porcentuales de los distintos grupos de animales. Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 animales. * $p > 0,05$ respecto a CS

4.6.5 Expresión del factor de transcripción Nrf2

Las células responden al estrés oxidativo mediante la inducción de enzimas antioxidantes, muchas de estas enzimas son controladas por el elemento de la respuesta antioxidante (ARE), secuencia presente en la región promotora de numerosos genes que codifican para enzimas antioxidantes y detoxificadoras. El principal regulador de la respuesta antioxidante es el factor de transcripción Nrf2. El Nrf2 se encuentra en el citosol asociado a la proteína Keap1 en condiciones fisiológicas. El estrés oxidativo y la exposición a agentes químicos exógenos, hace que Nrf2 se disocie de Keap1 se trasloque al núcleo y se una al ARE presente en el promotor. De esta forma se produce la activación de la expresión génica de enzimas antioxidantes.

En la Figura 4-43 podemos ver un aumento significativo en la expresión nuclear del factor Nrf2 en el grupo de animales irradiados tanto en el estudio realizado a 7 como a 30 días post-irradiación. Este aumento es mayor en el estudio realizado a los 7 días y se corresponde con un 70% de aumento en los animales irradiados sin tratar respecto a los controles, frente a un 59% en los animales irradiados y tratados con quercetina. El incremento en la expresión de Nrf2 es menor en los animales irradiados a los 30 días post-irradiación.

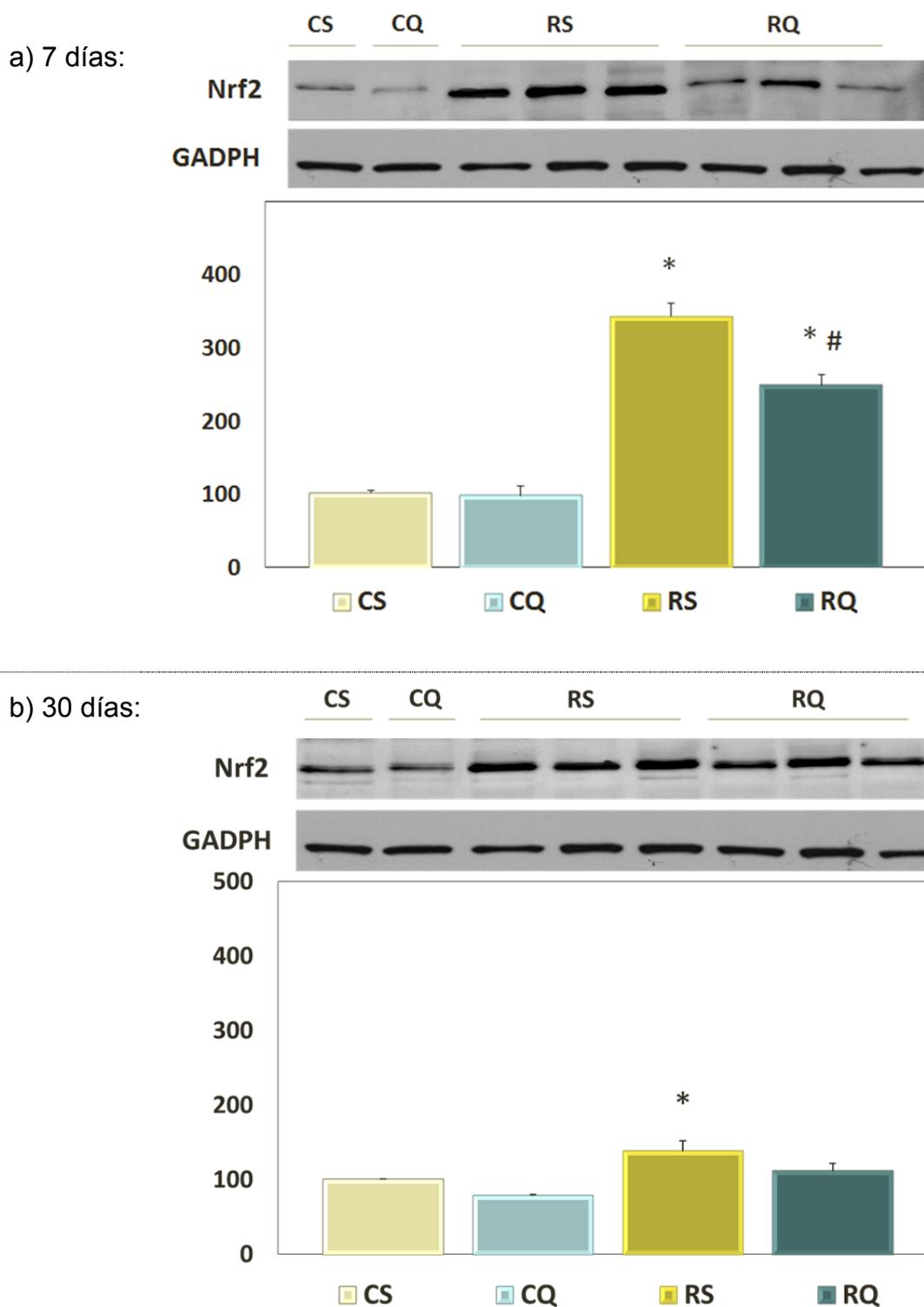


Figura 4-43. Expresión nuclear de Nrf2 en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.

El panel superior muestra Western Blot representativo de 1-3 animales por cada grupo experimental. El panel inferior muestra los cambios porcentuales de los distintos grupos. Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 animales. * $p < 0,05$ respecto a CS. # $p < 0,05$ respecto a RS.

4.6.6 Expresión de la proteína Keap1

La función de Keap1 es mantener a Nrf2 anclado en el citosol mientras las condiciones en la célula sean normales. Sin embargo bajo condiciones de estrés, Keap1 se liberará de Nrf2 y se mantendrá en el citoplasma hasta su degradación.

En la Figura 4-44 observamos un aumento significativo en la expresión hepática de Keap1 en los grupos de animales irradiados respecto a los controles tanto a 7 como a 30 días post-irradiación. Cuando estos animales son sometidos al tratamiento con quercetina los valores de expresión de Keap1 aumentan pero en menor medida estando más próximos a los valores que presentan los animales control.

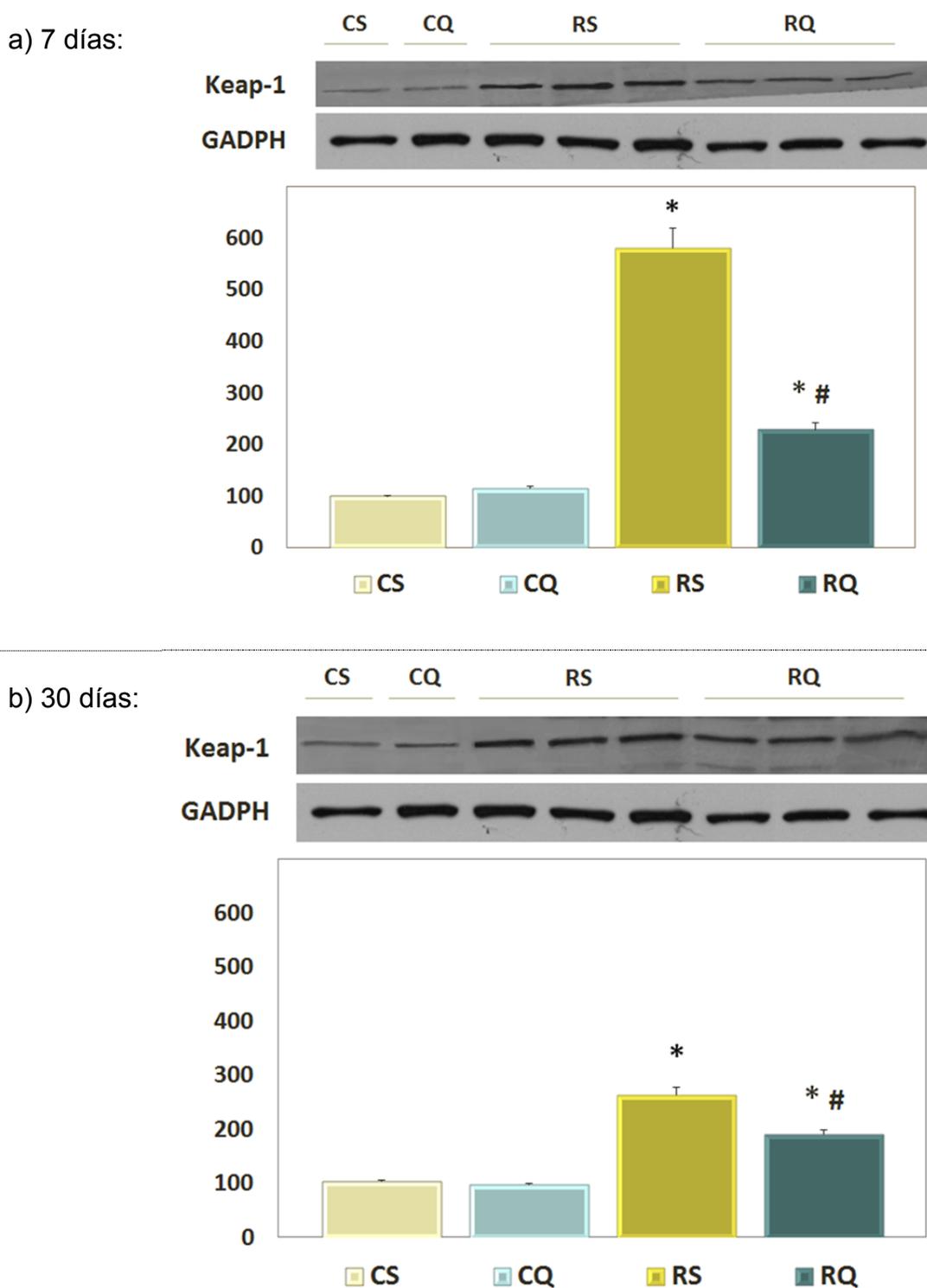


Figura 4-44. Expresión de la proteína Keap1 en tejido hepático estudiada a los 7 días (a) y a los 30 días (b) post-anestesia/irradiación.

El panel superior muestra Western Blot representativo de 1-3 animales por cada grupo experimental. El panel inferior muestra los cambios porcentuales de los distintos grupos. Valores medios \pm E.E.M. de 8-10 animales. * $p < 0,05$ respecto a CS. # $p < 0,05$ respecto a RS.

5 DISCUSIÓN

La radiación ionizante ejerce una serie de efectos biológicos atribuidos básicamente a cambios químicos inducidos en las moléculas por la absorción de energía. La exposición de tejidos a una radiación con suficiente energía provoca la ionización de moléculas, y por tanto un aumento en la formación de radicales libres que pueden ser suficientemente reactivas como para cambiar la estructura y alterar la función de las moléculas biológicas que se encuentren en sus proximidades ⁴¹.

Las células maduras en reposo son relativamente radorresistentes, pero las que se dividen dentro de un tejido son radiosensibles, por lo que la irradiación intensa puede matar un número suficiente de células como para que el tejido se atrofie. La rapidez de esta atrofia depende de la dinámica de la población celular dentro del tejido afectado, de tal modo que, en órganos caracterizados por un recambio celular lento, como el hígado y el endotelio vascular, el proceso es mucho más lento que en órganos caracterizados por un recambio celular rápido, como médula ósea, epidermis y mucosa intestinal. Por otra parte, también influye el volumen de tejido irradiado ya que si es bastante pequeño, o si la dosis se acumula con la lentitud suficiente, la gravedad de la lesión puede reducirse notablemente por la proliferación compensatoria de las células supervivientes ⁵⁴. Se ha comprobado que la exposición a dosis bajas de radiación ionizante causa una mayor cantidad de estrés oxidativo que durante los procesos metabólicos normales del organismo ⁵⁵.

Puesto que la exposición a la radiación puede producir importantes efectos secundarios no deseados, es importante tratar de mejorar o mitigar tales efectos mediante el uso de agentes radioprotectores o radiomodificadores. Éstos deben ser administrados antes de la irradiación, con el objetivo de reducir las lesiones causadas por este tratamiento. Estos agentes son compuestos sintéticos o productos naturales de origen vegetal.

La búsqueda de agentes radioprotectores ha sido una constante durante las últimas décadas. Los estudios de experimentación sobre los agentes

radioprotectores han permitido tener un conocimiento más amplio acerca de la física, química y biología de la radiación. La utilización de animales de experimentación en estudios de radioprotección o tratamientos post-exposición para víctimas potenciales de accidentes de radiación ³⁵⁵, presenta limitaciones relacionadas con diseños experimentales potencialmente no comparables entre el ser humano y dichos modelos animales, como pueden ser las vías de administración o las dosis de radiación utilizadas ⁸⁵.

Como resultado de la gran necesidad clínica para aumentar la eficacia de estos agentes radioprotectores, han sido preparados y probados muchos de ellos para que sean más eficaces, menos tóxicos y más fácilmente auto-administrados ³⁶.

En nuestro trabajo de investigación el radiomodificador utilizado fue la quercetina, un polifenol presente en frutas y verduras con importantes características tanto antioxidantes como antiinflamatorias ³⁵⁶, antitumorales ³⁵⁷ o antibacterianas ³⁵⁸.

5.1 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros corporales

Aunque ya en los años 50 se comenzaron a estudiar los efectos de la exposición del organismo animal a la radiación ionizante, durante la década de los 60 se profundizó en estos estudios ³⁵⁹⁻³⁶¹. En 1969, Tsuchihashi y cols. ³⁵⁹ realizaron un trabajo de investigación en ratas expuestas a dosis de irradiación en un rango de 6 a 9 Gy. Observaron que el peso corporal de los animales disminuía gradualmente a partir del cuarto día post-irradiación. Esta situación se agravaba conforme se incrementaba la dosis de radiación, la cual estaba inversamente relacionada con el porcentaje de supervivencia de los animales.

En nuestro trabajo, al estudiar la evolución del peso corporal relativo, en general hemos podido constatar un aumento progresivo del peso corporal en todos los animales hasta el día 10 (tomando como punto de partida la llegada

de las ratas al animalario) coincidiendo con el día de la anestesia con pentobarbital seguida de la irradiación o no a cuerpo entero (6 Gy) dependiendo del grupo experimental. A partir de aquí el aumento del peso corporal de todos animales comenzó a disminuir en los días siguientes, siendo más pronunciado este descenso en los animales irradiados. Así mismo, a partir de los 5 días post-irradiación observamos una recuperación del peso en todos los grupos experimentales, siendo más lenta en los animales irradiados ya fueran o no tratados con quercetina. Cuando este análisis lo realizamos a los 2 y a los 5 días post-irradiación pudimos observar que la pérdida media de peso corporal experimentada por las ratas no suplementadas que sufrieron irradiación fue aproximadamente el doble que la pérdida acaecida en las ratas suplementadas oralmente con quercetina, constatando así los efectos beneficiosos de este flavonoide sobre la pérdida de peso post-irradiación. No obstante, transcurridos 30 días desde la irradiación no se encontraron diferencias significativas entre los pesos de los animales radiados y control.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un trabajo realizado anteriormente por nuestro equipo ⁹, donde se comprobó el descenso del peso corporal en las ratas después de ser sometidas a irradiación de 6 Gy de rayos X a cuerpo entero. En dicho estudio los animales fueron alimentados *ad libitum* y bebieron cada día voluntariamente entre 2 y 10 ml de mosto de uva (con alto contenido en quercetina), o de una solución isocalórica de glucosa y fructosa, durante una semana antes y dos semanas después de irradiación, momento en que fueron sacrificadas. En este estudio el peso de los animales irradiados tratados con mosto fue similar a los de los animales control y con diferencias significativas frente a los animales irradiados no tratados con mosto. En ambos estudios se ha podido comprobar un efecto beneficioso de los flavonoides sobre el descenso del peso corporal tras una irradiación con rayos X. Otros estudios de investigación más recientes también confirman el efecto de la exposición a radiación ionizante disminuyendo el peso corporal en ratas que no habían sido previamente tratadas con sustancias radioprotectoras. Este descenso se observó especialmente al final de la segunda semana post-irradiación, con recuperación del peso hacia el final de la cuarta semana post-irradiación ³⁶²⁻³⁶⁴, de forma similar a nuestros resultados.

Por otro lado, en el estudio de los pesos de hígado y cerebro no observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales tras su sacrificio a los 7 ni a los 30 días post-irradiación, simplemente un ligero descenso no significativo en el peso de los cerebros de los animales irradiados. Sin embargo, Andrade y cols.¹⁰ observaron un descenso significativo del peso hepático a los 15 días post-irradiación en los animales irradiados sin suplementación con mosto en comparación con su control y los demás grupos experimentales. Aunque investigaciones previas han demostrado un incremento en el peso del hígado en ratas a las 6 horas post-irradiación³⁶⁵, recientes trabajos de investigación^{362,364} confirman un descenso del peso hepático en ratas tras 14 días de exposición a cuerpo entero a una dosis de 6,7 Gy de rayos X. No obstante, Mihailovic y cols.³⁶² no encontraron diferencias en el peso hepático ni a los 7 ni a los 28 días post-irradiación.

Aunque los hepatocitos son considerados más radiorresistentes que otras células, el hígado es un órgano muy sensible ante una exposición a radiación ya que ésta debilita e incluso puede inhibir sus mecanismos de defensa³⁶⁴. Los resultados obtenidos por Mirjana y cols.³⁶⁴ confirmaban una disminución significativa del peso hepático observada a las dos semanas post-irradiación, coincidiendo con un descenso general del peso corporal y un aumento en la mortalidad en todas las ratas irradiadas. Esta disminución del peso hepático a la segunda semana post-irradiación, junto a la no existencia de cambios tanto a la primera como a la cuarta semana, confirman los resultados hallados por Andrade y cols.¹⁰ y en la presente memoria.

En nuestro estudio no se observaron diferencias en el peso del cerebro entre los grupos experimentales. En este sentido, Liu y cols. (2010) tampoco apreciaron cambios en el peso del cerebro en ratas macho sometidas a irradiación craneal de 10 Gy de rayos γ , aunque a una tasa de irradiación (0,3 Gy/min) inferior a la utilizada en la presente memoria (0,4 Gy/min).

5.2 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros de daño orgánico. Resonancia magnética.

La detección temprana de los daños producidos por una exposición a radiación en cerebros sanos es una poderosa herramienta para evaluar la inocuidad de los diferentes protocolos de radioterapia. Desde que la resonancia magnética se convirtió en una importante herramienta de diagnóstico³⁶⁶⁻³⁶⁸, la mayoría de las investigaciones han sido las anatómicas. Pero la resonancia magnética permite el estudio de los tejidos funcionales, siendo una de las aplicaciones la medición de los tiempos de relajación en regiones específicas de los órganos de interés. Los procesos que afectan al cerebro no pueden ser visibles en las exploraciones convencionales de resonancia magnética, pero podría detectarse a través de un análisis cuantitativo si existen alteraciones significativas en los tiempos de relajación³⁶⁶.

Se efectuó el registro de las alteraciones de señal inducidas por la radiación experimental en encéfalo, médula espinal, y médula ósea de los cuerpos vertebrales, de todos los grupos experimentales. Hay que resaltar que la tecnología de imagen empleada (señal T2) parece subestimar la magnitud de las lesiones histológicas³⁶⁷, existiendo actualmente técnicas de imagen basadas en difusión de tensor (DTI) que permiten el estudio a escala microscópica de la estructura tisular y sus cambios³⁶⁹.

En las imágenes obtenidas durante las dos primeras semanas post-irradiación no observamos evidencia de gliosis, edema, ni hemorragias. El único cambio fue un aumento de señal en secuencias T1 de las vértebras como consecuencia de la radiación de la médula ósea. Esta ausencia de alteraciones a corto plazo mediante resonancia magnética en ratas, también fue observada en un trabajo realizado por Huang y cols.³⁷⁰. Tras una exposición craneal a radiación con una dosis de 1 a 4 Gy, pudieron comprobar la ausencia de alteraciones significativas para cualquiera de las dosis utilizadas cuando se analizaron los tejidos una semana post-irradiación. Teniendo en cuenta el corto periodo de tiempo post-irradiación para realizar el análisis y la baja dosis administrada, no les fue posible visualizar la presencia de edemas o posibles patologías tisulares. Trivedi y cols.³⁶⁹ realizaron recientemente otro trabajo en

esta misma línea de investigación con el objetivo de detectar y vigilar los cambios patológicos sobre el parénquima cerebral de ratones, inducidos por la administración de radiación de dosis 3, 5 y 8 Gy y evaluados a los 1, 5 y 10 días post-irradiación. Como en nuestro caso, tras realizar las imágenes ponderadas T1-T2 para todos los grupos experimentales, no se observaron lesiones aparentes en ninguno de los tres tiempos de estudio. De los 45 ratones irradiados a diferentes dosis, sólo 4 de ellos (tres ratones irradiados con 8 Gy y uno con 5 Gy) presentaron una ligera dilatación ventricular, que podía observarse a partir del quinto día post-irradiación. En nuestro caso, en el análisis realizado a los 7 días post-irradiación tampoco se apreciaron diferencias entre los dos grupos de ratas irradiadas, ya estuvieran tratadas o no con quercetina.

Sin embargo, a partir de los 15 días post-irradiación pudimos distinguir algún foco aislado puntiforme y sutil de microhemorragias, identificados en secuencia T2* GE, ligeramente más llamativos en la ratas irradiadas sin tratamiento con quercetina. Estos microsangrados los pudimos observar en una imagen de resonancia magnética correspondiente al hemisferio cerebral derecho en secuencia T2* GE en plano coronal y en otra correspondiente al hemisferio cerebeloso izquierdo, ambas imágenes procedentes de ratas irradiadas sin tratamiento. En el caso de las ratas suplementadas con quercetina no se observaron ningún foco de microsangrados. Tras una amplia revisión bibliográfica, pudimos observar que la mayoría de los trabajos de investigación que estudiaban los efectos de una exposición a radiación mediante el análisis por resonancia magnética, obtenían alteraciones tisulares significativas a partir de los tres meses post-irradiación^{366,371-375}. De aquí que en nuestro trabajo no obtuviéramos alteraciones significativas post-irradiación en los tejidos, debido a un corto periodo de estudio experimental.

Por ejemplo, Miot y cols.³⁷¹ utilizaron una dosis de radiación de 25 Gy sobre el cerebro de cerdos, y estudiaron los efectos mediante análisis con resonancia magnética tras 110 días post-irradiación. Inicialmente, en el 50% de los animales, pudieron observar cambios anatómicos que se centraban en una compresión y oclusión del ventrículo lateral irradiado. Sin embargo, tras una

segunda exposición a radiación pudieron observar un aumento visible en la intensidad de la señal que correspondía con la materia blanca y gris periventricular. Estos cambios los observaron a partir del día 170 post-irradiación en el hemisferio irradiado todos los animales supervivientes expuestos previamente a radiación. Las alteraciones estaban correlacionadas con la detección de necrosis en las secciones histológicas correspondientes.

De la misma manera y a diferencia de nuestro trabajo, Philippens y cols.³⁷³ realizaron un estudio en ratas pero con una dosis de radiación más alta (36 Gy) incidiendo sobre la médula espinal a nivel toracolumbar, y los efectos nocivos de la radiación comenzaron a estudiarse a partir del tercer mes post-irradiación. Dado que la dosis utilizada superaba la tolerada por los animales, se esperaba la aparición de una disfunción motora (parálisis) dentro de los 4-6 meses post-irradiación. Pudieron observar que el intervalo entre la irradiación y los primeros síntomas neurológicos fue de aproximadamente 26 semanas. De los seis animales irradiados, cuatro de ellos presentaron déficits motores graves, y sólo dos no desarrollaron una disfunción motora completa. En la sustancia blanca de la médula espinal, pudieron observar tres regiones mediante técnicas de resonancia magnética: áreas que presentaban desmielinización y necrosis focal, regiones necróticas confluentes y zonas con inflamación que rodeaban a estas regiones necróticas. Las áreas focales con hemorragia se manifestaban en las imágenes de resonancia magnética como pequeñas zonas con baja intensidad de T2, tanto en la sustancia gris como en la blanca.

5.3 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros de daño orgánico. Análisis histopatológico

Los resultados histopatológicos presentan cierta correlación con los hallazgos de resonancia magnética.

Los animales sometidos a rayos X presentaban una médula ósea roja con una disminución clara en la densidad celular y sustitución por células

adiposas, originando por tanto una disminución en la capacidad hematopoyética. Estas alteraciones fueron menos evidentes en los animales sacrificados a los 30 días post-irradiación, sin presentar diferencias significativas con los grupos experimentales tratados con quercetina, ya fueran estudiados a los 7 como a los 30 días post-radiación.

Mihailovic y cols.³⁷⁶ observaron en 2009 cambios en la médula ósea tras la exposición a rayos X con una dosis de 6,7 Gy en ratas tratadas y sin tratar con un compuesto radioprotector (α 2-macroglobulina). Los resultados demostraron una disminución en el índice mitótico en las ratas irradiadas sin tratamiento, reflejando la destrucción significativa de las células de médula ósea traducida en un descenso pronunciado en el recuento de leucocitos. Estos autores pudieron observar un efecto citoprotector en la médula ósea de la α 2-macroglobulina administrada a las ratas irradiadas.

Crescenti y cols.³⁷⁷ presentaron recientemente un estudio cuyo objetivo fue investigar la capacidad de una combinación de oligoelementos y veneno de la víbora *Lachesis muta* para prevenir los daños producidos por una exposición a radiación ionizante en el intestino delgado, médula ósea y glándulas submandibulares de la rata. Tras una única dosis de rayos X a cuerpo entero (5 Gy) observaron una aplasia medular total con pérdida de la capacidad hematopoyética a los 3 días post-radiación, sin efectos beneficiosos de la administración de dicha combinación. Sin embargo, estos efectos sí fueron observados en el estudio histopatológico realizado a los 30 días post-irradiación, que revelaron una repoblación de la médula ósea y aumento significativo de todas las progenies medulares en los grupos experimentales irradiados bajo tratamiento, respecto de los grupos control.

Una de las características del daño inducido por la radiación ionizante sobre sistema nervioso central, es su aparición tras largos intervalos de latencia desde la aplicación de la radiación. En muchas especies, entre ellas el hombre, se manifiestan como radionecrosis en cerebro y médula espinal después de transcurridos entre 4 y 6 meses³⁷⁸. Sin embargo, existen daños histológicos aparentes tras tiempos mucho más cortos. Se ha descrito como

signo temprano de daño celular el ensanchamiento nodal y la desmielinización, que aparecen a las dos semanas tras dosis superiores a 5 Gy³⁷⁹.

Mansoub y cols.³⁸⁰ en 2011 utilizaron de 5 a 20 Gy de rayos γ sobre la rata, y observaron alteraciones vasculares en cerebro en los grupos experimentales expuestos a radiación y sacrificados a los 30 días, de forma similar a los resultados obtenidos en la presente memoria. En nuestro caso, estas alteraciones se presentaron en forma de focos de hemorragia tanto en la sustancia gris como en la blanca y en el epéndimo. Se acepta actualmente que estos daños vasculares de origen temprano tras la irradiación, son atribuibles a la alteración de la barrera hematoencefálica como resultado de apoptosis endotelial³⁸¹ o neuroinflamación^{107,382}. Los animales que fueron irradiados y suplementados con quercetina no presentaron alteraciones neurovasculares a los 7 ni a los 30 días tras la irradiación. En este caso podemos relacionar estas observaciones con un efecto radiomodificador de la quercetina como antioxidante¹².

En nuestro estudio histopatológico sobre el hipocampo el resultado más destacado fue la aparición de neuronas con picnosis, es decir, con presencia de condensación y agregación de la cromatina en los animales irradiados sin tratamiento sacrificados a los 7 días. Sin embargo, y de forma análoga a los resultados obtenidos en el estudio de la médula espinal, los grupos experimentales suplementados con quercetina no presentaron estas irregularidades ni a los 7 ni a los 30 días post-irradiación. Estos hallazgos concuerdan con el estudio realizado por Wei y cols.³⁸³ en 2012 en el que observaron también la aparición de picnosis neuronal al investigar los efectos de la radiación γ a nivel craneal en ratas. Otro trabajo de investigación llevado a cabo en el 2002 por Hu y cols.³⁸⁴ se centraba en el estudio de los efectos de una irradiación de baja y alta dosis sobre ratas, obteniendo evidencias de edemas cerebrales en todas las muestras. Además cuanto mayor era la dosis de radiación observaron la existencia de células con una compactación citoplasmática evidente a nivel cerebral, y condensación de la cromatina nuclear, obtenidos en los días posteriores a la exposición (48 y 72 horas), al igual que la aparición de células necróticas.

Los efectos tempranos de una alta dosis de radiación (14 Gy) a nivel hepático se presentan en forma de necrosis, inflamación celular y pérdida del núcleo celular ³⁸⁰. En nuestro caso observamos discretos infiltrados portales constituidos principalmente por linfocitos, presentes en las preparaciones de los animales sometidos a irradiación, ya fueron tratados o no con quercetina, y sacrificados a los 7 días. También se observaron alteraciones morfológicas de los hepatocitos, relacionadas con posibles trastornos del metabolismo hídrico o degeneración glucogénica. En el caso de los animales irradiados y sacrificados a los 30 días, aparecieron asimismo infiltrados portales esporádicos, e inclusiones de naturaleza proteica en los hepatocitos más proximales a zonas periportales. Estos resultados concuerdan con los resultados de Gultekin y cols. en 2012 en que tras irradiación con 6 Gy de rayos X, observaron como principales efectos adversos dilatación sinusoidal, congestión y dilatación en las venas centrales, así como un pequeño infiltrado de células mononucleares en las tríadas portales ³⁸⁵. No pudimos observar efectos beneficiosos de la administración de quercetina ni a 7 ni a 30 días post-irradiación.

5.4 Efectos de la radiación y la quercetina sobre parámetros sanguíneos

Debido a su alto nivel de renovación celular, el sistema hematopoyético es uno de los tejidos del cuerpo más sensibles a la radiación. Dosis relativamente bajas de irradiación aguda son capaces de afectar y eliminar células. La exposición a las radiaciones ionizantes induce una disminución dosis-dependiente de células hematopoyéticas circulantes, ya que la producción de células de la médula ósea se reduce y se produce la redistribución de las células maduras ^{10,64-66}. En general, aparece disminución de la cantidad de linfocitos y granulocitos en un período de horas o días después de la irradiación ⁶⁷. En consonancia con su vida media, las plaquetas también disminuyen transcurridos varios días ⁶⁹. Pueden aparecer infecciones oportunistas que se traducen en sepsis, una causa principal de mortalidad durante las primeras fases del síndrome hematopoyético inducido por la

radiación, a causa del bajo recuento de neutrófilos y un aumento de la translocación bacteriana a través de la mucosa gastrointestinal. Esto puede verse complicado por la trombocitopenia y hemorragia resultantes, así como deficiencias del sistema inmunológico como resultado de apoptosis linfocitaria y caída de la linfopoyesis ⁶⁴.

El eritrocito, debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, a su contacto directo con el oxígeno y a la presencia de iones ferrosos formando parte de la hemoglobina, es muy susceptible al daño oxidativo en situaciones de deterioro tisular o cuando hay un predominio de los oxidantes con respecto a los antioxidantes intracelulares. En tales circunstancias, la oxidación de la hemoglobina en metahemoglobina se incrementa considerablemente, generando gran cantidad de radicales superóxido, que dan lugar finalmente a la formación de radicales sumamente reactivos como los radicales hidroxilo. Estos radicales, o cualquier otra especie reactiva, son capaces de oxidar diferentes componentes del eritrocito así como la hemoglobina. Estas alteraciones generan cambios en la estructura de la membrana eritrocitaria, que ocasionan un descenso en la deformación del eritrocito, disminuyendo su estabilidad isotónica y aumentando las formas esferocíticas, con la consiguiente pérdida de la integridad celular y el acortamiento de su vida media ^{386,387}.

Resultados previos realizados en nuestro laboratorio indicaron la ausencia de cambios significativos en el recuento eritrocitario, hematócrito y concentración de hemoglobina durante los primeros dos días post-irradiación, mientras que a los 16 días se producía un descenso significativo (cerca de un 50%) en el recuento eritrocitario ¹⁰. Nuestros resultados muestran un descenso significativo en el recuento eritrocitario tanto a los 7 como a los 30 días post-irradiación, sin efectos de la suplementación con quercetina en ninguno de los grupos experimentales (fig 4.15). No obstante, el valor hematócrito (fig 4.16) y la concentración de hemoglobina (fig. 4.17) se recuperaron hacia valores normales a los 30 días en todos los animales irradiados ya estuvieran o no suplementados. Este aumento del valor hematócrito y de la concentración de hemoglobina en el experimento tardío es consistente con la aparición de una

gran proporción de células sanguíneas inmaduras tras la irradiación^{388,389}, de mayor tamaño que los eritrocitos. En este sentido, registros obtenidos en el laboratorio para el recuento eritrocitario en animales irradiados a 30 días permitieron apreciar la existencia de dos picos poblacionales, correspondientes a eritrocitos y a células inmaduras (reticulocitos), mientras que sólo aparecía un pico de eritrocitos en los resultados correspondientes al experimento temprano. El conjunto de células inmaduras no se tiene en cuenta para el recuento eritrocitario, pero sí interviene en la obtención del valor hematócrito y la concentración de hemoglobina. Nuestras observaciones indican un descenso próximo al 20% en el hematócrito a los 7 días post-irradiación y una normalización del hematócrito a los 30 días tras la irradiación. En el estudio de Andrade y cols. 2009, el valor hematócrito disminuyó un 40% respecto al valor control a los 16 días post-irradiación.

Todo ello está de acuerdo con la progresiva estimulación de la actividad eritropoyética de la médula ósea tras la irradiación apreciada por otros autores³⁸⁹.

El recuento de plaquetas presentaba diferencias significativas en los grupos experimentales radiados frente a los controles, aunque sólo en el experimento realizado a los 7 días post-irradiación. En el estudio de investigación antes citado¹⁰, el recuento plaquetario disminuyó a los 16 días post-irradiación, sin cambios a las 6, 24 o 48 horas post-irradiación, mostrando algunos animales irradiados hemorragia nasal posiblemente relacionada con el agotamiento de las plaquetas.

Se observó una drástica disminución en el recuento de leucocitos en los grupos irradiados estudiados a los 7 días. A los 30 días post-irradiación también se apreció una ligera disminución no significativa en este parámetro. El análisis hematológico realizado por Andrade y cols.¹⁰ presentó las anomalías típicas de la exposición a radiación ionizante, con disminución leucocitaria temprana y anemia. Tampoco observamos diferencias entre los animales tratados y sin tratar con quercetina. Benkovic y cols.¹² apreciaron efectos radiomodificadores de la quercetina (100 mg/Kg), al observar un aumento en el

recuento leucocitario en animales irradiados y tratados con dicho flavonoide a los 3 días post-irradiación.

Los leucocitos son un grupo de células altamente radiosensibles, y su recuento disminuye rápidamente en función de la dosis administrada. Mihailovic y cols.³⁷⁶ observaron un fuerte descenso post-irradiación en el recuento de leucocitos, en ratas que fueron expuestas a una dosis de rayos X de 6,7 Gy y no tratadas previamente con ninguna sustancia radioprotectora. Este descenso correspondía a un 40% respecto a los valores iniciales, y tenía lugar durante la segunda semana post-irradiación. Como en nuestro caso, es a partir de este momento cuando el número de leucocitos de las ratas irradiadas sin tratamiento comenzó a recuperarse hasta valores iniciales en un 90% de los animales.

Por lo tanto, en nuestro estudio experimental no podemos hablar de un efecto positivo de la quercetina sobre la recuperación de parámetros correspondientes a la serie roja. No obstante, la suplementación con la misma parece incrementar el recuento leucocitario a los 30 días post-irradiación. Tampoco se observó este efecto radiomodificador en trabajos previos en los que se utilizó mosto de uva tinta, en cuya composición participa mayormente la quercetina como antioxidante¹⁰.

En resumen, estos resultados apuntan a un daño masivo en la médula ósea como consecuencia de una exposición a irradiación X sobre el cuerpo entero del animal, como se muestran en otros trabajos de investigación con radiación ionizante^{390,391}.

Podemos afirmar que, de forma análoga a los estudios efectuados desde hace varias décadas en seres humanos, la disminución de linfocitos, granulocitos y eritrocitos en la rata tiene lugar en rangos de tiempo expresados en horas, días y semanas, respectivamente, al igual que sucede con el recuento plaquetario⁶⁹.

La radioprotección ofrecida por flavonoides se ha investigado principalmente a través del uso de la prueba de micronúcleos para la actividad

anticlastogénica y de proliferación celular. El ensayo de micronúcleos ha sido ampliamente utilizado para la detección de potencial carcinogénico y genotóxico de diferentes radiaciones ionizantes y productos químicos. El daño a los cromosomas se manifiesta como roturas en el ADN y aparición de fragmentos, que se manifiestan como pequeñas partículas similares a núcleos (micronúcleos) en el citoplasma de las células en rápida proliferación. Una serie de flavonoides (genisteína, quercetina, luteolina) reducen la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos en la sangre periférica de los ratones irradiados²⁷⁷. Se ha demostrado que una única dosis intraperitoneal de hesperidina, una flavona glucosidada, a una dosis de 80 mg / kg, 45 minutos antes de 2 Gy de irradiación γ , redujo la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE). Los valores de MNPCE totales tras irradiación se vieron reducidos 2,85 veces en el grupo tratado con hesperidina en comparación con el control⁶⁶. Los efectos de la pre-incubación de linfocitos con hesperidina 16,38 μ M durante 30 minutos antes de la irradiación γ (4 Gy) mostraron una protección óptima al disminuir la frecuencia de MN, aberraciones dicéntricas y atributos cometa²⁹⁹. El tratamiento con genisteína (200 mg/kg) aumentó significativamente la tasa de supervivencia a 30 días de ratones expuestos a 9,5 Gy de radiación γ por ^{60}Co ³⁰⁰, y un estudio posterior demostró que la genisteína aumenta el estado quiescente en las células madre hematopoyéticas, mejora la regeneración del sistema hematopoyético y el mantenimiento de la actividad de reparación del ADN tras los daños inducidos por la radiación³⁰¹. La formación de micronúcleos en los fibroblastos de pulmón y otros indicadores de daño pulmonar en ratones hembra resultaron asimismo disminuidos por una sola administración subcutánea de genisteína (200 mg/kg) 24 h antes de 7,75 Gy de radiación γ de cuerpo entero con ^{60}Co ³⁰². La genisteína también mostró efectos radioprotectores cuando se administró en la dieta (aproximadamente 10 mg/kg) de ratones hembras seguido de nueve fracciones de 3,1 Gy de rayos X a lo largo de 30 días. No se apreciaron evidencias de protección de cáncer de pulmón por el tratamiento con genisteína a lo largo de 28 semanas después de la irradiación³⁰³.

El tratamiento de ratones con diferentes dosis de naringina antes de estar expuestos a 2Gy de radiación γ por ^{60}Co dio como resultado una disminución significativa en la frecuencia de MNPCE en comparación con los controles irradiados²⁹⁰. Se obtuvieron resultados análogos tras la irradiación de rayos X en la médula ósea de ratones tratados previamente con diosmina y rutina²⁸⁷.

5.5 Efectos de la radiación y la quercetina sobre el comportamiento

La irradiación empleada en el tratamiento de los tumores y malformaciones vasculares del SNC puede causar importantes alteraciones en los tejidos adyacentes principalmente a nivel de cerebro y médula espinal, situación que podría tener importantes consecuencias clínicas. En el ámbito celular, las principales alteraciones producidas son la muerte de las células del endotelio vascular, de las células de la glía y, en dosis más elevadas, también de las neuronas. Diferentes estudios sobre el comportamiento han comprobado la aparición de cambios transitorios rápidos y frecuentes inducidos por la radiación, en el comportamiento tanto de roedores como de humanos expuestos a dosis efectivas comprendidas entre 3 y 7 Gy^{38,392,393}.

Existe una gran cantidad de evidencias de que la respuesta del SNC después de la radioterapia sigue un proceso de interacción continuo y dinámico. Debido a su localización anatómica, el SNC se ve afectado por la dosis de radiación en el tratamiento de tumores localizados en la cabeza, cuello, fracción torácica y parte superior abdominal³⁹.

5.5.1 Efectos sobre el comportamiento exploratorio

La radiación induce daños neurofisiológicos transitorios que pueden aparecer y desaparecer en cuestión de días. Si para la realización de un determinado trabajo o una tarea, un animal necesita una población concreta de neuronas que han sido dañadas previamente, esto se manifiesta como

alteraciones o problemas en el rendimiento y en el comportamiento del animal, lo que se puede considerar como un efecto directo de la radiación. Además, el deterioro de esta población de neuronas puede modificar la actividad de otras poblaciones cercanas y persistir aún después de la recuperación de las demás neuronas, dando lugar a alteraciones permanentes. Este deterioro es el que se considera como efecto indirecto de la radiación. Tanto los efectos directos como indirectos de este deterioro cabe esperar que se intensifiquen con el tiempo, dando lugar a un incremento en los déficits del comportamiento ⁷.

Aparte de la radiación como terapia clínica, el sistema nervioso central está expuesto continuamente a otras fuentes de radiación que pueden causar a corto o a largo plazo efectos adversos sobre las funciones neuronales ^{59,394}. Estos cambios frecuentemente se manifiestan como déficits en las funciones de aprendizaje y memoria, dependientes del hipocampo. Se sabe poco acerca de los mecanismos a través de los cuales se produce el deterioro de la memoria, pero estudios recientes confirman que el estrés oxidativo inducido por la radiación afecta a las células precursoras del giro dentado del hipocampo ^{395,396}.

Una exposición a radiación ionizante puede inducir cambios en el comportamiento del animal en términos de ansiedad. La prueba de open field comprueba los efectos comportamentales de los entornos no familiares, midiendo la actividad emocional del animal ³⁹⁷. La evaluación del grado de ansiedad de los animales se ha efectuado midiendo la relación entre la distancia recorrida por el animal mientras éste se mantiene en el centro del open field y la distancia total recorrida durante toda la sesión de registro ³⁹⁸. Además, un aumento en el tiempo de permanencia del animal en el centro del open field indica un bajo nivel de ansiedad o un efecto ansiolítico, al igual que el descenso en la latencia hasta llegar al centro ³⁶⁹. Los animales que presentan valores de actividad bajos en este nuevo entorno se consideraron más dañados que los animales con el comportamiento contrario ^{399,400}. Además, elevados valores de actividad implican aumento de la exploración, mientras su disminución indica habituación ⁴⁰¹.

Nuestros resultados, independientemente de la existencia (experimento 1) o ausencia (experimento 2) de un contacto previo con el open field por parte de los animales, no muestran cambios destacables en las pautas de comportamiento entre ninguno de los grupos experimentales. Cuando realizamos un análisis de medidas repetidas para el estudio de la frecuencia de acceso y de la duración de la estancia de los animales en las diferentes zonas del open field, pudimos observar que existía una tendencia al descenso en el tiempo y la distancia estudiadas por minuto, en los animales que habían sido expuestos a radiación, observados el día posterior a la misma. En el caso de los animales control, se observó un aumento no significativo para ambos parámetros en las esquinas y los lados del open field, durante cada sesión de entrenamiento, lo que significaba la presencia de un comportamiento exploratorio por parte de estos animales, que no fue observado en las ratas expuestas a radiación. Sin embargo, esta situación disminuía desde el minuto 1 hasta el 5 durante los 3 días consecutivos a la anestesia. A más largo plazo los efectos de la radiación subletal con rayos X parecen mitigarse, sin que aparezcan diferencias significativas de comportamiento entre los grupos experimentales en pruebas efectuadas a los 14, 19 y 29 días post-irradiación, debido probablemente a la existencia de una habituación de los animales al entorno.

Debe también señalarse el efecto negativo de la anestesia inducida mediante pentobarbital sobre las pruebas comportamentales realizadas al día siguiente. Podría argumentarse que el supuesto efecto de la radiación estaría mediado asimismo por la anestesia practicada a los animales tanto de los grupos control como de los grupos irradiados, pero no obstante la disminución de actividad continúa en los animales RS durante los siguientes días, mientras que mejora en los animales irradiados suplementados con quercetina. La administración de quercetina en los animales del grupo CQ parece prevenir este descenso de parámetros comportamentales.

Existen diversos estudios sobre la habituación de los animales a nuevos entornos, que suponen la capacidad de memoria y aprendizaje^{97,369,402-405}. Puede ser identificada a través de diferentes parámetros de comportamiento,

en los cuales el hipocampo y la amígdala juegan un papel importante⁴⁰⁶. Las diferentes respuestas a lo largo de las sesiones de open field, como pueden ser la disminución de los tiempos de latencia en las diferentes zonas experimentales, pueden ser interpretadas como indicativas del reconocimiento y recuerdo posterior por parte de los animales a un determinado ambiente, cuando previamente ya habían sido expuestos al mismo⁴⁰². En nuestro presente estudio pudimos comprobar que, con el paso del tiempo, los animales acababan habituándose al open field, lo que se ponía de manifiesto por el descenso de la frecuencia de acceso a las diferentes zonas experimentales, independientemente de si habían sido expuestos o no a radiación o tratados o no con quercetina.

Nuestros resultados también van en línea con los obtenidos recientemente por Trivedi y cols.³⁶⁹, quienes realizaron un estudio de investigación con el objetivo de detectar y controlar los cambios patológicos inducidos por la exposición a radiación con una dosis de 5 Gy sobre el parénquima cerebral de ratones a los 5 días post-irradiación, pudiendo así establecer una relación entre los resultados obtenidos por resonancia magnética unidos a los estudios neuroconductuales, en fase aguda. Sin haber mantenido contacto previo con el open field, utilizaron el tiempo que permanecían en el centro de la arena como índice de ansiedad, de manera que valores altos de este parámetro implicarían un descenso de la ansiedad en los animales y un aumento del comportamiento exploratorio. Observaron que tras este periodo de 5 días post-irradiación el tiempo de permanencia en el centro de la arena disminuía significativamente en los animales irradiados con una dosis de 5 Gy respecto al grupo control, y por lo tanto un aumento de la ansiedad en estos animales. Nuestros resultados apuntan a una mayor permanencia de los grupos control en el centro del open field en los días posteriores a la anestesia (Figura 4-23), lo que puede interpretarse como una disminución de la ansiedad. Sin embargo, en los animales que fueron expuestos a la radiación experimental de 6 Gy pudimos observar la tendencia a una mayor permanencia, respecto a los controles, en los lados y en las esquinas del open field, sin apenas acceso al centro de la arena, observando de esta manera un efecto ansiogénico de la radiación. Hay que señalar no

obstante que en este experimento los animales tuvieron cuatro días de acceso previo al open field. En el experimento 2, en el que los animales iniciaron las sesiones comportamentales después de la irradiación experimental, la administración de quercetina indujo un aumento de la frecuencia de acceso a esquinas y lados (Figura 4-30) y en la distancia recorrida (Figura 4-32) tras la anestesia (grupo CQ), sugiriendo un efecto inmediato de la quercetina mitigando el efecto de la anestesia que no se manifiesta a los 25 días, en que ya ha finalizado la administración de quercetina. No se observaron cambios provocados por la irradiación en la frecuencia de acceso o la distancia recorrida en lados y esquinas a excepción de los días 2 y 3 tras la irradiación, con disminución de estos parámetros independientemente de la administración de quercetina.

La tigmotaxis, como tendencia de los animales a permanecer más tiempo en los perímetros de un nuevo entorno, se ha asociado desde hace años como parámetro ansiogénico⁴⁰⁷. Los animales control manifestaron más tigmotaxis (considerando tanto tiempo de permanencia como distancia recorrida en los lados del open field) que los animales irradiados (Figura 4-23), y en éstos últimos la administración de quercetina incrementó la tigmotaxis en el día 3 post-irradiación, disminuyendo la permanencia y distancia en las esquinas, con lo que podemos concluir una progresiva habituación de los animales control al open field. El efecto ansiogénico de la irradiación aparece en nuestros resultados manifestado como la alta permanencia de los animales irradiados en las esquinas, que es parcialmente contrarrestado por la quercetina en el día 3 post-irradiación.

No obstante, nuestras gráficas de respuesta inmediata (Figura 4-24) pueden parecer contradictorias ya que no pudimos observar estos resultados al día siguiente a la irradiación, en el que todos los animales se comportaban de forma similar durante los 5 minutos de permanencia en el open field, por lo que este hecho puede estar asociado a la anestesia administrada por igual a todos los grupos experimentales y no a la exposición a la radiación.

Aunque la causa de estos cambios inducidos en el comportamiento aún no está clara, sí se ha confirmado que la radiación induce un aumento del

estrés oxidativo relacionado con las alteraciones cognitivas en los animales experimentales³⁶⁹. También se considera que el número de veces que los animales cruzan las esquinas representa actividad motora: la reducción de la frecuencia de acceso con el paso del tiempo indicaría habituación al open field, y su aumento indicaría actividad exploratoria. En un estudio reciente se utilizaron ratas macho sometidas a dos sesiones consecutivas de 5 minutos cada una en open field. Los animales que recibieron fenilalanina intrahipocampal una hora antes del entrenamiento como inductor de daño oxidativo presentaron una reducción en la actividad exploratoria, y por lo tanto una habituación al medio, en relación con los animales control⁴⁰⁴. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales cuando se estudió la latencia de los animales en el open field, ni cuando se les administró previamente piruvato o creatina como antioxidantes, lo que indicó que los efectos observados en la habituación no se debían a efectos emocionales. En nuestro trabajo observamos una disminución en la frecuencia de acceso en los días previos a la irradiación (o anestesia) en todos los grupos experimentales, indicativo de habituación. Sin embargo, durante los tres días post-irradiación/anestesia los animales controles incrementaron su actividad exploratoria mientras que los irradiados mantuvieron valores similares de frecuencia de acceso. La suplementación con quercetina (grupo RQ) provocó un aumento de la actividad exploratoria similar a los controles en el día 3 post-irradiación.

Diversos trabajos han estudiado los efectos de la exposición a radiación sobre el comportamiento exploratorio de los animales, ya sea a corto o a largo plazo^{7,97,408,409}. Entre ellos destacamos el realizado por Pecaut y cols.⁷, en el que tras irradiar varios grupos de ratones con dosis de 3 y 4 Gy (0,75-0,95 Gy/min) fueron estudiados en las semanas 0, 1, 2, 4, 8 y 12 post-irradiación. Los test de comportamiento se realizaron dos veces por semana en sesiones de 5 minutos de duración y, como en nuestro caso, se estudiaron parámetros como la latencia en cada zona experimental o la actividad de los animales. El objetivo de este trabajo fue determinar los posibles cambios en el comportamiento ocasionados por esta exposición a radiación en forma de protones, y comprobar si estos animales irradiados presentaban o no la

habitación al open field a lo largo del tiempo que se observaban en los animales control. Los citados investigadores pudieron comprobar que los efectos directos de la radiación se manifestaban en forma de daños neurofisiológicos transitorios durante los primeros días tras la misma, que desaparecían transcurridas dos semanas. Estas alteraciones demostraron que la radiación afecta al rendimiento de los animales de manera que les cuesta más habituarse al entorno, a diferencia de los controles, sugiriendo que los déficits podrían ser debidos a los daños producidos por la exposición a la radiación sobre las funciones dopaminérgicas del hipocampo, cerebelo y prosencéfalo.

Cuando estudiamos la respuesta de los animales que habían sido irradiados y previamente suplementados con quercetina, pudimos señalar que, a pesar de las limitaciones impuestas por la gran variabilidad individual inherente a todos los estudios comportamentales, la quercetina estimula la vuelta a la normalidad comportamental de los animales, en un efecto temprano tras la radiación experimental con 6 Gy de rayos X, posiblemente como consecuencia de un menor daño neurovascular del tejido nervioso. Estas observaciones, unidas a la disminución de la pérdida de peso a los 2 y 5 días en las ratas irradiadas o la disminución del aumento en células sanguíneas inmaduras tras la irradiación como vimos anteriormente, permiten sugerir una posible utilización preventiva de quercetina para mejorar los síntomas que pueden aparecer a corto plazo tras las sesiones de radioterapia.

5.5.2 Efectos sobre el comportamiento cognitivo

La presencia de estrés oxidativo celular y el consiguiente aumento de las EROs dan lugar a importantes deterioros funcionales de tipo cognitivo. En este sentido, se ha apreciado que una disminución del estado pro-oxidante en el cerebro puede mejorar la cognición espacial en un modelo de rata con lesión cerebral e intoxicación por alcohol⁴¹⁰.

Se considera que el comportamiento cognitivo de un organismo está regulado por la capacidad de las células precursoras del hipocampo para proliferar y diferenciarse. Se ha demostrado que los factores de estrés ambiental, incluyendo la radiación, son capaces de inhibir la neurogénesis, lo que está relacionado a su vez con la aparición de deterioro cognitivo ⁵⁹.

Para el estudio de los posibles cambios cognitivos en ratas hemos utilizado una prueba dependiente del hipocampo: el laberinto de Morris ⁴¹¹. Nuestros resultados nos demostraron que los animales presentaban las mismas pautas de comportamiento, independientemente de que hubieran tenido contacto previo (experimento 1) o no (experimento 2) con este test de comportamiento, y su consiguiente recuperación con el paso del tiempo.

De esta manera observamos que en los días previos a la irradiación o anestesia todos los animales tendían a disminuir el tiempo de latencia hasta alcanzar la plataforma de escape con el paso de los días, debido al aprendizaje y a la memoria espacial de los animales ⁴¹⁰. El grupo de animales control tratados con quercetina presentó una cierta mejoría al descender de manera no significativa el tiempo de latencia, respecto a los controles no tratados.

La literatura presenta varios trabajos de investigación cuyo objetivo es el estudio de los efectos de una exposición a radiación sobre el comportamiento cognitivo en roedores ^{59,410,412-415}. En nuestro caso, los animales irradiados presentaban un claro ejemplo de los efectos adversos de la radiación frente al comportamiento cognitivo aumentando el tiempo de latencia en el que encontraban la plataforma de escape respecto a los grupos control, asociado al deterioro cognitivo y a la pérdida del balance oxidativo ^{412,415}. En esta misma línea de investigación Manda y cols. ⁴¹⁰ comprobaron los efectos de la radiación sobre la memoria espacial en el laberinto de Morris en ratones, de manera que el descenso o aumento de la latencia durante los días experimentales representarían cambios en la memoria a largo plazo o memoria de referencia. Para ello utilizaron una dosis de rayos X de 6 Gy (0,55 Gy/min), administrada a los animales a cuerpo entero, confirmando los efectos adversos de la exposición a radiación ionizante sobre la memoria espacial y el deterioro cognitivo. Al igual que en el experimento 1 realizado en nuestro trabajo, los

animales fueron entrenados en el laberinto de Morris los días previos a la irradiación, y comprobaron que todos los grupos de animales presentaron una mejora de la latencia conforme iban pasando los días. Sin embargo, Manda y cols. pudieron observar que en el primer día post-irradiación la latencia de los animales irradiados se incrementaba significativamente respecto a los grupos control, situación que se revertía a los 5 días del estudio post-irradiación. En nuestro estudio, esta tendencia al aumento de la latencia también la pudimos observar en los animales que fueron estudiados durante los 6 días siguientes a la irradiación (experimento 2), pero de forma no significativa entre los diferentes grupos experimentales, independientemente de si habían sido tratados o no con quercetina, debido a la recuperación de la memoria de los animales con el paso del tiempo. No obstante, en el grupo de animales irradiados y tratados con quercetina pudimos observar una ligera tendencia a un aprendizaje más rápido, ya que el tiempo de latencia disminuía más que los animales irradiados sin tratamiento, es decir, el aprendizaje se efectuaba con rapidez similar a los grupos control, lo que nos indicaría un efecto neuroprotector de la quercetina frente a la exposición a radiación. Sin embargo, en el experimento de aprendizaje efectuado a los 25 días post-irradiación (Figura 4-34) no apreciamos efectos de la radiación ni de la suplementación con quercetina.

Existen varios estudios en los que se utilizó como tratamiento para mitigar los efectos de la radiación sobre el comportamiento cognitivo, diferentes tipos de flavonoides ^{59,413,416}. El grupo de investigación antes citado, realizó un año más tarde otro trabajo con el objetivo de estudiar los efectos protectores de un metabolito de la melatonina (AFMK) contra la exposición de partículas radiactivas de alta energía (2 Gy) que originaban daño oxidativo a nivel cerebral, y se manifestaban como déficits en las funciones dependientes del hipocampo, como el aprendizaje y la memoria. Pudieron observar que el pretratamiento con este metabolito supuso una protección significativa contra el deterioro de la memoria inducido por la radiación que se comprobó a partir del día 40 post-irradiación, a diferencia de los animales irradiados sin tratamiento, cuya latencia disminuía significativamente respecto a los controles a partir del día 23 post-irradiación (correspondiente al momento de mayor estrés oxidativo cerebral) ⁵⁹.

En esta misma línea de investigación encontramos un trabajo muy reciente realizado en ratones, en el que se comprobaron los efectos radiomodificadores del flavonoide baicaleína como potente antioxidante. Para ello se administró una sola dosis de 5 Gy de radiación a cuerpo entero, pudiendo comprobar que el pretratamiento con baicaleína prevenía de los déficits de retención de memoria y aprendizaje espacial inducidos por la radiación, y por lo tanto atenuaba el deterioro de la neurogénesis en el hipocampo inducido por la presencia de estrés oxidativo⁴¹³. Esta mejora del comportamiento cognitivo ante un tratamiento con polifenoles, también la pudieron observar Shukitt-Hale y cols.⁴¹⁶ en un trabajo realizado en ratas, a las que se les administraba una dieta rica en extractos de frutas durante 8 semanas antes de la exposición a radiación (partículas de Fe⁵⁶ de alta energía). Comprobaron que esta suplementación en la dieta era capaz de proteger contra los efectos perjudiciales de la radiación, que se manifestaban en las ratas irradiadas, al igual que en nuestro presente trabajo, como un aumento de la latencia hasta encontrar la plataforma de escape en el laberinto de Morris.

En un trabajo de investigación cuyo objetivo fue estudiar los efectos de la diabetes sobre el comportamiento cognitivo en ratas utilizando el laberinto de Morris, y comprobar si la suplementación con quercetina prevenía los posibles déficits comportamentales. Los autores pudieron comprobar que ante el tratamiento con quercetina a diferentes dosis (5-20 y 40 mg/Kg de peso corporal por vía oral) administrada dos veces al día durante 30 días, los animales disminuían su tiempo de latencia para encontrar la plataforma de escape respecto a los animales sin tratamiento, lo que indica que la quercetina previene las disfunciones cognitivas de la diabetes⁴¹⁷.

Por lo tanto, y ante todos estos resultados, podemos confirmar que una suplementación con flavonoides u otros antioxidantes proporciona una protección contra los efectos nocivos de una exposición a radiación, sobre todo a nivel de memoria y aprendizaje espacial, ya que son capaces de actuar en diferentes regiones del cerebro induciendo estos efectos benéficos⁴¹⁶.

5.5.3 Efectos sobre la ingestión de agua y alimento

Desde los años 50 ya se comenzaba a estudiar los efectos de la radiación sobre el comportamiento ingestivo⁴¹⁸⁻⁴²⁰. Garcia y cols.⁴¹⁹ realizaron un trabajo con el objetivo de estudiar los efectos de la exposición a una radiación γ de baja intensidad, sobre el consumo de alimento en ratas. Tras realizar varios experimentos observaron, como en nuestro trabajo, que en todos los casos la ingesta de alimento disminuía significativamente tras la primera exposición a radiación, respecto a los animales control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio experimental, donde pudimos observar que el consumo de alimento descendía significativamente en los animales expuestos a radiación en los días posteriores a la misma, situación que se revertía en el tiempo tanto en los animales irradiados suplementados con quercetina, como en los no suplementados. Los grupos control presentan una ingestión de alimento más lineal, con un pequeño descenso que se corresponde con la anestesia sufrida por todos los animales en el día de la irradiación experimental. Estos resultados van correlacionados con la excreción de heces que también disminuía significativamente en todos los animales irradiados, y se revertía posteriormente hasta alcanzar valores próximos a los controles.

En cuanto al consumo de agua pudimos observar un efecto contrario de la irradiación, ya que todos los animales irradiados presentaban un aumento significativo de la ingesta de agua (polidipsia) respecto a los grupos control durante 5 días consecutivos a la radiación. No observamos diferencias entre los animales irradiados con o sin tratamiento. Como en el caso anterior, la excreción de orina va a ir correlacionada con el agua ingerida, de tal manera que se observó un aumento significativo en los grupos irradiados respecto a los controles, sin efectos visibles de la quercetina. En el trabajo de Smith y cols.⁴¹⁸ en ratas se comprobó, como en nuestro caso, que tras la exposición a irradiación los animales sufrían alteraciones en el consumo de agua en función de la dosis de irradiación a la que habían sido expuestos. En general observaron que la irradiación producía una inmediata presencia de polidipsia en los animales que habían sido previamente irradiados.

5.6 Efectos de la radiación y la quercetina sobre el estrés oxidativo

Se sabe que la exposición a radiaciones ionizantes induce la presencia de estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, dando lugar a un desequilibrio del estado antioxidante/prooxidante en las células^{11,421,422}. El aumento de estrés oxidativo asociado a una radiación experimental constituye la base para uno de los enfoques de radioprotección frente al daño a tejidos sanos inducido por la radioterapia. Son muchos los trabajos de investigación acerca de los efectos de los flavonoides y otros polifenoles en la mitigación del estrés oxidativo⁴²³⁻⁴²⁸.

La presencia de estrés oxidativo puede determinarse de diversas formas, que de manera resumida se puede agrupar en tres: a) cuantificación de los radicales libres, b) cuantificación de los marcadores de estrés oxidativo y c) cuantificación de los sistemas antioxidantes⁴²⁹.

Sin embargo, los radicales libres son difíciles de medir debido a su alta reactividad, que les condiciona una vida media muy corta, y a las dificultades técnicas de su cuantificación, que precisa de aparatos caros, poco accesibles y complejos, como son algunas técnicas de resonancia de electrones. Por ello, y como hicimos en nuestro estudio experimental, una aproximación alternativa sería la cuantificación de los marcadores de daño oxidativo, que resultan de la interacción de los radicales libres con las macromoléculas como el ADN, lípidos y proteínas.

La mayoría de los marcadores de estrés oxidativo utilizados reflejan el ataque de los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados a través de la peroxidación lipídica, que rinde hidroperóxidos y endoperóxidos. El proceso de oxidación de los lípidos, o peroxidación lipídica, genera como productos finales aldehídos citotóxicos, que son muy reactivos frente a las proteínas y el ADN. La cuantificación de los aductos de malondialdehído y ácido tiobarbitúrico (TBARS) es una forma útil y ampliamente utilizada para medir peroxidación lipídica⁴²⁹. Por ello en nuestro trabajo hemos utilizado el estado oxidante/antioxidante hepático en los diferentes grupos experimentales mediante esta cuantificación de los TBARS, observando un aumento

significativo en la concentración de TBARS en el homogenizado hepático del grupo de animales irradiados con respecto al control a los 7 y a los 30 días post-irradiación, lo que nos indica que existe un aumento de la peroxidación lipídica y por tanto de estrés oxidativo. Estos resultados concuerdan con lo observado por muchos investigadores tras una exposición a radiación ionizante ⁴³⁰. En nuestros resultados el estrés oxidativo disminuye a los 30 días post-irradiación a valores que son la mitad de los encontrados a los 7 días tras la radiación, pero son significativamente más altos que los encontrados en los animales no irradiados. Estos datos van en la línea de lo indicado por Meydan y cols. en 2011, quienes observan en ratas sometidas a una irradiación de 8 Gy un descenso del estrés oxidativo a los 68 días comparado con los 10 días post-irradiación ⁴³¹.

Destacamos en nuestro estudio que en el grupo de ratas irradiadas y tratadas con quercetina la concentración de TBARS disminuye significativamente frente al grupo de animales irradiadas sin tratamiento a los 7 días post-irradiación. Esto nos indica que en esta situación, el flavonoide ejerce un efecto antioxidante a través de la modulación de la peroxidación lipídica y del estado antioxidante hepático, de forma similar a otros antioxidantes ⁴³⁰. Elmissiry y cols. ⁷⁰ llevaron a cabo en 2007 un trabajo experimental muy similar al nuestro, en el que se expusieron las ratas a dosis de radiación gamma de 2 y 4 Gy (0,84 Gy/min) respectivamente. En este experimento la mitad de las ratas de cada grupo experimental fueron sometidas a un tratamiento pre-irradiación con melatonina i.p. durante los 4 días previos a la misma. Los resultados verificaron un aumento de la concentración hepática de MDA respecto a los controles en las ratas irradiadas sin previo tratamiento, cuando fueron sacrificadas a los 5 días post-irradiación, el tratamiento pre-irradiación con este antioxidante disminuía los valores hepáticos de MDA hasta aproximadamente los valores de los grupos control. Análogos resultados se obtuvieron tras administrar quercetina (50 mg/Kg) por vía intraperitoneal una hora antes de irradiar con rayos UVA (1,25 mW/cm²). Los análisis se llevaron a cabo durante períodos de 3,6 y 9 días, y la radiación se administró durante 4 horas al día. Los resultados obtenidos demostraron que el mayor incremento de los valores de MDA tenía lugar a los 9 días post-irradiación en el grupo de animales

irradiados cuando se compraba con el grupo control. Sin embargo, el tratamiento pre-irradiación con quercetina revertía esta situación, alcanzando valores de MDA próximos al control ⁴²⁸.

Entre las técnicas para la identificación de estrés oxidativo en la célula se utiliza la cuantificación de los sistemas antioxidantes. Las células contienen defensas antioxidantes que previenen o reparan el daño ocasionado por las EROs. En los mamíferos juegan un papel importante las enzimas antioxidantes intracelulares: SOD, catalasa y GPx. La SOD convierte el ión superóxido en H₂O₂, mientras la catalasa y la GPx convierten H₂O₂ en H₂O. De este modo, dos especies tóxicas son convertidas a productos acuosos menos dañinos. Estas funciones antioxidantes son necesarias para el mantenimiento de la vida celular ⁴³².

En nuestro estudio experimental observamos un aumento de la expresión de las enzimas antioxidantes catalasa, SOD-Cu/Zn y NQO1 en los grupos de animales que fueron irradiados y sacrificados a los 7 días post-irradiación, lo que también nos corrobora la presencia de estrés oxidativo. Esta situación también la observamos cuando el estudio lo realizamos a los 30 días post-irradiación para la encima SOD-Cu/Zn y NQO1 pero no se produce sobreexpresión de la catalasa.

La radiación ionizante induce múltiples cambios moleculares en las células dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. Factores de transcripción tales como AP-1 o NF-κB son activados 24 horas después de la radiación ⁴³³ y al mismo tiempo se induce la enzima SOD-Mn vía el factor NF-κB. Existen trabajos de investigación en los que se confirma el aumento de la expresión de enzimas antioxidantes ante una exposición previa a radiación, aun a dosis bajas ⁴³⁴⁻⁴³⁷. Destacamos el estudio realizado por Bravard y cols. ⁴³⁶, quienes sugieren una respuesta adaptativa del organismo a bajas dosis de radiación. Observaron que linfoblastos humanos expuestos a una irradiación γ de 3 Gy, presentaron un aumento significativo en la expresión de las enzimas antioxidantes SOD-2 y catalasa analizadas 20 horas post-irradiación, en relación a su expresión antes de la exposición ⁴³⁶. Se

observaron aumentos en la expresión hepática de glutatión-S-transferasa, NADH deshidrogenasa y peroxirredoxina VI estudiadas a las 24 horas post-irradiación, en ratones que habían sido expuestos a radiación de cuerpo entero⁴³⁷. Se ha indicado que determinados antioxidantes protegen al organismo actuando a nivel celular, incrementando la capacidad antioxidante tanto de la enzimática como de la no enzimática como GSH⁸⁶.

Cuando analizamos la expresión de las enzimas antioxidantes en los animales que habían sido expuestos a radiación y previamente tratados con quercetina, observamos que los valores de SOD-Cu/Zn y NQO1 son significativamente menores que en los animales irradiados no tratados pero siguen siendo mayores que en los animales control, tanto a los 7 como a los 30 días post-irradiación. Esto se podría explicar por la acción de la quercetina, que actúa como antioxidante inactivando los radicales libres originados por la radiación, y disminuyendo por tanto el estrés oxidativo en la célula^{438,439}.

Diferentes investigadores han puesto de manifiesto la importancia de la activación del factor de transcripción Nrf2 como mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo o electrofílico. Esta activación controla la expresión de genes cuyos productos proteicos intervienen en la detoxificación y eliminación de agentes oxidantes y electrofílicos a través de reacciones de conjugación aumentando así la capacidad antioxidante celular^{425,426,440-445}.

En nuestro estudio detectamos un aumento significativo en la expresión nuclear del factor Nrf2 en el grupo de animales irradiados y sacrificados a los 7 días y a los 30 días post-irradiación, de manera que podríamos explicar que la radiación ionizante activa a Nrf2 para incrementar la expresión génica de las enzimas antioxidantes examinadas (catalasa, SODCu/Zn y NQO1) a los 7 días post-irradiación, manteniéndose este efecto incluso 30 días después, aunque en menor medida. En el grupo de animales irradiados y previamente tratados con quercetina observamos una disminución significativa de la expresión de Nrf2 respecto a los grupos irradiados sin tratamiento a los 7 días post-irradiación, lo que parece indicar que la acción antioxidante de la quercetina disminuye los radicales libres y por lo tanto la activación del factor Nrf2 respondiendo al diferente estado de oxidación celular.

Nuestros resultados van en la línea con lo manifestado por McDonald y cols.⁹⁶ en 2010, quienes demostraron una activación dosis dependiente del Nrf2 después de dosis únicas de radiación ionizante de 2-8 Gy en células de cáncer de mama a los 5 días post-irradiación. Estos mismos autores aprecian disminución de la actividad del Nrf2 a los 5 días post-irradiación cuando administran después de la irradiación de forma exógena antioxidantes como GSH y PEG-SOD (superóxido dismutasa unida covalentemente a polietilenglicol) pero no con PEG-CAT (catalasa unida covalentemente a polietilenglicol). Sin embargo, otros autores han indicado aumento en la expresión de Nrf2 después de la administración de antioxidantes. Liu y cols. en 2012⁴²⁵ no observaron incremento en la expresión de Nrf2 en el cerebro de ratón después de 12 horas de una dosis única de 4 Gy de radiación, pero los animales tratados con concentraciones crecientes de melatonina (1-10 mg/Kg) muestran expresión incrementada de Nrf2. De forma similar después de inducir EROs por la administración de dietilnitrosamina, la administración de melatonina (50 mg/kg) durante 14 días fue capaz de doblar la expresión nuclear de Nrf2.

Ha sido tradicionalmente aceptado que la proteína Keap1 está involucrada en la detección del estrés oxidativo mediante la modificación oxidativa de diferentes residuos de cisteína que lleva a cambios en la configuración para posibilitar la liberación de Nrf2, pero la propia proteína Nrf2 puede actuar como un sensor redox. Cuanto mayor sea la concentración de oxidantes más proteínas Nrf2 se trasladan al núcleo y a mayor velocidad. Esta graduada translocación nuclear de Nrf2 muestra que el factor no se limita a transmitir la presencia de estrés oxidativo sino también la intensidad de éste⁴⁴⁶. Se ha señalado una interacción cíclica de autorregulación entre Nrf2 y Keap1, de tal manera, que un incremento en la expresión de Nrf2 puede inducir la actividad promotora del gen de Keap1 al unirse a un ARE presente en la cadena reversa del promotor proximal del gen de Keap1⁴⁴⁷. Esta retroalimentación positiva puede ayudar a explicar el incremento paralelo de la expresión de ambas proteínas Nrf2 y Keap1 encontrado en nuestro trabajo a los 7 días post-irradiación así como el descenso en su expresión observado en los animales irradiados tratados con quercetina.

Hemos mostrado en nuestro trabajo un aumento significativo de la expresión de la enzima NQO1 a los 7 días post-irradiación y comprobamos que la quercetina no modificó dicha expresión, mientras que la expresión del factor Nrf2 disminuye significativamente en las ratas irradiadas suplementadas con quercetina. Se podrían explicar estos datos considerando que la quercetina, debido a su actividad eliminadora de radicales libres, produce derivados oxidados como el metiluro orto-quinona/quinona de la quercetina (QQ) que es un sustrato capaz de reaccionar con NQO1⁴⁴⁸. El hecho de que la expresión de NQO1 no se altere en el grupo de animales irradiados y tratados con quercetina puede ser atribuido, entre otros factores, a la necesidad adicional de la NQO1 de inactivar los productos oxidados de la quercetina.

La quercetina ha sido ampliamente utilizada como un antioxidante en varios estudios *in vitro* usando cultivos celulares^{12,449}, pero su actividad *in vivo* ha sido recientemente cuestionada. Estudiando ratas deficientes en vitamina E y suplementadas con vitamina E o varios flavonoides, incluyendo la quercetina, Duthie y cols⁴⁵⁰ observaron en 2012 que la suplementación *in vivo* con quercetina (100 mg/kg dieta) resultaba ineficaz para restaurar los índices de peroxidación lipídica en plasma y en hígado. Sin embargo la concentración de malondialdehído en suero estuvo inversamente correlacionada con la dosis oral diaria de quercetina (0,01 a 1 g/kg de peso corporal) transcurridos 22 días de tratamiento.

Se sospecha que la sobreexpresión de Nrf2 puede aumentar la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia mientras que la desregulación de Nrf2 podría volverlas más susceptibles a estos agentes⁴⁵¹. En células de hepatoma HepG2 incubadas con quercetina 0-40 μ M, el flavonoide no solo aumenta el estado de equilibrio de Nrf2 sino que también reduce el estado de equilibrio de Keap1 mediante la degradación de éste de forma no dependiente del proteosoma 26S²¹⁰. El mismo estudio concluye además que la quercetina es capaz de incrementar la proteína Nrf2 y al mismo tiempo inhibir su ubiquitinación, mientras que la expresión de Keap1 disminuye. Estos efectos han sido llevados a cabo en cultivos celulares sin tratamiento adicional. Recientemente Lin en 2012⁴⁵² indica que la combinación de

quercetina más radiación puede incrementar significativamente la radiosensibilidad de varias líneas celulares y del ratón. Nuestros datos han mostrado que la suplementación *in vivo* con quercetina repercute en el sistema antioxidante disminuyendo el estrés oxidativo y modificando la activación de Nrf2 y la expresión de varias enzimas antioxidantes. La administración de quercetina a los animales irradiados ayudaría a mantener el estado antioxidante de las células sanas y al mismo tiempo a disminuir la supervivencia de las células tumorales. Podemos inferir por nuestros resultados la existencia de un potencial efecto beneficioso de la quercetina al reducir el incremento en la expresión de Nrf2 asociado con el aumento del estrés oxidativo, incremento que podría ser útil para el crecimiento de los tumores.

6 Conclusiones

Conclusión primera

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min provoca la aparición de focos aislados puntiformes y sutiles de microhemorragias en los hemisferios cerebrales puestos de manifiesto mediante imágenes por resonancia magnética a partir de los 15 días post-irradiación. El previo tratamiento con quercetina previene la aparición de estas lesiones cerebrales.

Conclusión segunda

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min induce la aparición de lesiones histológicas en médula ósea, médula espinal, hipocampo e hígado a los 7 días post-irradiación, siendo más leves a los 30 días post-irradiación. La suplementación con quercetina no provoca una mejoría significativa de las lesiones producidas por la radiación ionizante sobre estos tejidos.

Conclusión tercera

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min provoca disminución significativa del valor hematócrito, de la concentración de hemoglobina y de los recuentos eritrocitario, leucocitario y plaquetario a los 7 días post-irradiación, sin que la suplementación oral con quercetina produzca modificaciones en dichos cambios.

Conclusión cuarta

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min provoca disminución significativa del recuento eritrocitario a los 30 días post-irradiación, sin que la suplementación oral con quercetina produzca modificaciones en dicho parámetro hematológico.

Conclusión quinta

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min provoca aumento de la ansiedad y disminución de la habituación y del comportamiento exploratorio

en el open field. La suplementación con quercetina manifiesta efectos ansiolíticos en el día 3 post-irradiación.

Conclusión sexta

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min hace disminuir el aprendizaje espacial puesto de manifiesto por el aumento del tiempo de latencia hasta encontrar la plataforma de escape en la prueba de Morris, y ralentiza el aprendizaje iniciado antes de la irradiación, sin efectos significativos de la suplementación con quercetina.

Conclusión séptima

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min produce una disminución significativa en la ingestión de alimento y producción de heces durante los días inmediatamente siguientes a la irradiación, recuperándose dichos valores a partir del día 6 post-irradiación, sin efectos provocados por la administración de quercetina.

Conclusión octava

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min produce un aumento significativo en la ingestión de agua y producción de orina durante el segundo día post-irradiación, recuperándose dichos valores a partir del día 6 post-irradiación, sin efectos provocados por la administración de quercetina.

Conclusión novena

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min genera estrés oxidativo puesto de manifiesto por el incremento significativo de la concentración hepática de TBARS tanto a los 7 como a los 30 días post-irradiación. Estos cambios se acompañan de un aumento significativo de las enzimas antioxidantes SOD-Cu/Zn, catalasa y NQO1 a los 7 días post-irradiación. El tratamiento con quercetina previene el estrés oxidativo hepático, reduciendo el incremento de este marcador de peroxidación lipídica y disminuyendo significativamente la expresión de SOD-Cu/Zn a los 7 y 30 días post-irradiación.

Conclusión décima

La administración de 6 Gy de rayos X a 0,4 Gy/min provoca un aumento significativo en la expresión del factor nuclear Nrf2 y del inhibidor Keap1 citosólico a los 7 y a los 30 días post-irradiación. El tratamiento con quercetina disminuye significativamente la expresión de Nrf2 y Keap1 respecto a los animales irradiados transcurridos los mismos períodos de tiempo.

Raquel Marina Hernández

León, 21 de diciembre de 2012

7 Bibliografía

1. Lehnert, S. (2007). *Biomolecular Action of Ionizing Radiation*. New York: Taylor & Francis Group LLC.
2. Ahmed, R. G. (2005). Damage Pattern as Function of Various Types of Radiations. *Med J of Islamic World Acad of Sci* **15**, 135-147
3. Waselenko, J. K., MacVittie, T. J., Blakely, W. F., Pesik, N., Wiley, A. L., Dickerson, W. E., Tsu, H., Confer, D. L., Coleman, C. N., Seed, T., Lowry, P., Armitage, J. O., y Dainiak, N. (2004). Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Ann Intern Med* **140**, 1037-1051
4. Lengyel, Z., Rékó, G., Matjtényi, K., Pisch, J., Csornai, M., Lesznyák Tron, L., y Esik, O. (2003). Autopsy verifies demyelination and lack of vascular damage in partially reversible radiation myelopathy . *Spinal Cord* **41**, 577-585
5. Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., VandenBerg, S. R., y Frike, J. R. (2004). Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat. Res.* **162**, 39-47
6. Wong, C. S. y Van der Kogel, A. J. (2004). Mechanisms of radiation injury to the central nervous system: implications for neuroprotection. *Mol Interv* **4**, 273-284
7. Pecaut, M. J., Haerich, P., Zuccarelli, C. N., Smith, A. L., Zendejas, E. D., y Nelson, G. A. (2002). Behavioral consequences of radiation exposure to simulated space radiation in the C57BL/6 mouse: open field, rotorod, and acoustic startle. *Cogn Affect Behav Neurosci* **2**, 329-3
8. Nair, C. K., Parida, D. K., y Nomura, T. (2001). Radioprotectors in Radiotherapy. *J Radiat Res* **42**, 21-37
9. Mccumber, L. M. (2004). The Potential Influence Of Cell Protectors For Dose Escalation In Cancer Therapy: An analysis Of Amifostine. *Medical Dosimetry* **29**, 139-143
10. Andrade, E. R., Da Costa Escobar Piccoli, J., Mânica da Cruz, I. B., Teixeira Rocha, J. B., Garzo, E., Marina, R., Mauriz, J. L., González, P., y Barrio, J. P. (2009). Radiomodifying effects of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats. *Nutrición Hospitalaria* **24**, 297-303
11. Andrade, E. R., Cruz, I. B., Andrade, V. V., Piccoli, J. C., Gonzalez-Gallego, J., Barrio, J. P., y Gonzalez, P. (2011). Evaluation of the potential protective effects

-
- of ad libitum black grape juice against liver oxidative damage in whole-body acute X-irradiated rats. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1026-1032
12. Benkovic, V., Knezevic, A. H., Dikic, D., Lisicic, D., Orsolic, N., Basic, I., y Kopjar, N. (2009). Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **60**, 129-138
 13. Boots, A. W., Haenen, G. R., y Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* **585**, 327-337
 14. Kim, G. N. y Jang, H. D. (2009). Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 530-537
 15. Egger, A. L., Gay, K. A., y Mesecar, A. D. (2008). Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol. Nutr. Food Res.* **52 Suppl 1**, S84-S94.10.1002/mnfr.200700249 [doi]
 16. Sykiotis, G. P. y Bohmann, D. (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* **14**, 76-65
 17. Kaspar, J. W., Niture, S. K., y Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1304-1309
 18. Ma, Z. C., Hong, Q., Wang, Y. G., Tan, H. L., Xiao, C. R., Liang, Q. D., Zhang, B. L., y Gao, Y. (2010). Ferulic Acid Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cell for Radiation Induced Oxidative Stress by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Bio Pharm Bull* **33**, 29-34
 19. Dias, A. S., Porawski, M., Alonso, M., Marroni, N., Collado, P. S., y González-Gallego, J. (2005). Quercetin decreases oxidative stress, NF-κB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* **135**, 2299-2304
 20. Tieppo, J., Cuevas, M., Vercelino, R., Tuñón, M. J., Marroni, N. P., y González-Gallego, J. (2009). Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr* **139**, 1339-1346
 21. Rubio, S., Quintana, J., Eiroa, J. L., Triana, J., y Estévez, F. (2007). Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. *Carcinogenesis* **28**, 2105-2113
 22. Ong, C. S., Tran, E., Nguyen, T. T., Ong, C. K., Lee, S. K., Lee, J. J., Ng, C. P., Leong, C., y Huynh, H. (2004). Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncol Rep* **11**, 727-733
 23. Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Tran-Thi, Q., Proksch, P., y Kahl, R. (2005). Low concentrations of flavonoids

- are protective in rats H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr* **135**, 525-531
24. De Marchi, U., Biasutto, L., Garbisa, S., Toninello, A., y Zoratti, M. (2009). Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1425-1432
 25. Imhoff, B. R. y Hansen, J. M. (2009). Extracellular redox status regulates Nrf2 activation through mitochondrial reactive oxygen species. *Biochem J.* **424**, 491-500
 26. Hertog, M. G. L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B. S., Toshima, H., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., y Katan, M. B. (1995). Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* **155**, 381-386
 27. Cook, N. C. y Samman, S. (1996). Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotection effects and dietary sources. *J Nutr Biochem* **7**, 66-76
 28. Manach, C., Morand, C., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., y Rémésy, C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett* **409**, 12-16
 29. Erlund, I., Marniemi, J., Hakala, P., Alfthan, G., Meririnne, E., y Aro, A. (2003). Consumption of black currants, lingonberries and bilberries increases serum quercetin concentrations. *Eur J Clin Nutr* **57**, 37-42
 30. da Silva, E. L., Piskula, M. K., Yamamoto, N., Moon, J. H., y Terao, J. (1998). Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett* **430**, 405-408
 31. Kawai, Y., Saito, S., Nishikawa, T., Ishisaka, A., Murota, K., y Terao, J. (2009). Different profiles of quercetin metabolites in rat plasma: comparison of two administration methods. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 517-523
 32. Chandrasekharan, D. K., Kagiya, T. V., y Nair, C. K. (2009). Radiation protection by 6-palmitoyl ascorbic acid-2-glucoside: studies on DNA damage in vitro, ex vivo, in vivo and oxidative stress in vivo. *J Radiat Res* **50**, 203-212
 33. Martínez, C., Duncker, R., y Fosado Márquez, M. G. (1995). Aspectos biológicos y médicos básicos sobre las radiaciones ionizantes.
 34. Koukourakis, M. (2012). Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. *Br J Radiol.* 10.1259/bjr/16386034 [doi]
 35. Mettler, F. A. y Bolees, G. L. (2002). Major radiation exposure--what to expect and how to respond. *N Engl J Med* **346**, 1554-1561
 36. Hall, J. E. y Giaccia, A. J. (2006). *Radiobiology for the Radiologist* 6 ed., pp. 117-124. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

-
37. Jackson, W. L., Gallager, C., Myhand, R. C., y Waselenko, J. K. (2005). Medical management of patients with multiple organs dysfunction arising from acute radiation syndrome. *BJR Suppl.* **27**, 161-168
 38. Bogo, V. (1988). Early behavioral toxicity produced by acute ionizing radiation. *Fundam Appl Toxicol* **11**, 578-579
 39. Tofilon, P. J. y Fike, J. R. (2000). The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. *Radiat. Res.* **153**, 357-370
 40. Rabin, B. M., Hunt, W. A., Joseph, J. A., Dalton, T. K., y Kandasamy, S. B. (1991). Relationship between linear energy transfer and behavioral toxicity in rats following exposure to protons and heavy particles. *Radiat. Res.* **128**, 216-221
 41. Reiter, R. J., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., y Tan, D. X. (2012). Melatonin protection from chronic, low-level ionizing radiation. *Mutat. Res.* **751**, 7-14
 42. Radford, I. R. (1986). Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol* **49**, 611-620
 43. Murray, D., Prager, A., y Milas, L. (1989). Radioprotection of cultured mammalian cells by the aminothiols WR-1065 and WR-255591: correlation between protection against DNA double-strand breaks and cell killing after X -radiation. *Radiat. Res.* **120**, 154-163
 44. Karbownik, M. y Reiter, R. J. (2000). Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **225**, 9-22
 45. Hall, J. E. y Giaccia, A. J. (2006). *Radiology for the Radiologist* 6 ed., pp. 339-360.
 46. Spitz, D. R., Azzam, E. I., y Gius, D. (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev* **23**, 322
 47. Azzam, E. I. (2011). Exposure to low level environmental agents: the induction of hormesis. *Mutat Res* **726**, 89-90
 48. Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P., y Pain, D. (2011). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* **327**, 48-60
 49. Petkau, A. (1987). Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury. *Br J Cancer* **8**, 87-95
 50. Khozouz, R., Hug, S. Z., y Perry, M. C. (2008). Radiation-induced liver disease. *J Clin Oncol* **26**, 4844-4845

-
51. Buonanno, M., Toledo, S. M., Pain, D., y Azzam, E. I. (2011). Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress. *Radiat. Res.* **175**, 415
 52. Nagasawa, H. y Little, J. B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α -particles. *Cancer Res* **52**, 6394-6396
 53. Ponnaiya, B., Suzuki, M., Tsuruoka, C., Uchihori, Y., Wei, Y., y Hei, T. K. (2011). Detection of chromosomal instability in bystander cells after Si490-ion irradiation. *Radiat. Res.* **176**, 280-290
 54. Puthran, S. S., Sudha, K., Rao, G. M., y Shetty, B. V. (2009). Oxidative stress and low dose ionizing radiation. *Indian J Physiol Pharmacol* **53**, 181-184
 55. Robert, N. y Cherry, J. R. (2001). *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* p. 48.
 56. Little, J. B. (2000). Radiation Carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**, 397-404
 57. Augustine, A. D., Gondre-Lewis, T., McBride, W., Millar, L., Pellmar, T. C., y Rockwell, S. (2005). Animal models for radiation injury, protection and therapy. *Radiat. Res.* **164**, 100-109
 58. Chukwuemeka, N., Philippe, M., Magdalene, N., y Onyeduligbo, O. (2012). Effects of total body irradiation on fatty acid and total lipid content of rats. *Pak J Pharm Sci* **25**, 169-173
 59. Manda, K., Ueno, M., y Anzai, K. (2008). Space radiation-induced inhibition of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus and memory impairment in mice: ameliorative potential of the melatonin metabolite, AFMK. *J Pineal Res* **45**, 430-438
 60. Barlind, A., Karlsson, N., Bjork-Eriksson, T., Isgaard, J., y Blomgren, K. (2010). Decreased cytogenesis in the granule cell layer of the hippocampus and impaired place learning after irradiation of the young mouse brain evaluated using the IntelliCage platform. *Exp. Brain Res.* **201**, 781-787
 61. Guan, J., Stewart, J., Ware, J. H., Zhou, Z., Donahue, J. J., y Kenedy, A. R. (2006). Effects of dietary supplements on the space radiation-induced reduction in total antioxidant status in CBA mice. *Radiat. Res.* **165**, 373-378
 62. Lalonde, R. y Strazielle, C. (2003). The effects of cerebellar damage on maze learning in animals. *Cerebellum* **2**, 300-309
 63. Hotz, M. E., Fliedner, T. M., y Meineke, V. (2010). Radiation accident preparedness: a European approach to train physicians to manage mass radiation casualties. *Health Phys* **98**, 894-897
 64. Whitnall, M. H., Elliot, T. B., Harding, R. A., Inal, C. E., Landauer, M. R., Wilhelmsen, C. L., McKinney, L., Miner, V. L., Jackson III, W. E., Loria, R. M., Ledney, G. D., y Seed, T. M. (2000). Androstenediol stimulates

-
- myelopoiesis and enhances resistance to infection in gamma-irradiated mice. *International Journal of Immunopharmacology* **22**, 1-14
65. Zhou, Y. y Mi, M. T. (2005). Genistein Stimulates Hematopoiesis and Increases Survival in Irradiated Mice. *J Radiat Res* **46**, 425-433
66. Hosseinimehr, S. J., Zakaryae, V., y Froughizadeh, M. (2006). Oral oxymetholone reduces mortality induced by gamma irradiation in mice through stimulation of hematopoietic cells. *Mol. Cell Biochem.* **287**, 193-199
67. Andrade, E. R., Da Costa Escobar Piccoli, J., Mânica da Cruz, I. B., Teixeira Rocha, J. B., Rocha, J. B., Andrade, V. V., González, P., Bauermann, L. F., y Barrio, J. P. (2009). Effect of black grape juice intake on liver peroxidation and body weight loss in whole body X-irradiated rats. *J Med CBR* **7**, 1-12
68. Li, X. H., Fu, D., Latif, N. H., Mullaney, C. P., Ney, P. H., Mog, S. R., Whitnall, M. H., Srinivasan, V., y Xiao, M. (2010). Delta-tocotrienol protects Mouse and human hematopoietic progenitors from gamma-irradiation through Erk/m TOR signaling. *Haematologica* **95**, 1996-2004
69. Dainiak, N. (2002). Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp. Hematol.* **30**, 513-528
70. El-Missiry, M. A., Frayed, T. A., El-Sawry, M. R., y El-Sayed, A. A. (2007). Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induce oxidative stress and tissue injury. *Ecotoxicology and environmental safety* **66**, 278-286
71. Abouf-Seif, M. A., El-Naggar, M. M., El-Far, M., Ramadam, M., y Salah, N. (2003). Prevention of biochemical changes in gamma-irradiated rats by some metal complexes. *Clinical Chemistry and Laboratory* **41**, 926-933
72. Little, J. B. (1999). Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**, 397-404
73. Upton, A. C. (1986). Evolving perspectives on the biology and mechanisms of carcinogenesis. *Leuk Res* **10**, 727-734
74. Donnelly, E. H., Nemhauser, J. B., Smith, J. M., Kazzi, Z. N., Farfán, E. B., Chang, A. S., y Naeem, S. F. (2010). Acute radiation syndrome: assessment and management. *South Med J* **103**, 541-546
75. Moulder, J. E. y Cohen, E. P. (2007). Future strategies for mitigation and treatment of chronic radiation-induced normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol* **17**, 141-148
76. Xiao, M. y Whitnall, M. (2009). Pharmacological Countermeasures for the Acute Radiation Syndrome. *Current Molecular Pharmacology* **2**, 122-133
77. Fliedner, T. M., Friesecke, I., Graessle, D., Paulsen, C., y Weiss, M. (2002). Hematopoietic cell renewal as the limiting factor in low-level radiation exposure: diagnostic implications and therapeutic options. *Military Medicine* **167**, 46-48

-
78. Suman, S., Maniar, M., Fornace, A. J. J., y Datta, K. (2012). Administration of ON 01210.Na after exposure to ionizing radiation protects bone marrow cells by attenuating DNA damage response. *Radiation Oncology* **7**.10.1186/1748-717X-7-6 [doi]
 79. Nenot, J. C. (2009). Radiation accidents over the last 60 years. *J Radiol Prot* **29**, 301-320
 80. Niazi, A. K. y Niazi, S. K. (2011). Endocrine effects of Fukushima: Radiation-induced endocrinopathy. *Indian J Endocrinol Metab* **15**, 91-95
 81. Citrin, D., Cotrim, A. P., Hyodo, F., Baum, B. J., Krishna, M. C., y Mitchell, J. B. (2010). Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist* **15**, 360-371
 82. Andrews, G. A. (1967). Radiation accidents and their management. *Radiat Res Suppl* **7**, 390-397
 83. Bentzen, S. M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Canver* **6**, 702-713
 84. Knight, A., Bailey, J., y Balcombe, J. (2006). Animal carcinogenicity studies: 2. Obstacles to extrapolation of data to humans. *Altern Lab Animal* **34**, 29-38
 85. Hosseinimehr, S. J. (2007). Foundation review: Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discovery Today* **12**, 794-805
 86. Blakely, E. A. y Kronenberg, A. (1998). Heavy-ion radiobiology: new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness. *Radiat. Res.* **150**, 126-145
 87. Shin, S. C., Lee, K. M., Kang, Y. M., Kim, C. S., Yang, K. H., Jin, Y. W., Kim, C. S., y Kim, H. S. (2010). Alteration of cytokine profiles in mice exposed to chronic low-dose ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun* **397**, 644-649
 88. Barnard, C. J. (2004). *Animal Behavior: Mechanism, Development, Function and Evolution*, Pearson Education Ltd. ed. Harlow.
 89. Fernández Parra, A. (1997). *Transtornos del comportamiento en la infancia. Fundamentos teóricos y prácticos*, Grupo Editorial Universitario ed. Granada.
 90. Ribes, E. (1990). *Psicología General*. Mexico: Trillas Ed.
 91. Pierce, W. D. y Cheney, C. D. (2004). *Behavior Analysis and Learning* 3 ed., pp. 1-27. Mahwah; New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.
 92. Pierce, W. D. y Cheney, C. D. (2004). *Behavior Analysis and Learning* 3 ed., pp. 27-53. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.
 93. Koolhaas, J. M., Baumans, V., Blom, H. J. M., von Holst, D., Timmermans, P. J. A., y Wiepkema, P. R. (2001). *Principles of Laboratory Animal Science* , editado

-
- por L. F. van Zutphen, V. Baumans, y A. C. Beynen, pp. 83-110. Amsterdam: Elsevier Publishing Company.
94. Hunt, P. S., Fanselow, M. S., Richardson, R., Mauk, M. D., Freeman, J. H., y Stanton Jr, M. E. (2007). Synapses, circuits, and the ontogeny of learning. *Dev Psychobiol* **49**, 649-663
 95. Vann, S. D. y Albasser, M. M. (2009). Hippocampal, retrosplenial, and prefrontal hypoactivity in a model of diencephalic amnesia: Evidence towards an interdependent subcortical-cortical memory network. *Hippocampus* **19**, 1090-1102
 96. Pothuizen, H. H., Davies, M., Albasser, M. M., Aggleton, J. P., y Vann, S. D. (2009). Granular and dysgranular retrosplenial cortices provide qualitatively different contributions to spatial working memory: evidence from immediate-early gene imaging in rats. *Eur J Neurosci* **30**, 877-888
 97. York, J. M., Blevins, N. A., Meling, D. D., Peterlin, M. B., Gridley, D. S., Cengel, K. A., y Freund, G. G. (2012). The biobehavioral and neuroimmune impact of low-dose ionizing radiation. *Brain Behav Immun* **26**, 218-227
 98. Maguire, E. A. (2001). The retrosplenial contribution to human navigation: a review of lesion and neuroimaging findings. *Scand. J. Psychol.* **42**, 225-238
 99. Buckner, R. L., Andrews-Hanna, J. R., y Schacter, D. L. (2008). The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1124**, 1-38
 100. Vann, S. D. y Aggleton, J. P. (2002). Extensive cytotoxic lesion of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory. *Behavioral Neuroscience* **116**, 85-94
 101. Cho, J. y Sharp, P. E. (2001). Head direction, place, and movement correlates for cell in the rat retrosplenial cortex. *Behav. Neurosci.* **115**, 3-25
 102. Van Groen, T. y Wyss, J. M. (2003). Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J. Comp. Neurol* **463**, 249-263
 103. Sugar, J., Witter, M. P., van Strien, N. M., y Cappaert, N. L. (2011). The retrosplenial cortex: intrinsic connectivity and connections with the (para)hippocampal region in the rat. An interactive connectome. *Front Neuroinform* **5**, 1-13.10.3389/fninf.2011.00007 [doi]
 104. Andersen, K., Morris, H., Morris, L., Morris, J., Amaral, D. J., Amaral, J., Vasseur, I., y O'Keefe, E. (2007). *The hippocampus Book*, Oxford University Press, Inc. ed. New York.
 105. Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Neurobiology* **3**, 225-229

-
106. Kasper, D. L., Braunwald, E., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., y Jameson, J. L. (2004). *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2nd ed., editado por H. McGraw.
 107. Bálentová, S., Hajmanová, E., Kinclová, I., Lehotsky, J., Dobrota, D., y Adamkov, M. (2012). Radiation-induced Long-term Alterations in Hippocampus under Experimental Conditions. *Klin Onkol* **25**, 110-116
 108. Schlessinger, A. R., Cowan, W. M., y Gottlieb, D. I. (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* **159**, 149-175
 109. Amaral, D. G. y Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591
 110. Achanta, P., Fuss, M., y Martínez, J. L. (2009). Ionizing Radiation Impairs the Formation of Trace Fear Memories and Reduces Hippocampal Neurogenesis. *Behavioral Neuroscience* **123**, 1036-1045
 111. Lazarini, F., Mouthon, M. A., Gheusi, G., Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., Lamarque, S., Nora Abrous, D., Boussin, F. D., y Lledo, P. M. (2009). Cellular and Behavioral Effects of Cranial Irradiation of the Subventricular Zone in Adult Mice. *Plos One* **4**, e7017
 112. Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* **93**, 74-104
 113. Gallagher, M., Burwell, R., y Burchinal, M. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience* **107**, 618-626
 114. Rosenzweig, E. S. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* **69**, 143-179
 115. Wilson, I. A., Ikonen, R. W., McMahan, M., Gallagher, M., Eichenbaum, H., y Tanila, H. (2003). Place cell rigidity correlates with impaired spatial learning in aged rats. *Neurobiology of aging* **24**, 297-305
 116. Villanueva, R. (2012). The cerebellum and neuropsychiatric disorders. *Psychiatry Research* **198**, 527-532
 117. Bauer, D. J., Kerr, A. L., y Swain, R. A. (2011). Cerebellar dentate nuclei lesions reduce motivation in appetitive operant conditioning and open field exploration. *Neurobiol Learn Mem.* **95**, 166-175
 118. Flagel, S. B., Clark, J. J., Robinson, T. E., Mayo, L., Czuj, A., Willuhn, I., Akers, C. A., Clinton, S. M., Phillips, P. E., y Akil, H. (2011). A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. *Nature* **469**, 53-57
 119. Stepanovic, S. R. y Nikolic, J. V. (1979). The effect of x-irradiation on the amount of dopamine in corpus striatum of the rat. *Experientia* **35**, 111-112
-

-
120. Markovska, V., Georgiev, V., y Ankov, V. (1979). Influence of x-ray irradiation on the effects of apomorphine and L-dopa with respect to the dopamine level in rat brain and corpus striatum. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* **5**, 27-34
 121. Morgado-Bernal, I. (2005). *Psicobiología del aprendizaje y la memoria*. Madrid, España.
 122. Baum, W. M. (1983). *Animal cognition and behavior* In R.L.Mellgren ed., pp. 253-278. New York: North-Holland.
 123. Benes, F. M., Wickramasinghe, R., Vincent, S., Khan, Y., y Todtenkopf, M. (1997). Uncoupling of GABA_A and benzodiazepine receptor binding activity in the hippocampal formation of schizophrenic brain. *Brain Res* **755**, 121-129
 124. Cunningham, M. G., Bhattacharya, S., y Benes, F. M. (2002). Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: Implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *Journal of Comparative Neurology* **453**, 116-130
 125. Ishizuka, S., Kasai, T., y Hara, H. (2000). Dietary sugar beet fiber ameliorates diarrhea as an acute gamma-radiation injury in rats. *Radiat. Res.* **154**, 261-267
 126. Bermúdez-Rattoni, F. F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 209-217
 127. Whishaw, I. Q. y Kolb, B. (2005). *The Behavior of laboratory rats*.
 128. Barrio, J. P. (1999). Técnicas para el registro de la ingestión de alimento en animales de laboratorio. *Nutr Hosp* **XIV**, 231-236
 129. Kissileff, H. R. (2000). Ingestive behavior microstructure, basic mechanisms and clinical applications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **24**, 171-172
 130. Zorrilla, E. P., Inoue, K., Fekete, E., Tabarin, A., Valdez, G. R., y Koob, G. F. (2005). Measuring meals: structure of prandial food and water intake of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R1450-R1467
 131. Smeets, P. A., Charbonnier, L., van Meer, F., van der Laan, L. N., y Spetter, M. S. (2012). Food-induced brain responses and eating behaviour. *Proc Nutr Soc* **29**, 1-10
 132. Stein, D. G., Finger, S., y Hart, T. (1983). Brain damage and recovery: problems and perspectives. *Behav Neural Biol* **37**, 185-222
 133. Chee, S. J. y Isaac, W. (1991). The effects of occipital ablation on a conditioned visual avoidance learning task in young and old rats. *Physiol Behav* **49**, 481-484
 134. Denham, J. W. y Hauer-Jensen, M. (2002). The radiotherapeutic injury - a complex 'wound'. *Radiotherapy and Oncology* **63**, 129-145

-
135. Stone, H. B., Coleman, C. N., Anscher, M. S., y McBride, W. H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* **4**, 536
 136. Schull, W. J., Norton, S., y Jensch, R. P. (1990). Ionizing radiation and the developing brain. *Neurotoxicology and Teratology* **12**, 249-260
 137. Flickinger, J. C., Kondziolka, D., Lunsford, L. D., Pollock, B. E., Yamamoto, M., Gorman, D. A., Schomberg, P. J., Sneed, P., Larson, D., Smith, V., McDermott, M. W., Miyawaki, L., Chilton, J., Morantz, R. A., Young, B., Jokura, H., y Liscak, R. (1999). A multi-institutional analysis of complication outcomes after arteriovenous malformation radiosurgery. *Int J Radiat Biol Phys* **44**, 67-74
 138. Erbayraktar, S., de Lanerolle, N., de Lotbinière, A., Knisely, J. P., Erbayraktar, Z., Yilmaz, O., Cerami, A., Coleman, T. R., y Brines, M. (2006). Carbamylated Erythropoietin Reduces Radiosurgically-Induced Brain Injury. *Mol Med* **12**, 74-80
 139. Jensch, R. P., Brent, R. L., y Vogel, W. H. (1986). Studies concerning the effects of low level prenatal X-irradiation on postnatal growth and adult behavior in the Wister rat. *Int J Radiat Biol* **50**, 1069-1081
 140. Rabin, B. M., Shulitt-Hale, B., Joshep, J. A., Carrihill-Knoll, K. L., Carey, A. N., y Cheng, V. (2007). Relative effectiveness of different particles and energies in disrupting behavioral performance. *Radiat Environ Biophys* **46**, 173-177
 141. Guelman, L., Zorrilla Zubilete, M. A., Rios, H., y Zieher, L. M. (2003). WR-2721 (amifostine, ethyol©) prevents motor and morphological changes induced by neonatal X-irradiation. *Neurochemistry International* **42**, 385-391
 142. Kameyama, Y. y Inouye, M. (1994). Irradiation injury to the developing nervous system: mechanisms of neuronal injury. *Neurotoxicology* **15**, 75-80
 143. Baskar, R. y Uma Devi, P. (2000). Influence of gestational age to low-level gamma irradiation on postnatal behavior in mice. *Neurotoxicology and Teratology* **22**, 593-602
 144. Rola, R., Raber, J., Rizk, A., Otsuka, S., VandenBerg, S. R., Morhardt, D. R., y Fike, J. R. (2004). Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* **188**, 316-330
 145. Andres-Mach, M., Rola, R., y Fike, J. R. (2008). Radiation effects on neural precursor cells in the dentate gyrus. *Cell Tissue Res* **331**, 251-262
 146. Naylor, A. S., Bull, C., Nilsson, M. K., Zhu, C., Björk-Eriksson, T., Eriksson, T., Blomgren, K., y Kuhn, H. G. (2008). Voluntary running rescues adult hippocampal neurogenesis after irradiation of the young mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14632-14637

-
147. Madsen, T. M., Kristjansen, P. E., Bolwing, T. G., y Wörtwein, G. (2003). Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* **119**, 635-642
 148. Wojtowicz, J. M., Askew, M. L., y Winocur, G. (2008). The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *Eur J Neurosci* **27**, 1494-1502
 149. Dubois, A. y Walker, R. I. (1988). Prospects for management of gastrointestinal injury associated with the acute radiation syndrome. *Gastroenterol.* **95**, 500-507
 150. Kim, J. S., Lee, H. J., Kim, J. C., Kang, S. S., Bae, C. S., Shin, T., Jin, J. K., Kim, S. H., Wang, H., y Moon, C. (2008). Transient impairment of hippocampus-dependent learning and memory in relatively low-dose of acute radiation syndrome is associated with inhibition of hippocampal neurogenesis. *J Radiat Res* **49**, 517-526
 151. Lee, H. J., Kim, J. S., Song, M. S., Seo, H. S., Yang, M., Kim, J. C., Jo, S. K., Shin, T., Moon, C., y Kim, S. H. (2010). Amifostine ameliorates recognition memory defect in acute radiation syndrome caused by relatively low-dose of gamma radiation. *J Vet Sci* **11**, 81-83
 152. Kempermann, G., Kuhn, H. G., y Gage, F. H. (1997). Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10409-10414
 153. Guerra, A., Rego, C., Laires, M. J., Castro, E. M., Silva, D., Monteiro, C., Silva, Z., Lebre, E., y Bicho, M. (2001). Lipid profile and redox status in high performance rhythmic female teenagers gymnasts. *J Sports Med Phys Fitness* **41**, 505-512
 154. Kumar, H., Lim, H. W., More, S. V., Kim, B. W., Koppula, S., Kim, I. S., y Choi, D. K. (2012). The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci* **13**, 10478-10504
 155. Fedorova, M., Kuleva, N., y Hoffmann, R. (2009). Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle protein in a rat model of acute oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* **1792**, 1185-1193
 156. Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Aviñó, J., Perez, P., y Estrelas, J. M. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associated with tumor growth in vivo. *Free Rad Biol Med* **26**, 410-418
 157. Jones, M. L., Mark, P. J., Lewis, J. L., Mori, T. A., Keelan, J. A., y Waddell, B. J. (2010). Antioxidant defenses in the rat placenta in late gestation: Increased labyrinthine expression of superoxide dismutases, glutathione peroxidases 3, and uncoupling protein 2. *Biology of Reproduction* **83**, 254-260
 158. Ciejka, E. y Goraca, A. (2008). Influence of low magnetic field on lipid peroxidation. *Polski merkuriusz lekarski* **24**, 106-108

-
159. Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* **65**, 27-33
 160. Halliwell, B. (1999). Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr Rev* **57**, 104-113
 161. Jacob, R. A. y Burri, B. J. (1996). Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* **63**, 985S-990S
 162. Martínez-Florez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* **17**, 271-278
 163. Anderson, D., Yu, T. W., Philips, B. J., y Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* **307**, 261-271
 164. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. t., Mazur, M., y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**, 44-84
 165. Dickinson, D. A. y Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and tiols metabolism. *Biochem Pharmacol* **64**, 1019-1926
 166. Klatt, P. y Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* **267**, 4928-4944
 167. Kaplowitz, N. y Tsukamoto, H. (1996). Oxidative stress and liver disease. *Prog Liver Dis* **14**, 131-159
 168. Dalle-Donne, L., Milzani, A., Gagliano, N., Giustaini, D., y Rossi, R. (2008). Molecular mechanism and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxidants & redox signaling* **10**, 445-473
 169. Bergmann, N., Bonhommeau, S., Lange, K. M., Greil, S. M., Eisebitt, S., de Groot, F., Chergui, M., y Aziz, E. F. (2010). On the enzymatic activity of catalase: an iron L-edge X-ray absorption study of the activity centre. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 4827-4832
 170. Mills, G. C. (1959). The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem* **234**, 502-506
 171. Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* **57**, 1825-1835
 172. Thompson, J. A., See, V. H., Thomas, P. M., y Schuller, K. A. (2010). Cloning and characterization of two glutathione peroxidase cDNA from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **156**, 287-297
 173. Fridovich, I. (1998). The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci* **7**, 2688-2690

-
174. Marikovsky, M., Ziv, V., Nevo, N., Harris-Cerruti, C., y Mahler, O. (2003). Cu/Zn Superoxide Dismutase Play Important Role in Immune Response. *The Journal of Immunology* **170**, 2993-3001
 175. Zelko, I. N., Mariani, T. J., y Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**, 337-349
 176. Edsmyr, F. y Menander-Huber, K. B. (1981). Orgotein efficacy in ameliorating side effects due to radiation therapy. *Eur J Rheumatol Inflamm* **4**, 228-236
 177. Ernest, L., Daniel, L., y Ljunggren, M. (1962). DT diaphorase. I. Purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties. *Biochim Biophys Acta* **9**, 171-188
 178. Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A., y Siegel, D. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* **129**, 77-97
 179. Hosoda, S., Nakamura, K., y Hayashi, K. (1974). Properties and reaction mechanism of DT diaphorase from rat liver. *J Biol Chem* **249**, 6416-6423
 180. Lind, C., Cadenas, E., Hochstein, P., y Ernster, L. (1990). DT-diaphorase: purification, properties, and function. *Methods Enzymol* **186**, 287-301
 181. Cadenas, E., Hochstein, P., y Ernest, L. (1992). Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. *Adv Enzymol Relat Areas Biol* **65**, 97-146
 182. Gutierrez, P. L. (2000). The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-Diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review. *Free Rad Biol Med* **29**, 263-275
 183. Sharkis, D. H. y Swenson, R. P. (1989). Purification by cibacron blue F3GA dye affinity chromatography and comparison of NAD(P)H:quinone reductase from rat liver cytosol and microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 434-441
 184. Winski, S. L., Koutalos, Y., Bently, D. L., y Ross, D. (2002). Subcellular localization of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human cancer cells. *Cancer Res* **62**, 1420-1424
 185. Navarro, F., Navas, P., Burgess, J. R., Bello, R. I., De Cabo, R., Arroyo, A., y Villalba, J. M. (1998). Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane. *Faseb J* **12**, 1665-1673
 186. Jaiswal, A. K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1199-1207

-
187. Dinkova-Kostova, A. T. y Talalay, P. (2000). Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic Biol Med* **29**, 231-240
188. Favreau, L. V. y Pickett, C. B. (1991). Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J Biol Chem* **266**, 4556-4561
189. Rushmore, T. H., Morton, M. R., y Pickett, C. B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* **266**, 11632-11639
190. McMahon, M., Yamamoto, M., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McLellan, L. I., Wolf, C. R., Cavin, C., y Hayes, J. D. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* **61**, 3299-3307
191. Gaikwad, A., Long, D. J., Stringer, J. L., y Jaiswal, A. K. (2001). In vivo role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the regulation of intracellular redox state and accumulation of abdominal adipose tissue. *J Biol Chem* **276**, 22559-22564
192. Beyer, R. E., Segura-Aguilar, J., Di Bernardo, S., Cavazzoni, M., Fato, R., Fiorentini, D., Galli, M. C., Setti, M., Landi, L., y Lenaz, G. (1996). The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2528-2532
193. Siegel, D., Bolton, E. M., Burr, J. A., Liebler, D. C., y Ross, D. (1997). The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol.* **52**, 300-305
194. Siegel, D. y Ross, D. (2000). Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Rad Biol Med* **29**, 246-253
195. Iskander, K., Gaikwad, A., Paquet, M., Long, D. J., Brayton, C., Barrios, R., y Jaiswal, A. K. (2005). Lower induction of p53 and decreased apoptosis in NQO1-null mice lead to increased sensitivity to chemical-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res* **65**, 2054-2058
196. Bello, R. I., Gómez-Díaz, C., Navarro, F., Alcaín, F. J., y Villalba, J. M. (2001). Expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in HeLa cells: role of hydrogen peroxide and growth phase. *J Biol Chem* **276**, 44379-44384
197. Beall, H. D., Murphy, A. M., Siegel, D., Hargreaves, R. H., Butler, J., y Ross, D. (1995). Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate): quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) as a target for bioreductive antitumor quinones: quinone

-
- cytotoxicity and selectivity in human lung and breast cancer cell lines. *Mol Pharmacol.* **48**, 499-504
198. Gong, X., Kole, L., Iskander, K., y Jaiswal, A. K. (2007). NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20s proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res* **67**, 5380-5388
199. Fagerholm, R., Hofstetter, B., Tommiska, J., Aaltonen, K., Vrtel, R., Jäkoski, K., Kallioniemi, A., Kilpivaara, O., Mannermaa, A., Kosma, V. M., Uusitupa, M., Eskelinen, M., Kataja, V., Aittomäki, K., von Smitten, K., Heikkilä, P., Lukas, J., Holli, K., Bartkova, J., Blomqvist, C., Bartek, J., y Nevanlinna, H. (2008). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet* **40**, 844-853
200. Ahn, K. S., Sethi, G., Jain, A. K., Jaiswal, A. K., y Aggarwal, B. B. (2006). Genetic deletion of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 abrogates activation of nuclear factor-kappaB, IkappaBalpha kinase, c-Jun N-terminal kinase, Akt, p38, and p44/42 mitogen-activated protein kinases and potentiates apoptosis. *J Biol Chem* **281**, 19798-19808
201. Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* **26**, 18-25
202. Wild, A. C., Moinova, H. R., y Mulcahy, R. T. (1999). Regulation of g-Glutamylcysteine Synthetase Expression by the Transcription factor Nrf2. *Biol Chem* **274**, 33627-33636
203. Kim, Y., Masutani, H., Yamaguchi, Y., Itoh, K., Yamamoto, K., y Yodoi, J. (2001). Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *J Biol Chem* **276**, 18399-18406
204. Dreger, H., Westphal, K., Weller, A., Baumann, G., y Stangl, K. (2009). Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res* **83**, 354-361
205. Venugopal, R. y Jaiswal, A. K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14960-14965
206. Chan, K., Han, X. D., y Kan, Y. W. (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4611-4616
207. Kimura, S., Warabi, E., Yanagawa, T., Ma, D., Itoh, K., Ishii, Y., Kawachi, Y., y Ishii, T. (2009). Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* **387**, 109-114

-
208. Marrot, L., Jones, C., Perez, P., y Meunier, J. R. (2007). The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 79-88
209. Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S., y Pickett, C. B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. *J Biol Chem* **278**, 4536-4541
210. Tanigawa, S., Fujii, M., y Hou, D. (2007). Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Rad Biol Med* **42**, 1690-1703
211. Ohnuma, T., Nakayama, S., Anan, E., Nishiyama, T., Ogura, K., y Hiratsuka, A. (2010). Activation of the Nrf2/ARE pathway via S-alkylation of cysteine 151 in the chemopreventive agent-sensor Keap-1 protein by falcariindiol, a conjugated diacetylene compound. *Toxicology and Applied Pharmacology* **244**, 27-36
212. Dinkova-Kostova, A. T. (2008). Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms. *Planta Med.* **74**, 1548-1559
213. Yao, K., Zhang, L., Zhang, Y., Ye, P., y Zhu, N. (2008). The flavonoid, fisetiin, inhibits UV radiation-induced oxidative stress and the activation of NF-kappaB and MAPK signaling in human lens epithelial cells. *Mol Vis* **14**, 1865-1871
214. Aleksunes, L. M. y Manautou, J. E. (2007). Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol.* **35**, 459-473
215. Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., y Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* **711**, 193-201
216. Tamminga, J. y Kovalchuk, O. (2011). Role of DNA damage and epigenetic DNA methylation changes in radiation-induced genomic instability and bystander effects in germline in vivo. *Current Molecular Pharmacology* **4**, 115-125
217. Cucinotta, F. A. y Chappell, L. J. (2010). Non-targeted effects and the dose response for heavy ion tumor induction. *Mutat Res* **687**, 49-53
218. Tubiana, M. (2009). Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review. *Radiother. Oncol.* **91**, 4-15
219. Hall, E. J. (2004). Henry S. Kaplan Distinguished Scientist Award 2003. The crooked shall be made straight; dose-response relationships for carcinogenesis. *Int J Radiat Biol* **80**, 327-337
220. Schonfeld, S. J., Bhatti, P., Brown, E. E., Linet, M. S., Simon, S. L., Weinstock, R. M., Hutchinson, A. A., Stovall, M., Preston, D. L., Alexander, B. H., Doody, M. M., y Sigurdson, A. J. (2010). Polymorphisms in oxidative stress and inflammation pathway genes, low-dose ionizing radiation, and the risk of breast

-
- cancer among US radiologic technologists. *Cancer Causes Control* **21**, 1857-1866
221. Ferradini, C. y Jay-Gerin, J. P. (1999). Radiolysis of water and aqueous solutions: history and present state of the science. *Can J Chem* **77**, 1542-1575
222. Sinha, S., Gupta, M., y Chandra, P. (1997). Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicol Environ Saf* **38**, 286-291
223. Berlett, B. S. y Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**, 20313-20316
224. Mikkelsen, R. B. y Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* **22**, 5734-5754
225. Jay-Gerin, J. P. y Ferradini, C. (2000). Are there protective enzymatic pathways to regulate high local nitric oxide (NO) concentrations in cells under stress conditions?. *Biochimie* **82**, 161-166
226. Frongillo, Y., Goulet, T., Fraser, M. J., Cobut, V., Patau, J. P., y Jay-Gerin, J. P. (1998). Monte Carlo simulation of fast electron and proton tracks in liquid water. II. Nonhomogeneous chemistry. *Radiat Phys Chem* **51**, 245-254
227. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation: an update. *FEBS Lett* **307**, 108-112
228. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* 4 ed., pp. 30-79.
229. Meesungnoen, J. y Jay-Gerin, J. P. (2005). High-LET radiolysis of liquid water with 1H^+ , 4He^{2+} , 12C^{6+} , and 20Ne^{9+} ions: effects of multiple ionization. *J Phys Chem A* **109**, 6406-6419
230. Goodhead, D. T. (1989). The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol* **56**, 623-634
231. Campa, A., Ballarini, F., Belli, M., Cherubini, R., Dini, V., Esposito, G., Friedland, W., Gerardi, S., Molinelli, S., Ottolenghi, A., Paretzke, H., Simone, G., y Tabocchini, M. A. (2005). DNA DSB induced in human cells by charged particles and gamma rays: experimental results and theoretical approaches. *Int J Radiat Biol* **81**, 841-854
232. O'Neill, P. y Wardman, P. (2009). Radiation chemistry comes before radiation biology. *Int J Radiat Biol* **85**, 9-25
233. Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F. L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A. J., Walkey, C., Maser, R. S., Tonon, G., Foerster, F., Xiong, R., Wang, Y. A., Shukla, S. A., Jaskelioff, M., Martin, E. S., Heffernan, T. P., Protopopov, A., Ivanova, E., Mahoney, J. E., Kost-Alimova, M., Perry, S. R., Bronson, R., Liao, R., Mulligan, R., Shirihai, O. S., Chin, L., y DePinho, R.

-
- A. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* **470**, 359-365
234. Nomura, T., Li, X. H., Ogata, H., Sakai, K., Kondo, T., Takano, Y., y Magae, J. (2011). Suppressive effects of continuous low-dose-rate γ irradiation on diabetic nephropathy in type II diabetes mellitus model mice. *Radiat. Res.* **176**, 356-365
235. Kadhim, M. A., Macdonald, D. A., Goodhead, D. T., Lorimore, S. A., Marsden, S. J., y Wright, E. G. (1992). Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation. *Nature* **355**, 738-740
236. Formenti, S. C. y Demaria, S. (2008). Local control by radiotherapy: is that all there is?. *Breast Cancer Res* **10**, 215.10.1186/bcr2160
237. Robbins, M. E. y Zhao, W. (2004). Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol* **80**, 251-259
238. Zhao, W. y Robbins, M. E. (2009). Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr Med Chem* **16**, 130-143
239. Hayashi, T., Kusunoki, Y., Hakoda, M., Morishita, Y., Kubo, Y., Maki, M., Kasagi, F., Kodama, K., Macphee, D. G., y Kyoizumi, S. (2003). Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol* **79**, 129-136
240. Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35
241. Azzam, E. I., de Toledo, S. M., y Little, J. B. (2003). Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* **22**, 7050-7057
242. Ilnytsky, Y. y Kovalchuk, O. (2011). Non-targeted radiation effects-an epigenetic connection. *Mutat Res* **714**, 113-125
243. Lorimore, S. A., Mukherjee, D., Robinson, J. I., Chrystal, J. A., y Wright, E. G. (2011). Longlived inflammatory signaling in irradiated bone marrow is genome dependent. *Cancer Res* **71**, 6485-6491
244. Weinberg, F. y Chandel, N. S. (2009). Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell Mol Life Sci* **66**, 3663-3673
245. Sarsour, E. H., Kumar, M. G., Chaudhuri, L., Kalen, A. L., y Goswami, P. C. (2009). Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants & redox signaling* **11**, 2985-3011
246. Allen, R. G. y Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med* **28**, 463-499
-

-
247. López-Barneo, J., López-López, J. R., Ureña, J., y González, C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* **241**, 580-582
248. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95
249. Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* **476**, 52-54
250. Cadet, J., Douki, T., y Ravanat, J. L. (2011). Measurement of oxidatively generated base damage in cellular, DNA. *Mutat Res* **711**, 3-12
251. Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715
252. Wilson, D. M., Kim, D., Berquist, B. R., y Sigurdson, A. J. (2011). Variation in base excision repair capacity. *Mutat Res* **711**, 100-112
253. Georgakilas, A. G., Holt, S. M., Hair, J. M., y Loftin, C. W. (2010). *Current Protocols in Cell Biology* John Wiley & Sons, Inc.
254. Feinendegen, L. E. (2002). Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol* **21**, 85-90
255. Brenner, D. J. y Ward, J. F. (1992). Constraints on energy deposition and target size of multiple damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* **61**, 737-748
256. Szatrowski, T. P. y Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* **51**, 794-798
257. Menon, S. G., Sarsour, E. H., Kalen, A. L., Venkataramen, S., Hitchler, M. J., Domenn, F. E., Oberley, L. W., y Goswami, P. C. (2007). Superoxide signaling mediates Nacetyl- L-cysteine-induced G1 arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* **67**, 6392-6399
258. Nagasawa, H., Li, C. Y., Maki, C. G., Imrich, A. C., y Little, J. B. (1995). Relationship between radiation-induced G1 phase arrest and p53 function in human tumor cells. *Cancer Res* **55**, 1842-1846
259. Kar, S., Subbaram, S., Carrico, P. M., y Melendez, J. A. (2010). Redox-control of matrix metalloproteinase-1: a critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* **174**, 299-306
260. Leach, J. K., Van Tuyle, G., Lin, P. S., Schmidt-Ullrich, R., y Mikkelsen, R. B. (2001). Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/ nitrogen. *Cancer Res* **61**, 3894-3901
261. Cadenas, E. y Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* **29**, 222-230
262. Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1476

-
263. Boveris, A., Cadenas, E., y Stoppani, A. O. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **156**, 435-444
264. Claude, A. (1975). The coming of age of the cell. *Science* **189**, 433-435
265. Champe, P. C., Harvey, R. A., y Ferrier, D. R. (2008). *Biochemistry* 4th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
266. Werner, E. y Werb, Z. (2002). Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J Cell Biol* **158**, 357-368
267. Sidoti-de Fraisse, C., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B., y VayssiŠre, J. L. (1998). TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* **17**, 1639-1651
268. Buonanno, M., de Toledo, S. M., y Azzam, E. I. (2011). Increased frequency of spontaneous neoplastic transformation in progeny of bystander cells from cultures exposed to densely-ionizing radiation. *Plos One* **6**, e21540.10.1371/journal.pone.0021540 [doi]
269. Qiao, L. y Wong, B. C. (2009). Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. *Drug Resist Updat* **12**, 55-64
270. Rosario, L. A., Arencibia, D. F., y Curveco, D. L. (2003). Sustancias radioprotectoras, clasificaci3n y sus mecanismos de acci3n. *RETEL Revista de Toxicologja en l3nea* 42-48
271. Srinivasa, P., Nathan, S., Suresh, T., y Perumalsamy, P. L. (2001). Antimicrobial activity of certain indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Ethnopharmacol* **74**, 217-220
272. Griffin, W. J. y Lin, G. D. (2000). Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. *Phytochemistry* **53**, 623-637
273. Yuhas, J. M. y Storer, J. B. (1969). Differential chemoprotection of normal and malignant tissues. *J Natl cancer Inst.* **42**, 331-335
274. Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N., y Sharma, R. K. (2005). Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother. Res.* **19**, 1-22.10.1002/ptr.1605 [doi]
275. Cermak, R. y Wolfram, S. (2006). The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms. *Curr. Drug Metab* **7**, 729-744
276. Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem.* **8**, 797-807
277. Shimoi, K., Masuda, S., Furugori, M., Esaki, S., y Kinae, N. (1994). Radioprotective effects of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis* **15**, 2669-2672
-

-
278. Wang , X. D. y Russel, R. M. (1999). Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr Rev* **57**, 263-272
279. Hou, D., Ose, T., Lin, S., Harazoro, K., Imamura, I., Kubo, M., Uto, T., Terehara, N., Yoshimoto, M., y Fujii, M. (2003). Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cell: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol* **23**, 705-712
280. Middleton, E. J., Kandaswami, C., y Theoharides, T. (2000). The effects of plants falvonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751
281. Hollman, P., Hertog, M., y Katan, M. (1996). Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart heart disease. *Biochemical Society Transactions* **24**, 785-789
282. Mira, L., Fernández, M., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M., y Jennings, K. (2002). Interactions of flavonoids with ironand copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* **36**, 1199-1208
283. Metodiewa, D., Jaiswal, A., Cenas, N., Dickancait., E., y Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may acts as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad Biol Med* **26**, 107-116
284. Gupta, S., Afaq, F., y Mukhtar, H. (2002). Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* **21**, 3727-3738
285. Rithidech, K. N., Tungjai, M., y Whorton, E. B. (2005). Protective effects of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **585**, 96-104
286. van Rijn, J. y van den Berg, J. (1997). Flavonoids as enhancers of x-ray-induced cell damage in hepatoma cells. *Clin Cancer Res* **3**, 1775-1779
287. Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., y Alcaraz, M. (2002). Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfur-containing compunds. *J Med Food* **5**, 125-135
288. Devi, P. U., Bisht, K. S., y Vinitha, M. (1998). A comparative study of radioprotection by *Ocimum* flavonoids and synthetic aminothiol protectors in the mouse. *Br. J. Radiol.* **71**, 782-784
289. Ganasoundari, A., Devi, P. U., y Rao, B. S. (1998). Enhancement of bone marrow radioprotection and reduction of WR-2721 toxicity by *Ocimum sanctum*. *Mutat. Res.* **397**, 303-312

-
290. Jagetia, G. C. y Reddy, T. K. (2002). The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mutat. Res.* **519**, 37-48.S1383571802001110 [pii]
291. Jankovic, T., Savikin, K., Menkovic, N., Aljancic, I., Leskovac, A., Petrovic, S., y Joksic, G. (2008). Radioprotective effects of *Gentianella austriaca* fractions and polyphenolic constituents in human lymphocytes. *Planta Med.* **74**, 736-740
292. Campbell, J. K., King, J. L., Harmston, M., Lila, M. A., y Erdman, J. W. (2006). Synergistic Effects of Flavonoids on Cell Proliferation in Hepa-1c1c7 and LNCaP Cancer Cell Lines. *Journal of Food Science* **71**, S358-S363.10.1111/j.1750-3841.2006.00013.x
293. Parihar, V. K., Prabhakar, K. R., Veerapur, V. P., Priyadasini, K. I., Unnikrishnan, M. K., y Rao, C. M. (2007). Anticlastogenic activity of morin against whole body gamma irradiation in Swiss albino mice. *Eur J Pharmacol* **557**, 58-65
294. Maliar, T., Jenidák, A., Kadrabova, J., y Sturdík, E. (2004). Structural aspects of flavonoids as trypsin inhibitors. *Eur J Med Chem* **39**, 241-248
295. Arima, H. y Danno, G. (2002). Isolation of antimicrobial compound from Guava (*Psidium guajava* L) and their structure elucidation. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 1727-1730
296. Chen, Y. R., Meyer, C. F., y Tan, T. H. (1996). Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 631-634
297. Maurya, D. K., Salvi, V. P., y Krishnan Nair, C. K. (2004). Radioprotection of normal tissues in tumor-bearing mice by troxerutin. *Eur J Med Chem* **39**, 241-248
298. Lee, H. J., Kim, J. S., Moon, C., Kim, J. C., Lee, Y. S., Jang, J. S., Jo, S. K., y Kim, S. H. (2008). Modification of gamma-radiation response in mice by green tea polyphenols. *Phytother. Res.* **22**, 1389-1383
299. Kalpana, K. B., Devipriya, N., Srinivasan, M., y Menon, V. P. (2009). Investigation of the radioprotective efficacy of hesperidin against gamma-radiation induced cellular damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* **676**, 54-61
300. Landauer, M., Srinivasan, V., y Seed, T. (2003). Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury. *Journal of Applied Toxicology* **23**, 379-385
301. Davis, T. A., Mungunsukh, O., Zins, S., Day, R. M., y Landauer, M. R. (2008). Genistein induces radioprotection by hematopoietic stem cell quiescence. *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 713-726
302. Day, R. M., Barshishat-Kupper, M., Mog, S. R., McCart, E. A., Prasanna, P. G., Davis, T. A., y Landauer, M. R. (2008). Genistein protects against biomarkers of
-

-
- delayed lung sequelae in mice surviving high-dose total body irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **49**, 361-372
303. Para, A. E., Bezjak, A., Yeung, I. W., Van, D. J., y Hill, R. P. (2009). Effects of genistein following fractionated lung irradiation in mice. *Radiother. Oncol.* **92**, 500-510
304. González, P., Andrade, E. R., Soares, F. A., Marina, R., y Barrio, J. P. (2011). Flavonoides como radioprotectores: Evidencias y Mecanismos de Acción. *Fisiología. Boletín Informativo de la SECF* **13**, 11-17
305. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., y Katan, M. B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food. Chem.* **40**, 2379-2383
306. Mullen, W., Edwards, C. A., y Crozier, A. (2006). Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr* **96**, 107-116
307. Chen, C. Y., Milbury, P. E., Lapsley, K., y Blumberg, J. B. (2005). Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr* **135**, 1366-1373
308. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., y Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**, 1007-1011
309. Le Marchand, L., Muerphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., y Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Natl. Cancer. Inst.* **92**, 154-160
310. Cao, G., Sofic, E., y Prior, R. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. *Free Rad Biol Med* **22**, 749-760
311. Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M. R., y Williamson, G. (2001). Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* **35**, 941-952
312. Moon, J. H., Tsushida, T., Nakahara, K., y Terao, J. (2001). Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after an oral administration of quercetin. *Free Rad Biol Med* **30**, 1274-1285
313. Devipriya, N., Sudheer, A. R., Srinivasan, M., y Menon, V. P. (2008). Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* **654**, 1-7
314. Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Fraga, C. G., y Oteiza, P. I. (2004). The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential Determinant of Flavonoid Antioxidant Effects. *Free Radical Research* **38**, 1311-1320

-
315. Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., y Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad Biol Med* **19**, 481-486
316. Bisht, K., Wagner, K. H., y Bulmer, A. C. (2010). Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology* **278**, 88-100
317. Williams, C. A. y Grayer, R. J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* **21**, 539-573
318. Barbaste, M., Berké, B., Dumas, M., Soulet, S., Delaunay, J. C., Castagnino, C., Arnaudinaud, V., Chèze, C., y Vercauteren, J. (2002). Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks. *J Nutr Health Aging* **6**, 209-223
319. Akhlaghi, M. y Bandy, B. (2009). Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 309-317
320. Williams, G., Cai, X. J., Elliott, J. C., y Harrold, J. A. (2004). Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav* **81**, 211-222
321. Cos, P., De Bryne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. V., y Vlietinck, A. J. (2004). Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem* **11**, 1345-1359
322. Vita, J. A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* **81**, 292S-297S
323. Lotito, S. B. y Fraga, C. G. (2000). Ascorbate protects (+)-catechin from oxidation both in a pure chemical system and human plasma. *Biol Res* **33**, 151-157
324. Urquiaga, I. y Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res* **33**, 55-64
325. Narang, H. y Krishna, M. (2005). Inhibition of radiation induced nitration by curcumin and nicotinamide in mouse macrophages. *Mol Cell Biochem* **276**, 7-13
326. Lee, N. J., Choi, J. H., Koo, B. S., Ryu, S. Y., Han, Y. H., y Lee, D. U. (2005). Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*. *Biol Pharm Bull* **28**, 2158-2161
327. Andreassi, M. G., Botto, N., Colombo, M. G., Biagini, A., y Clerico, A. (2000). Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 265-269
328. Dubner, D., Gisone, P., Jaitovich, I., y Perez, M. (1995). Free radicals production and estimation of oxidative stress related to gamma irradiation. *Biol Trace Elem Res* **47**, 265-270

-
329. Shimoi, K., Masuda, S., Shen, B., Furugori, M., y Kinae, M. (1996). Radioprotective effect of antioxidative plant flavonoids. *Mutat. Res.* **350**, 153-161
330. Brown, J., O'Prey, J., y Harrison, P. R. (2003). Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. *Carcinogenesis* **24**, 171-177
331. Jagetia, G. C. (2007). Radioprotective Potential of Plants and Herbs against the Effects of Ionizing Radiation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **40**, 74-81
332. Violi, F., Pignatelli, P., y Pulcinelli, F. M. (2002). Synergism among flavonoids in inhibiting platelet aggregation and H₂O₂ production. *Circulation* **105**, e53
333. Cetin, A., Kaynar, L., Kocyigit, I., Hacıoglu, S. K., Saraymen, R., Ozturk, A., Orhan, O., y Sagdic, O. (2008). The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. *Turk. J. Gastroenterol.* **19**, 92-98
334. Saada, H. N., Said, U. Z., Meky, N. H., y Abd el Azime, A. S. (2009). Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorder in rats. *Phytother. Res.* **23**, 434-438
335. Becker, E. M., Ntouma, G., y Skibsted, L. H. (2007). Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. *Food Chemistry* **103**, 1288-1296
336. Yang, J. y Liu, R. H. (2009). Synergistic effect of apple extract and quercetin 3-beta-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* **57**, 8581-8586
337. Hsieh, T. C. y Wu, J. M. (2009). Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, genistein and quercetin. *Anticancer Res.* **29**, 4025-4032
338. Lambert, J. D., Sang, S., y Yang, C. S. (2007). Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol* **20**, 583-585
339. Skibola, C. F. y Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Rad Biol Med* **29**, 375-383
340. Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., y Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2179-2205
341. Schmidt, M., Schmidt, H. J., Baumgart, A., Guédon, D., Netsch, M. I., Kreuter, M. H., Schmidlin, C. B., y Schrenk, D. (2005). Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food Chem Toxicol.* **43**, 307-314
342. Formica, J. V. y Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* **33**, 1061-1080

-
343. Lam, T. K., Rotunno, M., Lubin, J. H., Wacholder, S., Consonni, D., Pesatori, A. C., Bertazzi, P. A., Chanock, S. J., Burdette, L., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Caporaso, N. E., Subar, A. F., y Landi, M. T. (2010). Dietary quercetin, quercetin-gene interaction, metabolic gene expression in lung tissue and lung cancer risk. *Carcinogenesis* **31**, 634-642
344. Lodi, F., Jimenez, R., Menendez, C., Needs, P. W., Durate, J., y Perez-Vizcaino, F. (2008). Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidise, do not generate free radical and do not decrease nitric oxide bioavailability. *Planta Med.* **74**, 741-746
345. Boots, A. W., Li, H., Schins, R. P., Duffin, R., Heemskerk, J. W., Bast, A., y Haenen, G. R. (2007). The quercetin paradox. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**, 89-96
346. López-Lázaro, M., Willmore, E., y Austin, C. A. (2010). The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as a dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutat. Res.* **696**, 41-47
347. Morton, D. B. y Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* **116**, 431-436
348. Squire, L. F. y Novelline, R. A. (1997). *Squire's fundamentals of radiology*, 5 ed. Cambridge: Harvard University Press.
349. Borden, N. M. y Forseen, S. E. (2011). *Pattern Recognition Neuroradiology*. New York: Cambridge University Press.
350. Elmaoglu, M. y Çelik, A. (2012). *MRI Handbook. MR Physics, Patient Positioning, and Protocols*. New York: Springer.
351. Motulsky, H. (2007). *GraphPad Prism 5.0 Programming Guide* San Diego CA, USA: GraphPad Software Inc.
352. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* **72**, 248-254
353. Wills, E. (1987). *Biochemical toxicology: a practical approach*, editado por K. Snell y B. Mullock, pp. 407-420. Oxford.
354. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
355. Weiss, J. F. y Landauer, M. R. (2009). History and development of radiation-protective agents. *Int J Radiat Biol* **85**, 539-573
356. Jung, J. H., Kang, J. I., y Kim, H. S. (2012). Effect of quercetin on impaired immune function in mice exposed to irradiation. *Nutr Res Pract.* **6**, 301-307
-

-
357. Avila, M. A., Velasco, J. A., Cansado, J., y Notario, V. (1994). Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-mb468. *Cancer Res.* **54**, 2424-2428
358. Nagata, H., Takekoshi, S., Takeyama, R., Homma, T., y Yoshiyuki Osamura, R. (2004). Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **17**, 66-73
359. Tsuchihashi, S., Enomoto, Y., y Yamada, T. (1969). The mortality and body weigh response of male wistar rats in the letahl x-ray dose range. *J Radiat Res* **10**, 133-138
360. Ewoane, C., Portemer, C., Bernard, P., y Chatagner, F. (1982). Effect of in vivo irradiation of the rat on the taurine concentration of the heart. *Experientia* **38**, 1033
361. Conard, R. A. (1953). Effect of X-irradiation on weight and contest of rat stomach, small and large intestine. *Proc Soc Exp Biol Med* **82**, 33-37
362. Mihailovic, M., Milosevic, V., Grigorov, I., Poznanovic, G., Ivanovic-Matic, S., Grdovic, N., y Bogojevic, D. (2009). The radioprotective effect of alpha2-macroglobulin: A morphological study of rat liver. *Med Sci Monit* **15**, 188-193
363. Mihailovic, M., Dobric, S., Poznanovic, G., Petrovic, M., Uskokovic, A., Arambasic, J., y Bogojevic, D. (2009). The acute-phase protein alpha2-macroglobulin plays an important role in radioprotection in the rat. *Shock* **31**, 607-614
364. Mirjana, M., Goran, P., Nevena, G., Melita, V., Svetlana, D., Ilijana, G., y Desanka, B. (2010). The rat acute-phase protein alpha2-macroglobulin plays a central role in amifostine-mediated radioprotection. *J Radiat Res* **30**, 567-583
365. Supplee, H., Weinman, E. O., y Entenman, C. (1956). Enlargement of the liver in Sprague-Dawley rats following whole-body x-irradiation. *Am J Physiol* **185**, 583-588
366. Miot, E., Hoffschir, D., Alapetite, C., Gaboriau, G., Pontvert, D., Fetissof, F., Le Pape, A., y Akoka, S. (1995). Experimental MR study of cerebral radiation injury: quantitative T2 changes over time and hitopathologic correlation. *AJNR Am J Neuroradiol.* **16**, 79-85
367. Benczik, J., Tenhunen, M., Snellman, M., Joensuu, H., Färkkilä, M., Joensuu, R., Abo Ramadan, U., Kallio, M., deGritz, B., Morris, G. M., y Hopewell, J. W. (2002). Late radiation effects in the dog brain: correlation of MRI and histological changes. *Radiother. Oncol.* **63**, 107-120
368. Arbab, A. S., Janic, B., Jafari-Khouzani, K., Iskander, A. S., Kumar, S., Varma, N. R., Knight, R. A., Soltanian-Zadeh, H., Brown, S. L., y Frank, J. A. (2010). Differentiation of glioma and radiation injury in rats using in vitro produce magnetically labeled cytotoxic T-cells and MRI. *Plos One* **5**, e9365

-
369. Trivedi, R., Khan, A. R., Rana, P., Haridas, S., Hemanth Kuman, B. S., Manda, K., Rathore, R. K., Tripathi, R. P., y Khushu, S. (2012). Radiation-induced early change in the brain and behavior: serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation. *J Neurosci Res* **90**, 2009-2019
370. Huang, L., Smith, A., Cummings, P., Kendall, E. J., y Obenaus, A. (2009). Neuroimaging assessment of memory-related brain structures in a rat model of acute space-like radiation. *J Magn Reson Imaging* **29**, 785-792
371. Miot-Noirault, E., Akoka, S., Hoffschir, D., Pontvert, D., Gaboriau, G., Alapetite, C., Fetissof, F., y Le Pape, A. (1996). Potential of T2 relaxation time measurements for early detection of radiation injury to the brain: experimental study in pigs. *AJNR Am J Neuroradiol.* **17**, 907-912
372. Atwood, T., Robbins, M. E., y Zhu, J. M. (2007). Quantitative in vivo proton MR spectroscopic evaluation of the irradiated rat brain. *J Magn Reson Imaging* **26**, 1590-1595
373. Philippens, M. E., Gambarota, G., Van der Kogel, A. J., y Heerschap, A. (2009). Radiation effects in the rats spinal cord: evaluation with apparent diffusion coefficient versus T2 al serial MR imaging. *Radiology* **250**, 387-3970
374. Peiffer, A. M., Shi, L., Olson, J., y Brunso-Bechtold, J. K. (2010). Differential effects of radiation and age on diffusion tensor imaging in rats. *Brain Res* **1351**, 23-31
375. Kumar, S., Arbab, A. S., Jain, R., y Kim, J. (2012). Development of a novel animal model to differentiate radiation necrosis from tumor recurrence. *J Neurooncol* **108**, 411-420
376. Mihailovic, M., Vidakovic, M., Grdovic, N., Dinic, S., Uskokovic, A., Martinovic, V., y Blagojevic, J. (2009). The radioprotective efficacy of the rat acute-phase protein alpha2-macroglobulin on bone marrow cells. *Genetika* **41**, 29-39
377. Crescenti, E. J., Medina, V. A., Croci, M., Sambuco, L. A., Prestifilippo, J. P., Elverdin, J. C., Bergoc, R. M., y Rivera, E. S. (2011). Radioprotection of sensitive rat tissues by oligoelements Se, Zn, Mn plus Lachesis muta venom. *J Radiat Res* **52**, 557-567
378. Van der Kogel, A. J. (1986). Radiation-induced damage in the central nervous system: an interpretation of target cell response. *Br J Cancer Suppl.* **7**, 207-217
379. Mastaglia, F. L., McDonald, W. I., Watson, J. V., y Yogendran, K. (1976). Effects of x-irradiation on the spinal cord: an experimental study of the morphological changes in central nerve fibres. *Brain* **99**, 101-122
380. Mansoub, N. H. y Sarvestani, A. H. (2011). Effects of gamma irradiation on histomorphology of different organs in rats. *Annals of Biological Research* **2**, 580-585
-

-
381. Li, Y. Q., Chen, P., Haimovitz-Friedman, A., Reilly, R. M., y Wong, C. S. (2003). Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* **63**, 5950-5956
382. Moore, A. H., Olschowka, J. A., Williams, J. P., Paige, S. L., y O'Banion, M. K. (2004). Radiation-induced edema is dependent on cyclooxygenase 2 activity in mouse brain. *Radiat. Res.* **161**, 153-160
383. Wei, M., Li, H., Xu, D., Zhi, D., Liu, D., y Zhang, Y. (2012). Increased expression of EMMPRIN and VEGF in the rat brain after gamma irradiation. *J Korean Med Sci* **27**, 291-299
384. Hu, X., Johansson, I. M., Brännström, T., Olsson, T., y Wester, P. (2002). Long-lasting neuronal apoptotic cell death in regions with severe ischemia after photothrombotic ring stroke in rats. *Acta Neuropathol.* **104**, 462-470
385. Gultekin, F. A., Bakkal, B. H., Guven, B., Tasdoven, I., Bektas, S., Can, M., y Comert, M. (2012). Effects of ozone oxidative preconditioning on radiation-induced organ damage in rats. *J Radiat Res* 1-9
386. López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J. I., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., y Llanillo, M. (2005). Increased in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to t-BuOOH. *Biochim. Biophys. Acta* **1734**, 74-85
387. López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J. I., García-Montero, A. C., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., y Llanillo, M. (2007). Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes. *Free Radic Biol Med* **42**, 1106-1118
388. Chaudhuri, J. P. y Messerschmidt, O. (1982). Amount of peripheral reticulocytes as biologic dosimetry of ionizing radiation. *Oncology* **21**, 177-179
389. Tanke, H. J., van Vianen, P. H., Emiliani, F. M., Neuteboom, I., de Vogel, N., Tates, A. D., de Bruijn, E. A., y van Oosterom, A. T. (1986). Changes in erythropoiesis due to radiation or chemotherapy as studied by flow cytometric determination of peripheral blood reticulocytes. *Histochemistry* **84**, 544-548
390. Umegaki, K., Sugisawa, A., Shin, S. J., Yamada, K., y Sano, M. (2001). Different onsets of oxidative damage to DNA and lipids in bone marrow and liver rats given total body irradiation. *Free Rad Biol Med* **39**, 1066-1074
391. Lee, T. J., Know, H. C., Kim, J. S., Im, S. K., y Choi, K. C. (1988). The radiation effect on peripheral blood cell. *J Korean Soc Ther Radiol* **6**, 253-258
392. Ariznavarreta, C., Castillo, C., Segovia, G., Mora, F., Azcoitia, I., y Tresquerres, J. A. (2012). Growth hormone and aging. *Homo.* **54**, 132-141
393. Isla, A., Budke, M., García-Grande, A., Gómez de la Riva, A., Morales, C., y Rey, J. (2007). Radioprotección de la médula espinal mediante la hormona de crecimiento (GH). Estudio experimental en ratas. *Neurocirugía* **18**, 89-94

-
394. Manda, K., Ueno, M., y Anzai, K. (2009). Cranial irradiation-induced inhibition of neurogenesis in hippocampal dentate gyrus of adult mice: attenuation by melatonin pretreatment. *J Pineal Res* **46**, 71-78
395. Rola, R., Sarkissian, V., Obenaus, A., Nelson, G. A., Otsuka, S., Limoli, C. L., y Fike, J. R. (2005). High-LET radiation induces inflammation and persistent changes in markers of hippocampal neurogenesis. *Radiat. Res.* **164**, 556-560
396. Ishii, J., Natsume, A., Wakabayashi, T., Takeuchi, H., Hasegawa, H., Kim, S. U., y Yoshida, J. (2007). The free-radical scavenger edaravone restores the differentiation of human neural precursor cells after radiation-induced oxidative stress. *Neurosci Lett.* **423**, 225-230
397. Hall, C. S. (1941). Temperament: a survey of animal studies. *Psychol Bull.* **38**, 943
398. Prut, L. y Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* **463**, 3-33
399. Walsh, R. N. y Cummins, R. A. (1976). The open field: a critical review. *Psychol Bull.* **83**, 482-504
400. Archer, J. (1973). Test for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* **21**, 205-235
401. Van de Weerd, H. A. (1996)., Universiteit Utrecht.
402. Vasques, V., Brinco, F., Viegas, C. M., y Wajner, M. (2006). Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. *J Neurol Sci.* **244**, 23-29
403. Langen, B. y Dost, R. (2011). Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animals models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonist. *Atten Defic Hyperact Disord.* **3**, 1-12
404. Berti, S. L., Nasi, G. M., Garcia, C., Castro, F. L., Nunes, M. L., Rojas, D. B., Moraes, T. B., Dutra-Filho, C. S., y Wannmacher, C. M. (2012). Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats. *Metab Brain Dis.* **27**, 79-89
405. Taylor, S. B., Markham, J. A., Taylor, A. R., Kanaskie, B. Z., y Koenig, J. I. (2011). Sex-specific neuroendocrine and behavioral phenotypes in hypomorphic Type II Neuregulin 1 rats. *Behav Brain Res.* **224**, 223-232
406. Denenberg, V. H. (1969). Open-field behavior in the rat: what does it mean. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **159**, 852-859
407. Treit, D. y Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* **31**, 959-962
-

-
408. Whishaw, I. Q., Gharbawie, O. A., Clark, B. J., y Lehmann, H. (2006). The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. *Behav Brain Res.* **171**, 230-239
409. Liu, Y., Xiao, S., Liu, J., Zhou, H., Liu, Z., Xin, Y., y Suo, W. Z. (2010). An experimental study of acute radiation-induced cognitive dysfunction in a young rat model. *AJNR Am J Neuroradiol.* **31**, 383-387
410. Manda, K., Ueno, M., Moritake, T., y Anzai, K. (2007). Radiation-induced cognitive dysfunction and cerebellar oxidative stress in mice: protective effect of alpha-lipoic acid. *Behav. Brain Res.* **177**, 7-14.10.1016/j.bbr.2006.11.013 [doi]
411. Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., y O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681-683
412. Takai, N., Sun, X. Z., Ando, K., MISHIMA, K., y Takahashi, S. (2004). Ectopic neurons in the hippocampus may be a cause of learning disability after prenatal exposure to X-rays in rats. *J Radiat Res* **45**, 563-569
413. Oh, S. B., Park, H. R., Jang, Y. J., Choi, S. Y., Son, T. G., y Lee, J. (2012). Baicalein attenuates impaired hippocampal neurogenesis and the neurocognitive deficits induced by gamma-ray radiation. *Br J Pharmacol.* 10.1111/j.1476-5381.2012.02142.x [doi]
414. Yoneoka, Y., Satoh, M., Akiyama, K., Sano, K., Fujii, Y., y Tanaka, R. (1999). An experimental study of radiation-induced cognitive dysfunction in an adult rat model. *Br J Radiol* **72**, 1196-1201
415. An, L., Liu, S., y Zhang, T. (2012). Cognitive impairment in rats induced by nano-CuO and its possible mechanisms. *Toxicol Lett.* **213**, 220-227
416. Shukitt-Hale, B., Carey, A. N., Jenkins, D., Rabin, B. M., y Joseph, J. A. (2012). Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiol Aging* **28**, 1187-1194
417. Bhutada, P., Mundhada, Y., Bansod, K., Bhutada, C., Tawari, S., Dixit, P., y Mundhada, D. (2010). Ameliorative effect of quercetin on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurobiol Learn Mem.* **94**, 293-302
418. Smith, D. E. y Tyree, E. B. (1955). Influence of X-irradiation upon water consumption by the rat. *Am J Physiol* **184**, 127-133
419. García, J., Kimeldorf, D. J., Hunt, E. L., y Davies, B. P. (1956). Food and water consumption of rats during exposure gamma-radiation. *Radiat. Res.* **4**, 33-41
420. Gunter-Smith, P. J. (1989). Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum. *Radiat. Res.* **117**, 419-432
421. Karran, P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev.* **10**, 144-150

-
422. Bhosle, S. M., Huilgol, N. G., y Mishra, K. P. (2005). Enhancement of radiation-induced oxidative stress and cytotoxicity in tumor cells by ellagic acid. *Clin Chim Acta* **359**, 89-100
423. Basli, A., Soulet, S., Chaher, N., Mérillon, J. M., Chibane, M., Monti, J. P., y Richard, T. (2012). Wine polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev.* **2012**, 1-14.10.1155/2012/805762 [doi]
424. Bournival, J., Plouffe, M., Renaud, J., Provencher, C., y Martinoli, M. G. (2012). Quercetin and sesamin protect dopaminergic cells from MPP⁺-induced neuroinflammation in a microglia (N9)-neuronal (PC12) coculture system. *Oxid Med Cell Longev.* **2012**, 921941-9219520
425. Liu, Y., Zhang, L., Zhang, H., Liu, B., Wu, Z., Zhao, W., y Wang, Z. (2012). Exogenous melatonin modulates apoptosis in the mouse brain induced by high-LET carbon ion irradiation. *J. Pineal Res.* **52**, 47-56
426. Erlank, H., Elmann, A., Kohen, R., y Kanner, J. (2011). Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radic Biol Med* **51**, 2319-2327
427. Xi, J., Zhang, B., Luo, F., y Yang, T. (2012). Quercetin protects neuroblastoma SH-SY5Y cells against oxidative stress by inhibiting expression of Krüppel-like factor 4. *Neurosci Lett.* **527**, 115-120
428. Kahraman, A. y Erden Inal, M. (2002). Protective effects of quercetin on ultraviolet A light-induced oxidative stress in the blood of rat. *J Appl Toxicol* **22**, 303-309
429. Kohen, R. y Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* **30**, 620-650
430. Srinivasan, M., Sudheer, A. R., Pillai, K. R., Kumar, P. R., Sudhakaran, P. R., y Menon, V. P. (2007). Modulatory effects of curcumin on -radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* **24**, 98-105
431. Meydan, D., Gursel, B., Bilgici, B., Can, B., y Ozbek, N. (2011). Protective effect of lycopene against radiation-induced hepatic toxicity in rats. *J. Int. Med. Res.* **39**, 1239-1252
432. Irani, K., Xia, Y., y Zweier, J. L. (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**, 1649-1652
433. Orłowski, R. Z. y Baldwin, A. S. J. (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med.* **8**, 385-389
434. Okunieff, P., Swarts, S., Keng, P., Sun, W., Wang, W., Kim, J., Yang, S., Zhang, H., Liu, C., Williams, J. P., Huser, A. K., y Zhang, L. (2008).
-

Antioxidants reduce consequences of radiation exposure. *Adv Exp Med Biol.* **614**, 165-178

435. Nwozo, S. O., Okameme, P. E., y Oyinloye, B. E. (2012). Potential of piper guineese and Aframomum longiscapum to reduce radiation induced hepatic damage in male Wistar rats. *Radiats Biol Radioecol* **52**, 363-369
436. Bravard, A., Luccioni, C., Moustacchi, E., y Rigaud, O. (1999). Contribution of antioxidant enzymes to the adaptative response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int J Radiat Biol* **75**, 639-645
437. An, J. H., Kim, J., y Seong, J. (2004). Redox signaling by ionizing radiation in mouse liver. *Ann N Y Acad Sci* **1030**, 86-94
438. Azab, K., Mostafa, A. H., Ali, E. M., y Abdel-Aziz, M. A. (2011). Cinnamon extract ameliorates ionizing radiation-induced cellular injury in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* **74**, 2324-2329
439. Zerin, T., Kim, Y. S., Hong, S. Y., y Song, H. Y. (2012). Quercetin reduces oxidative stress damage induced by paraquat via modulating expression of antioxidant genes in A549 cells. *J Appl Toxicol*.10.1002/jat.2812 [doi]
440. Ikeda, H., Nishi, S., y Sakai, M. (2004). Transcription factor Nrf2/mafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem J.* **380**, 515-521
441. Kim, J. H., Joung, H. Y., Kang, S. A., Pyun, K. H., y Shim, I. (2007). Ginsenoside Rb1 as a suppressor in central modulation of feeding in the rat. *Appetite* **49**, 303-127
442. Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R. K., Rath, S. K., Ashush, H., Coulter, J., Blackford, A., Goodman, S. N., Bunz, F., Watson, W. H., Gabrielson, E., Feinstein, E., y Biswal, S. (2008). RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res.* **68**, 7975-7984
443. McDonald, J. T., Kim, K., Norris, A. J., Vlashi, E., Phillips, T. M., Lagadec, C., Della Donna, L., Ratikan, J., Szelag, H., Hlatky, L., y McBride, W. H. (2010). Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer Res.* **70**, 8886-8895
444. Tsukimoto, M., Tamaishi, N., Homma, T., y Kojima, S. (2010). Low-dose gamma-ray irradiation induced translocation of Nrf2 into nuclear in mouse macrophage RAW264.7. *J Radiat Res* **51**, 349-353
445. Arredondo, F., Echeverry, C., Abin-Carriquiry, J. A., Blasina, F., Antúnez, K., Jones, D. P., Go, Y. M., Liang, Y. L., y Dajas, F. (2010). After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Rad Biol Med* **49**, 738-747

-
446. Li, W., Khor, T. O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W. S., Yu, S., y Kong, A. N. (2008). Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 1485-1489
447. Lee, O. H., Jain, A. K., Papusha, V., y Jaiswal, A. K. (2007). An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J. Biol. Chem.* **282**, 36412-36420
448. Boots, A. W., Bast, A., y Haenen, G. R. (2005). No role of DT-diaphorase (NQO1) in the protection against oxidized quercetin. *FEBS Lett.* **579**, 677-682
449. Kook, D., Wolf, A. H., Yu, A. L., Neubauer, A. S., Priglinger, S. G., Kampik, A., y Welge-Lussen, U. C. (2008). The protective effect of quercetin against oxidative stress in the human RPE in vitro. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 1712-1720
450. Duthie, G. y Morrice, P. (2012). Antioxidant capacity of flavonoids in hepatic microsomes is not reflected by antioxidant effects *in vivo*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**. 10.1155/2012/165127 [doi]
451. Wang, X. J., Sun, Z., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G. T., Wong, P. K., y Zhang, D. D. (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**, 1235-1243
452. Lin, C., Yu, Y., Zhao, H. G., Yang, A., Yan, H., y Cui, Y. (2012). Combination of quercetin with radiotherapy enhances tumor radiosensitivity in vitro and in vivo. *Radiother. Oncol.* **104**, 395-400