

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Disminución de los efectos genotóxicos,  
citotóxicos y radiosensibilizante de  
bisfosfonatos mediante antioxidantes: un  
modelo experimental**

D<sup>a</sup>. Amparo Olivares Rueda

2014





**Instituto  
Universitario  
Investigación**  
Envejecimiento

**DISMINUCIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS,  
CITOTÓXICOS Y RADIOSENSIBILIZANTE DE  
BISFOSFONATOS MEDIANTE ANTIOXIDANTES: UN  
MODELO EXPERIMENTAL.**

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN  
ENVEJECIMIENTO**



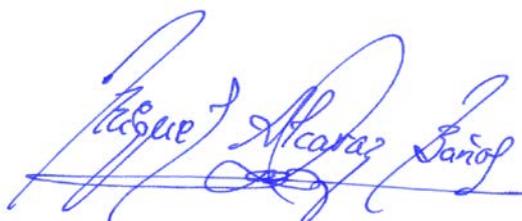
UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

**D. MIGUEL ALCARAZ BAÑOS, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL AREA DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA DEL DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA, ESTOMATOLOGIA Y RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis de Doctoral titulada “**DISMINUCIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS, CITOTÓXICOS Y RADIOSENSIBILIZANTE DE BISFOSFONATOS MEDIANTE ANTIOXIDANTES: UN MODELO EXPERIMENTAL.**”, presentada por **D<sup>a</sup>. AMPARO OLIVARES RUEDA**, se ha realizado bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de DERMATOLOGIA, ESTOMATOLOGIA Y RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA, y que se presenta para la obtención del grado de Doctor por la **Universidad de Murcia**.

En Murcia, a 3 de Marzo de 2014.


Facultad de Enfermería

Área de Radiología y Medicina Física

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
T. 868 88 3601 – [www.um.es/webs.um.es/mab](http://www.um.es/webs.um.es/mab)



# f SéNeCa<sup>(+)</sup>

Agencia de Ciencia y Tecnología  
Región de Murcia

Este trabajo se ha realizado con tres ayudas de la Agencia de Ciencia y Tecnología de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Fundación Seneca): una “**Beca para estudios de master universitario conducente al doctorado**” durante los años 2010 y 2011; una “**Beca-Contrato Predoctoral de Formación del Personal Investigador**” durante los años 2011, 2012, 2013 y 2014, dentro marco del Plan de Ciencia y Tecnología de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia 2007-2010, para desarrollar el proyecto titulado “Disminución de los efectos genotóxico, citotóxico y radiosensibilizante de bifosfonatos mediante flavonoides y polifenoles: un modelo experimental”, y una ayuda institucional para realizar una estancia predoctoral durante cinco meses (01/09/2013 - 31/01/2014) en el **Instituto Karolinska** (Estocolmo, Suecia) gracias al disfrute de una “**Ayuda para estancias cortas en centros distintos al de aplicación de los becarios-contratados FPI- 2013**” .



UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**



Este trabajo se ha realizado con una ayuda del **Programa CENIT** del **Ministerio de Ciencia e Innovación** del Gobierno de España titulado “Investigación industrial de dietas y alimentos con características específicas para personas mayores (Acrónimo: SENIFOOD)”.

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

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
T. 868 88 3601 – [www.um.es/webs.um.es/mab](http://www.um.es/webs.um.es/mab)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Miguel Alcaraz Baños, director de esta Tesis Doctoral, quien con su calidad científica y humana me acogió en su grupo de trabajo; le agradezco sinceramente su orientación, seguimiento y la supervisión continua de mi trabajo de investigación, pero sobre todo por su confianza y apoyo incondicional. Muchas veces ha sido casi como un padre para mí, y sin duda, un ejemplo a seguir.

A la Fundación Séneca de la Región de Murcia por concederme una beca predoctoral de formación de personal investigador integrada en el Plan de Ciencia y Tecnología de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia que me ha permitido estos 5 años de formación investigadora.

A mis compañeros del grupo de investigación “Radiología Experimental” de la Universidad de Murcia por su apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo. Al Profesor David Armero Barranco por su colaboración, interés y ayuda introduciéndome en las técnicas de laboratorio. A Daniel Achel y Encarnación Olmos por compartir tantos momentos de trabajo y dudas.

Mi agradecimiento más sincero al Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento, al Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales y al Servicio de Protección Radiológica. Por ello, a Antonia Bernabeu, José Muñoz, Juana García, M<sup>a</sup> Dolores Alcázar y Régulo Cánovas por haber puesto a mi disposición todo el material necesario para la realización de este trabajo.

Al profesor Thomas Helleday por aceptarme y brindarme la oportunidad de realizar mi estancia predoctoral en el Instituto Karolinska de Estocolmo. A todo el laboratorio Helleday: a mi supervisora, Petra Groth por todo lo que me ayudó, fue maestra y amiga; a Jose Calderón, por su compañerismo pero sobre todo por su amistad; a Jordi Carreras por su inolvidable apoyo; a Lars, Patrick, Oliver, Armando, Cissi, Sabin y a todos los que me han enseñado y han conseguido que me sintiera como en casa.

A mis amigos, por aguantarme en tantas ocasiones y siempre animarme a seguir.

A mi hermana y a mi cuñado, por estar siempre cuando los he necesitado, siendo un apoyo en todos los momentos difíciles.

A mis padres, sin ellos nunca hubiera podido llegar aquí, me han dado todas facilidades para poder hacer todo aquello que he querido, con confianza incondicional en todos los proyectos que me he propuesto. Gracias por todo, ¡os quiero!

A mi familia y amigos,  
por haber estado a mi lado animándome en todo momento.

## LISTA ABREVIATURAS

<b>AA</b> – ácido ascórbico	<b>FP</b> -factor de Protección
<b>AMF</b> - aminofosfatina	<b>FPP</b> - farnesil difosfato
<b>AMPc</b> - adenosín monofosfato cíclico	<b>FPPS</b> - farnesil pirofosfato sintasa
<b>ANT</b> - adenosina nucleótido translocasa mitocondrial	<b>FS</b> - factor de sensibilización
<b>API</b> - apigenina	<b>GA</b> - ácido gálico
<b>Apppl</b> - ATP análogo pro-apoptotico	<b>GGPP</b> - geranylgeranyl difosfato
<b>ATP</b> - adenosina-5'-( $\beta$ , $\gamma$ -diclorometileno)-trifosfato	<b>Gy</b> - Gray
<b>BP</b> - bisfosfonatos	<b>IC</b> - inhibición de crecimiento
<b>BSA</b> - Albúmina de suero bovino liofilizada	<b>IGF</b> - factor de crecimiento insulínico
<b>CB</b> -células binucleadas	<b>IPP</b> - pirofosfato isopentenil
<b>CBMN</b> -célula binucleada con micronúcleo en el citoplasma	<b>IR</b> - radiación ionizante
<b>CI</b> - índice de combinación	<b>MTT</b> - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
<b>CIK</b> - cloruro potásico	<b>N-BPs</b> - bisfosfonatos nitrogenados
<b>COL</b> - carnosol	<b>ONM</b> -osteonecrosis de los maxilares
<b>Cyt B</b> - cytochalasina B	<b>PBS</b> - tampón fosfato salino
<b>DMEM</b> - medio de Eagle modificado por Dulbecco	<b>PHA</b> -Phytohemagglutinin
<b>DMSO</b> - dimetilsulfóxido	<b>PTHrP</b> - hormona paratiroidea
<b>DRF</b> - factor redactor de dosis	<b>RA</b> - ácido rosmarínico
<b>E</b> - $\delta$ -tocoferol	<b>RANKL</b> - factor nuclear ligando $\kappa\beta$
<b>EA</b> - ácido elálgico	<b>ROS</b> - especies reactivas de oxígeno
<b>ER</b> - factor de potenciación (enhancement ratio)	<b>RT</b> - radioterapia
<b>FOD</b> - distancia foco objeto	<b>RUT</b> - rutina
	<b>RX</b> - rayos X
	<b>TLDs</b> - dosímetros de termoluminiscencia
	<b>Z</b> - ácido zolendrónico



# ÍNDICE

Pág

## **A) TESIS COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
I.1. Antecedentes.....	2
I.2. Trabajos presentados.....	13
I.3. Unidad científica de la tesis.....	18
<b>II. RESUMEN GLOBAL.....</b>	<b>21</b>
Objetivos.....	23
Material y Método.....	25
Resultados.....	58
Discusión.....	67
Conclusiones.....	73
<b>III. PUBLICACIONES.....</b>	<b>75</b>
Artículo I.....	76
Artículo II.....	77
Artículo III.....	78
Artículo IV.....	79
<b>IV. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>82</b>
<b>V. ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## **B) MENCIÓN INTERNACIONAL DEL TÍTULO DE DOCTOR**

<b>I. SUMMARY (≥ 2000 words).....</b>	<b>93</b>
<b>II. CONCLUSIONS.....</b>	<b>110</b>

## **I. INTRODUCCION GENERAL**

## I.1. ANTECEDENTES

Los bisfosfonatos (BP) son análogos estables de los pirofosfatos inorgánicos que tienen una gran afinidad por el calcio y que han demostrado su eficacia para el tratamiento de diversas patologías (Junquera LM, 2008; Guise T, 2008; Winter *et al.*, 2008; Langer and Hirsh, 2010; Neville-Webbe and Coleman, 2010). Son ampliamente utilizados como agentes terapéuticos para los trastornos de los huesos caracterizados por aumento de la resorción, por ejemplo, enfermedad de Paget (Seton M, 2013), la osteoporosis posmenopáusica (Thiébaud *et al.*, 1997; Delmas, 2002; Lee *et al.*, 2011), dolor óseo (Body *et al.*, 2004; Mancini *et al.*, 2004), la hipercalcemia en enfermedades neoplásicas (Langer and Hirsh, 2010; Ricciardi and Marinis, 2009), en diversos carcinomas, cáncer de mama (Heras *et al.*, 2009; Body *et al.*, 2003 2004), próstata (Dumon *et al.*, 2004; Morgan and Wagstaff, 2009; Epplen *et al.*, 2011), colorectal (Heras *et al.*, 2007), hueso (Coleman, 2005), y más recientemente en las metástasis óseas (Guise, 2008; Winter *et al.*, 2008).

### a) Estructura

A diferencia de los pirofosfatos que tienen una estructura P-O-P central, los bisfosfonatos tienen un átomo de carbono de transición entre los dos grupos fosfato. La fracción de P-C-P actúa como un "anzuelo del hueso" y es necesaria para su unión con los minerales en el hueso y la quelación con iones de calcio. La unión covalente al átomo de carbono son dos cadenas laterales (R1 y R2), de cuyas estructuras varían entre los diferentes bisfosfonatos (figura 1), que influyen en su actividad biológica (Winter *et al.*, 2008; Neville-Webbe and Coleman, 2010; Coleman, 2009; Valenti *et al.*, 2009; Langer and Hirsh, 2010)

Los bisfosfonatos se pueden clasificar en dos grupos según su estructura en la cadena lateral R2:

-Bisfosfonatos que contienen un átomo de nitrógeno (N-BPs), son significativamente más potentes desde el punto de vista biológico.

-Bisfosfonatos que no contienen nitrógeno (no-N-BPs).

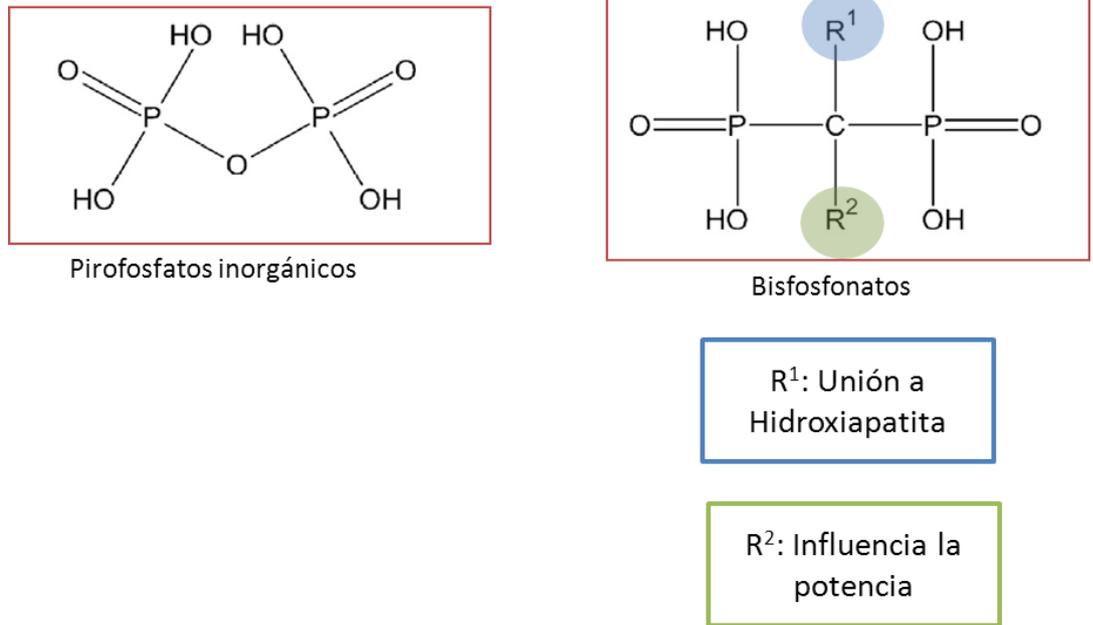


Figura 1. Estructura básica de los pirofosfatos inorgánicos y los bisfosfonatos. La estructura de los bisfosfonatos muestra dos grupos fosfatos unidos a un átomo de carbono (P-C-P). Las cadenas laterales (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) diferencian a los distintos bisfosfonatos (Giger *et al.*, 2013).

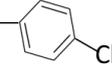
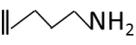
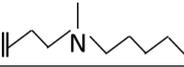
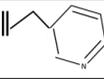
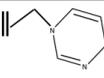
Bisfosfonato	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Año de entrada en el mercado americano
Etidronato	-OH	-CH <sub>3</sub>	1977
Clodronato	-CH	-Cl	*
Tiludronato	-H	-S- 	1997
Alendronato	-OH	- 	1995
Pamidronato	-OH	- 	1991
Ibandronato	-OH	- 	2003
Risodronato	-OH	- 	1998
Acido Zolendronico	-OH	- 	2007

Figura 2. Clasificación de los distintos bisfosfonatos según sus cadenas laterales R1 y R2 y su año de entrada en el mercado americano (\* no incluido en el mercado americano) (Giger *et al.*, 2013).

La potencia parece que viene dada por la posición y la conformación tridimensional de la cadena lateral R2 (figura 2). La presencia de un nitrógeno terciario en el lado de la cadena R2 aumenta aún más su capacidad de inhibir osteolisis. El ácido zoledrónico es el más potente comercialmente, y está caracterizado por un anillo de imidazol, con dos átomos de nitrógeno (Winter *et al.*, 2008)

## **b) Farmacología**

Los bisfosfonatos comparten propiedades comunes. Sin embargo, como ocurre con otras clases de fármacos, existen diferencias químicas, bioquímicas y farmacológicas entre los distintos compuestos. Diferencias en las afinidades de unión entre los bisfosfonatos influyen en su distribución diferencial dentro del hueso, su potencia biológica, y su duración de acción. Los efectos farmacológicos generales de los bisfosfonatos sobre el hueso, por lo tanto, parecen depender de estas dos propiedades clave de la afinidad por el mineral de los huesos y los efectos inhibitorios sobre los osteoclastos (Ebetino *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción es diferente entre los bisfosfonatos N-BPs y los no-N-BPs. Los bisfosfonatos de primera generación, tales como etidronato y clodronato, no contienen átomos de nitrógeno en su estructura y actúan como análogos de pirofosfatos. Se metabolizan a un análogo citotóxico de ATP, adenosina-5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -diclorometileno)-trifosfato, que inhibe la adenosin nucleótido translocasa mitocondrial (ANT) y, finalmente desencadena la apoptosis (Giger *et al.*, 2013).

Los bisfosfonatos que contienen nitrógeno (N-BP, por ejemplo, pamidronato, ibandronato, risedronato y ácido zoledrónico [Z]) inhiben la vía del mevalonato de la biosíntesis del colesterol *in vitro* y evitan la prenilación de proteínas en los osteoclastos (figura 3). La diana molecular de los bisfosfonatos es la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) (Russell *et al.*, 2008; van Beek *et al.*, 1999; Dunford *et al.*, 2001). Cuando se inhibe esta enzima, se reduce la cantidad de difosfato de farnesil (FPP) y geranylgeranyldiphosphate (GGPP) requeridos para la prenilación de proteínas. Esta prenilación de proteínas se requiere para la transferencia de dos intermedios lipídicos isoprenoides (farnesil difosfato y difosfato geranylgeranil) al resto de proteínas diana, tales como Rho, Rac, Ras, o Rab, que son importantes para la organización del

citoesqueleto y la morfología celular. Sin prenilación, la actividad de los osteoclastos se reduce y se produce la apoptosis (Rogers *et al.*, 2000; Green and Clézardin, 2002; Coleman *et al.*, 2005). También alteran la función de los osteoclastos por acumulación de pirofosfato isopentenil (IPP), el cual puede conjugarse con AMPc y ser convertido a Apppl a través de la vía aminoacil-tRNA-sintetasas.

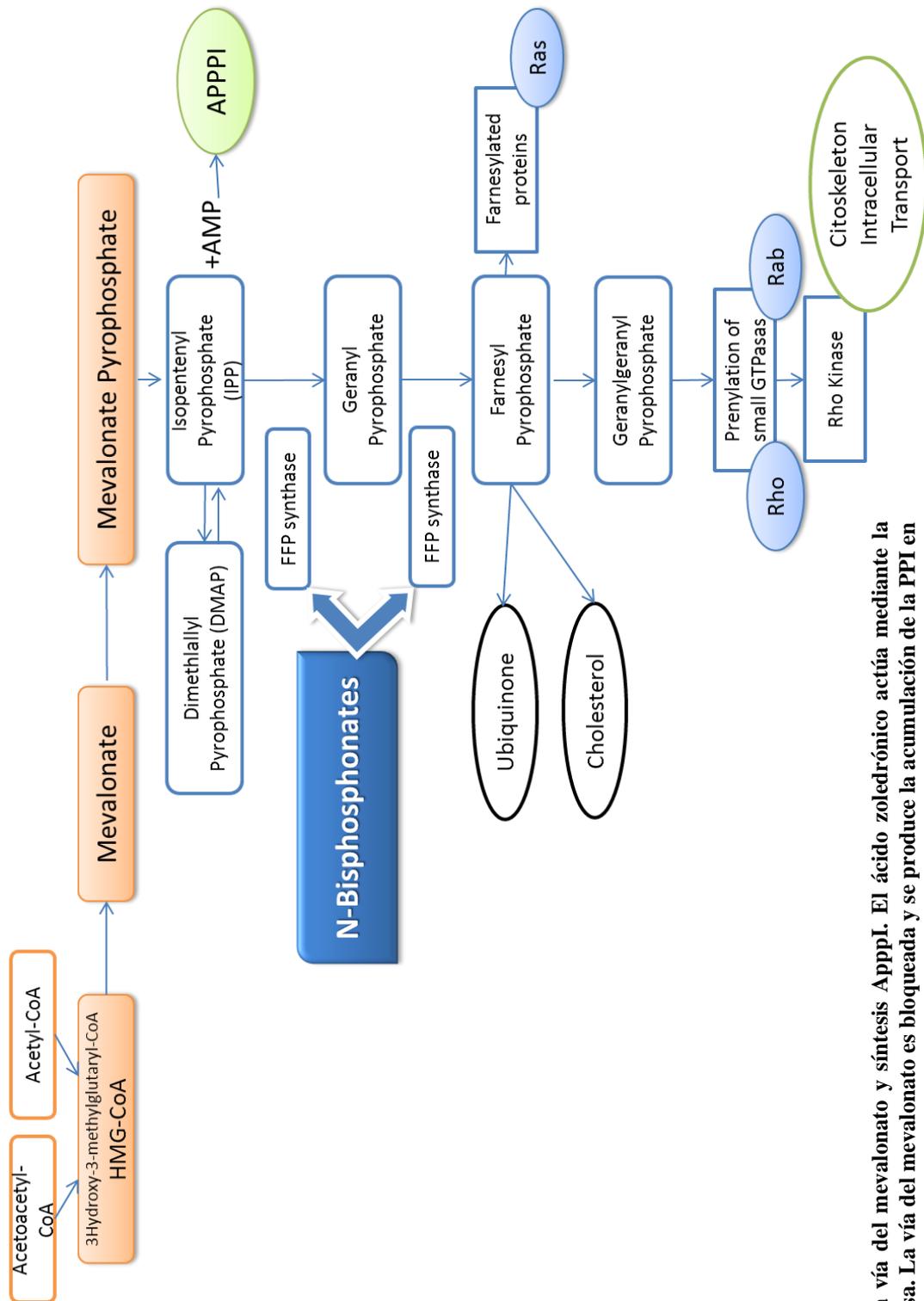


Figura 3. Diagrama de la vía del mevalonato y síntesis AppPI. El ácido zoledrónico actúa mediante la inhibición de la FPP sintasa. La vía del mevalonato es bloqueada y se produce la acumulación de la PPI en consecuencia. Además, la PPI se conjuga con AMP para formar un análogo del ATP, el AppPI.

Además de reducir la morbilidad esquelética, es cada vez más reconocido que los bifosfonatos pueden también ejercer efectos antitumorales directos o indirectos en muchos tipos de cáncer:

a) Directos: el mecanismo primario antitumoral de los bisfosfonatos consiste en la inducción directa de la apoptosis en osteoclastos y células tumorales. La concentración de los bisfosfonatos necesaria para inducir la apoptosis de células tumorales es mayor (10-100  $\mu\text{mol/L}$ ) que las necesarias para la inducción de la apoptosis de osteoclastos (Morgan and Lipton, 2010). Fromigue and Body (2002) demostraron que en las células in vitro, ambos no- N-BPs y N-BPs inducían apoptosis en el cáncer de mama MCF-7, pero fueron los N-BP (ibandronato, el ácido zoledrónico) los más potentes. Senaratne *et al.* (2002) demostraron que el ácido zoledrónico indujo apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama humano a través de la liberación mitocondrial de citocromo C y la activación la vía caspasa-3.

Se muestra en la literatura que la mayoría de las metástasis óseas por cáncer de mama son osteolíticas, lo que resulta en un aumento de la resorción ósea. En consecuencia, los bisfosfonatos se han utilizado ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama metastásico, ya que inhiben la resorción ósea (Body , 1998).

Además de la regulación positiva de la proteína proapoptótica de regulación bcl-2, la inhibición de la activación de Ras por el bloqueo de las enzimas involucradas en prenilacion de proteínas provocando la liberación del citocromo c y la activación caspasa-3, la caspasa-7, y la caspasa-9 que puede contribuir a los efectos del Z en la apoptosis de la célula tumoral mediante la fragmentación del ADN. Además, las mitocondrias participan en la amplificación de la señal apoptotica mediante la activación de la caspasa-8 (Shipman *et al.*, 1997).

b) Indirectos: se ha descrito que la reabsorción inducida por un tumor óseo provoca la liberación de una variedad de factores de crecimiento de la matriz ósea que estimulan aún más el crecimiento del tumor, creando así una retroalimentación positiva. Los bisfosfonatos puede impedir el crecimiento del tumor indirectamente por la inhibición de la reabsorción ósea y la posterior liberación de los factores

estimulantes de crecimiento, interrumpiendo el ciclo (Guise T, 2008; Winter *et al.*, 2008; Morgan and Lipton, 2010).

Fromigue and Body (2002) demostraron que varios factores de crecimiento (IGF-I, IGF-II y FGF-2) promueven la proliferación y supervivencia de la MCF-7 y T47D (líneas celulares de cáncer de mama in vitro). Describieron que la incubación con el ácido zoledrónico, pamidronato, ibandronato y el clodronato, inhibía los efectos estimulantes de IGF-1, IGF-II, FGF-2 y EGF en parte o completamente, con la reducción de la supervivencia del MCF-7 y T47D de las células del cáncer de mama in vitro.

La presencia de células tumorales en el hueso provoca reabsorción a un ritmo acelerado debido a que las células tumorales son capaces de promover la formación de osteoclastos y la liberación de factores derivados de células tumorales, como el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), prostaglandina-E y sialoproteína ósea. Factores como PTHrP, se unen a receptores en los osteoblastos y estimulan la producción de activador del receptor de factor nuclear ligando  $\kappa\beta$  (RANKL), un potente diferenciador, activador y factor de supervivencia de los osteoclastos. RANKL se une a su receptor sobre los osteoclastos que conduce a un aumento de la resorción del hueso. Los bisfosfonatos, como el Z, pueden regular la expresión de osteoprotegerina. Los factores de crecimiento secretados en la matriz ósea por los osteoblastos como factor de crecimiento transformante-b (TGF-b), las interleucinas similares a la insulina y factores de crecimiento (IGF), liberados posteriormente como resultado de la reabsorción ósea, hace que siga promoviendo la colonización de células tumorales, la proliferación y la supervivencia y la continuación de esta ciclo (Winter *et al.*, 2008).

La evidencia preclínica indica que los bisfosfonatos son potentes inhibidores de la angiogénesis, una clave proceso en el crecimiento y progresión tumoral. En modelos experimentales, el Z fue capaz de inhibir factores de crecimiento, estimuló la proliferación de células endoteliales in vitro, y demostró una inhibición dosis-dependiente de la angiogénesis in vivo. Además, el Z inhibe específicamente la integrina  $v\beta 3$  (Morgan y Lipton, 2010).

Los BP que contienen nitrógeno también muestran propiedades inmunomoduladoras, sobre todo en lo que respecta a la regulación de las células T  $\gamma\delta$ . Además la activación de la función citolítica de los linfocitos T, el Z también induce la maduración de interferón  $\gamma$  (Bosch-Barrera *et al.*, 2011). Las células T Gamma-Delta son conocidas por mediar en la respuesta inmune innata dirigida contra ciertas bacterias y células tumorales a través de reconocimiento de compuestos no peptídicos que contienen un residuo de fosfato (Guise T, 2008). Debido a que hay una similitud estructural entre los ligandos y los bisfosfonatos se sabe que estos pueden activar las células T  $\gamma\delta$ . Los bifosfonatos que contienen nitrógeno (alendronato, risedronato, y el pamidronato) han demostrado que estimulan la expansión de las células T  $\gamma\delta$  en células primarias mononucleares de sangre periférica (Kunzmann *et al.*, 2000).

Aunque todavía está en controversia, hay algunas pruebas que sugieren que el Z puede inhibir las metástasis viscerales. Estos efectos se atribuyen en gran parte a la inhibición de la migración y la invasión de células tumorales (Morgan and Lipton, 2010).

#### **c) Tratamiento combinado**

Un tratamiento bien establecido como tratamiento local de las metástasis óseas es la radioterapia. Aunque los efectos del tratamiento con la radiación son principalmente el resultado de la destrucción directa de las células tumorales, se ha demostrado que la eficacia de la radioterapia en parte se podría explicar por la inhibición de la actividad osteoclástica. Parece que el uso combinado de la radioterapia y bisfosfonatos es incluso más eficaz que cualquier tratamiento por separado (Journé *et al.*, 2006; Ural *et al.*, 2005; Morgan and Lipton, 2010).

#### **d) Efectos adversos**

Los bisfosfonatos son generalmente bien tolerados, pero se asocian con una gran variedad de efectos secundarios adversos, muchos de los cuales son relacionados con su forma de administración. Los efectos secundarios negativos de los bisfosfonatos se pueden clasificar en cuatro grupos principales: las reacciones de fase aguda, los efectos secundarios gastrointestinales, los efectos secundarios renales, y la

osteonecrosis (necrosis avascular o necrosis aséptica) de la mandíbula asociada a bisfosfonatos (BP-ONM), la última de las cuales fue descrita por primera vez por Marx en 2003 y desde entonces ha aumentado en frecuencia.

La osteonecrosis de los maxilares (ONM) es considerada principalmente como una complicación de la radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Una patología similar, la "fosfonecrosis," se observó en los siglos IXX y XX en los trabajadores expuestos a la metabólicamente activa el fósforo blanco utilizado en las fábricas (Pazianas, 2011). Su patogenia radica en la interrupción de la actividad remodeladora osteoclástica y del recambio (*turnover*) celular óseo, por lo tanto la actividad fisiológica del hueso (deposición y remodelación) se ve gravemente comprometida en pacientes tratados con bisfosfonatos (Migliorati *et al.*, 2006), agravada por una insuficiencia vascular localizada como consecuencia de cambios isquémicos.

### **Radioterapia y antioxidantes**

La mitad de los pacientes con tumor maligno sólido recibirán radioterapia (RT) con intención curativa o paliativa en el transcurso de su tratamiento. Los efectos secundarios indeseables pueden producir toxicidades agudas y crónicas que reducen la calidad de vida a largo plazo en estos pacientes (Bourgier *et al.*, 20012). Existe la necesidad de reducir la toxicidad de la radiación ionizante para proporcionar un mayor beneficio terapéutico y mejorar la calidad de vida general (Prasanna *et al.*, 2012).

Los agentes farmacológicos que se pueden utilizar antes o después de la radioterapia (RT) para reducir estos efectos secundarios indeseables, se clasifican en función del momento en el que se aplican en relación con la RT. Los llamados "Radioprotectores" se utilizan como una estrategia preventiva molecular antes de la RT, y se basan principalmente en las propiedades antioxidantes (Bourgier *et al.*, 2012).

Algunos estudios han proporcionado pruebas de que los antioxidantes podrían disminuir la eficacia de la terapia de radiación (Ferreira *et al.*, 2004; Lesperance *et al.*, 2002; Berk *et al.*, 2007). Aunque otros, sin embargo (Misirlioglu *et al.*, 2006; Lissoni *et*

*al.*, 1996), describen que la RT combinada con la administración de suplementos antioxidantes aumentó la supervivencia del paciente.

Ante esta problemática ha surgido un objetivo importante para ofrecer una nueva estrategia terapéutica que consiga proteger selectivamente a las células sanas de IR sin protección de las células tumorales cuando ambos tipos de células se exponen en forma conjunta a la IR. En este caso, las células normales pueden beneficiarse de sus efectos radioprotectores de las sustancias, mientras que por el contrario, las células tumorales sufrirían el efecto radiosensibilizador de las mismas (Alcaraz *et al.*, 2013). Este sería el objetivo básico de una excelente radioprotección, la intervención con antioxidantes para proteger los tejidos sanos de los efectos tóxicos inducidos por la RT, quimioterapia, o carcinógenos presentes en la terapia contra el cáncer.

Recientemente, se ha descrito de la capacidad de ciertos extractos de plantas que contienen polifenoles, flavonas, catequinas y procianiclinas que actúan eliminando los ROS y con efectos en distintas líneas celulares tanto *in vivo* como *in vitro* cuando se exponen a IR (Castillo *et al.*, 2000, 2001; Benavente-García O *et al.*, 2002; Alcaraz *et al.*, 2009, 2011).

Los extractos de romero han demostrado que poseen hasta un 95,1 % de capacidad para la eliminación de radicales con aproximadamente el 90 % de la actividad anti-oxidante atribuida a los diterpenos COL y ácido carnósico (Johnson, 2011). COL ha demostrado que inhibe  $\text{Cu}^{+2}$ , induciendo la oxidación de LDL y la producción de radicales libre en lípidos y en microsomas de hígado de ratón (Johnson *et al.*, 2010; Johnson, 2011), y es considerado un buen eliminador de radicales libres peróxido.

Según Prasanna *et al.* (2012), la búsqueda de un radioprotector universal que funcione en todos los tipos de tejidos y ubicaciones anatómicas es probable que produzca un éxito muy limitado, ya que los diversos órganos y tejidos difieren en factores tales como la sensibilidad a la radiación, la respuesta al daño del ADN, el estado de proliferación y la oxigenación de tejidos, capilarización, absorción de fármacos, y la activación, la liberación, y la respuesta a las citoquinas inflamatorias.

Además, los datos de un número limitado de ensayos controlados y aleatorios han demostrado que la suplementación con antioxidantes a dosis elevadas durante la radioterapia disminuye el control local del tumor y acorta la supervivencia de pacientes con cáncer al proteger también a las células tumorales de la RT o quimioterapia utilizada en su tratamiento. Aunque el potencial de daño de esta terapia adyuvante podría limitarse a unos pocos antioxidantes, la incertidumbre acerca de la dosis y de los compuestos exigirían evitar durante la radiación estos antioxidantes, menos que una clara evidencia disponible que los beneficios supere el riesgo potencial que se sospecha (Lawenda *et al.*, 2008).

## **I.2. TRABAJOS PRESENTADOS**

## ARTICULO I

### Zoledronic acid and radiation: toxicity, synergy or radiosensitization?

Alcaraz M, Olivares A, Armero D, Alcaraz-Saura M, Achel D.

*Clinical and Translational Oncology*, 2013;15 (4):300-306.

**Introducción:** El ácido zoledrónico (Z) es un bisfosfonato utilizado en el cáncer relacionado con la hipercalcemia, en las complicaciones de las metástasis óseas y en la osteoporosis posmenopáusica y que se ha relacionado con la osteoradionecrosis, especialmente cuando se asocia con radiación en las estructuras de cabeza y cuello.

**Objetivo:** Determinar la capacidad de radiosensibilización del ácido zoledrónico (Z) en el tratamiento combinado con radiación ionizante (IR) mediante la evaluación de su capacidad genotóxica y citotóxica en células no tumorales.

**Material y métodos:** El efecto genotóxico de Z se estudió mediante la prueba de micronúcleos en los linfocitos humanos bloqueados citogenéticamente (CBMN) antes y después de ser irradiados con 2 Gy de rayos X, mientras que el efecto citotóxico fue estudiado por la prueba de viabilidad celular (MTT) en la línea celular PNT2 (próstata normal) antes y después de la exposición a diferentes dosis de rayos X (0 Gy – 20 Gy) en cuatro grupos (Z solo, la radioterapia sola, Z+IR e IR+Z).

**Resultados:** se demostró un efecto citotóxico dependiente de la dosis y dependiente del tiempo del Z y de la IR en las células PNT2 in vitro ( $p > 0,001$ ). Con las concentraciones recomendadas para los seres humanos, el tratamiento combinado tenía un efecto más pronunciado que los tratamientos individuales ( $p < 0,001$ ). El efecto fue sinérgico ( $CI < 1$ ), con un aumento del incremento lesivo (enhancement ratio) del Z (2,6) y el factor de sensibilización (56 %); el efecto de Z era siempre mayor después de la exposición de IR. En el efecto genotóxico, sólo la administración de Z después de la irradiación (IR+Z) aumentó el daño cromosómico ( $p < 0,001$ ) y el factor de sensibilización (35,7 %).

**Conclusión:** altas concentraciones del Z son tóxicas, pero las concentraciones recomendadas para la práctica clínica en los seres humanos dan las características de un agente de radiosensibilización, cuyo efecto es aún mayor cuando se administra después de la radiación ionizante.

## ARTICULO II

### **Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines.**

*Alcaraz M, Olivares A, Achel DG, Alcaraz-Saura M.*

*Anticancer Research, 2013;33(8):3217-3224*

**Antecedentes:** Los bisfosfonatos se usan en la hipercalcemia relacionada con el cáncer, en las complicaciones de la metástasis en los huesos y en la osteoporosis posmenopáusica, y a menudo se han asociado con complicaciones adversos.

**Objetivo:** Determinar el efecto protector de la apigenina contra la inhibición del crecimiento de las células de próstata epitelial humana normal (PNT2), de adenocarcinoma de próstata de ratón transgénico (TRAMP-C1) y células del melanoma metastásico (B16F10) en tratamientos combinados con bisfosfonatos y la radiación ionizante (IR).

**Materiales y Métodos:** La inhibición del crecimiento en PNT2, TRAMP-C1 y las células B16F10 en los tratamientos combinados con bisfosfonatos (ácido zoledrónico, ibandronato y el pamidronato) y la IR en presencia y ausencia de apigenina se estudió usando un ensayo de viabilidad celular.

**Resultados:** El ácido zoledrónico tenía un efecto citotóxico sobre las células PNT2, TRAMP-C1 y B16F10. Sin embargo, el ibandronato y el pamidronato tenían un efecto citotóxico sólo en las células PNT2. La administración de apigenina en el tratamiento combinado con bisfosfonatos y IR mostró: una disminución en el efecto citotóxico sobre TRAMP-C1 y las células B16F10 en el tratamiento con ibandronato; un efecto protector sobre las células normales PNT2 y de melanoma, pero no en las células TRAMP-C1 en el tratamiento con ácido zoledrónico, y consiguió protección sólo a las células PNT2 en el tratamiento con pamidronato.

**Conclusión:** El uso del antioxidante produjo una mayor disminución en el efecto citotóxico sobre las células no tumorales que en las células tumorales cuando fueron tratadas solo con bisfosfonatos y podría ser utilizado en patologías no tumorales. Sin embargo, en un tratamiento combinado con IR, también puede proporcionar protección a las células tumorales, reduciendo de este modo el efecto deseado de la IR.

### ARTICULO III

#### **Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility.**

*Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J.*

*Clinical and Translational Oncology, 2013;15(9):712-719.*

**Objetivo:** Comparar el efecto genoprotectivo y radioprotector de carnosol (COL) contra el daño inducido por la radiación ionizante con efectos similares producidos por diferentes compuestos antioxidantes.

**Métodos:** El efecto genoprotectivo se estudió por medio de la prueba de micronúcleos para la actividad anti-mutagénica en las que se evaluó la reducción en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados citogenéticamente. Los efectos radioprotectores fueron estudiados por la prueba de viabilidad celular (MTT) en las líneas celulares PNT2 (próstata normal) y B16F10 (melanoma) cuando se administran antes de la exposición a diferentes dosis de rayos X (4, 6, 8, 10 y 0 Gy).

**Resultados:** El carnosol muestra una capacidad significativa genoprotective ( $p < 0,001$ ) contra la radiación con un factor de protección de 50 %, y un factor de reducción de la dosis de 4,3. La supervivencia celular obtenido con COL se administra antes de la exposición a 10 Gy de rayos X mostró un factor de protección de 55,1 %, la eliminación de 39 % de la muerte celular inducida por radiación en las células epiteliales normales de próstata (PNT2) ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, en las líneas celulares de melanoma (B16F10) ensayadas, COL actuaba no como un radioprotector, sino como un agente sensibilizante el aumento de la muerte celular por 34 % ( $p < 0,01$ ) y con un incremento en el efecto lesivo (enhancement ratio) del 2,12.

**Conclusiones:** El carnosol puede ser desarrollado como un agente radioprotector en las células no tumorales. Sin embargo, en las células del melanoma B10F16, la melanogénesis se activa COL conduce a la redistribución de los elementos enzimáticos de la vía del glutatión y la producción de cisteína-*liasa*, lo que podría poner en peligro el sistema de defensa redox intracelular. Este efecto aparece como un aumento en la capacidad de ionizar el daño inducido por la radiación, y por lo tanto presenta un efecto protector paradójico del COL en células de melanoma.

## ARTICULO IV

### Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells.

Alcaraz M, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Olivares A, López-Morata JA, Castillo J.  
*Anticancer Research, 2014;34 (in press)*

**Antecedentes:** El ácido rosmarínico es un éster del ácido cafeico con interesantes actividades biológicas incluyendo efectos antioxidantes y secuestradores de radicales libres de oxígeno.

**Objetivo:** determinar el efecto potencialmente paradójico del ácido rosmarínico, siendo típicamente radioprotector cuando se aplica a las células no tumorales, sin embargo, por el contrario muestra una acción sensibilizante cuando se aplica a las células de melanoma metastásico B16F10.

**Material y Método:** El efecto genoprotectivo se estudió mediante el ensayo de micronúcleos para la actividad anti-mutagénica en los que se evaluó la reducción en la frecuencia de micronúcleos utilizando linfocitos humanos bloqueados citogenéticamente. El efecto radioprotector se estudió a través de una prueba de viabilidad celular en las células PNT2 (epitelio de próstata humano) y células de melanoma B16F10.

**Resultados:** El ácido rosmarínico mostro una capacidad genoprotectiva significativa contra los rayos X con un factor de protección de 58 % , y un factor de reducción de la dosis de 7,2 . La supervivencia celular obtenido después de la exposición a 10 Gy de rayos X mostró un factor de protección de 47,5 % , eliminando de este modo 29,1 % de la muerte celular inducida por radiación en las células epiteliales de la próstata normal. Sin embargo, en las células de melanoma metastásico B16F10, ácido rosmarínico no actuó como un radioprotector, sino como un agente sensibilizante, aumentando la muerte celular un 42 % , con un incremento de la actividad lesional (enhancement ratio) del 2,36.

**Conclusión:** El ácido rosmarínico tiene una mayor capacidad para producir daño inducido por la radiación, y por lo tanto un efecto perjudicial paradójico en células de melanoma. Potencialmente, la investigación sobre sustancias como el ácido rosmarínico podría ayudar a aclarar los mecanismos que protegen a las células normales sanas mientras que daña exclusivamente las células neoplásicas, presentando así una nueva estrategia para los pacientes sometidos a radioterapia para el cáncer.

### I.3. UNIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS

Los cuatro artículos científicos presentados se incluyen en el proyecto de tesis presentado y que se corresponde con el proyecto de investigación por el que se obtuvo una Beca-Contrato Predoctoral de Formación del Personal Investigador en el año 2010 tiene por titulado “DISMINUCION DE LOS EFECTOS GENOTOXICOS, CITOTOXICOS Y RADIOSENSIBILIZANTE DE BISFOSFONATOS MEDIANTE FLAVONOIDES Y POLIFENOLES: UN MODELO EXPERIMENTAL”.

La utilización de los bisfosfonatos en diferentes tipos de tratamiento clínico como paliar el dolor oncológico, inhibición del desarrollo de las metástasis óseas o frenar el desarrollo de osteoporosis constituyen el interés terapéutico y científico de las sustancias que se pretenden estudiar; sin embargo, todas estas aplicaciones se encuentran limitadas por los efectos secundarios tóxicos inducidos por estos bisfosfonatos.

Esta tesis doctoral estudia los Bisfosfonatos más utilizados en la clínica para determinar dichos efectos tóxicos tanto sobre material genético (genotoxicidad) utilizando la técnica de recuento de micronúcleos sobre linfocitos humanos bloqueados citogenéticamente para la cuantificación de las lesiones cromosómicas; así como determinar sus efectos citotóxicos utilizando líneas celulares tanto normales como tumorales, para cuantificar su capacidad lesiva mediante la técnica clásica de supervivencia/viabilidad celular con MTT.

La unidad y el interés científico de esta tesis está en a) la cuantificación de la toxicidad (genotoxicidad y citotoxicidad) de los bisfosfonatos ensayados; b) la posibilidad de disminuir significativamente estos efectos tóxicos mediante la administración de sustancias antioxidantes, ricas en la dieta, y que permitirían aumentar la eficacia terapéutica de los bisfosfonatos disminuyendo sus efectos secundarios tóxicos; y c) determinar posibles mecanismos sensibilizantes de algunos de estos bisfosfonatos al combinarlos con la radiación ionizante que podrían explicar algunas de las complicaciones más frecuentes inducidas por estos bisfosfonatos.

En el desarrollo de la investigación, primero obtuvimos los resultados del efecto genotóxico “in vitro” y citotóxico “in vitro” del Ácido Zoledrónico (Z) sólo y en combinación con la radiación ionizante (administrada previamente o tras la administración del Z) a diferentes concentraciones, resultados que han sido publicados en un primer artículo titulado *“Zoledronic acid and radiation: toxicity, synergy or radiosensitization? Clin Transl Oncol. 2013; 15(4):300-306”*; continuamos ensayando distintos antioxidantes para valorar su capacidad radioprotectora en distintas líneas celulares obteniendo resultados paradójicos al utilizar la línea celular de melanoma metastasico B16F10 junto con Carnosol (resultados recogidos en un segundo artículo *“Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility Clin Transl Oncol. 2013; 15(9):712-719”*); y posteriormente lo vimos también con la administración del Ácido Rosmarinico (resultados publicados en un tercer artículo *“Radiosensitizing effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10. Cells Anticancer Res. 2014 (in press)”*). Finalmente, continuamos el desarrollo de estos efectos protectores con agentes antioxidantes dentro de nuestro proyecto de tesis, alcanzando el último eslabón de nuestra hipótesis que formulamos y ensayamos mediante el uso de antioxidantes para disminuir los efectos tóxicos del Z al ser combinados con radiación ionizante, y cuyos resultados estan recogidos en el cuarto artículo presentado *“Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines. Anticancer Res. 2013; 33(8):3217-3224”*.

Este trabajo desarrollado dentro del programa de la beca-contrato se explica bajo una misma directriz basada en el análisis de la toxicidad, estudiando tanto la genotoxicidad como la citotoxicidad celular para valorar la supervivencia celular frente al daño inducido por la radiación ionizante y otras sustancias quimioterápicas que consiguen modificar dicho daño. Nuestros resultados permiten concluir que la administración de sustancias antioxidantes consigue una disminución de la toxicidad de los agentes difosfonados pero al mismo tiempo también disminuyen su efecto lesivo en los tratamientos oncológicos en los que se utilizan como quimioterapicos asociados a radiación ionizante. Por ello su empleo debería quedar circunscrito, por el momento, al empleo de dichos bisfosfonatos solo en las patologías no tumorales. Por otro lado, el conocimiento de los mecanismos de acción de la actividad

radioprotectora de algunas de estas sustancias antioxidantes podría también utilizarse para conseguir una acción específica y selectiva de la radiación ionizante que permita lesionar a las células tumorales exclusivamente consiguiendo una protección de los tejidos normales incluidos en el mismo campo de radiación.

## **II. RESUMEN GLOBAL**

## II. RESUMEN GLOBAL

Las tesis presentadas dentro de Tesis Doctorales como la modalidad de Compendio de publicaciones han de contener necesariamente un apartado adicional denominado Resumen Global. Este debe contener los objetivos de la investigación y las conclusiones finales, en el que se unifiquen los resultados parciales presentados en cada uno de los trabajos.

Por ello, en cumplimiento de la norma académica se procede a exponer la Tesis por Compendio siguiendo los apartados siguientes:

Objetivos, Material y Método, Resultados, Discusión y Conclusiones

- **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Los objetivos que se han pretendido alcanzar en esta Memoria de Tesis Doctoral como Compendio de publicaciones son:

**1º.** Determinar el efecto genotóxico y citotóxico de los bisfosfonatos (ácido zoledrónico, ibandronato y pamidronato) aislados y en combinación con radiación ionizante para evaluar un posible efecto tóxico sinérgico entre ambas terapias.

**2º.** Valorar un posible efecto radiosensibilizante de estos bisfosfonatos que permita explicar algunos de los efectos tóxicos descritos tras la administración combinada con radiación ionizante.

**3º.** Determinar un posible efecto protector de algunos antioxidantes (carnosol, ácido rosmarínico y apigenina) frente a la toxicidad inducida por estos bisfosfonatos que podría permitir el incremento de su efecto terapéutico y/o de las dosis administradas.

**4º.** Evaluar las posibles consecuencias de un efecto protector de estas sustancias antioxidantes sobre los bisfosfonatos en su efecto terapéutico.

- **MATERIAL Y MÉTODO**

## MATERIAL

### 1. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Obtuvimos 26 muestras de sangre periférica de 25 ml cada una de 6 donantes supuestamente sanos mediante el sistema a vacío Venosafe™ (Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica), que heparinizamos mediante Heparina sódica 5% (Laboratorios Rovi, Spain).

### 2. MEDIO DE CULTIVO

Las muestras de sangre periférica se cultivaron en el medio de cultivo compuesto por:

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

### 3. TINCION DE LAS PREPARACIONES

Para la tinción de las preparaciones necesitaremos May-Grünwald (Merck, Darmstadt, Alemania) puro y diluido con agua destilada (Braun, Melsungen, Alemania) y Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania). También utilizaremos tampón fosfato 100 mM pH 6,2 y cubreobjetos.

### 4. CULTIVOS CELULARES

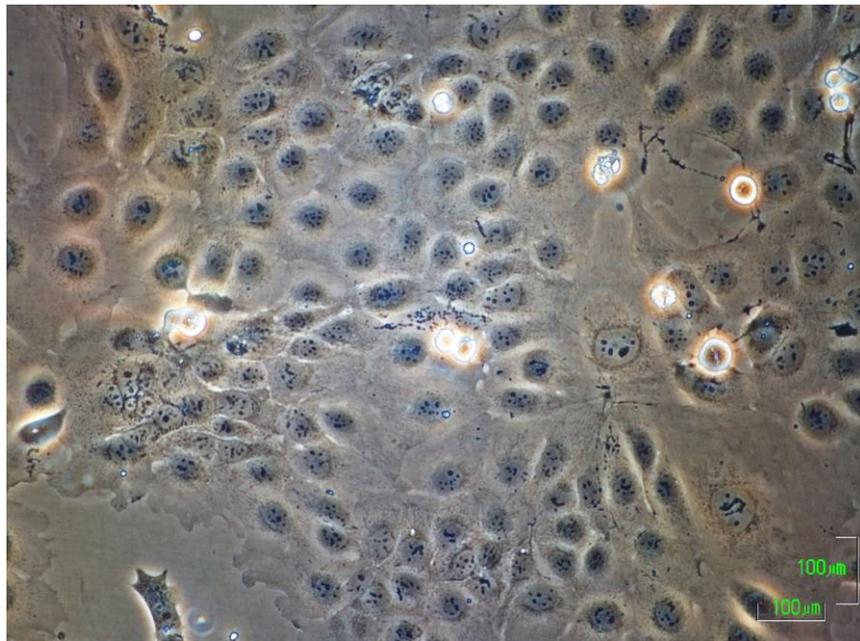
#### A) LÍNEA CELULAR

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

**-Línea celular epitelial de próstata PNT2 (HPACC, Reino Unido) (Figura 4).**

Línea celular epitelial de próstata humana normal, establecida a partir del tejido de próstata de un hombre de 33 años, e inmortalizada mediante la transfección de un plásmido con el genoma del virus SV40 con un origen de replicación defectivo.

La firma comercial suministradora es: HPA CC (Salisbury, Reino Unido). Para el cultivo de esta línea celular hemos utilizado el medio RPMI 1640 (Tabla I), tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con SBF (10%), glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml) y estreptomocina (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub>.



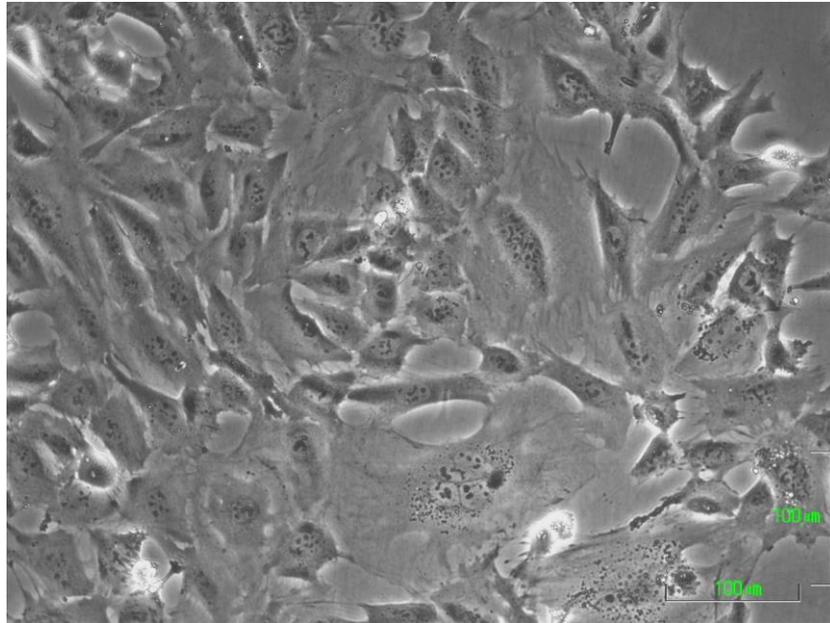
**Figura 4. Células de la línea PNT2 en cultivo (100X)**

**-Línea celular de carcinoma de ratón transgénico TRAMP-C1 (ATCC, EEUU) (Figura 5).**

Esta línea celular de carcinoma de próstata fue obtenida en 1996 de un tumor primario desarrollado en la cepa transgénica TRAMP. Estos ratones procedentes de la cepa C57BL/6 fueron diseñados para dirigir la expresión específica en el epitelio prostático del antígeno T grande del virus SV40. Todos los machos TRAMP se desarrollan, de forma espontánea y uniforme tras la pubertad, todo el espectro tumoral de la próstata, que semeja completamente a la patogenia del cáncer de próstata en humanos.

La firma comercial suministradora es: ATCC (EEUU). Para el cultivo de la línea celular TRAMP-C1 hemos utilizado el medio de DMEM con 4,5 gr/l de glucosa,

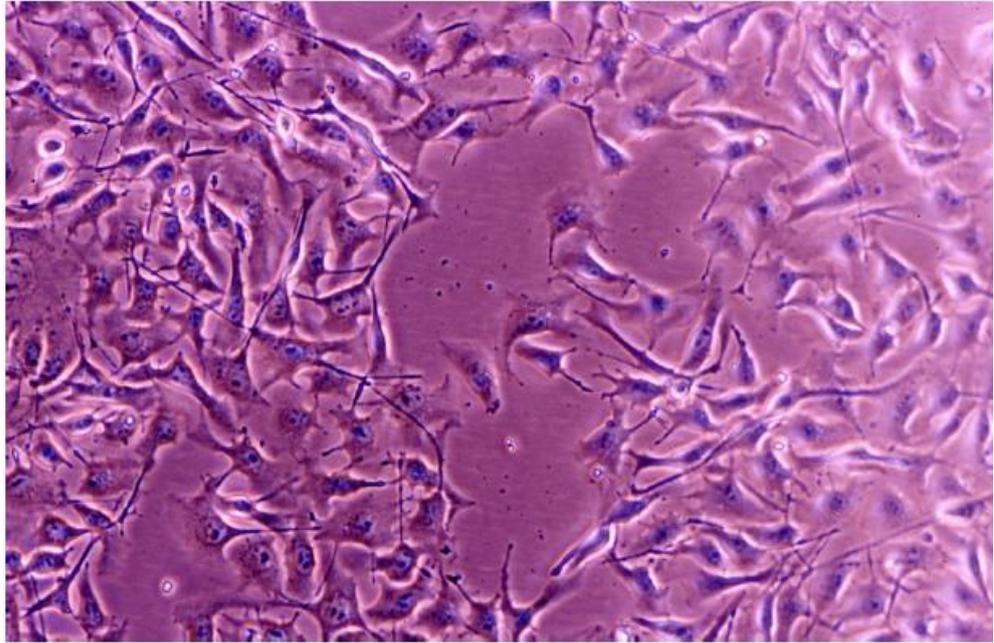
tamponado a pH de 7,2-7,4 y suplementado con suero bovino fetal (5 %) y Nu-Serum (5 %), glutamina (4 mM), deshidrosterona (10 nM), insulina (10 mgr/ml), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37 °C, con una humedad relativa del 90-95 % y una atmósfera con el 8 % de CO<sub>2</sub>.



**Figura 5. Células de la línea TRAMP-C1 en cultivo (100X)**

**-Línea celular de melanoma metastásico murino B16F10 (Figura 6).**

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



**Figura 6. Celulas de la linea B16F10 en cultivo (200X)**

Los medios de cultivo para el mantenimiento celular, se usaron con el marcador colorimétrico de pH (rojo fenol) y se han conservado en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, dentro de las estufas, con las condiciones de temperatura, humedad y concentración de CO<sub>2</sub> adecuados.

**Tabla I. Composición del Medio RPMI 1640**

<b>Sales inorgánicas</b>	<b>mg/l</b>	L-Leucina	50
Ca(NO <sub>3</sub> ),4H <sub>2</sub> O	100	L-Lisina. HCl	40
KCl	400	L-Metionina	15
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	48,84	L-Fenilalanina	15
NaCl	6.000	L-Prolina	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	800	L-Serina	30
		L-Treonina	20
<b>Otros componentes</b>	<b>mg/l</b>	L-Triptófano	5
D-Glucosa	2.000	L-Tirosina(sal disódica)	28,94
Glutatión (reducido)	1	L-Valina	20
Rojo Fenol	5		
		<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/l</b>	D-Biotin	0,20
L-Arginina HCl	241,86	D-Pantotenato Ca	0,25
L-Asparragina (base libre)	50	Cloruro de Colina	3
Ácido L-Aspártico	20	Ácido Fólico	1
L-Cisteina.2HCl	65,15	i-Inositol	35
Ácido L-Glutámico	20	Nicotinamida	1
L-Glutamina	300	Ácido para-aminobenzoico	1
Glicina	10	Piridoxal HCl	1
L-Histidina (base libre)	15	Riboflavina	0,20
L-Hidroxiprolina	20	Tiamina HCl	1
L-Isoleucina	50	Vitamina B <sub>12</sub>	0,005

**Tabla II. Composición del Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME)**

<b>Sales inorgánicas</b>	<b>mg/l</b>	L-Fenilalanina	66
Cloruro cálcico (anhidro)	200	L-Treonina	95
Cloruro potásico	400	L-Triptófano	16
Sulfato magnésico (anhidro)	97,67	L-Tirosina(sal disódica)	3,79
Cloruro sódico	6.400	L-Valina	94
Fosfato sódico monobásico	109	L-Serina	42
Nitrato férrico.9H <sub>2</sub> O	0,1	L-Glutamina	584
		Glicina	30
<b>Otros componentes</b>	<b>mg/l</b>		
D-Glucosa	4.500	<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Rojo Fenol.Na	5,9	D-Pantotenato (hemicalcio)	4
		Cloruro de Colina	4
<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/l</b>	Ácido Fólico	4
L-Arginina.HCl	84	Mio-Inositol	7,2
L-Cisteina.2HCl	62,6	Niacinamida	4
L-Histidina HCl. H <sub>2</sub> O	42	Piridoxal HCl	4
L-Isoleucina	105	Riboflavina	4
L-Leucina	105	Tiamina CL	4
L-Lisina.HCl	146		
L-Metionina	30		

## **B) MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS**

Las dos líneas se mantuvieron por medio de cultivo masivo y fueron conservadas por criop congelación. El cultivo masivo lo realizamos en frascos de 75 cm<sup>3</sup>, con el medio adecuado para cada línea. Todas las operaciones fueron realizadas en cabinas de flujo laminar vertical, Cultair ASB tipo II (Cultek S.L.U, Madrid, España) con el instrumental adecuadamente esterilizado.

El crecimiento celular fue controlado por la observación directa de los frascos con un microscopio invertido de contraste de fases, cambiando el medio aproximadamente cada dos días, o cuando el indicador de pH señalaba agotamiento. Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia formando una monocapa. En esta fase tratamos los cultivos con 2 ml de tripsina (0,1 mg/ml) y EDTA (0,2 mg/ml) durante 5 minutos en estufa a 37 °C y agitándolos hasta que las células se despegaban. Seguidamente, añadíamos 4 ml de medio frío suplementado con SBF y centrifugábamos a 214 g durante 10 minutos a 22 °C para eliminar completamente la enzima. Resuspendíamos el sedimento en 2 ml de medio fresco y procedíamos al recuento del número de células vivas en cámara hemocitométrica mediante un ensayo de exclusión de colorante (azul tripán) y calculábamos el inóculo necesario para nuevos frascos donde propagar el cultivo.

De los frascos de cultivo, tomábamos regularmente muestras de las dos líneas con el fin de comprobar la ausencia de contaminación por *Mycoplasma spp*, mediante fluorescencia directa con el colorante específico para el ADN (H33233, Hoecht, Alemania). Realizamos la criop congelación cuando los cultivos estaban próximos a la confluencia. Para las dos líneas celulares, procedíamos a la tripsinización y centrifugación. Resuspendíamos el sedimento en medio fresco suplementado con SBF hasta alcanzar una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml y se distribuían en ampollas de criop congelación con un 10 % (v/v) de DMSO como agente crioprotector.

En todos los casos, la criop congelación fue realizada primero en alcohol isopropílico que provoca una bajada de temperatura de 1 °C/minuto, hasta alcanzar los

-80 °C y seguidamente, colocábamos las ampollas en nitrógeno líquido para bajar la temperatura hasta -196 °C para su almacenamiento.

Para restablecer los cultivos a partir de los viales congelados, introducíamos el vial en un baño a 37 °C para su rápida descongelación. Seguidamente, en la cabina de flujo laminar, vertíamos el contenido en un tubo de centrifuga adicionando 10 ml de medio de cultivo para diluir el DMSO que contiene el medio de congelación. Tras centrifugar 10 minutos a 214 g, desechábamos el sobrenadante y resuspendíamos las células en 1-2 ml de medio de cultivo para realizar el recuento celular en cámara hemocitométrica utilizando como colorante el azul tripán y estimular la viabilidad celular tras la congelación. Después de ajustar la concentración, realizábamos la siembra en un frasco de cultivo para reiniciar el cultivo celular, cambiando el medio de cultivo a las 24 horas y suplementándolo con mayor proporción de SBF para las células con peor recuperación.

### **C) REACTIVOS**

**Medio DMEM y RPMI.** El medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el medio RPMI 1640 procedían de Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A, Madrid).

#### **Sustancias añadidas al medio de cultivo**

- a) Cytochalasina B (Cyt B) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se obtuvo en presentaciones de 1 y de 5 mg
- b) Solución Hipotónica de Cloruro Potásico o ClK (Probos, Madrid, España)
- c) Tampón Fosfato
- d) Solución Fijadora: Alcohol Metílico (Pancrea, Madrid, España) y Ácido Acético Glacial (Scharlao SL, Madrid, Spain)
- e) Formaldehido 1%

**MTT.** 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio de Pm 414,3 (Sigma-Aldrich Química S.A.), almacenado a 0-5° C en condiciones de absoluta oscuridad. Se

preparara en PBS frío a una concentración stock de 8 mg/ml y almacenado (no más de 1 mes) a 4 °C y en oscuridad hasta su utilización.

**DMSO.** Dimetilsulfóxido Pm 78 y d=1,1 g/l (Sigma-Aldrich Química S.A). Se utilizó con una pureza mínima del 99,5 % y mantenido a temperatura ambiente (nunca por debajo de 4 °C) en condiciones anhidras hasta su utilización.

**BSA.** Albúmina de suero bovino liofilizada, fracción V, con una pureza mínima del 96% (Sigma-Aldrich Química S.A.). Almacenada a 0-5 °C y se utilizó a la concentración de 20 mg/ml en PBS. Para su uso en cultivo se esterilizó por ultrafiltración.

## **5. SUSTANCIAS ENSAYADAS**

### **A. Bisfosfonatos**

1. Ácido Zoledrónico (Zometa<sup>®</sup>, Novartis (Barcelona, España) al 5 % y 100 %.
2. Ibandronato (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, España).
3. Pamidronato (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, España).

### **B. Polifenoles presentes en el romero**

4. Carnosol (Nutrafur Español S.A., Alcantarilla, Murcia).
5. Ácido Rosmarínico (Extrasynthèse S.A., Genay, Francia).

### **C. Otros compuestos fenólicos presentes en el Extracto de Olivo.**

6. Apigenina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### **D. Disolvente**

7. Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### **1. Ácido Zoledrónico**

El ácido Zoledronico (Zometa<sup>®</sup>, Novartis Farmacéutica, Barcelona, España) pertenece al grupo de bisfosfonatos de tercera generación y actúa específicamente en el hueso. Es un inhibidor de la resorción ósea osteoclástica. Se compone de un vial en

polvo y una ampolla disolvente. La dosis recomendada en hipercalcemia es de 4 mg de ácido Zoledrónico solución para perfusión, reconstituido y posteriormente diluido (diluido con 50 ml de cloruro sódico al 0,9 % p/V o solución de glucosa al 5 % p/V), administrados como perfusión intravenosa única durante 15 minutos.

Nosotros utilizamos PBS para disolver el ácido zoledrónico a un 100 % y un 5 %.

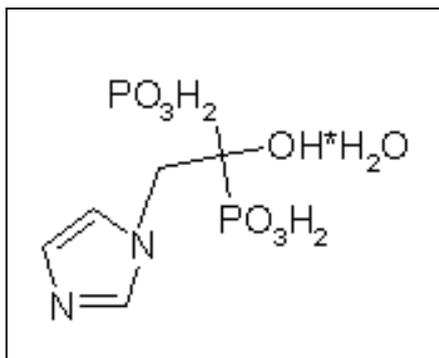


Figura 7. Estructura química del ácido zoledrónico

## 2. Ibandronato

El Ibandronato (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) pertenece al grupo de bisfosfonatos de tercera generación y actúa específicamente en el hueso. Es un inhibidor de la resorción ósea osteoclástica. Se presenta 1 mg/ml. La dosis recomendada es de 3 mg de Ibandronato, administrado como inyección intravenosa durante 15-30 segundos, cada tres meses. Nosotros utilizamos DMSO para disolver el Ibandronato.

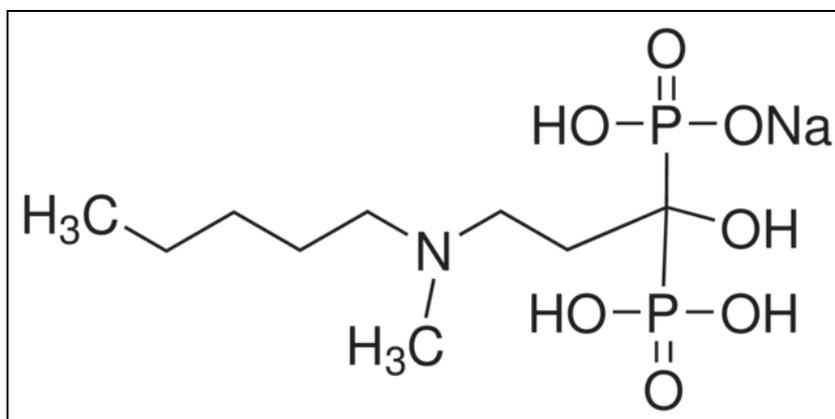


Figura 8. Estructura química del ibandronato

### 3. Pamidronato

El pamidronato (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) pertenece al grupo de bisfosfonatos de tercera generación y actúa específicamente en el hueso. Es un inhibidor de la resorción ósea osteoclástica. Se presenta 1 mg/ml.

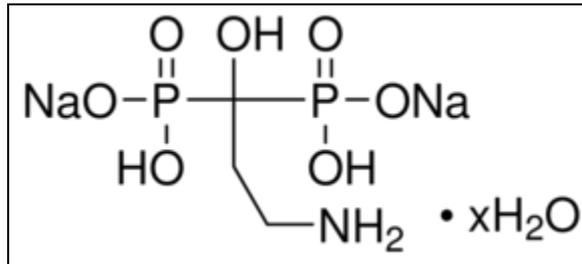
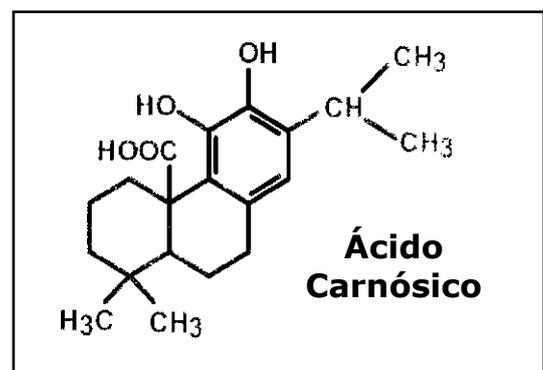
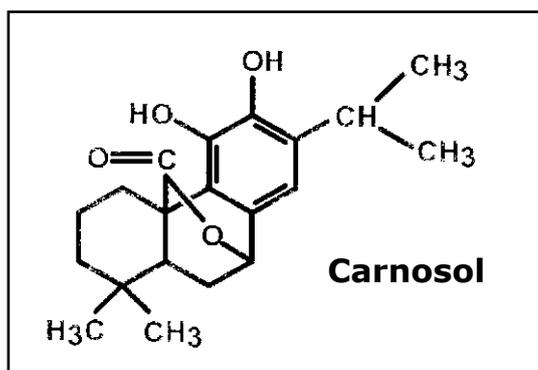


Figura 9. Estructura química del pamidronato

### 4. Carnosol

El carnosol (Nutrafur Español S.A., Alcantarilla, Murcia), sustancia que constituye junto con el ácido carnosico, uno de los principios activos más importantes del romero y que posee las mismas propiedades antioxidantes y anticarcinogénicas que éste, fue administrada tras su solubilización en DMSO en una proporción de 1 mg de sustancia por cada ml de DMSO debido a que esta sustancia es insoluble en agua, parcialmente soluble en alcohol y soluble en disolventes orgánicos y aceites.



Figuras 10 y 11. Estructuras químicas del carnosol y del ácido carnosico

## 5. Ácido Rosmarínico

El ácido rosmarínico (Extrasynthèse S.A., Genay, Francia) es el principal componente activo de los extractos acuosos del romero. Presenta propiedades antioxidantes como captador del radical anión superóxido e inhibidor de la peroxidasa lipídica, mostrando asimismo ciertas propiedades antiinflamatorias dosis-dependiente. Su actividad antioxidante en medios hidroalcohólicos como inhibidor de la oxidación de ciertos sustratos tales como el ácido linoleico es muy superior a la del ácido ascórbico, el antioxidante usado con más frecuencia en medio acuoso. Del mismo modo que el resto de sustancias empleadas en este estudio, el ácido rosmarínico ha sido disuelto en DMSO a razón de 1 mg/ml antes de añadirlo a las muestras de sangre.

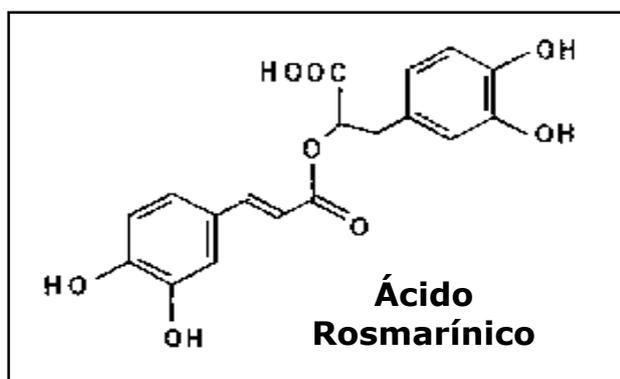


Figura 12. Ácido rosmarínico

## 6. Dimetilsulfóxido (DMSO)

El dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) es una sustancia de amplio uso en cultivos celulares. En nuestro estudio experimental lo hemos utilizado como disolvente de las sustancias químicas ensayadas. Su estructura química es  $C_2H_6OS$  y se caracteriza por presentar puentes disulfuro que, clásicamente, se aceptan como protectores frente a la radiación ionizante. Además, presenta propiedades antioxidantes que podrían solaparse con las de las sustancias a las que solubiliza.

Hemos utilizado el dimetilsulfóxido en disolución en agua destilada al 5 % (50 g de DMSO en 1000 ml de agua destilada) y lo hemos almacenado a 4 °C hasta su utilización.

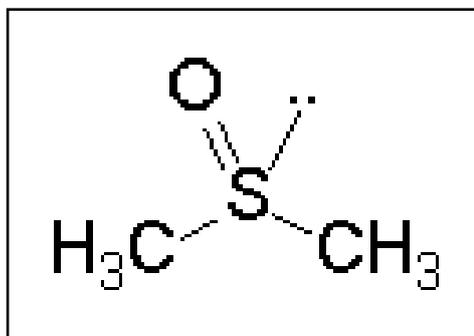


Figura 13. Estructura química del dimetilsulfóxido

## 6. EQUIPOS UTILIZADOS

**A. Irradiador de RX.** Equipo de rayos X modelo, Smart 583 E, con un tubo de rayos X modelo Smart 200 E (200 kV y 4'5 mA), marca YXLON Internacional AS, (Copenhague, Dinamarca). Este equipo está ubicado en el Servicio de Radioprotección y Residuo, del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación), de la Universidad de Murcia.



Figura 14. Irradiador YXLON (Rayos X)

**B. Electrómetro.** Hemos utilizado el modelo UNIDOS E, con la sonda (cámara de ionización) TW 30010-1 (PTW, Freiburg, Alemania), para medir las dosis de RX administradas a las muestras de sangre y a las líneas celulares en cultivo. Gracias a la sonda de este modelo, nos ha sido posible medir y comprobar las dosis administradas en el interior del irradiador.



Figura 15. Electrómetro con la sonda.

**C. Dosímetros de termoluminiscencia (TLDs).** utilizamos cristales de Fluoruro de Litio con Mg, Cu, P (GR-200r, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China). Los TLDs tienen forma redondeada (pastilla) de 4-5 mm de diámetro por 1 mm de espesor y hemos introducido los dosímetros de dos en dos, en bolsas de plástico transparente de 8x16 mm que sellamos térmicamente. El Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) del Ministerio de Industria y Energía ha proporcionado los dosímetros de termoluminiscencia y ha realizado la lectura de los mismos, determinando las dosis de radiación utilizadas en este trabajo.



Figura 16. Dosímetros de termoluminiscencia

**D. Centrifugadora.** para el centrifugado de las muestras utilizamos la centrifuga Heraeus Multifuge 3SR Plus (Thermoscientific, Leicestershire, UK).



Figura 17. Centrifuga Heraeus Multifuge

**E. Microscopio Óptico.** para el estudio de las extensiones hematológicas utilizamos tres microscopios ópticos: LABORLUX 12 (Leitz, Alemania), HUND V200 (Wetzlar, Alemania) y OLYMPUS BX40 (Barcelona, España).

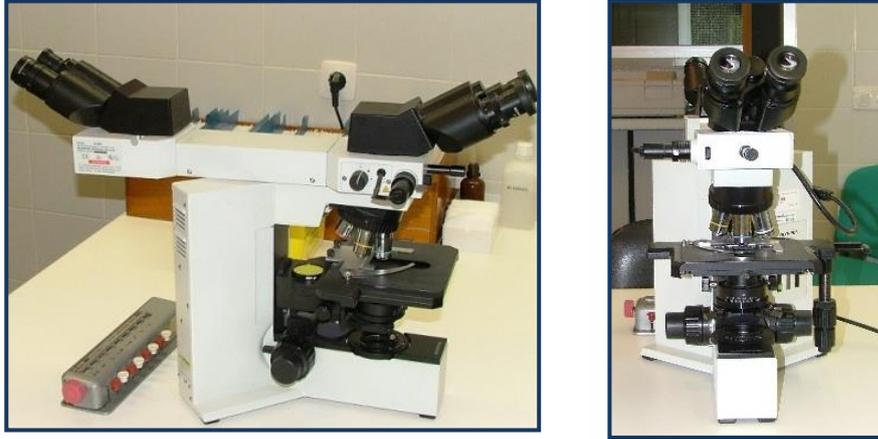


Figura 18. Microscopio optico OLYMPUS BX40

**E. Microscopio Digital.** para el recuento de celulas binucleadas utilizamos el microscopio Leica DM4000 B LED (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemania) Equipo situado en el Instituto de Envejecimiento, de la Universidad de Murcia.



Figura 19. Microscopio digital Leica DM4000 B LED

**F. Cabina de Seguridad Biológica.** Hemos utilizado CYSTOTAR (Telstar, España), con 3 etapas de filtración (Sistemas HEPA de extracción, recirculación, impulsión), para asegurar la ausencia de contaminación del producto durante la manipulación del mismo siendo necesaria además una alta protección del operador y del medio

ambiente minimizando los riesgos al trabajo con agentes biológicos de las Clases 1, 2 y 3 ya que están especialmente diseñadas para la preparación de citostáticos.



Figura 20. Cabina de flujo laminar

H. **Incubadora.** Steri-Cult 200 Incubator CO<sub>2</sub>, que hemos utilizado para mantener los cultivos.



Figura 21. Incubadora para el mantenimiento de cultivos

**I. Equipo de HPLC.** Para realizar el análisis cromatográfico de las diferentes sustancias utilizaremos el modelo de Hewlett-Packard, serie HP 1100 HPLC System (Agilent technologies, Santa Clara, USA) equipado con detector de array de diodos. Como fase estacionaria utilizaremos una columna C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm id) con un tamaño promedio de partícula de 5 micras. La temperatura fue de 30 °C, el flujo de 1ml/min y la longitud de onda empleada de 280 nm.



Figura 22. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

**J. Lectores de placas: FLUOstar Omega.** Hemos utilizado el modelo Fluostar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania) que realiza medidas de fluorescencia, luminiscencia y absorbancia (220-850 nm), que dispone de los siguientes filtros: 340, 380, 405, 520, 550, 560 y 690 nm. Software (MARS) que permite el análisis remoto de datos y la exportación directa a Excel. Equipo situado en Servicio de Cultivo de Tejidos perteneciente al SAI, de la Universidad de Murcia.



Figura 23. Lector de placas FLUOstar Omega

## MÉTODO

### A. ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD

#### I. MUESTRAS DE SANGRE

Seleccionamos donantes voluntarios supuestamente sanos, de los que obtuvimos muestras de sangre periférica, que heparinizamos y trasvasado a tubos cónicos estériles para recolección de sangre al vacío Venosafe™ (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium).

Los donantes son no fumadores, sin enfermedad médica conocida y, por ello, considerados supuestamente sanos. En todos los casos solicitamos su autorización expresa para el empleo de las muestras de sangre en la presente investigación. Los donantes serán divididos en 2 grupos:

**Grupo 1:** las muestras de sangre fueron donadas voluntariamente por dos donantes. Estas muestras fueron utilizadas para la obtención de la curva dosis-respuesta "in vitro" con radiación gamma y, para ello, se estudiarán: 2 muestras sanguíneas como controles y 12 muestras sanguíneas irradiadas con diferentes dosis de radiación gamma.

**Grupo 2:** las muestras de sangre de este grupo las obtuvimos de 4 donantes: dos mujeres y dos hombres. Estas muestras fueron utilizadas para la evaluación del efecto radiosensibilizante de las diferentes sustancias ensayadas (pre y postirradiación) y, para ello, se necesitarán 12 extracciones sanguíneas de 25 ml cada una. Cada una de estas muestras fue alicuotada en tubos de 2 ml para obtener en cada experimento tres muestras controles (basal espontánea, control irradiado y control con sustancia ensayada), otras muestras tratadas preirradiación con cada una de las sustancias del experimento y otro grupo de muestras correspondientes a las que habían sido tratadas postirradiación con las sustancias ensayadas.

### ***Dosimetría de termoluminiscencia***

La determinación de las dosis de radiación gamma a las que hemos expuesto las muestras de sangre fue un paso previo fundamental para establecer el efecto biológico que pretendemos estudiar, lo que permite establecer la curva dosis-respuesta de dicho ensayo. Por ello hemos elegido el mejor procedimiento del que se dispone en nuestro medio, aceptado durante años como una técnica adecuada: la dosimetría de termoluminiscencia (TLD).

Colocamos los dosímetros de dos en dos, en bolsas de plástico que sellamos térmicamente quedando ambos detectores protegidos del exterior. Rotulamos las bolsas indeleblemente con un código que los identifica. El tamaño y la posibilidad de ver los dosímetros facilitan la colocación de los mismos junto a las muestras de sangre irradiadas.



**Figura 24. Dosímetros de termoluminiscencia usados en este estudio.**

Preparamos los 50 dosímetros simultáneamente en lotes de 24 bolsas y, en una de ellas, colocamos 4 dosímetros que no expusimos a radiación ionizante. Estos 4 dosímetros los consideramos como dosímetros controles, con el fin de substraer la dosis de radiación debida a la radiación natural durante el periodo de tiempo desde la preparación de los dosímetros hasta su lectura tras haber sido expuestos. Esta corrección permite que el lote de dosímetros pueda ser utilizado durante un periodo aproximado de 2 a 3 meses.

Los dosímetros fueron procesados en un lector automático Harshaw 5500 para pastillas. El calentamiento se basa en la inyección de nitrógeno caliente, siendo posible la programación de los perfiles tiempo-temperatura adecuados para diferentes materiales termoluminiscentes. En base a la experiencia en el CIEMAT, para el LiF: Mg, Cu, P se ha definido un ciclo de lectura que somete el detector a una tasa de calentamiento lineal de 15 °C/s desde 50 °C hasta 275 °C, manteniéndose esta temperatura durante 12'7 segundos, con un tiempo total de lectura de 26'7 segundos. Este ciclo asegura la lectura completa del detector hasta dosis superiores a 1 Gy, siendo incluso posible su reutilización inmediata.

La evaluación de las dosis se basa en el análisis simplificado de las curvas de emisión empleando, para ello, los programas informáticos desarrollados en el CIEMAT. Una vez que determinamos la dosis de 2 Gy como la adecuada para nuestro procedimiento experimental, se utilizaron el tiempo de exposición junto con la pérdida de rendimiento de la fuente como parámetros básicos que son comprobados periódicamente.

## **II. TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS**

Este experimento se basa en la utilización de la técnica de micronúcleos en cultivos de linfocitos obtenidos de sangre periférica humana y bloqueados citocinéticamente en su primera división mitótica, descrito por Fenech (2007) y considerado como el procedimiento más adecuado para el análisis citogenético del daño genotóxico inducido por radiación ionizante de forma sistemática (IAEA, 2011).

La técnica utilizada es la siguiente:

### **A. Preparación del medio de cultivo**

Para realizar la técnica de micronúcleos, cultivamos 1 ml de cada muestra de sangre heparinizada (irradiada o no y/o tratada o no) en frascos de cultivo de 25 ml en una estufa a 37 °C y ambiente enriquecido con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72-76 horas junto

con 4,5 ml de medio de cultivo preparado como se ha comentado anteriormente. Esto fue realizado en cabina de flujo laminar.

Transcurridas 44 horas de cultivo añadimos 150  $\mu$ l de la disolución de Cytochalasina B (Cyt B) a cada cultivo. Estos 150  $\mu$ l de disolución, contienen 30  $\mu$ gr de Cyt B (6  $\mu$ g/ml).

Posteriormente, continuamos el cultivo durante otras 28-32 horas, siendo el tiempo total de cultivo hasta 72-76 horas. Transcurrido este tiempo trasvasamos el contenido de los frascos de cultivo a tubos cónicos de 15 ml y lo centrifugamos durante 5 minutos a 800 rpm (Heraeus, Minifuge T, Madrid, España).

A continuación, extrajimos el sobrenadante y agregamos 7 ml de solución hipotónica de CLK (75  $\mu$ M). De esta forma, obtuvimos una mezcla que incubamos nuevamente en estufa durante 3 minutos, en las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

Posteriormente, centrifugamos el cultivo a 800 rpm durante 8 minutos, decantamos el sobrenadante y lo resuspendemos en 5 ml de fijador (Alcohol metílico: Ácido Acético Glacial, 3:1 y formaldehído 1%) que volvemos a centrifugar a 600 rpm durante 8 minutos. Volvemos a decantar el sobrenadante y añadimos nuevamente 5 ml de fijador (Alcohol metílico: Ácido Acético Glacial, 3:1) que volvemos a centrifugar a 600 rpm durante 8 minutos. Este último paso es necesario (fijación y centrifugación) 3 ó 4 veces, hasta obtener un sobrenadante transparente.

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

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

1º) En una solución de May-Grünwald puro durante 3 minutos.

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

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

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

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

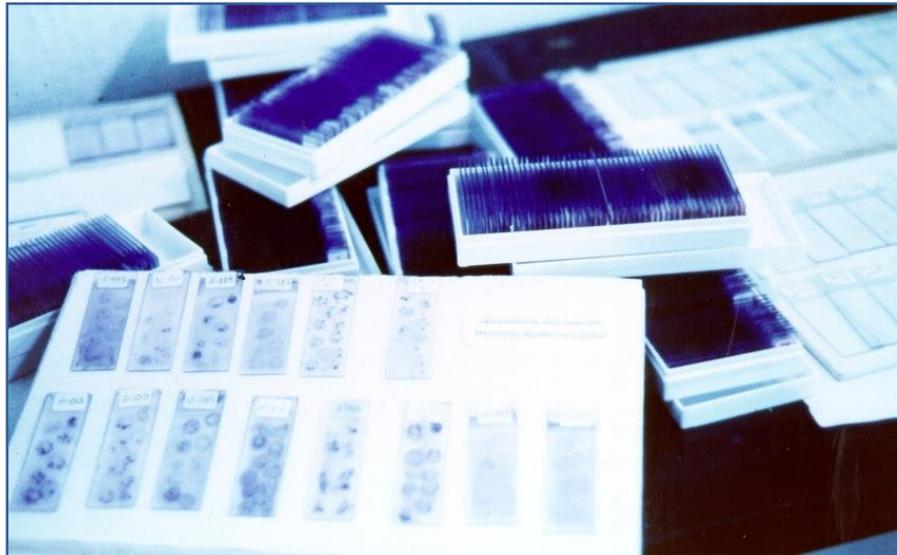


Figura 25. Preparaciones microscópicas tras la tinción con May-Grünwald y Giemsa

## B. Preparación de las sustancias añadidas al medio de cultivo

- a) Preparación de la Fitohemaglutinina.
- b) Preparación de la Cytochalasina B.
- c) Preparación de la solución hipotónica de cloruro potásico.
- d) Preparación del tampón fosfato.
- e) Preparación de la solución fijadora.

### **a) Preparación de la Fitohemaglutinina**

La Fitohemaglutinina o PHA se obtuvo en presentaciones de 1 y de 5 mg que era guardada a 2-8 °C hasta su utilización. Para utilizarla, la PHA previamente debía estar disuelta en medio de cultivo Ham F10 en ambiente estéril a razón de 1 mg de PHA/ml de Ham F10 y almacenada a -20 °C para su conservación.

Habitualmente, preparamos 100 ml de medio de cultivo y como se precisan 16 µg PHA/ml, suministrábamos 1.600 µg PHA para 100 ml de medio de cultivo o, lo que es lo mismo, 1'6 mg de PHA. Como diluimos 1 mg/ml de HAM F10, para administrar 1'6 mg de PHA añadíamos 1'6 ml de la disolución de PHA previamente preparada. Su función es el estímulo de la división o proliferación celular de los linfocitos que, en condiciones normales, no se dividen.

### **b) Preparación de la Cytochalasina B**

La Cytochalasina B (Cyt B) realiza el bloqueo de la citocinesis mediante bloqueo tras la primera división mitótica; es la sustancia que añadíamos a cada uno de los cultivos a las 44 horas del mismo en cabina estéril.

La Cyt B se obtuvo en presentaciones de 1 y de 5 mg y era almacenada a una temperatura de -20 °C hasta su utilización. Para ser utilizada, la Cyt B debía ser disuelta previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 % en ambiente estéril. Dicha disolución se realizaba a razón de 1 mg de Cyt B por cada 0,5 ml de DMSO.

Posteriormente y en cabina estéril, esta disolución era alícuotada en tubos de 1 ml de capacidad a razón de 0,1 ml de disolución/tubo al que se añadían 0,9 ml de PBS quedando alícuotas que presentaban la siguiente proporción: 0,9 ml de PBS, 0,1 ml de DMSO y 200 µg de Cyt B. Finalmente, estas alícuotas eran almacenadas a -80 °C y sólo se descongelaban en el momento de ser utilizadas, es decir, para su adición al cultivo.

La concentración de Cyt B que se añadía al cultivo es de 3 µg/ml. Como cada cultivo tiene 10 ml, debemos añadir 30 µg de Cyt B, para lo que se precisan 150 µl del contenido de cada tubo previamente preparado.

#### **c) Preparación de la solución hipotónica de Cloruro Potásico**

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

#### **d) Preparación del tampón Fosfato**

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

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  -----1,560 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  -----2,340 g/l

#### **e) Preparación de la solución fijadora**

La solución fijadora utilizada se prepara mezclando 3 partes de alcohol metílico con 1 parte de ácido acético glacial. Esta disolución debe ser preparada en el momento de ser utilizada.

### **C. Criterios de recuento de micronúcleos**

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

El recuento de micronúcleos en las preparaciones microscópicas de linfocitos humanos lo realizamos sobre 500 células binucleadas (CB) en cada una de las 6 preparaciones que obtendremos de los 2 cultivos realizados por cada muestra de sangre (1 muestra de sangre, 2 cultivos celulares y 6 preparaciones microscópicas). Por

lo que, aunque las cifras de micronúcleos serán presentadas por 500 células bloqueadas (MN/500 CB), el estudio corresponde al análisis de 3000 CB para cada uno de los valores mostrados, obtenidos por 2 observadores independientemente.

El recuento fue realizado a doble ciego, desconociendo las características de la preparación observada, obteniéndose un único valor para cada punto que corresponde a la media de las 6 lecturas diferentes para cada una de las muestras.

Seguiremos los criterios para el recuento de micronúcleos establecidos por Almassy en 1987. Dichos criterios sobre el recuento de micronúcleos son los siguientes:

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

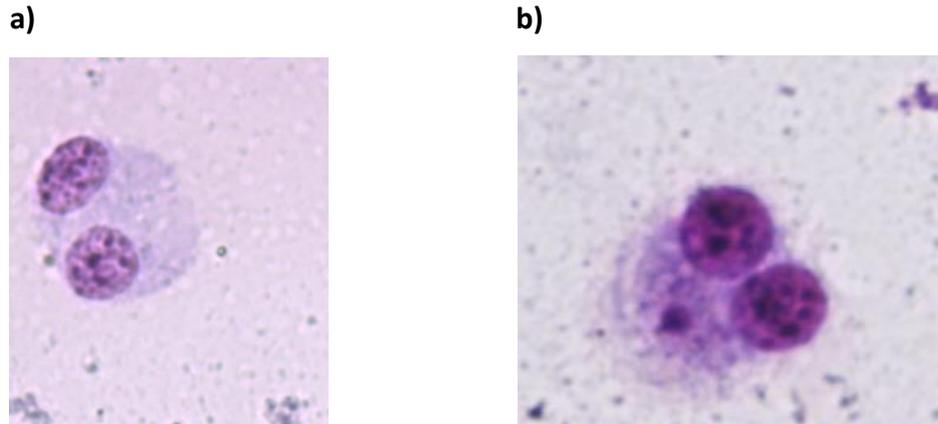


Figura 26. a) célula binucleada con el citoplasma conservado y b) linfocito o célula binucleada (CB) con 1 micronúcleo en su citoplasma (400x).

### III. MUESTRAS CONTROLES

Para el desarrollo de este estudio necesitamos, en primer lugar, verificar la utilidad del test de micronúcleos como dosímetro biológico de la exposición de la sangre periférica a radiación X en nuestro laboratorio. Para ello, obtuvimos muestras de sangre de los donantes de nuestro grupo 2, a las que no administraremos ninguna sustancia ni expusimos a radiación ionizante, con lo que confirmamos la frecuencia basal o espontánea de micronúcleos de dichas muestras antes de proceder a la irradiación. A dichas muestras las denominamos **muestras controles no irradiadas**.

Al mismo tiempo, obtuvimos muestras de sangre de estos donantes para exponerlas a 2 Gy de radiación X, con el fin de poner de manifiesto, la respuesta según la sensibilidad del test de micronúcleos como método biológico para la detección del efecto genotóxico de la radiación “in vitro”; las hemos llamado **muestras controles irradiadas**.

### IV. TRATAMIENTOS REALIZADOS: ADMINISTRACIÓN PREIRRADIACIÓN Y POSTIRRADIACIÓN

Obtuvimos muestras de sangre de los mismos donantes a las que administramos 20 µl de las disoluciones con cada una de las sustancias cuyo efecto biológico pretendemos estudiar y que no fueron expuestas a radiación X. A estas muestras las hemos denominado **muestras tratadas no irradiadas**. Estas muestras

sirven para determinar el posible efecto genotóxico de la sustancia ensayada directamente sobre la sangre sin el efecto de la radiación.

En nuestro experimento estudiamos también el efecto de diferentes sustancias químicas frente al daño cromosómico inducido por la radiación X en cultivos de linfocitos irradiados de sangre humana con bloqueo citocinético. Para ello, administramos las sustancias cuyo efecto biológico pretendemos estudiar, en diferentes volúmenes, a unas concentraciones aproximadas de 25  $\mu$ M antes de exponer las muestras a una dosis constante de radiación X (2 Gy), que ha sido la dosis elegida para este ensayo (**muestras tratadas preirradiación**).

Posteriormente, para conocer el posible efecto de las mismas sustancias pero, en este caso, administrados inmediatamente después de la irradiación con 2 Gy de radiación X administramos la misma cantidad de sustancia a muestras sanguíneas previamente irradiadas (**muestras tratadas postirradiación**).

## B. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

### A. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS

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

**El cultivo masivo** lo realizamos en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, con el medio adecuado para cada línea. Todas las operaciones fueron realizadas en cabinas de flujo laminar vertical, con el instrumental adecuadamente esterilizado.

El crecimiento celular fue controlado por la observación directa de los frascos con un microscopio invertido de contraste de fases, cambiando el medio aproximadamente cada dos días, o cuando el indicador de pH señala agotamiento.

Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia formando una monocapa. En esta fase tratamos los cultivos con 2 ml de tripsina (0,1 mg/ml) y EDTA (0,2 mg/ml) durante 5 minutos en estufa a 37 °C y agitándolos hasta que las células se despegan. Seguidamente, añadimos 4 ml de medio frío suplementado con SBF y centrifugamos a 214 g durante 10 minutos a 22 °C para eliminar completamente la enzima. Resuspendemos el sedimento en 2 ml de medio fresco y procederemos al recuento del número de células vivas en cámara hemocitométrica mediante un ensayo de exclusión de colorante (azul tripán) y calcularemos el inóculo necesario para nuevos frascos donde propagar el cultivo.

De los frascos de cultivo, tomamos regularmente muestras de las dos líneas con el fin de comprobar la ausencia de contaminación por *Mycoplasma spp*, mediante fluorescencia directa con el colorante específico para el ADN (H33233, Hoecht, Alemania).

Realizamos la criocongelación cuando los cultivos están próximos a la confluencia. Para esta línea celular, procedemos a la tripsinización y centrifugación. Resuspendemos el sedimento en medio fresco suplementado con SBF hasta alcanzar

una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se distribuían en ampollas de criocongelación con un 10 % (v/v) de DMSO como agente crioprotector.

En todos los casos, la criocongelación fue realizada primero en alcohol isopropílico que provoca una bajada de temperatura de 1 °C/minuto, hasta alcanzar los -80 °C y seguidamente, colocamos las ampollas en nitrógeno líquido para bajar la temperatura hasta -196 °C para su almacenamiento.

Para restablecer los cultivos a partir de los viales congelados, introducimos el vial en un baño a 37 °C para su rápida descongelación. Seguidamente, en la cabina de flujo laminar, vertemos el contenido en un tubo de centrifuga adicionando 10 ml de medio de cultivo para diluir el DMSO que contiene el medio de congelación. Tras centrifugar 10 minutos a 214 g, desechamos el sobrenadante y resuspendemos las células en 1-2 ml de medio de cultivo para realizar el recuento celular en cámara hemocitométrica utilizando como colorante el azul tripán y estimular la viabilidad celular tras la congelación. Después de ajustar la concentración, realizamos la siembra en un frasco de cultivo para reiniciar el cultivo celular, cambiando el medio de cultivo a las 24 horas y suplementándolo con mayor proporción de SBF para las células con peor recuperación.

## **B. ENSAYOS**

Realizamos dos tipos de ensayos, a 24 y 48 horas de haber aplicado el tratamiento y/o la radiación X, para valorar el efecto de los bifosfonatos sobre la viabilidad e inhibición del crecimiento de los cultivos celulares.

Utilizamos placas de fondo plano de 96 pocillos con capacidad de 300 µl/pocillos. Para cada tratamiento y línea celular realizamos cultivos controles, sometidos a las mismas condiciones que los cultivos tratados en cuanto a los porcentajes del disolvente presente en los tratamientos. Los ensayos se realizaron a partir de los cultivos celulares en crecimiento exponencial sin llegar a la confluencia y se mantuvieron en las mismas condiciones que los frascos de cultivo para cada línea

celular. Los tratamientos se incubaron 24 horas después de la siembra en ambos tipos de ensayos para conseguir la adaptación y la adherencia de las células en los pocillos.

Para cada línea celular sembramos el número adecuado de células para evitar la confluencia del cultivo durante los tratamientos. Tras analizar la curva de crecimiento para cada línea celular, concluimos que el número más conveniente es: 3200 células/pocillo para las células PNT2.

En cada pocillo colocamos 200  $\mu$ l de medio por pocillo y añadimos diferentes concentraciones de las disoluciones de los compuestos a ensayar. Tras 15 minutos, irradiamos las placas con una dosis de Rx (10 Gy). Tras los tratamientos, las muestras se dejan en la estufa durante 24 ó 48 horas más, para realizarles pasado ese tiempo el ensayo colorimétrico con MTT.

#### **Preparación del dimetilsulfóxido para añadirlo a los cultivos:**

En nuestro estudio experimental lo utilizamos como disolvente de las sustancias químicas ensayadas. Su estructura química es  $C_2H_6OS$  y se caracteriza por presentar puentes disulfuro que, clásicamente, se aceptan como protectores frente a la radiación ionizante. Además, presenta propiedades antioxidantes que podrían solaparse con las de las sustancias a las que solubiliza. El DMSO, lo utilizaremos en solución al 0,2 % y al 0,1 %, diluido en medio de cultivo suplementado y sin rojo fenol.

Para conseguir la concentración del 0,2% se introducían 30 ml de medio de cultivo en un frasco estéril, de los cuales, se extraían 60  $\mu$ l del mismo para volver a introducirlos pero ahora de DMSO puro. Así se conseguía la concentración al 0,2 %. Es decir, una dilución 1/500. A continuación se esterilizaba la solución con filtro de tamaño de poro de 0,22 micras. Para conseguir el DMSO al 0,1 %, diluíamos, 9 ml de la solución al 0,2 %, con otros 9 ml de medio de cultivo, es decir una dilución al 50 %.

Tras terminar el proceso, obteníamos las dos concreciones de DMSO con las que íbamos a tratar los cultivos, es decir, 0,1 % y 0,2 %.

### **C. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR. TEST CON MTT**

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Utilizamos la técnica descrita por Carmichael *et al.* (1987a; 1987b) y por Alley *et al.* (1988), adaptada a nuestras condiciones de cultivo (Vicente *et al.*, 1997), para cuantificar la viabilidad celular.

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

- 1.- Centrifugar las placas a 1000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar el medio de los pocillos.
- 2.- Reemplazar con 200  $\mu$ l de medio fresco con SBF por pocillo.
- 3.- Añadir 50  $\mu$ l de MTT (8mg/ml) a cada pocillo.
- 4.- Incubar durante 4 horas en la estufa a 37<sup>o</sup> C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- 5.- Centrifugar de nuevo a 1000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar el medio y el MTT no metabolizado.
- 6.- Añadir 100 $\mu$ l de DMSO para solubilizar el MTT formazán producido por las células.
- 7.- Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 8.- Realizamos la lectura en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340P utilizando un sistema de doble longitud de onda (560 y 690 nm).

### **D. ANALISIS ESTADÍSTICO**

El estudio estadístico fue realizado en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, utilizando el

paquete BMDP Statistical Software, Inc y consistió en comparaciones entre grupos realizando contrastes de igualdad de medias mediante análisis de varianza. Asimismo, realizaremos análisis de regresión y correlación lineales y polinómicos. Consideramos los resultados estadísticamente significativos cuando p sea menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Factor de Protección (FP). La capacidad de protección de una sustancia radioprotectora, expresada como porcentaje de protección, descrito por Sarma y Kesavan (1993), se expresa mediante la fórmula:

$$FP (\%) = \frac{F_{\text{control}} - F_{\text{tratadas}}}{F_{\text{control}}} \times 100$$

En la que:

**FP** es la magnitud de protección expresada en %,

**F<sub>control</sub>** es la frecuencia de micronúcleos en las muestras controles irradiadas, y

**F<sub>tratadas</sub>** es la frecuencia de micronúcleos en las muestras irradiadas y tratadas.

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

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

Los valores de LD<sub>50</sub> se obtuvieron a partir de la curva ajustada a los promedios de los cocientes de absorbancia respecto al control.

Análisis de Isobogramas. El método de análisis del isoblograma fue utilizado para evaluar si un efecto sinérgico o aditivo, se observaba cuando Z e IR fueron combinados, como se describe anteriormente (Algur et al., 2005). Las curvas dosis-

respuesta representaron gráficamente los efectos de BP y los efectos de la IR sobre la viabilidad celular. A partir de estas curvas, los tratamientos combinados (BP + IR) IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>75</sub> y 75 % de valores de inhibición de crecimiento (por ejemplo, IC<sub>75</sub>=75 % del efecto máximo=25 % restante células supervivientes) se determinaron para cada curva. La relación de la combinación de IC<sub>50</sub> y IC<sub>75</sub> para los distintos valores de IC<sub>50</sub> y IC<sub>75</sub> para cada fármaco solo se calcularon y se representan en un isoblograma. El índice de combinación (CI) se calculó a continuación por la fórmula:  $CI = (d1/Dx1) + (d2/dx2)$ , donde DX1 es la dosis de agente 1 (IR) necesaria para producir el efecto x solo, y la d1 es la dosis de agente 1 (IR) necesaria para producir el mismo x porcentaje en combinación con d2 (BP). Dx2 es igualmente la dosis de agente 2 (BP) necesario para producir x porcentaje solo, y d2 (BP) es la dosis de agente 2 requerida para producir el mismo x porcentaje en combinación con d1 (IR). Los valores de CI se interpretan como: <1 sinergia, 1 aditivo, y > 1 antagonismo.

La eficacia de un sensibilizador se expresa en términos de Factor de Potenciación (Enhancement ratio) (ER) [Ural, 2005]. Esto se define como la relación de las dosis en la ausencia y en presencia de la droga que producen el mismo efecto biológico. Se utilizó el ER de Z (ERZ) para las células incubadas durante diferentes horas y se analizaron tres dosis diferentes: IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>75</sub> (valores de inhibición del crecimiento de 25 % 50 % y 75 % de las células, respectivamente.).

Para determinar el factor de sensibilización (FS) se modificó la fórmula anteriormente descrita por Sarma y Kesavan (1993), modificada para el análisis de inhibición del crecimiento (IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>75</sub>) se utilizó:

$$FS (\%) = \frac{MT - MC}{MC} \times 100$$

dónde: MT = mortalidad celular en las muestras irradiados y tratadas con BP;  
MC=mortalidad celular en las células control irradiadas.

- **RESULTADOS**

- **ARTICULO I**

**Zoledronic acid and radiation: toxicity, synergy or radiosensitization?**

*Alcaraz M, Olivares A, Armero D, Alcaraz-Saura M, Achel D.*

*Clinical and Translational Oncology, 2013;15 (4):300-306.*

El Ácido zoledrónico (Z) es un bisfosfonato de ultima generación utilizado en la hipercalcemia relacionada con el cáncer, en las complicaciones por metástasis óseas y en la osteoporosis posmenopáusica que se ha relacionado con la osteoradionecrosis, especialmente cuando se asocia con la irradiación de las estructuras de cabeza y cuello con fines radioterapicos.

Este estudio tiene como objetivo determinar un posible efecto (tóxico, aditivo, sinérgico o radiosensibilizante) del Z en el tratamiento combinado con radiación ionizante (IR) (administrado antes y después de irradiación) mediante la evaluación de sus capacidades genotóxicas y citotóxicas “in vitro” sobre células no tumorales.

El efecto genotóxico del Z se ha estudiado mediante el ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados citogenéticamente con citochalasina B e irradiados, antes y después de su administracion, con 2 Gy de rayos X; mientras que el efecto citotóxico se ha estudiado mediante el ensayo de viabilidad celular (MTT) en la línea de celulas epiteliales de prostata normal PNT2 antes y después de la exposición a diferentes dosis de rayos X (0, 4, 6, 8, 10 y 20 Gy) en cuatro grupos (Z solo, IR sola, Z + IR e IR + Z, respectivamente).

Tanto para la IR como para el Z se ha demostrado un efecto citotóxico dosis dependiente y tiempo dependiente en la línea celular PNT2. Demostramos un efecto sinérgico ( $IC < 1$ ) mediante la combinacion del Z con IR, aumentando un incremento lesivo (enhancement ratio) del Z (2,6) conjuntamente con el factor de sensibilización del 56 %. El efecto del Z es siempre mayor tras la exposición a IR. El daño cromosómico (efecto genotóxico), sólo lo hemos observado en la administración de Z después de la irradiación (IR+Z) con un factor de sensibilización del 35,7 %.

En conclusión este trabajo muestra que la administración in vitro de concentraciones altas de Z es tóxica, mientras que las dosis recomendadas para el uso clínico humano combinado con IR muestra un efecto sinérgico con todas las características de un potente agente radiosensibilizador. El efecto más intenso se observa cuando se administra inmediatamente después de la exposición a la IR, lo que podría explicar algunos de los efectos secundarios descritos en algunos pacientes oncológicos después de los tratamientos combinados con ambos agentes.

- **ARTICULO II**

**Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines.**

*Alcaraz M, Olivares A, Achel DG, Alcaraz-Saura M.*

*Anticancer Research, 2013;33(8):3217-3224.*

Algunos estudios han sugerido que la administración de antioxidantes en combinación con quimioterapia (ácido zoledrónico y/o ibandronato) y radioterapia podrían reducir la toxicidad inducida por estos agentes y de esta forma se podría aumentar la dosis para incrementar los efectos terapéuticos.

En este estudio determinamos el efecto protector de la apigenina (un antioxidante y radioprotector conocido) frente a la inhibición del crecimiento en los tratamientos combinados con bisfosfonatos y con radiación ionizante (IR) en distintas líneas celulares: células normales de epitelio de próstata humana (PNT2), células tumorales del adenocarcinoma transgénico de próstata de ratón (TRAMP-C1) y células del melanoma metastásico murino (B16F10), mediante un ensayo de viabilidad celular en los tratamientos combinados con bisfosfonatos (ácido zoledrónico, ibandronato y el pamidronato) y IR en presencia y ausencia de apigenina.

Nuestros resultados muestran que el ácido zoledrónico muestra un efecto citotóxico sobre las células PNT2, TRAMP-C1 y B16F10 ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, el ibandronato y el pamidronato tienen un efecto citotóxico sólo en las células PNT2 ( $p < 0,001$ ).

La administración de apigenina con bisfosfonatos e IR mostró un efecto radioprotector de la apigenina sobre las células PNT2 y B16F10 en el tratamiento con Z, sobre las células TRAMP-C1 y las B16F10 en el tratamiento con ibandronato y sobre las células PNT2 en el tratamiento con pamidronato.

Nuestros resultados muestran que el uso del antioxidante produjo una mayor disminución en el efecto citotóxico sobre la línea no tumoral que en las células tumorales cuando fueron tratadas solas con los bisfosfonatos y podría ser utilizado en

patologías no tumorales. Sin embargo, en un tratamiento combinado con la IR, también puede proporcionar protección a las células tumorales, reduciendo de este modo el efecto deseado de la IR.

- **ARTICULO III**

**Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility.**

*Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J.*

*Clinical and Translational Oncology, 2013;15(9):712-719.*

El Carnosol (COL) es un diterpeno-orto difenólico con una actividad antioxidante del 90%. Se considera que su capacidad antioxidante se produce al ser activado mediante los grupos hidroxilo de catecol de forma, que se convertiría en una quinona.

El objetivo de este estudio ha sido comparar valorar la actividad genoprotectora y radioprotectora del COL contra el daño inducido por la radiación ionizante (IR).

El efecto genoprotector se ha estudiado mediante el ensayo de micronúcleos de linfocitos humanos (CBMN) bloqueadas citogenéticamente en su primera división mitótica con citochalasin B, como una técnica recomendada para la determinación del daño cromosómico inducido por IR.

El efecto radioprotector se ha estudiado mediante la prueba de viabilidad celular (MTT) en las líneas celulares PNT2 (células epiteliales de próstata humana normal) de interés en radioterapia debido a la necesidad de radioprotección en los pacientes oncológicos con cáncer de próstata y en las células B16F10 (células metastásicas de melanoma murino) tradicionalmente radioresistente, expuestas a diferentes dosis de rayos X (4, 6, 8, 10 y 0 Gy como control).

El COL muestra una capacidad significativa genoprotectora frente a la radiación con un factor de protección del 50 %, y un factor de reducción de la dosis de 4,3. La supervivencia celular obtenida con el COL cuando se administra antes de la exposición a 10 Gy de rayos X mostró un factor de protección de 55,1 % en las células epiteliales normales de próstata (PNT2). Sin embargo, en las líneas celulares de melanoma (B16F10) ensayadas, COL no actuaba como un radioprotector, sino como un agente

radiosensibilizante, aumentando la muerte celular en un 34 % y con un incremento en el efecto lesivo (enhancement ratio) del 2,12.

Con ello hemos mostramos que el COL puede ser desarrollado como un agente radioprotector en las células no tumorales mientras que seria un elemento sensibilizante en las celulas tumorales. Todo ello podria permitir una nueva estrategia de tratamiento oncologico ya que su administracion permitiria incrementar el daño sobre las celulas tumorales consiguiendo al mismo tiempo la proteccion de las celulas normales expuestas a IR. En las células del melanoma B10F16, podria activar la melanogénesis y el COL conduciría a una redistribución de los elementos enzimáticos de la via del glutati6n y la producci6n de cisteína-liasa, lo que podría poner en peligro el sistema de defensa redox intracelular. Este efecto aparece como un aumento del daño inducido por la radiaci6n, y por lo tanto presenta un efecto lesivo paradójico del COL en células de melanoma. Por ello, estos efectos contradictorios podrian ofrecer una nueva estrategia para tratar una gran variedad de cánceres humanos, que son considerados resistentes a la radioterapia.

- **ARTICULO IV**

**Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells.**

*Alcaraz M, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Olivares A, López-Morata JA, Castillo J. Anticancer Research, 2014 (in press)*

El ácido rosmarínico (RA) es un éster del ácido caféico con diferentes actividades biológicas que incluyen efectos secuestradores de radicales libres del oxígeno y por ello gran capacidad antioxidante.

En este estudio, hemos examinado la capacidad radioprotectora de RA en células no tumorales, que desaparece y se transforma en una actividad de sensibilización en células del melanoma metastásicos murino B16F10.

El efecto genoprotector se ha estudiado mediante el ensayo de micronúcleos en los que se evaluó la reducción en la frecuencia de micronúcleos utilizando linfocitos humanos bloqueados citogenéticamente con citochalasin B. El efecto citoprotector se estudió a través de la prueba de viabilidad celular (MTT) en PNT2 (epitelio de próstata humano normal) y células de melanoma metastásico murino B16F10. El RA muestra una capacidad genoprotectora significativa ( $p < 0,001$ ) frente al daño genotóxico inducido por los rayos X con un factor de protección del 58 % y un factor de reducción de la dosis de 7,2. La supervivencia celular obtenida después de la exposición a 10 Gy de rayos X mostró un factor de protección de 47,5 %, eliminando de este modo el 29,1 % de la muerte celular inducida por la radiación en las células epiteliales de la próstata normal ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, en las células de melanoma B16F10, el RA no actuó como un radioprotector, sino que se mostro como un agente radiosensibilizante, aumentando la muerte celular un 42 %, con un incremento de la actividad lesional (enhancement ratio) del 2,36.

En nuestra opinion estos efectos opuestos pueden ofrecer una nueva estrategia para el tratamiento de una gran variedad de tipos de cáncer humanos que son resistentes al tratamiento aislado con radiaciones ionizantes.

En nuestro estudio en las células epiteliales normales (PNT2), el RA actúa como antioxidante pudiendo eliminar el exceso de radicales libres inducidos por la radiación ionizante y se suma en su conjunto al sistema defensivo redox intracelular. Sin embargo, en las células del melanoma B10F16, la melanogénesis se activa mediante la administración del RA y desvía el glutatión hacia la producción de melanina, lo que podría comprometer este sistema de defensa antioxidante ya que implica una reducción en los niveles de eliminación endógena de los radicales superóxido, que provocaría una elevación de los elementos intermedios, tales como peróxido de hidrógeno intracelular, aumentando el daño celular de la IR en estas células.

Los estudios sobre sustancias como el RA podrían ayudar a aclarar los mecanismos que permitirían la protección de las células normales sanas mientras lesionarían exclusivamente las células tumorales lo que supondría una nueva estrategia para los pacientes sometidos a radioterapia en cánceres tradicionalmente considerados como radiorresistentes.

- **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran los efectos citotóxicos relacionados con la dosis y con el momento de administración “*in vitro*” del ácido zoledrónico (Z) en las células epiteliales normales de próstata (PNT2), en las células tumorales de próstata de ratón transgénico (TRAMP-C1) y en las células del melanoma metastásico murino (B16F10) “*in vitro*”. Estos resultados confirman lo descrito por algunos autores que consideraban que el Z puede inhibir la proliferación en diferentes células tumorales “*in vitro*” (Algur *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005; Ural *et al.*, 2006). Sin embargo, el ibandronato y el pamidronato sólo muestran efecto citotóxico dosis-dependiente sobre las células PNT2, pero no en las tumorales TRAMP-C1 y B16F10. Son escasos los estudios previos que describen efectos citotóxicos “*in vitro*” inducidos por el ibandronato y el pamidronato (Morgan *et al.*, 2009), aunque algunos autores muestran un efecto citotóxico inducido por el ibandronato en varias líneas celulares “*in vitro*” (Fromigue *et al.*, 2000; Hiraga *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004; Journe *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2009).

Nuestros resultados también muestran un efecto citotóxico dosis-dependiente de la radiación ionizante (IR) sobre las células PNT2, TRAMP-C1 y B16F10. Además al administrar una terapia combinada de bisfosfonatos junto con IR, el Z a las concentraciones terapéuticas recomendadas en clínica (5 %), produce un efecto citotóxico sinérgico con la IR, y muestra todas las características de un potente agente radiosensibilizador clásico (Hall, 1978). En este sentido, también algunos autores han descrito un posible efecto sensibilizador del Z en el tratamiento combinado con otros quimioterápicos e incluso con la IR en algunas líneas tumorales de mama y pulmón (Algur *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005; Ural *et al.*, 2006).

El mecanismo de sinergia entre el Z y la IR es desconocido hasta el momento (Ural *et al.*, 2006); se ha sugerido que la capacidad del Z para detener las células en la fase G<sub>2</sub>M o prolongar su progresión en el ciclo celular podría explicar este efecto ya que las células en esta fase son más sensibles a la IR que en otras fases del ciclo celular (Mila *et al.*, 1994; Ural *et al.*, 2006).

Karabulut et al. (2010) describen que la administración “*in vivo*” del Z causa una reducción significativa del glutatión intracelular (GSH) y de la cisteína gamma glutamato; con un aumento de nitritos y nitratos (derivados del óxido nítrico (NO)); y un aumento significativo del malondialdehído (MDA). Nosotros proponemos un posible mecanismo de la radiosensibilización inducida por el Z al incrementar el estrés oxidativo celular: (1) la MDA, es un producto importante de la peroxidación lipídica, y esta puede reaccionar con bases nitrogenadas del ADN, actuando como agente mutagénico, genotóxico y cancerígeno en los cultivos celulares (Uchiyama *et al.*, 1978; Cortas *et al.*, 1990), explicando el aumento de la citotoxicidad y la genotoxicidad observada en nuestras células; (2) las especies reactivas derivadas del NO que inhiben enzimas, fragmentan ADN, modifican bases nitrogenadas, destruyen los lípidos de membrana mediante oxidación y consumen los antioxidantes celulares (Uchiyama *et al.*, 1978; Geldof *et al.*, 1996), explicarían también el efecto que hemos descrito en los tratamientos combinados de Z+IR; (3) el GSH, el más abundante tiol intracelular, es considerado generalmente como un gran radioprotector por su capacidad de actuar eliminando radicales libres radioinducidos (Dewin *et al.*, 1987; Alcaraz *et al.*, 2009), por lo que al disminuir el nivel intracelular de GSH junto con como los mecanismos anteriores, aumentarían la sensibilidad celular a los efectos de la radiación de forma similar al clásico efecto radiosensibilizador descrito para el cisplatino y que está claramente establecido en la actualidad (Alcaraz *et al.*, 2009).

Nuestros resultados también muestran que el efecto genotóxico es dependiente de la dosis del Z en el test CBMN. Aunque no hemos encontrado ninguna referencia previa en la literatura científica consultada en este sentido, parece ser que el Z tiene un efecto genotóxico similar al de 2 Gy de rayos X; pero cuando lo administramos tras la exposición a IR, su efecto genotóxico es significativamente mayor actuando como un agente tóxico frente a unas células ya lesionadas por la IR. En este sentido, otros autores (Suzuki *et al.*, 2006) han descrito que la radiación potenciaría el efecto lesivo sobre las células de algunas sustancias químicas,

provocando el aumento de la expresión y la actividad de NAD(P) H quinona oxidorreductasa 1 (NQO1) tras la irradiación.

Por tanto, los mecanismos de acción del Z implicarían la generación de un estrés oxidativo celular con la formación de radicales libres y la caída de los niveles endógenos de antioxidantes; siendo todos estos mecanismos similares a los inducidos también por la IR (Matsumoto *et al.*, 2005; Alcaraz *et al.*, 2009). La radiación ionizante produce la generación de radicales hidroxilo “*in vivo*”, y formación de peróxido de hidrógeno endógeno (formado por la reducción del anión superóxido) a través de dos mecanismos: los modelos de Haber- Weiss y Fenton (Alcaraz *et al.*, 2009).

Actualmente, la capacidad de las diferentes sustancias para disminuir o eliminar el daño citotóxico se mide en términos de su capacidad para inhibir la actividad de las especies reactivas, especialmente del oxígeno (ROS). Los efectos anticitotóxicos son directamente proporcionales a la capacidad antioxidante de la sustancia ensayada, aunque también depende de sus características de biodisponibilidad en el medio biológico (Castillo *et al.*, 2000 y 2001; Benavente-García *et al.*, 2002; Del Baño *et al.*, 2006; Sánchez-Campillo *et al.*, 2009; Alcaraz *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, la administración del Z en combinación con un antioxidante (apigenina) reduce el efecto tóxico del Z sobre las células epiteliales normales de próstata pero no tiene ningún efecto protector sobre las células tumorales TRAMP-C1 ni en las células de melanoma B16F10. Sin embargo, la administración de apigenina no muestra efecto sobre la toxicidad dosis-dependiente del ibandronato o del pamidronato.

Sin embargo, esta capacidad protectora parece cambiar cuando el tratamiento se combina con la IR, de forma que en las células de próstata tumorales y no tumorales (PNT2 y TRAMP-C1), la administración de apigenina en el tratamiento combinado (IR más ácido zoledrónico o pamidronato) proporciona un mayor nivel de protección en las células normales que en las células tumorales. Aunque cuando se utiliza el

ibandronato, se observa mayor protección en las células TRAMP-C1 que en las células no tumorales. En cambio, sobre las células de melanoma B16F10, la administración de apigenina junto con IR protege contra los efectos tóxicos del Z.

Por tanto, si el mecanismo de la quimioterapia y/o el daño celular inducido por IR es a través de la producción de estrés oxidativo por un aumento de los radicales libres, la co-administración de antioxidantes consigue reducir su efecto lesivo; pero este tratamiento también reduciría el efecto lesivo de estos ROS sobre las células tumorales. Además, nuestros resultados sugieren que la administración de una sustancia antioxidante junto con un bisfosfonato produce una disminución mayor del efecto tóxico sobre las células no tumorales que sobre las células tumorales y podría ser utilizado en el tratamiento de patologías no tumorales. Por el contrario, en un tratamiento combinado con IR, el suplemento antioxidante puede proteger tanto a las células tumorales (TRAMP-C1 y B16F10), como a las células no tumorales (PNT2), disminuyendo así el efecto terapéutico deseado con la exposición a IR.

Posiblemente por esta razón, algunos autores no aportan complementos indiscriminados de antioxidantes en pacientes oncológicos sometidos a radioterapia o quimioterapia ya que pueden incrementar la supervivencia de las células tumorales, y el aumento de la recurrencia de la enfermedad en estos pacientes. Quizás, el conocimiento íntimo de los diferentes mecanismos del daño celular producido a través de diferentes mecanismos de acción podría lograr una protección selectiva de las células no tumorales sin reducir el efecto lesivo sobre las células tumorales (Lawenda *et al.*, 2008).

En este sentido, nuestros resultados también muestran que el carnosol (COL) y el ácido rosmarínico (RA) en las células PNT2, actúan como antioxidantes pudiendo eliminar el exceso de radicales libres inducidos por la IR, ayudando al sistema defensivo redox intracelular y comportándose como un radioprotector frente al daño inducido por la IR. Pero sorprendentemente, en las células del melanoma metastásico B10F16 hemos observado la ausencia de esta capacidad radioprotectora, que incluso

se convierte paradójicamente en un significativo efecto radiosensibilizador. Aunque el mecanismo por el cual el COL y el RA pierden su capacidad radioprotectora en las células del melanoma metastásico B16F10 no está claro, nosotros hemos propuesto un posible mecanismo que podría estar relacionado con la melanogénesis característica de estas células. Algunos estudios han demostrado que sustancias con estructura química similar al COL y RA (Ohguchi *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Sánchez-Campillo *et al.*, 2009; Kudugunti *et al.*, 2011) estimulan la melanogénesis en estas células de melanoma de ratón B16F10. La melanogénesis se activa dirigiendo el glutatión intracelular y la cisteína liasa para facilitar la producción de melanina, lo que podría comprometer el sistema de defensa redox intracelular en estas células. Esto implicaría una reducción de la capacidad eliminadora de los radicales superóxido por el sistema endógeno celular, pero también una pérdida de la propia capacidad antioxidante y protectora del COL y RA gastado en este proceso y que conllevaría una elevación de los productos intermedios tales como el peróxido de hidrógeno que incrementaría el daño celular. Esta situación experimental podría ofrecer una nueva aplicación terapéutica de estas sustancias al proteger selectivamente las células sanas de la IR sin aportar protección a las células tumorales cuando ambos tipos de células se exponen de forma conjunta a la IR en el mismo campo. Así, las células normales podrían beneficiarse de sus efectos radioprotectores, mientras que, al mismo tiempo, las células de melanoma sufrirían un significativo efecto radiosensibilizador inducido por estas mismas sustancias.

Por todo ello, la administración de antioxidantes en el tratamiento continuado con IR + bisfosfonatos disminuye sus efectos citotóxicos que podrían aprovecharse en tratamientos de patología benigna; sin embargo, también disminuirían su efecto sobre las células tumorales que podrían no estar indicado en los tratamientos oncológicos. Por último, un conocimiento previo de los mecanismos de acción de estos antioxidantes como radioprotectores permitiría, como en el melanoma, aumentar la radiosensibilidad de las células neoplásicas incrementando simultáneamente la radioprotección de las células normales que necesariamente quedarían incluidas en el mismo campo de radiación.

- **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Las conclusiones que hemos obtenido en esta Tesis Doctoral presentada como compendio de publicaciones son las siguientes:

- 1<sup>a</sup>. Los bisfosfonatos ensayados presentan un efecto citotóxico dosis-dependiente, destacando el ácido zoledrónico que presenta una capacidad genotóxica y citotóxica incluso a las dosis recomendadas para su utilización en clínica.
- 2<sup>a</sup>. Existe un efecto citotóxico sinérgico en el tratamiento combinado de la radiación ionizante con el ácido zoledrónico mostrándose éste como un potente agente radiosensibilizante.
- 3<sup>a</sup>. La administración de algunos antioxidantes junto con bisfosfonatos disminuye su toxicidad permitiendo aumentar las dosis administradas y la disminución de sus efectos tóxicos secundarios.
- 4<sup>a</sup>. La administración de antioxidantes en el tratamiento combinado de radiación ionizante con bisfosfonatos disminuye los efectos citotóxicos del tratamiento pero también reduce su eficacia al actuar contra los radicales libres inducidos que constituye el mecanismo de acción de ambos agentes terapéuticos. Esta situación apoyaría la administración de antioxidantes en pacientes tratados por patología benigna pero no en pacientes sometidos a radioterapia.
- 5<sup>a</sup>. La administración de algunos antioxidantes permite una disminución de los efectos tóxicos inducidos por la radiación ionizante comportándose como radioprotectores tanto en las células tumorales como en las células normales incluidas en el campo tratado. Sin embargo, el carnosol y el ácido rosmarínico en el melanoma muestran un efecto paradójico comportándose como radiosensibilizantes y podría permitir una nueva estrategia terapéutica al aumentar su radiosensibilidad pero protegiendo al mismo tiempo a los tejidos normales adyacentes irradiados.

### **III. PUBLICACIONES**

## Artículo I

### Zoledronic acid and radiation: toxicity, synergy or radiosensitization?

Alcaraz M, Olivares A, Armero D, Alcaraz-Saura M, Achel D.

*Clinical and Translational Oncology*, 2013;15 (4):300-306.

Url: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12094-012-0917-9>

### Abstract

**Introduction:** Zoledronic acid (Z) is a bisphosphonate used in hypercalcaemia-related cancer, in complications for bone metastasis and in postmenopausal osteoporosis and it has been related to osteoradionecrosis, especially when associated with radiation to the head and neck structures.

**Objectives:** To determine the radiosensitization capacity of zoledronic acid in the combined treatment with ionizing radiation (IR) by evaluating its genotoxic and cytotoxic capacities in non-tumoral cells.

**Materials and methods:** The genotoxic effect of Z was studied by means of the micronucleus test in cytokinesis-blocked cells of human lymphocytes irradiated before and after a 2 Gy irradiation, while the cytotoxic effect was studied by a cell viability test in the PNT2 cell line before and after exposure to different X-ray doses (0–20 Gy) in four groups (Z alone, radiation alone, Z + IR and IR + Z).

**Results:** A dose-dependent and time-dependent cytotoxic effect of Z and IR on PNT2 cells in vitro ( $p > 0.001$ ) was demonstrated. With the concentrations recommended for humans, the combined treatment had a more pronounced effect than individual treatments ( $p < 0.001$ ). The effect was synergic ( $CI < 1$ ), increasing the Z enhancement ratio (2.6) and sensitization factor (56 %); the effect of Z was always greater after IR exposure. In the genotoxic effect, only the administration of Z after irradiation (IR + Z) increased chromosome damage ( $p < 0.001$ ) and the sensibilization factor (35.7 %).

**Conclusion:** High concentrations of Z are toxic, but the concentrations recommended for clinical practice in humans give it the characteristics of a radiosensitization agent, whose effect is even greater when administered after IR.

## Artículo II

### Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines.

Alcaraz M, Olivares A, Achel DG, Alcaraz-Saura M.

*Anticancer Research, 2013;33(8):3217-3224*

Url: <http://ar.iiarjournals.org/content/33/8/3217.long>

#### Abstract

**Background:** Bisphosphonates are used in cancer-related hypercalcaemia, in complications of bone metastasis and in postmenopausal osteoporosis, and have often been associated with adverse complications. Aim: To determine the protective effect of apigenin against growth inhibition of normal epithelial human prostatic (PNT2), transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP-C1) and metastatic melanoma cells (B16F10) in combined treatments with bisphosphonates and ionizing radiation (IR).

**Materials and methods:** The growth inhibition on PNT2, TRAMP-C1 and B16F10 cells in the combined treatments with bisphosphonates (zoledronic acid, ibandronate and pamidronate) and IR in the presence and absence of apigenin was studied using a cell viability test.

**Results:** Zoledronic acid had a cytotoxic effect on PNT2, TRAMP-C1 and B16F10 cells ( $p < 0.001$ ). However, ibandronate and pamidronate had a cytotoxic effect only on PNT2 cells ( $p < 0.001$ ). The administration of apigenin in combined treatment with bisphosphonates and IR showed: a decrease in the cytotoxic effect on TRAMP-C1 and B16F10 cells in the treatment with ibandronate; a protective effect on normal PNT2 and melanoma cells, but not on TRAMP-C1 cells in the treatment with zoledronic acid; and provided protection only to PNT2 cells in the treatment with pamidronate.

**Conclusion:** The use of the antioxidant produced a greater decrease in the cytotoxic effect on the non-tumor than in tumor cells when treated with bisphosphonates-alone and could be used in non-tumor pathologies. However, in a combined treatment with IR, it can also provide protection to tumor cells, thus reducing the intended effect of the IR.

## Artículo III

### **Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility.**

*Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J.*

*Clinical and Translational Oncology, 2013;15(9):712-719.*

Url: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12094-012-0994-9>

#### **Abstract**

**Purpose:** To compare the genoprotective and radioprotective effect of carnosol (COL) against damage induced by ionizing radiation with similar effects produced by different antioxidant compounds.

**Methods:** The genoprotective effect was studied by means of the micronucleus test for antimutagenic activity in which the reduction in the frequency of micronuclei was evaluated in cytokinesis-blocked cells of human lymphocytes. The radioprotective effects were studied by cell viability test (MTT) in PNT2 (normal prostate) and B16F10 (melanoma) cell lines when they were administered before exposure to different X-ray doses (4, 6, 8, 10 and 0 Gy).

**Results:** Carnosol shows a significant genoprotective capacity ( $p < 0.001$ ) against radiation with a protection factor of 50 %, and a dose-reduction factor of 4.3. Cell survival obtained with COL administered before exposure to 10 Gy of X-rays showed a protection factor of 55.1 %, eliminating 39 % of radiation-induced cell death in normal epithelial cells of prostate (PNT2) ( $p < 0.001$ ). However, in the melanoma cell lines (B16F10) assayed, COL acted not as a radioprotector, but as a sensitizing agent increasing the cellular death by 34 % ( $p < 0.01$ ) and producing an enhancement ratio of 2.12.

**Conclusions:** Carnosol may be developed as a radioprotective agent in the non-tumoral cells. However, in the B10F16 melanoma cells, melanogenesis is activated by COL leading to redistribution of the enzymatic balances of glutathione and cysteine-lyase production, which could compromise the intracellular redox defence system. This effect appears as an increase in the capacity of ionizing radiation-induced damage, and thus exhibits a paradoxical protective effect of COL on melanoma cells.

## Artículo IV

### Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells.

Alcaraz M, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Olivares A, López-Morata JA, Castillo J.  
*Anticancer Research, 2014;34 (in press)*

**Background:** Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid with interesting biological activities including antioxidant effects and scavenging of oxygen free radicals. Aim: to determine the potentially paradoxical effect of rosmarinic acid, typically being radioprotective when applied to non-tumourous cells, yet conversely displaying a sensitizing action when applied to metastatic B16F10 melanoma cells.

**Materials and Methods:** The genoprotective effect was studied by means of micronucleus tests for antimutagenic activity in which the reduction in the frequency of micronuclei was evaluated using cytokinesisblocked human lymphocytes. The radioprotective effect was studied via a cell viability test in PNT2 (human prostate epithelium) and B16F10 melanoma cells.

**Results:** Rosmarinic acid exhibits a significant genoprotective capacity ( $p < 0.001$ ) against X-rays with a protection factor of 58%, and a dose reduction factor of 7.2. Cell survival obtained after exposure to 10 Gy of X-rays showed a protection factor of 47.5%, thus eliminating 29.1% of radiation-induced cell death in normal prostate epithelial cells ( $p < 0.001$ ). However, in the metastatic B16F10 melanoma cells, rosmarinic acid acted not as a radioprotector, but as a sensitizing agent, increasing cellular death by 42% ( $p < 0.001$ ), with an enhancement ratio of 2.36.

**Conclusion:** Rosmarinic acid has an increased capacity for producing radio-induced damage, and thus a paradoxical damaging effect in melanoma cells. Potentially, research into substances such as rosmarinic acid could help to clarify mechanisms that provide protection to healthy normal cells while exclusively damaging neoplastic cells, thus presenting a new strategy for patients undergoing radiotherapy for cancer.

**Asunto:**

**Fecha:** Wed, 04 Dec 2013 01:03:31 -0600

**De:** IIAR-ANTICANCER.ORG<[info@IIAR-ANTICANCER.ORG](mailto:info@IIAR-ANTICANCER.ORG)>

**Para:** [mab@um.es](mailto:mab@um.es)

I am pleased to inform you that your manuscript with no. **16864-A** entitled:  
**Radiosensitizing effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells**

is accepted for publication in Anticancer Research.  
Proofs and further details will reach you soon.

With my best regards,  
Yours sincerely,

John G. Delinassios  
Managing Editor

# ANTICANCER RESEARCH

International Journal of Cancer Research and Treatment

ISSN: 0250-7005 (print) ISSN: 1791-7530 (online)

---

December 4, 2013

Professor Miguel Alcaraz

Re: Your manuscript No. **16864-A** entitled «**Radiosensitizing Effect of..**»

Dear Dr

Referring to your above manuscript for publication in AR, please allow us to use this form letter in reply:

1. *Referee's recommendations:*

- Urgent to be published immediately.
- Accepted in the presented form.
- Accepted with minor changes.
- Accepted with grammatical or language corrections.
- Remarks: **Please provide Figures at a higher quality resolution**

2. *Excess page charges.*

- Your article has approx. **9** printed pages and is in excess of the allotted number by approx. **5** printed pages. The charges are EURO € **100** per excess page, totalling EURO € **400 (-20% Discount)**. We ask you to confirm acceptance of these charges.
- Your article includes pages with color figures. The charges are EURO € per color page, totalling EURO €
- Our invoice will be sent by e-mail to the corresponding author.

3.  Your article will appear in Volume **34**, Issue No. **NAA, 2014**

4.  Please order your reprints, pdf or online open access, now. This will facilitate our prompt planning of future issues and rapid publication of your article. Reprints will be delivered by rapid one-day delivery within one month from publication.

We would appreciate your prompt reply.

With many thanks,

Yours sincerely,



*J.G. Delinasios*  
*Managing Editor*

EDITORIAL OFFICE: INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH  
DELINASIOS G.J. & CO G.P., Kapandriti, P.O.B. 22, Attiki 19014, Greece. Tel.: 0030-22950-52945;  
Tel & Fax:0030-22950-53389; e-mail: journals@iia-anticancer.org

## **IV. BIBLIOGRAFÍA**

## IV. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaraz M, Acevedo C, Castillo J, Benavente-García O, Armero D, Vicente V, et al. Soluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. **Br J Radiol** 2009; 82: 605-9.
- Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J. Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility. **Clin Transl Oncol** 2013;15(9):712-9.
- Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernández H, et al. Chemical genoprotection: Reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. **Dentomaxillofac Radiol** 2011; 40: 310-4.
- Algur E, Macklis RM, Hafeli UO: Synergistic cytotoxic effects of zoledronic acid and radiation in human prostate cancer and myeloma cell lines. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2005; 61:535-542.
- Alley MC, Scudiero OA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski M J, Fine DL et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res** 1988; 48:589-601.
- Almássy Z, Krepinsky AB, Bianco A, Köteles GJ. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. **Int J Rad Appl Instrum A** 1987; 38(4):241-9.
- Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M. Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: Comparative study versus several flavonoids and sulfurcontaining compounds. **J Med Food** 2002; 5: 125-35.
- Berk L, Berkey B, Rich T, Hrushesky W, Blask D, Gallagher M, et al. Randomized phase II trial of high-dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119) . **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 68 (3): 852-7.
- Body JJ, Diel IJ, Bell R, Pecherstorfer M, Lichinitser MR, Lazarev AF et al. Oral ibandronate improves bone pain and preserves quality of life in patients with skeletal metastases due to breast cancer. **Pain** 2004; 111:306-12.
- Body JJ. Bisphosphonates. **Eur J Cancer** 1998; 34(2):263-9.
- Body JJ. Rationale for the use of bisphosphonates in osteoblastic and osteolytic bone lesions. **Breast** 2003; 12:S37-44.
- Bosch-Barrera J, Merajver S, Menéndez J, et al. Direct antitumour activity of zoledronic acid: preclinical and clinical data. **Clin Transl Oncol** 2011; 13:148-55
- Bourgier C, Levy A, Vozenin MC, Deutsch E. Pharmacological strategies to spare normal tissues from radiation damage: useless or overlooked therapeutics?. **Cancer Metastasis Rev.** 2012; 31(3-4):699-712

- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res** 1987a; 47:936-42.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JO, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. **Cancer Res** 1987b ;47:943-46.
- Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Lorente J, Alcaraz M, Dato MJ. Radioprotective effects against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays as a function of polymerization grade of grape seed extracts. **J Med Food** 2001; 4: 117-23.
- Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuño A, et al. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. **J Agric Food Chem** 2000; 48: 1738-45.
- Coleman RE. Adjuvant bisphosphonates in breast cancer: Are we witnessing the emergence of a new therapeutic strategy?. **Eur J cancer** 2009; 45: 1909 -15
- Coleman RE. Bisphosphonates in breast cancer. **Ann Oncol** 2005; 16:687-95.
- Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Del Río JA, Ortuño A, et al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. **J Agric Food Chem** 2003; 51:4247-53
- Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **Lancet** 2002; 359(9322): 2018-26.
- Dumon JC, Journe F, Kheddoumi N, Lagneaux L, Body JJ. Cytostatic and apoptotic effects of bisphosphonates on prostate cancer cells. **Eur Urol** 2004; 45:521-8
- Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates, **J Pharmacol Exp Ther** 2001; 296: 235-42.
- Ebetino F, Hogan AM, Sun S, Tsoumpira MK, Duan X, Triffitt JT et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone** 2011; 49: 20-33.
- Epplen R, Stöckle M, Engelmann U, Heidenreich A, Ohlmann CH. Differential effects of ibandronate, docetaxel and farnesol treatment alone and in combination on the growth of prostate cancer cell lines. **Acta Oncol** 2011; 50: 127-33
- Fenech M. Cytokinesis block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc** 2007; 5:1084-104.
- Ferreira PR, Fleck JF, Diehl A, Barletta D, Braga-Filho A, Barletta A , et al. Protective effect of alpha-tocopherol in head and neck cancer radiation-induced mucositis: a double-blind randomized trial. **Head Neck** 2004; 26(4): 313-21.

- Fromigue O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. **J Endocrinol Invest** 2002; 25: 539-46
- Giger EV, Castagner B, Leroux JL. Biomedical applications of bisphosphonates. **J Control Release** 2013; 167: 175-188
- Green JR, Clézardin P. Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. **Am J Clin Oncol** 2002; 25:S3-9.
- Guise T. Antitumor effects of bisphosphonates: Promising preclinical evidence. **Cancer Treat Rev** 2008; 34:S19-S24
- Heras P, Karagiannis S, Kritikos K, Hatzopoulos A, Mitsibounas D. Ibandronate is effective in preventing skeletal events in patients with bone metastases from colorectal cancer. **Eur J Cancer Care (Engl)** 2007; 16:539-42.
- Heras P, Kritikos K, Hatzopoulos A, Georgopoulou AP. Efficacy of ibandronate for the treatment of skeletal events in patients with metastatic breast cancer. **Eur J Cancer Care (Engl)** 2009; 18:653-56.
- International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies, **IAEA** 2011, Vienna.
- Johnson JJ, Syed DN, Suh Y, Heren CR, Saleem M, Siddiqui IA, et al. Disruption of androgen and estrogen receptor activity in prostate cancer by a novel dietary diterpene carnosol: implications for chemoprevention. **Cancer Prev Res (Phila)** 2010; 3:1112-23
- Johnson JJ. Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. **Cancer Lett** 2011; 305:1-7
- Journé F, Magné N, Chaboteaux C, Kinnaert E, Bauss F, Body JJ. Sequence- and concentration-dependent effects of acute and long-term exposure to the bisphosphonate ibandronate in combination with single and multiple fractions of ionising radiation doses in human breast cancer cell lines. **Clin Exp Metastasis** 2006; 23:135-47.
- Junquera LM. Diagnostico, prevención y tratamiento de la osteonecrosis de los maxilares por bifosfonatos. **Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac** 2008; 30 (3): 145-56
- Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gamma-delta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. **Blood** 2000; 96: 384-92.
- Langer C, Hirsh V. Skeletal morbidity in lung cancer patients with bone metastases: Demonstrating the need for early diagnosis and treatment with bisphosphonates. **Lung Cancer** 2010; 67: 4-11
- Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A, Blumberg JB. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy?. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100: 773-83.

- Lee YH, Song GG. Efficacy and safety of monthly 150 mg oral ibandronate in women with postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Korean J Intern Med** 2011; 26:340-347.
- Lesperance ML , Olivotto IA , Forde N, Zhao Y, Speers C, Foster H, et al. Mega-dose vitamins and minerals in the treatment of non-metastatic breast cancer: an historical cohort study . **Breast Cancer Res Treat** 2002; 76 (2): 137-43.
- Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L, Barni S, Tancini G, Fossati V, et al. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. **Oncology** 1996; 53(1): 43-6.
- Mancini T, Doga M, Mazziotti G, Giustina A. Cushing's syndrome and bone. **Pituitary** 2004; 7: 243-246
- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg** 2003; 61(9):1115-7
- Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. **J Am Dent Assoc** 2005; 136(12):1658-68
- Misirlioglu CH, Erkal H, Elgin Y, Ugur I, Altundag K. Effect of concomitant use of pentoxifylline and alpha-tocopherol with radiotherapy on the clinical outcome of patients with stage IIIB non-small cell lung cancer: a randomized prospective clinical trial. **Med Oncol** 2006; 23 (2): 185-9.
- Morgan C, Wagstaff J. Is there a role for ibandronate in the treatment of prostate cancer patients with bony metastases? **Acta Oncol** 2009; 48:882-89.
- Morgan G, Lipton A. Antitumor Effects and Anticancer Applications of Bisphosphonates. **Semin Oncol** 2010; 37: S30-S40
- Neville-Webbe HL, Coleman RE. Bisphosphonates and RANK ligand inhibitors for the treatment and prevention of metastatic bone disease. **Eur J Cancer** 2010; 46:1211-22
- Pazianas M. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103(3):232-40
- Prasanna PG, Stone HB, Wong RS, Capala J, Bernhard EJ, Vikram B et al. Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? **Transl Cancer Res.** 2012; 1(1):35-48.
- Prasanna PG, Stone HB, Wong RS, Capala J, Bernhard EJ, Vikram B, et al. Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? **Transl Cancer Res** 2012; 1(1): 35-48.
- Ricciardi S, Marinis F. Treatment of bone metastases in lung cancer: the actual role of zoledronic acid. **Rev Recent Clin Trials** 2009; 4(3):205-11

- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer** 2000; 88: 2961-78.
- Russell R, Watts N, Ebetino F, Rogers M. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int** 2008; 19: 733-759.
- Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of vitamina C and E against  $\gamma$ -ray-induced chromosomal damage in mouse. **Int J Radiat Biol** 1993; 63:759-64
- Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. **Brit J Cancer** 2000; 82:1459-68.
- Seton M. Paget disease of bone: diagnosis and drug therapy. **Cleve Clin J Med** 2013; 80(7):452-62.
- Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. **Brit J Haematol** 1997; 98: 665-72
- Thiébaud D, Burckhardt P, Kriegbaum H, Huss H, Mulder H, Juttmann JR et al. Three monthly intravenous injections of ibandronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Am J Med** 1997; 103 (4):298-307.
- Ural AU, Avcu F. Radiosensitizing effect of zoledronic acid in small cell lung cancer. **Lung Cancer** 2005; 50: 271-72 (letter).
- Valenti MT, Carbonare L, Bertoldo F. The effects on hTERT gene expression is an additional mechanism of amino-bisphosphonates in prostatic cancer cells. **Eur J Pharmacol** 2008; 580: 36-42
- Van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 264: 108-11.
- Vicente JR, Ortega VV, Jordana MC .Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio de crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma. **Patología** 1997; 30:18-27.
- Winter MC, Holen I, Coleman RE. Exploring the anti-tumour activity of bisphosphonates in early breast cancer. **Cancer Treat Rev** 2008; 34: 453-75

## **V. ANEXOS**

## V. ANEXO 1: OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA PRESENTADO

### CAPITULOS DE LIBROS

1. Armero Barranco D, **Olivares Rueda A**. 2013. Protección radiológica en Radiodiagnóstico (II). En: BASES FISICAS Y BIOLOGICAS DEL RADIODIAGNOSTICO MEDICO: Curso de capacitación para operar equipos de radiodiagnóstico médico y dental. Miguel Alcaraz Baños et al., eds Servicio de publicaciones de la Universidad de Murcia. ISBN: 978-84-15463-57-3, pp. 123-131
2. Aranda Rodríguez M, **Olivares Rueda A**, Alcaraz Saura M, Velasco Hidalgo F. 2013. Práctica 4. En: BASES FISICAS Y BIOLOGICAS DEL RADIODIAGNOSTICO MEDICO: Curso de capacitación para operar equipos de radiodiagnóstico médico y dental. Miguel Alcaraz Baños et al., eds Servicio de publicaciones de la Universidad de Murcia. ISBN: 978-84-15463-57-3, pp. 247, 275, 289
3. Alcaraz Baños M, Alcaraz Saura M, Martínez García-Cervantes, **Olivares Rueda A**. 2013. Radiobiología. En: FORMACION BASICA EN PROTECCION RADIOLOGICA: Curso de protección radiológica dirigido al personal técnico de empresas de venta y asistencia técnica de equipos de rayos X dentales. Miguel Alcaraz Baños et al., eds Servicio de publicaciones de la Universidad de Murcia. ISBN: 978-84-15463-89-4, pp. 127-166
4. Morant Echevarne J.J, Velasco Hidalgo E, **Olivares Rueda A**, Velasco Hidalgo F. 2013. Practica 3Pruebas de aceptación de equipos de rayos X dentales. En: FORMACION BASICA EN PROTECCION RADIOLOGICA: Curso de protección radiológica dirigido al personal técnico de empresas de venta y asistencia técnica de equipos de rayos X dentales. Miguel Alcaraz Baños et al., eds Servicio de publicaciones de la Universidad de Murcia. ISBN: 978-84-15463-89-4, pp. 305-318

## **COMUNICACIONES CIENTIFICAS**

### **INTERNACIONALES**

1. **Olivares A**, Alcaraz M, Armero D, Alcaraz-Saura M, Achel D, Castillo J. Zoledronic acid and radiation: accelerated toxicity. XIII<sup>th</sup> European Congress of Dentomaxillofacial Radiology. Leipzig, Alemania, **2012**. Libro de resúmenes del congreso pp.156
2. **Olivares A**, Urrutia I, Morales MC, Chiva F, Alcaraz M. Radiopaque dental cement in intraoral digital radiography: a study in vitro. XIII<sup>th</sup> European Congress of Dentomaxillofacial Radiology. Leipzig, Alemania, **2012**. Libro de resúmenes del congreso pp.157
3. **Olivares A**, Alcaraz M, Velasco F, Velasco E, Alcaraz-Saura M. The doses according to the imaging system used in spanish intraoral radiology. XIII<sup>th</sup> European Congress of Dentomaxillofacial Radiology. Leipzig, Alemania, **2012**. Libro de resúmenes del congreso pp.158
4. **Olivares Rueda A**, Vicente Hernández A, Alcaraz Baños M, Bravo González L.A. Cephalometric analysis by means of Cone Beam Computerised Tomography and conventional lateral cephalometric radiographs. 88th Congress European Orthodontic Society. Santiago de Compostela, España. Eur J Orthod **2012**; 34 (5): e219-e220.
5. **Olivares Rueda A**, Vicente Hernández A, Bravo González L.A, Alcaraz Baños M. Reliability of cephalometric measurements taken from 3D reconstructed images and conventional 2D images. 88th Congress European Orthodontic Society. Santiago de Compostela, España. Eur J Orthod **2012**; 34 (5): e220-e221.

### **NACIONALES**

1. Alcaraz Baños M, Villena García C, Moreno Capdevila C, Navarro Fernández, JL, Alcaraz Saura M, Achel DG, Claver Valderas MA, **Olivares Rueda A**, Olmos Ortiz E. Estimación del daño genotóxico en pacientes irradiados con (18 FDG) en Tomografía por emisión de positrones. XVIII Congreso nacional de la Sociedad

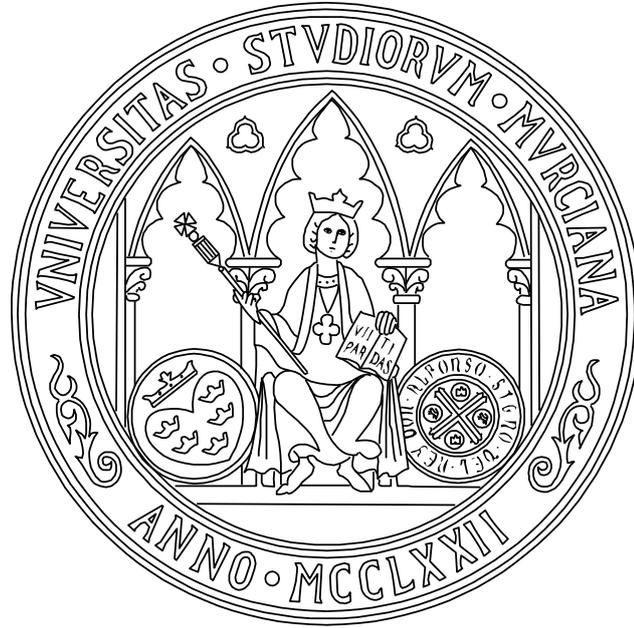
- Española de Física Médica y XIII Congreso nacional de la Sociedad Española de Protección Radiológica. Sevilla, España. Radioprotección **2011**; 68: 409-409
2. Achel GD, **Olivares A**, Armero D, Alcaraz-Saura M, Olmos E Y Alcaraz M. evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Zoledronic acid. XIX Congreso Español de Toxicología. Vigo, España. Revista de Toxicología **2011**; 28(1): 81-82
  3. Achel GD, Martínez Beneyto, Armero D, **Olivares A**, Alcaraz M. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of Triclosan at concentrations recommended by odontologists. XIX Congreso Español de Toxicología. Vigo, España. Revista de Toxicología **2011**; 28(1): 82-82
  4. Martínez Beneyto Y, **Olivares Rueda A**, García Cruz, E Pérez Lajarín L, Alcaraz Baños M. Determinación de la capacidad Mutagénica del Ácido Zoledrónico. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral. Oviedo, España. RCOE **2011**; 16 (3): 232-233.
  5. Martínez Beneyto Y, García Cruz E, **Olivares Rueda A**, Pérez Lajarín L, Alcaraz Baños M. Valoración de la capacidad genotóxica del Triclosán en las concentraciones habituales utilizadas en odontología. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral, Oviedo, España. RCOE **2011**; 16 (3): 232.
  6. Martínez Beneyto Y, García Cruz E, Chiva García F, **Olivares Rueda A**, Alcaraz Baños M. Ausencia de efecto genotóxico del adhesivo dental Prime and Bond NT®. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral, Oviedo, España. RCOE **2011**; 16 (3): 231-232.
  7. **Olivares Rueda A**, Achel D.G, Alcaraz Baños, M, Olmos E, Alcaraz Saura M, Castillo Sanchez J. Carnosic Acid: Radioprotective effects against damage induced by ionizing radiation. XVII Congreso nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica. Vigo, España Reports of practical oncology and radiotherapy **2013**; 18: 386-387
  8. **Olivares Rueda A**, Alcaraz Baños M, Armero Barranco D, Achel D.G, Alcaraz Saura M. Ibandronate cytotoxicity compared with zoledronic acid and ionizing radiation. XVII Congreso nacional de la Sociedad Española de Oncología

Radioterápica. Vigo, España. Reports of practical oncology and radiotherapy **2013**; 18: 388-388

9. **Olivares Rueda A**, Achel D.G, Alcaraz Baños M, Olmos E, Alcaraz Saura M, Castillo Sanchez J. paradoxical effect of Rosmarinic acid on metastatic melanoma B16F10 cells. XVII Congreso nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica. Vigo, España. Reports of practical oncology and radiotherapy **2013**; 18: 388-389

## MENCION INTERNACIONAL

## PhD THESIS SUMMARY



## UNIVERSITY OF MURCIA

### **Reducing the genotoxic, cytotoxic and radiosensitizing effects of bisphosphonates via antioxidants: an experimental model**

**Advisor during external stay:** Prof. Thomas Helleday  
Karolinska Institutet  
Stockholm, SWEDEN

## SUMMARY

### INTRODUCTION

Bisphosphonates (BPs) are a stable analogue of inorganic pyrophosphates, which have a strong affinity for calcium and whose efficiency in the treatment of osteolytic lesions associated with bone metastasis, multiple myeloma, malignant hypercalcaemia, Paget's disease and osteoporosis, has been demonstrated.

Two BP mechanisms have been described: a direct cytotoxic effect and an indirect cytostatic effect. Both could play a synergic role and also explain their unwanted clinical side-effects. By normalizing bone metabolism, BPs are capable of inhibiting growth factors in tumour cells and prolonging their pre-metastatic phase. Their apoptosis-inducing effects in osteoclasts and macrophages have also been demonstrated in a range of different tumour cells. Furthermore, their anti-adhesive, anti-proliferative, anti-invasive and anti-angiogenic effects have also been described in several tumour cell lines. Recently, it has been shown that BPs act synergically with other chemotherapeutic agents in breast cancer cells by potentiating their anti-tumoral capacity.

### AIMS

The aims we propose to achieve via this Doctoral Thesis are as follows:

**1º.** To determine the genotoxic and cytotoxic effects of bisphosphonates (zoledronic acid, ibandronate and pamidronate) both separately and in combination with ionizing radiation, in order to assess the possible existence of a synergically toxic effect resultant from both therapies.

**2º.** To assess the possible radiosensitizing effect of the aforementioned bisphosphonates which would allow us to explain certain toxic effects described following their administration in combination with ionizing radiation.

**3º.** To determine the potentially protective effect of antioxidants (carnosol, rosmarinic acid and apigenin) against the toxicity induced by the aforementioned

bisphosphonates which might enable an increase in their therapeutic effect and/or the dose administered.

**4º.** To assess the possible consequences derived from the protective effect of anti-oxidative substances against bisphosphonates, which might modify their therapeutic effect.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals and reagents**

Zoledronic acid (Zometa®) was obtained from Novartis Pharmaceuticals (Barcelona, Spain). Ibandronate (ibandronate sodium salt) and pamidronate (3-amino-1 hydroxypropylidene bisphosphonic acid) were obtained from Sigma-Aldrich Chemicals S.A, (Madrid, Spain). RPMI-1640 medium, Ham's F10, Phytohemagglutinin (PHA), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), cytochalasin B, streptomycin, penicillin, phosphate-buffered saline (PBS) and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma-Aldrich Chemicals S.A (Madrid, Spain). Fetal bovine serum was obtained from Gibco BRL (Louisville, KY (USA)) and Apigenin (API), L-ascorbic acid (AA) and 99%  $\delta$ -tocopherol (E) was obtained from Sigma Co. (Madrid Spain).

Carnosol (COL) (86%), eriodictyol, quercetin and green tea extract were supplied by Nutrafur-Furfural Español, SA (Murcia, Spain). Rosmarinic acid (RA) (95%), diosmine, 95% gallic acid (GA), 95% ellagic acid (EA) and 97% rutin (RUT) were obtained from Extrasynthese (Genay, France). Amifostine (AMF) was obtained from Shering-Plough (Ethyol®, Madrid, Spain).

### **Genototoxic Effect: frequency of micronuclei in cytokinesis-blocked cells of human lymphocytes (CBMN).**

#### **Blood samples and irradiation procedure**

Human whole blood were obtained from two healthy young non-smoking female donors into heparinised tubes and mixed well. COL and E were dissolved in 5 %

aqueous DMSO at a ratio of 1mg/ml, and Z, ibandronate, pamidronate, GA, AA, API, EA and RA were dissolved in water.

For the before-X-irradiation treatments, 20  $\mu$ L of these solutions were added to 2 mL of the heparinised human blood to obtain a final concentration of 25  $\mu$ M each, and the samples were homogenized just before X-irradiation. For the after X-irradiation treatments, 20  $\mu$ L of these solutions were added to 2 mL of irradiated human blood (25  $\mu$ M) and homogenized for 10 min after X-irradiation. The DMSO group was included in this study not only because DMSO was used as solvent, but also because it is generally considered to be a classic radical scavenger and a radioprotective agent according to structural and experimental data.

### **Culture Technique**

After X-irradiation, (with addition of phenolics before and after X-irradiation), the micronucleus (MN) assay was carried out on the irradiated lymphocytes, with the following cytokinesis-blocking (CBMN) method described by Fenech and Morley (1985) and adapted by the International Atomic Energy Agency (2011). Briefly: Whole blood samples (0.5 ml) were cultured at 37 °C for 72 hours in 4.5 ml of F-10 medium containing 15% foetal bovine serum, 1.6  $\mu$ g/ml phytohaemagglutinin, 1 % penicillin/streptomycin and 1  $\mu$ g/ml of glutamine. Forty-four hours after initiation of the lymphocyte cultures, 150  $\mu$ l of cytochalasin B was added at a concentration of 6  $\mu$ g/ml. At 72 hours the cultured lymphocytes were treated with hypotonic solution (KCl, 0.075 M) for 3 min and fixed using methanol: acetic acid (3:1). Air-dried slide preparations were made and stained with May-Grünwald Giemsa 24 hours later. Each experiment was repeated on three occasions.

The substances tested were administered by adding 25  $\mu$ l to each well. Zoledronic acid was administered at the recommended concentrations for humans (5%); ibandronate, pamidronate and API, COL and RA were administered at a concentration of 20  $\mu$ M.

### **Scoring of Micronuclei**

The numbers of micronuclei (MN) in at least 3,000 cytokinesis-blocked cells (CB cells) for each case were determined by two specialists who analysed the slides of all groups in a double blind. These slides were examined using an optic and digital microscope with 400X magnification for surveying the slides and 1000X magnification to confirm the presence of MN in the cells.

### **Cell survival Curve and viability quantification; MTT test.**

#### **Cell line and culture conditions**

The PNT2 cell line used was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) Health Protection Agency Culture Collection (Catalogue n°95012613, HPACC, UK). The PNT2 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine (2 mM) and streptomycin plus penicillin (100 µg/ml and 100 IU/ml, respectively). The metastatic melanoma cell line (B16F10) was kindly provided by Dr. Hearing from the National Cancer Institute (Bethesda, MA, USA). The transgenic adenocarcinoma of mouse prostate cell line (TRAMP-C1) used was obtained from the American Type Culture Collection (catalog n:CRL-2730, USA). The TRAMP-C1 and B16F10 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12K (1:1). Both media contained 10% foetal bovine serum (Gibco BRL) and 5% penicillin/streptomycin. The cell cultures were kept at 37°C and 95% relative humidity, in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Tests were carried out to confirm the absence of *Mycoplasma* spp. throughout the study. All the processes were carried out in a Cultair ASB type I vertical laminar flow chamber. The culture medium was changed every 2 days or when acidification was indicated by the pH indicator (phenol red).

#### **MTT test**

To analyze the effects of the substances studied on cell viability and survival, we used the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay for 24 or 48 hours. The methods of Carmichael *et al.* (1987) and Alley *et al.* (1988) were adapted to our culture conditions. Briefly, the cell cultures were incubated in 200 µl growth medium and allowed to adhere for 24 hours. After treatment with the

above mentioned incubation doses of the substances studied, and for the durations stated, supplemented growth medium and 50 µl of MTT (5 mg/ml) were added to each well in 96 well plates and the microplates were further incubated at 37 °C for 4 hours in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Afterwards, the plates were centrifuged at 90 rpm for 8min to carefully remove the medium and non-metabolized MTT, 100 µl of DMSO was added to each well to solubilize the MTT taken up by the living cells. After shaking for 30 min at room temperature, the plates were read with a spectrophotometer using 570 nm for the reading and 690 nm for the reference wavelengths. The negative control wells were used for the baseline zero. Each experiment was repeated on three occasions.

### **Irradiation**

The samples for the study were exposed to X-rays with an Andrex SMART 200E instrument (YXLON International, Hamburg, Germany) operating at 4.5 mA, 36 cm FOD at room temperature. The radiation doses were monitored by a UNIDOS® Universal Dosimeter with PTW Farne® ionization chambers TW 30010 (PTW-Freiburg, Freiburg, Germany) in the radiation cabin and the X-rays doses were confirmed by means of Thermoluminescent dosimeters (TLDs) (GR-200®, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China). The CIEMAT (Ministry of Industry and Energy, Spain) supplied the TLDs barges and also confirmed the absorbed doses in them after the experiments. In the micronucleus test with cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) of human lymphocyte cells 2 Gy of irradiation was administered, whereas different doses of X-rays (4, 6, 8, 10 and 0 Gy as control) were used to construct the cell survival curves and cell viability quantification (MTT test).

### **Statistical analysis**

In the genotoxicity study, the degree of dependence and correlation between variables were assessed using analysis of variance (ANOVA) complemented by a contrast of means ( $p < 0.05$ ). Quantitative means were compared by regression and linear correlation analysis. In addition, we adapted the formula used to evaluate the

Protection Factor described by Sarma and Kesavan (1993) to evaluate the Sensitization Factor (FS). For the MN analysis:

$$\text{Factor of Sensitization (\%)} = ((F_{\text{treated and irradiated}} - F_{\text{control irradiated}}) / F_{\text{control irradiated}}) \times 100.$$

Where  $F_{\text{control irradiated}}$  = frequency of MN in untreated but irradiated blood lymphocytes and  $F_{\text{treated irradiated}}$  = frequency of MN in blood lymphocytes treated with substances and irradiated (administered before and after X-irradiation).

The dose-reduction factor (DRF) was calculated as the ratio of radiation dose required to produce the same biologic effect in the presence and absence of the radioprotector. We used the formula described by Hall (1974): DRF= dose of reduction in the presence of radioprotector/doses of radiation in the absence of the radioprotector, to produce a given level of MN.

In the cytotoxicity assays, an analysis of variance (ANOVA) of repeated means was used to compare the percentages of surviving cells in the cultures with different concentrations of the substances studied. This was complemented by least significant difference analyses to contrast pairs and means. The analyses were carried out by logarithmically transforming the data to comply with ANOVA conditions.

To determine the Factor of Protection (FP) and Factor of Sensitization (FS) the above formula described by Sarma and Kesavan (1993) for the analysis of growth inhibition (IC25, IC50 and IC75):

$$F_P = \frac{M_T - M_C}{M_C} \times 100$$

where: MT = cell mortality in the samples irradiated and treated with the substances studied; MC = cell mortality in the irradiated control cells.

The effectiveness of a sensitizer is conveniently expressed in terms of the enhancement ratio (ER). This is defined as the ratio of doses in the absence and in the presence of the drug which produce the same biological effect.

### **Isobologram analysis**

The isobologram method of analysis was used to assess whether synergic or additive effects were seen when BP and IR were combined, as described previously (Algur et al., 2005). Dose–response curves were plotted for the effects of BP and for the effects of IR on cell viability. From these curves, the combined treatments (PB + IR)  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  and  $IC_{75}$  and 75 % growth inhibition values (e.g.  $IC_{75}$  = 75 % of maximum effect = 25 % remaining surviving cells) were determined for each curve. The ratio of the combined  $IC_{50}$  and  $IC_{75}$  values to the separate  $IC_{50}$  and  $IC_{75}$  values for each drug alone was calculated and plotted as an isobologram. The combination index (CI) was then calculated by the formula:  $CI = (d1/Dx1) + (d2/Dx2)$ , where  $Dx1$  is the dose of agent 1 (IR) required to produce x % effect alone, and  $d1$  is the dose of agent 1 (IR) required to produce the same x % effect in combination with  $d2$  (BP).  $Dx2$  is similarly the dose of agent 2 (BP) required to produce x% effect alone, and  $d2$  (BP) is the dose of agent 2 required to produce the same x% effect in combination with  $d1$  (IR). The CI values were interpreted as follows: <1.0, synergism; 1.0, additive; and >1.0, antagonism.

## RESULTS

### Manuscript 1.

#### **Zoledronic acid and radiation: toxicity, synergy or radiosensitization?**

*Alcaraz M, Olivares A, Armero D, Alcaraz-Saura M, Achel D.  
Clinical and Translational Oncology, 2013;15 (4):300-6.*

**Introduction:** Zoledronic acid (Z) is a bisphosphonate used in hypercalcaemia-related cancer, in complications for bone metastasis and in postmenopausal osteoporosis and it has been related to osteoradionecrosis, especially when associated with radiation to the head and neck structures.

**Objectives:** To determine the radiosensitization capacity of zoledronic acid in the combined treatment with ionizing radiation (IR) by evaluating its genotoxic and cytotoxic capacities in non-tumoral cells.

**Materials and methods:** The genotoxic effect of Z was studied by means of the micronucleus test in cytokinesisblocked cells of human lymphocytes irradiated before and after a 2 Gy irradiation, while the cytotoxic effect was studied by a cell viability test in the PNT2 cell line before and after exposure to different X-ray doses (0–20 Gy) in four groups (Z alone, radiation alone, Z + IR and IR + Z).

**Results:** A dose-dependent and time-dependent cytotoxic effect of Z and IR on PNT2 cells in vitro ( $p > 0.001$ ) was demonstrated. With the concentrations recommended for humans, the combined treatment had a more pronounced effect than individual treatments ( $p < 0.001$ ). The effect was synergic ( $CI < 1$ ), increasing the Z enhancement ratio (2.6) and sensitization factor (56 %); the effect of Z was always greater after IR exposure. In the genotoxic effect, only the administration of Z after irradiation (IR + Z) increased chromosome damage ( $p < 0.001$ ) and the sensibilization factor (35.7%).

**Conclusion:** High concentrations of Z are toxic, but the concentrations recommended for clinical practice in humans give it the characteristics of a radiosensitization agent, whose effect is even greater when administered after IR.

**Manuscript 2.**

**Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines.**

*Alcaraz M, Olivares A, Achel DG, Alcaraz-Saura M.  
Anticancer Research, 2013;33(8):3217-24.*

**Background:** Bisphosphonates are used in cancer-related hypercalcaemia, in complications of bone metastasis and in postmenopausal osteoporosis, and have often been associated with adverse complications. *Aim:* To determine the protective effect of apigenin against growth inhibition of normal epithelial human prostatic (PNT2), transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP-C1) and metastatic melanoma cells (B16F10) in combined treatments with bisphosphonates and ionizing radiation (IR).

**Materials and Methods:** The growth inhibition on PNT2, TRAMP-C1 and B16F10 cells in the combined treatments with bisphosphonates (zoledronic acid, ibandronate and pamidronate) and IR in the presence and absence of apigenin was studied using a cell viability test.

**Results:** Zoledronic acid had a cytotoxic effect on PNT2, TRAMP-C1 and B16F10 cells ( $p < 0.001$ ). However, ibandronate and pamidronate had a cytotoxic effect only on PNT2 cells ( $p < 0.001$ ). The administration of apigenin in combined treatment with bisphosphonates and IR showed: a decrease in the cytotoxic effect on TRAMP-C1 and B16F10 cells in the treatment with ibandronate; a protective effect on normal PNT2 and melanoma cells, but not on TRAMP-C1 cells in the treatment with zoledronic acid; and provided protection only to PNT2 cells in the treatment with pamidronate.

**Conclusion:** The use of the antioxidant produced a greater decrease in the cytotoxic effect on the non-tumor than in tumor cells when treated with bisphosphonates-alone and could be used in non-tumor pathologies. However, in a combined treatment with IR, it can also provide protection to tumor cells, thus reducing the intended effect of the IR.

**Manuscript 3.**

**Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility.**

*Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J.  
Clinical and Translational Oncology, 2013;15(9):712-9.*

**Purpose:** To compare the genoprotective and radioprotective effect of carnosol (COL) against damage induced by ionizing radiation with similar effects produced by different antioxidant compounds.

**Methods:** The genoprotective effect was studied by means of the micronucleus test for antimutagenic activity in which the reduction in the frequency of micronuclei was evaluated in cytokinesis-blocked cells of human lymphocytes. The radioprotective effects were studied by cell viability test (MTT) in PNT2 (normal prostate) and B16F10 (melanoma) cell lines when they were administered before exposure to different X-ray doses (4, 6, 8, 10 and 0 Gy).

**Results:** Carnosol shows a significant genoprotective capacity ( $p < 0.001$ ) against radiation with a protection factor of 50 %, and a dose-reduction factor of 4.3. Cell survival obtained with COL administered before exposure to 10 Gy of X-rays showed a protection factor of 55.1 %, eliminating 39 % of radiation-induced cell death in normal epithelial cells of prostate (PNT2) ( $p < 0.001$ ). However, in the melanoma cell lines (B16F10) assayed, COL acted not as a radioprotector, but as a sensitizing agent increasing the cellular death by 34 % ( $p < 0.01$ ) and producing an enhancement ratio of 2.12.

**Conclusions:** Carnosol may be developed as a radioprotective agent in the non-tumoral cells. However, in the B10F16 melanoma cells, melanogenesis is activated by COL leading to redistribution of the enzymatic balances of glutathione and cysteine-lyase production, which could compromise the intracellular redox defence system. This effect appears as an increase in the capacity of ionizing radiation-induced damage, and thus exhibits a paradoxical protective effect of COL on melanoma cells.

**Manuscript 4.**

**Radiosensitizing Effect of Rosmarinic Acid in Metastatic Melanoma B16F10 Cells.**

*Alcaraz M, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Olivares A, López-Morata JA, Castillo J.  
Anticancer Research, 2014;34 (in press)*

**Background:** Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid with interesting biological activities including antioxidant effects and scavenging of oxygen free radicals. Aim: to determine the potentially paradoxical effect of rosmarinic acid, typically being radioprotective when applied to non-tumourous cells, yet conversely displaying a sensitizing action when applied to metastatic B16F10 melanoma cells.

**Materials and Methods:** The genoprotective effect was studied by means of micronucleus tests for antimutagenic activity in which the reduction in the frequency of micronuclei was evaluated using cytokinesisblocked human lymphocytes. The radioprotective effect was studied via a cell viability test in PNT2 (human prostate epithelium) and B16F10 melanoma cells.

**Results:** Rosmarinic acid exhibits a significant genoprotective capacity ( $p < 0.001$ ) against X-rays with a protection factor of 58%, and a dose reduction factor of 7.2. Cell survival obtained after exposure to 10 Gy of X-rays showed a protection factor of 47.5%, thus eliminating 29.1% of radiation-induced cell death in normal prostate epithelial cells ( $p < 0.001$ ). However, in the metastatic B16F10 melanoma cells, rosmarinic acid acted not as a radioprotector, but as a sensitizing agent, increasing cellular death by 42% ( $p < 0.001$ ), with an enhancement ratio of 2.36.

**Conclusion:** Rosmarinic acid has an increased capacity for producing radio-induced damage, and thus a paradoxical damaging effect in melanoma cells. Potentially, research into substances such as rosmarinic acid could help to clarify mechanisms that provide protection to healthy normal cells while exclusively damaging neoplastic cells, thus presenting a new strategy for patients undergoing radiotherapy for cancer.

## DISCUSSION

Our results show the cytotoxic effects of zoledronic acid (Z), related to both the dose and moment of administration, in normal epithelial prostate cells (PNT2), in transgenic rat prostate tumour cells (TRAMP-C1) and in mouse metastatic melanoma cells (B16F10) “*in vitro*”. These results confirm that described by several authors who consider that Z can inhibit cell proliferation in a range of tumour cells *in vitro* (Algur *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005; Ural *et al.*, 2006). However, ibandronate and pamidronate only display dose-dependent cytotoxic effects in PNT2 cells but not in TRAMP-C1 or B16F10 tumour cells. There are few prior studies describing “*in vitro*” cytotoxic effects induced by ibandronate and pamidronate (Morgan *et al.*, 2009), although several authors have described the “*in vitro*” cytotoxic effects induced by ibandronate in a range of cell lines (Fromigue *et al.*, 2000; Hiraga *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004; Journe *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2009).

Our results also demonstrate the dose-dependent cytotoxic effect of ionizing radiation (IR) in PNT2, TRAMP-C1 and B16F10 cells. On administering a combined therapy using bisphosphonates together with IR, clinically recommended therapeutic concentrations of Z (5%), produce a synergic cytotoxic effect together with IR, as well as displaying all the classic characteristics of a potent radiosensitizing agent (Hall, 1978). In this sense, certain authors have also described the potential sensitizing effect of Z in treatments combined with other chemotherapies, including IR in certain tumour cell lines (Algur *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005; Ural *et al.*, 2006).

The exact synergic mechanism occurring between Z and IR is unknown (Ural *et al.*, 2006); it has been suggested that the capacity for Z to detain cells in their G<sub>2</sub>M phase or prolong their progression in the cell cycle could explain this effect since cells in this phase are more sensitive to IR than other cell cycle phases (Mila *et al.*, 1994; Ural *et al.*, 2006).

Karabulut *et al.* (2010) describe the “*in vivo*” administration of Z as causing a significant reduction in both intracellular glutathione (GSH) and gamma

glutamylcysteine; with an increase in nitrites y nitrates (by-products of nitric oxide (NO)); as well as a significant increase in malondialdehyde (MDA). We thus propose the following as the mechanism possibly responsible for the radiosensitization as induced by Z: (1) MDA is an important product of lipid peroxidation and can react with DNA nitrogen bases, thus acting as a mutagen, genotoxin and carcinogen in cell cultures (Uchiyama *et al.*, 1978; Cortas *et al.*, 1990), thus explaining the increase in cytotoxicity and genotoxicity as observed in the cells in this assay; (2) the reactive species derived from nitric oxide which inhibit enzymes, fragment DNA, modify nitrogen bases, destroy membrane lipids via oxidation and consume cellular antioxidants (Uchiyama *et al.*, 1978; Geldof *et al.*, 1996), would also explain the effect we have described in the combined treatments involving Z+IR; (3) GSH, the most abundant intracellular Thiol, is generally considered an important radioprotective agent due to its ability to eliminate radio-induced free radicals (Dewin *et al.*, 1987; Alcaraz *et al.*, 2009), and as such, on decreasing the intracellular levels of GSH, together with the aforementioned mechanisms, cell sensitivity to the effects of radiation would increase in a similar manner to the classic, and clearly established, radiosensitizing effects described for cisplatin (Alcaraz *et al.*, 2009).

Our results for the CBMN test also demonstrate that the genotoxic effect is Z-dose dependent. Although we have found no previous references supporting this in the scientific literature consulted, it would appear that Z has a similar genotoxic effect to 2 Gy worth of X-rays; yet when it is administered following exposure to IR, its genotoxic effect is significantly greater, thus it acts as a toxic agent in the presence of cells already damaged by IR. In this sense, other authors (Suzuki *et al.*, 2006) have described how radiation can further induce the damaging effect of certain chemical substances in cells, producing an increase in NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1) expression and activity following irradiation.

The mechanism of action of Z would imply the creation of oxidative stress together with the formation of free radicals and a drop in endogenous levels of antioxidants; all of which is similar to the mechanisms also induced by IR (Matsumoto

*et al.*, 2005; Alcaraz *et al.*, 2009). Ionizing radiation induces the creation of hydroxyl radicals “*in vivo*” and the formation of endogenous hydrogen peroxide (due to the reduction of the superoxide anion) via two mechanisms: Haber-Weiss and Fenton models (Alcaraz *et al.*, 2009).

Currently, the capacity for a range of substances to diminish or eliminate cytotoxic damage is measured in terms of their ability to inhibit reactive species activity, especially reactive oxygen species (ROS). The anti-cytotoxic effects are directly proportional to the antioxidant capacity of the substance in question, although it also depends on the characteristics defining its bioavailability in the biological medium (Castillo *et al.*, 2000 & 2001; Benavente-García *et al.*, 2002; Del Baño *et al.*, 2006; Sánchez-Campillo *et al.*, 2009; Alcaraz *et al.*, 2011).

In the present study, the administration of Z in combination with an antioxidant (apigenin) reduced the toxic effect of Z in normal epithelial prostate cells but produced no protective effect in TRAMP-C1 tumour cells or B16F10 melanoma cells. Nonetheless, the administration of apigenin had no effect on the dose-dependent toxicity of ibandronate or pamidronate.

However, this protective capability would appear to be altered when the treatment is combined with IR, in such a manner that, in tumoral and non-tumoral prostate cells (PNT2 y TRAMP-C1), the administration of apigenin in the combined treatment (IR plus zoledronic acid or pamidronate) provided a greater level of protection in normal cells than in tumour cells. Furthermore, when using ibandronate, a greater protective effect is observed in TRAMP-C1 cells than in non-tumoral cells. Regarding B16F10 melanoma cells, the administration of apigenin in conjunction with IR provided protection against the toxic effects of Z.

Therefore, if the chemotherapy mechanism and/or the cell damage induced by IR occur via the production of oxidative stress and an increase in free radicals, the coadministration of antioxidants reduces their damaging effect; albeit such treatment

also reduces the damaging effect of the aforementioned ROS on tumour cells. Moreover, our results suggest that the administration of an antioxidative substance in conjunction with bisphosphonates produces a greater decrease in toxic effects in non-tumour cells than in tumour cells and could be used in the treatment of non-tumoral pathologies. On the other hand, in treatments combined with IR, an antioxidative supplement may protect both tumoral cells (TRAMP-C1 y B16F10) and non-tumoral cells (PNT2), thus diminishing the desired therapeutic effect of the exposure to IR.

Perhaps for this reason, numerous authors do not provide antioxidants indiscriminately in oncology patients undergoing radiotherapy (RT) or chemotherapy, since this may increase the survival of tumour cells and thereby increase the rate of relapse in such patients. Perchance, further knowledge gained on cell damage via different action mechanisms could provide the selective protection of non-tumour cells without reducing the desired detrimental effect on tumour cells (Lawenda *et al.*, 2008).

In this sense, our results also demonstrate that carnosol (COL) and rosmarinic acid (RA) act as antioxidants in PNT2 cells, thus eliminating excess free radicals produced by IR and effectively boosting the intracellular redox defensive system and behaving in a radioprotective manner against IR-induced damage. Yet surprisingly, in metastatic B10F16 melanoma cells, an absence of their radioprotective effect is observed, and they may even paradoxically come to have a significantly radiosensitizing effect. Although the mechanism via which COL and RA lose their radioprotective capacity in metastatic B10F16 melanoma cells is unclear, this may be related to the melanogenetic character of these cells. Certain studies have demonstrated that substances with a chemical structure similar to COL and RA (Ohguchi *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Sánchez-Campillo *et al.*, 2009; Kudugunti *et al.*, 2011) stimulate melanogenesis in B16F10 melanoma cells in rats. melanogenesis is activated, intracellular glutathione and cysteine lyase facilitate the production of melanin, which in turn may compromise the redox defense system in the aforementioned cells. This would imply a decrease in the eliminatory capacity of the

superoxide radicals via the endogenous cell system, but also a loss in the actual antioxidant, and thus protective, capacity of COL and RA used in the process and which would lead to a rise in intermediate by-products such as hydrogen peroxide which contributes to an increase in cell damage. This experimental situation could offer forth a new therapeutic application for the aforementioned substances since selectively protecting healthy cells from IR without providing protection to tumour cells when both types are exposed simultaneously to the same IR field. Thus normal cells would benefit from their radioprotective effects, whilst at the same time the melanoma cells would undergo a significant radiosensitizing effect induced by the same substances.

## CONCLUSIONS

The conclusions this Doctoral Thesis arrives at, are as follows:

- 1<sup>a</sup>. The bisphosphonates tested present a dose-dependent cytotoxic effect, highlighting the genotoxic and cytotoxic capacity of zoledronic acid, even at doses recommended for use in clinical applications.
- 2<sup>a</sup>. A synergic cytotoxic effect exists in the combined treatment of ionizing radiation plus zoledronic acid, the latter displaying important radiosensitizing properties.
- 3<sup>a</sup>. The administration of certain antioxidants together with bisphosphonates reduces toxicity thus allowing for an increase in the dose administered together with a decrease in toxic side-effects.
- 4<sup>a</sup>. The administration of antioxidants in the combined treatment of ionizing radiation together with bisphosphonates diminishes the cytotoxic effects of the treatment but also reduces its efficiency on acting in detriment of the induced free radicals which make up the action mechanism of both therapeutic agents.
- 5<sup>a</sup>. The administration of certain antioxidants diminishes the toxic effects induced by the ionizing radiation, behaving in a radioprotective manner in both tumour and normal, non-tumour cells, even within the treated field. However, carnosol and rosmarinic acid display a paradoxical effect in melanoma cells since they behave in a radiosensitizing manner in melanoma cells only and thus might allow for a new strategy involving a radiosensitizing effect in the aforementioned cells, yet at the same time a protective effect in normal adjacent tissue.