

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Genotoxicidad de los campos magnéticos de
frecuencia extremadamente baja determinada
mediante el ensayo de micronúcleos**

D^a. Encarnación Olmos Ortíz

2013



INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN
ENVEJECIMIENTO

**Genotoxicidad de los campos magnéticos de
frecuencia extremadamente baja determinada
mediante el ensayo de micronúcleos**

D^a. Encarnación Olmos Ortíz

AÑO: 2013



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 “**GENOTOXICIDAD DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS DE FRECUENCIA EXTREMADAMENTE BAJA DETERMINADA MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**”, presentada por **D^a. ENCARNACIÓN OLMOS ORTÍZ**, 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 5 de julio de 2013.



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



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Vicente Vicente Ortega, Catedrático de Universidad del Área de Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** * en Envejecimiento, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "GENOTOXICIDAD DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS DE FRECUENCIA EXTREMADAMENTE BAJA DETERMINADA MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS", realizada por D^a ENCARNACIÓN OLMOS ORTIZ , bajo la inmediata dirección y supervisión de D. MIGUEL ALCARAZ BAÑOS, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 4 de julio del 2013, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 4 de julio de 2013

Doctorando: D^a. ENCARNACIÓN OLMOS ORTIZ

Mod: T-40



UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Este proyecto se ha realizado gracias a una ayuda del Programa Nacional de I + D+ i dentro del Programa CENIT del Ministerio de Ciencia y Tecnología denominado “Investigación industrial de alimentos y dietas específicas para 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

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi mayor gratitud al **profesor Miguel Alcaraz Baños**, Profesor Titular de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Murcia, al aceptar dirigir esta tesis doctoral, por su constante ayuda, motivación, orientación y apoyo incondicional que me han permitido completar y llevarla a buen término.

Además, quiero agradecer al **Prof. David Armero Barranco**, Decano de la Facultad de Enfermería de la Universidad de Murcia; a la Sra. **Amparo Olivares Rueda** y al **Dr. Daniel Gyngiri Achel** por sus numerosos consejos, resolución de dudas y su gran amistad durante este “viaje”.

Al Dr. **Julián Castillo Sánchez** y Nutrafur SA, por haberme proporcionado las sustancias ensayadas necesarias; al **Profesor José Margineda**, de la cátedra de Electromagnetismo de la Facultad de Física de la Universidad de Murcia por haber facilitado el equipo para la realización de este trabajo; y al **Profesor Manuel Canteras Jordana**, Catedrático de Bioestadística, por su ayuda en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

Asimismo, deseo destacar el esfuerzo del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, y en particular:

- **Dra. María Dolores Alcázar Fernández** y al Sr **Régulo Ángel Cánovas Ciller** por su ayuda en la irradiación de mis modelos experimentales y en las evaluaciones de dosimetría de este estudio.
- **Dra. Antonia Bernabéu Esclapez**, Directora del Servicio de Cultivo de Tejidos del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia; y a **D^a Juana M^a García Reverte** y **D. José Muñoz Ramos** por sus enseñanzas prácticas y asistencia en la realización de los cultivos de linfocitos utilizados.
- **Dra. Carmen Martínez Lagares** y el **Sr. Antonio Cano Gómez** por su asistencia en el mantenimiento de los animales en el animalario de la Universidad de Murcia.
- **Dra. Fara Sáez Belmonte** y **D. Antonio Espinosa Lozano** por su ayuda en el análisis de imágenes.

Por último, pero no menos importante, agradezco a mi **familia** y **amigos**, especialmente a mi marido, **Carlos**, mis **padres** y **mis hermanos**; por su apoyo durante todos estos años.

A Carlos, por creer en mí
y a mis padres, por su apoyo.

ÍNDICE

	Pág.
I. ANTECEDENTES	1
II. OBJETIVOS	51
III. MATERIAL Y MÉTODOS	53
IV. RESULTADOS	90
V. DISCUSIÓN	158
VI. CONCLUSIONES	189
VII. RESUMEN	191
VIII. BIBLIOGRAFÍA	194

I. Antecedentes

LA GENOTOXICIDAD DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS (ELF-EMF) A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS: SITUACIÓN ACTUAL.

En un primer acercamiento a los estudios publicados sobre los efectos biológicos inducidos por las radiaciones no ionizantes, y más específicamente a los denominados campos electromagnéticos (ELF) de frecuencia extremadamente baja (ELF-EMF), destacan las descripciones de efectos biológicos contradictorios y una excesiva complejidad en la interpretación de los resultados por las numerosas variables biológicas y físicas analizadas durante las últimas décadas (Alcaraz y cols., 2011).

Sin embargo, la lectura de estos resultados y su interpretación no deberían realizarse sin unas premisas básicas que acerquen al investigador al conocimiento más específico del campo biológico y/o físico con el que se va a encontrar. Una vez realizado este acercamiento, la interpretación parece simplificarse hasta, incluso, permitir algunas conclusiones bien sustentadas por estos mismos estudios científicos, aparentemente contradictorios. Si aplicamos este acercamiento previo al posible efecto genotóxico o daño cromosómico de los campos magnéticos determinado a través de la técnica de micronúcleos (MN), nos encontramos con 3 premisas iniciales antes de interpretar sus resultados: 1) conocer algunas características del ensayo de MN; 2) delimitar las variables estudiadas de los campos magnéticos que nos interesan; 3) por último, cómo deben interpretarse los resultados de estos ensayos de MN. Así, siguiendo este esquema:

1. Características del Ensayo de Micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son cuerpos pequeños (1,6-2,4 micras), redondos u ovales que se encuentran inmersos en el citoplasma celular y visiblemente separados del núcleo principal, pero al que se parecen en forma, estructura y coloración (Almassy y cols., 1987). Pueden originarse de

fragmentos cromosómicos acéntricos que no pueden incorporarse a los núcleos de las células hijas durante la división celular por carecer de centrómero (Sasaki y Norman, 1966; Heddle y Carrano, 1977), o pueden ser también cromosomas completos que quedan fuera del núcleo celular durante la mitosis por un fallo en el eje mitótico o por configuraciones complejas de cromosomas que causan problemas durante la anafase (Schmid, 1975; 1976). Estos ensayos no dejan lugar a dudas sobre el daño producido, pues lo observado como MN es claramente una pérdida de ADN. La prueba no detecta agentes que no produzcan pérdidas en el material genético o restos cromosómicos en anafase; tampoco es útil su empleo en células que no se dividen.

Se utilizan dos tipos diferentes de ensayos de micronúcleos: ensayos “*in vitro*” y ensayos “*in vivo*”. Aunque tienen diferentes características técnicas, su objetivo y utilidad son idénticos: determinando el incremento en su frecuencia de aparición se pone de manifiesto el daño cromosómico y, por tanto, la capacidad genotóxica y mutagénica de las diferentes sustancias químicas o agentes físicos ensayados. Estos ensayos de MN tienen algunas características diferenciales que son importantes para la interpretación de los resultados obtenidos:

a) Ensayo de MN “*in vivo*”: constituye el test sobre eritroblastos policromatófilos de médula ósea de roedor, generalmente ratón o rata, ideado originalmente como prueba de detección para evaluar el efecto de los fármacos sobre el material genético.

Estos micronúcleos comenzaron estudiándose sobre células de la serie blanca en frotis de médula ósea de los animales expuestos; posteriormente en los eritroblastos totales y en normocromatófilos para llegar finalmente a los eritroblastos policromatófilos como el test habitual más utilizado hoy día, tal y como fue diseñado por Schmid en 1975 (Schmid, 1975; 1976) y constituye probablemente el test de genotoxicidad “*in vivo*” más

utilizado hasta el día de hoy (Shimoi y cols., 1996; Benavente-Garcia y cols., 2002) (Figura 1).

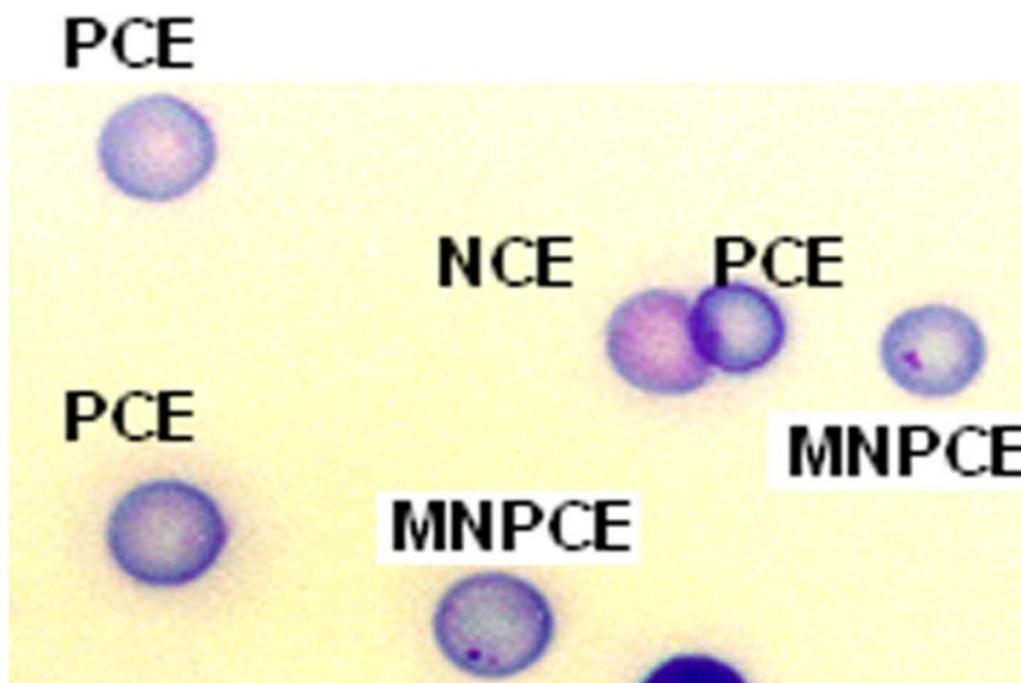


Figura 1. Fotomicrografía de médula ósea de ratón teñida con la técnica de May-Grünwald-Giemsa (1000X)(PCE: eritroblasto policromatófilo; MNPCE: eritroblasto policromatófilo con microneúcleo; NCE: eritroblasto normocromatófilo) (Alcaraz y cols., 2011).

Recientemente se ha incorporado el análisis de reticulocitos en sangre periférica (Okudan y cols., 2010) como una variante del test ya que permite estudiar la frecuencia de aquellos eritroblastos policromatófilos con MN en su interior formados en la médula ósea cuando ya han madurado y salen de la médula ósea a circular en sangre periférica.

Estos test “in vivo”, también denominados estudios cortos de genotoxicidad, se utilizan habitualmente tras la administración de una dosis única del agente problema (sustancia química o agente físico) para evaluar su genotoxicidad. Sin embargo, manteniendo las condiciones del test, también permiten evaluar exposiciones crónicas, ya que los animales pueden utilizarse entre la 9ª y 12ª semana de vida exclusivamente para seguir las características

básicas del test (Schmid, 1975; 1976). Otra variante del test de MN utilizada “in vivo”, en biosistemas vegetales, es la prueba MN-tradescantia (trad-MCN) desarrollada por Ma (1979) (Ma, 1979; 1981) para MN en tétradas de célula madre de polen y que se ha utilizado para estudios de genotoxicidad para evaluar contaminantes ambientales (Ma y cols., 1984).

b) Ensayo de MN “in vitro”: inicialmente desarrollados en linfocitos humanos por Countryman y Heddle en 1976. A lo largo del tiempo se han ido realizando numerosas modificaciones técnicas que han ido dotando al test de sensibilidad y especificidad progresivamente a lo largo de los últimos 30 años. Al principio se añadió fitohemaglutinina para inducir la división celular, después se analizaron en células con citoplasma destruido (Hogstedt, 1984; Prosser y cols., 1988), luego en células con citoplasma conservado (Hogstedt, 1984; Almassy y cols., 1987), posteriormente con estimulación mediante bromiouridina (Prosser y cols., 1988), con tinciones de acridina (Hayashi y cols., 1983) y finalmente con Fenech (Fenech y Morley, 1985) se describieron las técnicas con bloqueo citocinético mediante cytochalasina B que permitían estudiar los MN sólo tras la primera división mitótica, incrementando significativamente su sensibilidad. A partir del año 2000, a propuesta de Fenech (Fenech y Morley, 2000) y de la Agencia Internacional de la Energía Atómica (AIEA) (International Atomic Energy Agency, 2001) se ha utilizado como técnica habitual de rutina en dosimetría biológica, comenzando a homogeneizarse sus técnicas de aplicación en los diferentes laboratorios (Fenech y cols., 2003), constituyendo hoy la técnica más utilizada de MN “in vitro” para evaluar la genotoxicidad de los diferentes agentes físicos (Fenech, 2007; International Atomic Energy Agency, 2011) (Figura 2).

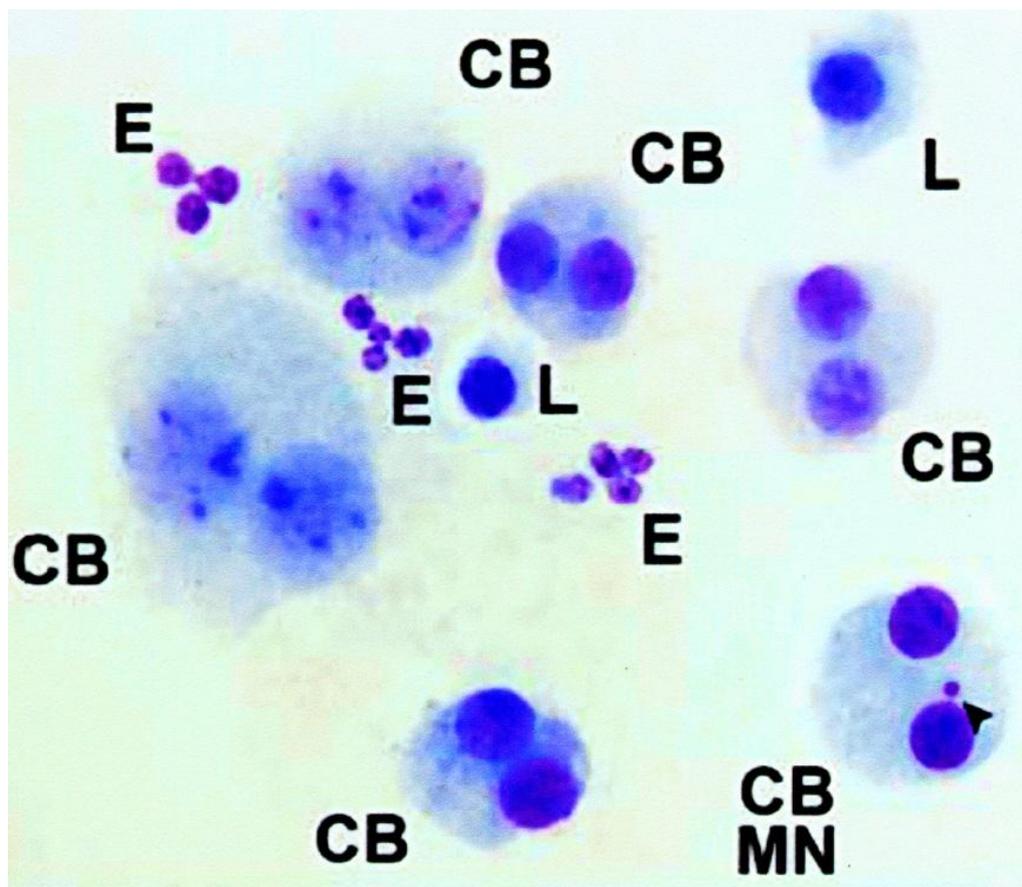


Figura 2. Fotomicrografía de un cultivo de linfocitos humanos con bloqueo citocinético teñido con la técnica de May-Grünwald-Giemsa (400X) (L: linfocito; CB: células binucleadas con bloqueo citocinético; CBMN: células binucleadas con bloqueo citocinético con micronúcleo en su citoplasma; E: restos de eritrocitos hemolizados) (Alcaraz y cols., 2011).

Se han desarrollado diferentes variantes de la técnica inicial describiéndose tests de MN para su determinación en células exfoliadas de mucosa bucal (CHOMN) (Stich y cols., 1982; Stich y Rosin, 1983), en células epiteliales de colon y de cánceres intestinales (Hedde y Carrano, 1977), en esperma de rata (Lahdetie y Parvinen, 1981), y en semen humano (Liming, 1985). También puede considerarse una variante del ensayo de MN el test Cometa, cuyo principio básico es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Al estudiarse la célula al microscopio (por fluorescencia o tinción del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y una cola (formada

por fragmentos nucleares que han emigrado en dirección al ánodo) de la que deriva su nombre de Cometa (Stronati y cols., 2004; Albert y cols., 2009).

Los más utilizados son los que han desembocado en el CBMN actual (Fenech, 2007; International Atomic Energy Agency, 2011). Sin embargo, estos ensayos sólo tienen una duración de 72 horas de cultivo celular, por lo que no permiten exposiciones crónicas a campos magnéticos para mostrar su capacidad genotóxica. Por ello, se reconoce que su utilidad es básicamente en estudios “cortos” o exposiciones cortas al agente físico estudiado.

2. Campos magnéticos.

Los campos eléctricos (EF), existen en cualquier sitio donde haya cargas eléctricas presentes, tanto si fluye o no la corriente eléctrica; las unidades se expresan como voltios por metro (V/m). Por el contrario, los campos magnéticos (MF) se producen cuando una corriente eléctrica está fluyendo a través de un cable; en este caso, las unidades se expresan en Tesla (T). Los campos magnéticos también se pueden medir en amperios por metro (A/m) o en Gauss (G) (1 G= 0,1 miliT o 100 microT). Los campos eléctricos de líneas de conducción eléctrica, así como los transformadores y las aplicaciones eléctricas se protegen y aíslan fácilmente teniendo poca capacidad de penetrar en los tejidos biológicos (Valberg y cols., 1997). Por el contrario, los campos magnéticos asociados a los EF pueden penetrar fácilmente a través de los diversos tejidos biológicos; de ahí que sean difíciles de aislar, proteger o eliminar completamente (Valberg y cols., 1997; Vijayalaxmi y Gunter, 2005). Todo ello, unido al conjunto de la evidencia experimental, ha llevado a proponer que, en general, los efectos biológicos derivados de la exposición ocupacional o residencial a campos electromagnéticos (EMF) de muy bajas frecuencias (ELF) se deben a su componente magnético (Jammet y cols., 1990; Vijayalaxmi y Gunter, 2005).

La humanidad ha estado disfrutando de las ventajas de la electricidad en casa y en los lugares de trabajo durante más de 100 años y, en estos momentos, resulta imposible imaginarse la vida sin su uso. La electricidad se suministra en frecuencias de 60 y 50 Hz en los Estados Unidos y en Europa/Países asiáticos, respectivamente. Siendo rigurosos, en términos de ingeniería eléctrica, los campos electromagnéticos del tipo considerado ELF, hacen referencia a frecuencias comprendidas entre los 30 y los 300 Hz; mientras que, en la literatura referente a la biología y la salud laboral, las frecuencias relativas a campos ELF abarcan desde 0 a 3000 Hz (Vijayalaxmi y Gunter, 2005; Alcaraz y cols., 2011) y constituyen la mayor área de interés para valorar el efecto genotóxico de los campos magnéticos. En esta revisión delimitamos el estudio a los campos magnéticos de “frecuencia extremadamente baja” (ELF-EMF) y a los campos magnéticos con aplicaciones diagnósticas.

3. Interpretación básica del test.

El ensayo de MN muestra una lesión cromosómica que constituye una pérdida de ADN y por ello expresa siempre un daño genético; y, como consecuencia, la sustancia o agente físico que lo produce se considera con capacidad mutagénica y se considera un agente genotóxico (Schmid, 1975; 1976; Fenech, 2007; International Atomic Energy Agency, 2011).

Sin embargo, si el test de MN no muestra daño genotóxico, su interpretación nunca es la **AUSENCIA** de genotoxicidad de dicho agente. Se puede NO determinar aumento de MN por numerosas variables técnicas (Fenech y cols., 2003); aunque la más evidente es el umbral de sensibilidad del propio ensayo de MN (Alcaraz y cols., 2002; 2009; 2011; Fenech y cols., 2003; Navarro y cols., 2004). La utilización de dosis del agente estudiado por debajo del umbral de sensibilidad del test imposibilita la detección de un posible efecto genotóxico (Fenech y cols., 2003; Navarro y cols., 2004; Alcaraz y cols., 2011). El ejemplo más característico lo constituye el umbral de sensibilidad que presenta el test de MN con las radiaciones ionizantes y que se ubica hoy día en

20-30 cGy (Fenech, 2007; International Atomic Energy Agency, 2011). Todos los ensayos de micronúcleos que pretendan demostrar un efecto genotóxico de las radiaciones ionizantes utilizando una dosis inferior a 20-30 cGy no revelarían ningún incremento de MN y podrían llegar a concluir que las radiaciones ionizantes no tienen ninguna capacidad genotóxica ni mutagénica al no mostrar un incremento de la frecuencia basal de MN.

Con estas premisas previas hemos realizado una revisión exhaustiva de la literatura científica para recoger los resultados previos que relacionan los diferentes test de MN con los campos magnéticos de “frecuencia extremadamente baja”, denominadas habitualmente ELF-EMF.

En la Tabla 1 se muestran las características más significativas de los estudios publicados desde 1994 hasta la actualidad y que han utilizado diferentes tipos de ensayos de MN “**in vivo**” para determinar la capacidad genotóxica inducida por diferentes tipos de campos magnéticos, así como el flujo o la intensidad de los mismos (mT) y el tiempo de exposición de los animales estudiados. De los 8 estudios analizados, 6 (75%) concluyen que existe un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN en los animales expuestos “in vivo”. Tal efecto estaría inducido directamente por los campos magnéticos ensayados y los autores concluyen que los campos magnéticos utilizados tienen una significativa capacidad mutagénica y una evidente capacidad genotóxica por sí mismos. Algunos de estos estudios han podido utilizar exposiciones crónicas, exponiendo a los animales varias horas diarias, en algunos casos durante semanas a los campos magnéticos ensayados (Ferreira y cols., 2006; Udriou y cols., 2006; Erdal y cols., 2007; Celikler y cols., 2009; Okudan y cols., 2010; Reddy y cols., 2010; Montoya y cols., 2011) aunque en ocasiones se han utilizado campos tan bajos como 5 μ T (Okudan y cols., 2011).

Estos tests “in vivo” se caracterizan por permitir la exposición corporal total de los animales expuestos, permitiendo valorar la respuesta biológica del organismo completo frente al agente físico estudiado. En estos

momentos, los ensayos de MN constituyen el test de genotoxicidad más utilizado dentro de los tests o ensayos cortos sobre genotoxicidad. Sin embargo, siguiendo las condiciones biológicas impuestas para la aplicación del test, sólo se puede utilizar entre la 9^a y 12^a semana de vida de los animales (Schmid, 1975; 1976), lo que limita no sólo sus posibilidades de uso como técnica detectora de genotoxicidad, sino que añade una limitación significativa a su empleo en las técnicas de exposiciones crónicas a campos magnéticos de los animales estudiados.

Autor	Año	Tipo Celular	Exposición- ELF	Densidad de flujo	Duración	MN
SINGH, P [39]	1997	Eritroblastos médula ósea (MO) ratón	50 Hz	2,1 mT	3 días	SI
SUZUKI, Y [40]	2001	Eritroblastos MO ratón	Estático	3 Teslas y 4,7 Teslas	1, 2 y 3 días	SI
FRAHM, J [41]	2006	Macrófagos de ratón	50 Hz	0,05; 0,1; 0,5; 1 mT	12h, 1 día y 2 días	NO
UDROIU, I [42]	2006	Hígado/sangre perif./ MO ratón	50 Hz	0,65 mT	24 h/día ,21 días (intraútero)	SI
ERDAL, N [44]	2007	Eritroblastos MO rata	50 Hz	1 mT	4 h y 4 h/45 días	SI
OKUDAN, N [11]	2010	Reticulocitos y MO ratón	50 Hz	0,004 - 0,005 mT	40 días	SI
REDDY, SB [46]	2010	Eritroblastos MO ratón	EMF Pulsados < 1000 Hz	1 mT	14, 28, 42 y 56 días	NO
MONTOYA,I [47]	2011	Eritroblastos MO ratón	50 Hz	0,2 mT	7, 14, 21 y 28 días	SI

Tabla 1. Resumen de resultados de estudios que investigan la potencial genotoxicidad inducida por exposición “in vivo” a ELM-EMF, analizada mediante los ensayos de micronúcleos. Leyenda: MO: médula ósea; mT: militeslas; MN SI/NO: Se obtuvo, o no, incremento significativo del número de micronúcleos (Alcaraz y cols., 2011)

En la Tabla 2 se exponen las características más significativas de los estudios publicados desde 1994 hasta la actualidad y que han utilizado diferentes tipos de ensayos de **MN “in vitro”** para determinar la capacidad mutagénica y el daño cromosómico inducido por diferentes tipos de campos magnéticos, así como el flujo o la intensidad de los mismos (mT) y el tiempo de exposición de las células estudiadas. De los 26 estudios revisados 14 (53,8%) concluyen que no se produce un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN en las células expuestas “in vitro”; mientras que otros 12 (46,2%) estudios describen un incremento de MN y concluyen que los campos magnéticos aplicados tienen una significativa capacidad mutagénica teniendo, por ello, una evidente capacidad genotóxica.

Sin embargo, entre los autores que describen una ausencia de efectos de los campos magnéticos, el 42,8% (6/14 estudios) han realizado algún tipo de análisis de sinergia o adición con otros agentes mutagénicos y describen un incremento sobre la frecuencia de MN esperada si tales agentes se emplean de forma combinada con la exposición a campos magnéticos. Así, si se utilizan de forma combinada la exposición a campos electromagnéticos con la exposición a rayos X o radiación gamma (Simkó y cols., 1998; Nakahara y cols., 2002), con bleomicina (Cho y cols., 2007), benzo(a)pyrene (Simkó y cols., 2001; Cho y cols., 2003), bencendiol y bencentriol (Pasquini y cols., 2003) o vinblastina (Verheyen y cols., 2003) se observa un significativo incremento de MN mayor que el inducido por dichos agentes en ausencia de los campos magnéticos. Estos resultados son interpretados por los diferentes autores como un incremento de MN inducido por los campos magnéticos, que actuarían como un cocarcinógeno (Nakahara y cols., 2002), un promotor o un inductor (Simkó y cols., 1998) de las lesiones cromosómicas inducidas por los agentes mutagénicos ensayados.

Autor	Año	Células estudiadas	Exposición- ELF	Densidad Flujo (mT)	Duración	MN
SCARFI, MR [48]	1994	Linfocitos humanos	EMF Puls. 50 -500 Hz	2,5 (pico)	1,2 y 3 días	NO
PAILE, W [49]	1995	Epiteliales tráquea rata	50 Hz	0,03-1	3 y 4 días	SI
LAGROYE, J [50]	1997	Epiteliales tráquea rata	50 Hz	0,1	1 día	NO
SIMKÓ, M [51]	1998	Líquido amniótico humano	50 Hz	0,1-1	1,2 y 3 días	NO
SIMKÓ, M [51]	1998	Escamosas de cáncer humano	50 Hz	0,1-1	1,2 y 3 días	SI
SIMKÓ, M [52]	1998	Líquido amniótico humano	50 Hz	1	1,2 y 3 días	SI
SCARFI, MR [53]	1999	Linfocitos humanos	50 Hz	0,05 - 1	3 días	NO
SIMKÓ, M [54]	1999	Líquido amniótico humano	EMF-H -50 Hz	1	24 h, 48 h ó 72 h	SI
SIMKÓ, M [55]	2001	Embrionarias de hamster	50 Hz	1	1,2 y 3 días	NO
ZENI, O [56]	2002	Linfocitos humanos	EMF Pulsados-50 Hz	2,5	3 días	SI
NAHAHARA, T [57]	2002	Ovario hamster	EMF Estáticos	>10000	4 días	NO
PASQUINI, R [58]	2002	Células Jurkat	50 Hz	5	1 h -1 día	SI
VERHEYEN, G [59]	2003	Linfocitos humanos	50 Hz	0,08 y 0,8	3 días	NO
CHO, YH [60]	2003	Linfocitos humanos	60 Hz	0,8	1 día	NO
STRONANTI, L [29]	2004	Linfocitos humanos y Cometa	50 Hz	1	2 h	NO
TESTA, A [61]	2004	Linfocitos humanos	50 Hz	1	2 días	NO
SCASELLATI, G [62]	2004	Linfocitos humanos	50 Hz	5	30, 60 ó 120 m	SI
WINKER, R [63]	2005	Fibroblastos humanos	50 Hz	1	10 h	SI
SCARFI, MR [64]	2005	Fibroblastos humanos y Cometa	50 Hz Intermitente	1	1 día	NO
FATIGONE, C [65]	2005	Trad-MN	50 Hz	1	1 h, 6 h y 12 h	SI
CHO, HY [66]	2007	Fibroblastos humanos	60 Hz	0,8	28 h, 88 h y 240 h	NO
SIMI, S [67]	2008	Linfocitos humanos	RM Diagnósticos	1500	1120 h	SI
ALBERT, GC [30]	2009	Linfocitos humanos y Cometa	60 Hz	0,2	4 h	NO
CELIKLER, S [45]	2009	Linfocitos humanos	50 Hz	Ocupacion al-Industria	19 ± 7 años	SI
LUUKKONEN, J [69]	2011	Neuroblastoma humano	50 Hz	0,1	24 h	NO
LEE, JW [70]	2011	Linfocitos humanos	RM Diagnósticos	3000	22, 45, 67 y 89 m	SI

Tabla 2. Resumen de resultados de estudios que investigan la potencial genotoxicidad inducida por exposición “in vitro” a ELM-EMF, analizada mediante los ensayos de micronúcleos. Leyenda: mT: militeslas; MN SI/NO: Se obtuvo, o no, incremento significativo del número de micronúcleos (Alcaraz y col., 2011)

En resumen, el 69,2% de los estudios publicados con estas técnicas de MN “in vitro” aplicadas básicamente en exposiciones cortas, utilizando campos electromagnéticos de muy baja frecuencia (ELF-EMF) en periodos muy cortos (horas-días), muestran algún tipo de efecto genotóxico estadísticamente significativo, bien sea directo (por sí mismo) o indirecto (como promotor, inductor o cocarcinógeno) inducido por los campos magnéticos sobre las células estudiadas.

En nuestra opinión (Alcaraz y cols., 2011), la utilización de los ensayos de MN presenta dos limitaciones importantes para evaluar la genotoxicidad de un agente físico, que se derivan de las características intrínsecas de la propia técnica: 1) tienen un umbral de sensibilidad (umbral de detección) muy alto, por lo que los agentes o dosis que no sean intensamente genotóxicos podrían ser indetectables; 2) tienen un período de detección corto (horas en los ensayos “in vitro”; semanas en los ensayos “in vivo”), por lo que los ensayos que precisen largos períodos de exposición, como podría ser la exposición crónica a campos magnéticos, no llegarían a alcanzar una dosis genotóxica suficiente para superar el umbral de determinación del efecto genotóxico. El conocimiento de la propia historia del empleo del test de MN como detector o cuantificador biológico en la determinación del efecto genotóxico de la radiación ionizante es imprescindible para la interpretación de los resultados obtenidos con los campos magnéticos. Así, al principio de uso de estas técnicas (años 1980-1990) el umbral de capacidad de detección de los efectos genotóxicos inducidos por radiaciones ionizantes estaba en 50 cGy; a principios de este siglo se ubicó en los 30 cGy. En estos momentos, tras las últimas modificaciones del test de MN más avanzado (CBMN) con células bloqueadas con Cytochalasina B en la primera división mitótica, el umbral de detección se encuentra en 20-30 cGy (Fenech, 2007; International Atomic Energy Agency, 2011). Si intentáramos determinar el efecto genotóxico en cualquier situación clínica, experimental u accidental, por debajo del umbral de dosis de 20-30 cGy el test no mostraría incremento significativo de MN y posiblemente podríamos concluir (como numerosos autores han hecho) (Navarro y cols., 2004; Serna y cols., 2008; Alcaraz y cols., 2009; 2011) que

tales dosis de radiaciones ionizantes no tienen ninguna capacidad genotóxica, ya que no dañarían el material genético al no incrementar la frecuencia de MN en las células o animales estudiados.

Expresado de otra forma, un test negativo de MN no excluye la posibilidad de que exista un daño genético inducido por los campos magnéticos. Sin embargo, un test de MN positivo muestra una pérdida de material genético y por tanto una lesión o daño genético manifiesto. Dado que el test de MN no deja lugar a dudas sobre el daño producido, y éste es una pérdida de DNA, existe suficiente evidencia para continuar nuevas experiencias que vayan identificando las variables físicas de los campos magnéticos que inducen este daño cromosómico (Alcaraz y cols., 2011).

Si se analizan los datos expuestos en las Tablas 1 y 2, se puede observar, en términos generales, que estos estudios muestran que cuanto más intensos son los campos magnéticos utilizados y mayor es el tiempo de exposición empleado (células/animales), mayor es la capacidad para poner de manifiesto un incremento de MN, mostrando una probable capacidad genotóxica de los campos en las condiciones analizadas. En este sentido, cuando se realizan tratamientos conjuntos con otros agentes mutágenos parece que los ELF-EMF muestran más fácilmente un efecto genotóxico al posibilitar un efecto aditivo o sinérgico entre dichos agentes.

Los estudios que se han publicado, muestran algunos resultados que ayudan a la selección de variables o situaciones de interés médico o biológico, y que precisarán nuevos estudios o confirmaciones de tales resultados. Algunos autores, obtienen un daño genotóxico relacionado directamente con el tiempo de exposición a campos magnéticos (Winker y cols., 2005; Fatigoni y cols., 2005) o presentan una clara respuesta dosis-dependiente (Simi y cols., 2008). La utilización médica de la Resonancia Magnética, aumenta el número de MN y podría ser genotóxica también (Simi y cols., 2008; Lee y cols., 2008). Aunque el daño genético podría ser reparado y el exceso de MN podría llegar a desaparecer a las 24 h de la finalización de la

exploración de resonancia; en ocasiones, el número de MN puede alcanzar un máximo y permanecer constante a lo largo del tiempo (Winker y cols., 2005).

Se han propuesto algunos mecanismos físicos por los que las ELF-EMF podrían interactuar con las células para producir un efecto biológico: 1) la transferencia de energía induciría la aceleración de iones y proteínas cargadas que alterarían la membrana celular y sus receptores para proteínas; 2) el campo eléctrico ejercería en el interior del cuerpo humano fuerzas sobre las cargas eléctricas o momentos eléctricos; 3) los campos podrían interactuar con el momento magnético de las partículas ferromagnéticas y de los radicales libres complejos; 4) también podrían inducir alteraciones resonantes que conducirían vibraciones o transiciones orbitales en las biomoléculas complejas; 5) cambios temporales o cronológicos inducidos por los campos provocarían cambios espaciales y alterarían la relación señal-ruido en algunos sistemas. Sin embargo, también se ha propuesto que los potenciales efectos biológicos inducidos por los ELF-EMF no estarían soportados, si existieran, por ninguno de estos mecanismos físicos conocidos (Valberg y cols., 1997).

No obstante, desde el punto de vista biológico, está ampliamente aceptado que los ELF-EMF son incapaces de transferir energía a las células en cantidades suficientes para romper los enlaces químicos y con ello lesionar directamente el ADN (Valberg y cols., 1997; Vijayalaxmi y Gunter, 2005). Por esta razón, los ELF-EMF no se consideran agentes genotóxicos directos. Su contribución al desarrollo del cáncer y de otras lesiones podría explicarse al inducir acontecimientos indirectos o secundarios en el organismo (Valberg y cols., 1997; Vijayalaxmi y Gunter, 2005). Numerosos estudios describen mecanismos a través de los cuales los ELF-EMF pueden ejercer sus efectos biológicos: originando situaciones de estrés oxidativo (Okano, 2008; Yocus y cols., 2008; Amara y cols., 2009; Kocacic y Somanathan, 2010; Emre y cols., 2011; Garj-Vrhovac y cols., 2011), incrementando la producción o la actividad de radicales libres (Simkó y cols., 1998), activando enzimas antioxidantes (Politawski y cols., 2010), modulando la activación de otros enzimas (Vijayalaxmi y Gunter, 2005), reforzando la proliferación celular (Verheyen y

cols., 2003), alterando el ciclo celular (Erdal y cols., 2007) o incrementando la apoptosis celular (Emre y cols., 2011; Garj-Vrhovac y cols., 2011).

En estos momentos está en discusión el auténtico significado de este incremento de MN como resultado de un test o ensayo de genotoxicidad. Actualmente se acepta que un incremento en el nivel o número de alteraciones cromosómicas puede ser indicativo de un incremento en el riesgo de padecer cáncer. Por ello, algunos autores resaltan que estos estudios deberían ser cuidadosamente considerados en la evaluación de un posible daño genético tras la exposición a campos magnéticos (Alcaraz y cols., 2011; Navarro y cols., 2004; Serna y cols., 2008). Sin embargo, los resultados de otros estudios epidemiológicos que se han publicado indican que estas alteraciones cromosómicas no tienen necesariamente que ir asociadas con un incremento demostrado de riesgo de cáncer (Navarro y cols., 2004; Serna y cols., 2008). Por ello, aún cuando el test detecta un incremento de la frecuencia de MN, y por tanto, incremento en el daño cromosómico de los animales o células expuestas, queda por determinar cuáles podrían ser las consecuencias biológicas reales en cuanto al riesgo de padecer una lesión tardía, y que estarían sin establecer todavía (Navarro y cols., 2004). En estos momentos, el incremento de MN podría considerarse como un biomarcador predictivo de susceptibilidad que manifestaría un incremento de riesgo para algunas enfermedades (El-Zen y cols., 2011). Con todo, lo que se pone de manifiesto es que, al menos una de las posibles vías de promoción de cáncer, como es el incremento de las lesiones del material genético, está relacionada con la exposición a campos magnéticos débiles de muy baja frecuencia (ELF-EMF).

En conclusión, desde el punto de vista del investigador, no parecen resultados contradictorios. Existen numerosas evidencias científicas que revelan una capacidad genotóxica de los campos magnéticos determinada mediante los ensayos de MN, en diferentes condiciones experimentales que pretenden simular condiciones de exposiciones humanas. La vía de lesiones cromosómicas es posible, aunque no se ha encontrado un claro mecanismo de acción que produzca estas lesiones. Así mismo, queda por determinar cuáles

serían las consecuencias biológicas que este incremento de lesiones cromosómicas podrían tener para la salud.

Nosotros pretendemos utilizar la experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio de la capacidad genotóxica de las radiaciones ionizantes y de la capacidad genoprotectora de diferentes sustancias antioxidantes en el estudio de los campos magnéticos (ELF-EMF).

Utilizaremos los dos tipos de ensayos de micronúcleos conjuntamente: “in vivo” e “in vitro”:

El primero consiste en el test de MN “in vivo” sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón para determinar; primero una posible capacidad genotóxica (mutagénica) de los campos magnéticos ELF-EMF, a los que posteriormente aplicaremos diferentes sustancias antioxidantes en la búsqueda de una reducción o modificación del posible efecto, y el segundo sometido a radiación ionizante, al que igualmente aplicamos diferentes sustancias antioxidantes preirradiación y postirradiación para determinar, si ello es posible, algún tipo de efecto radioprotector.

El segundo consiste en el test de MN “in vitro” sobre linfocitos humanos; al primer grupo se somete a radiación ionizante y se trata con dichas sustancias antioxidantes antes y después de la irradiación. Por último, analizaremos el efecto de las exploraciones de diagnóstico de Resonancia Magnética sobre la frecuencia de MN determinados en linfocitos circulantes de los pacientes estudiados.

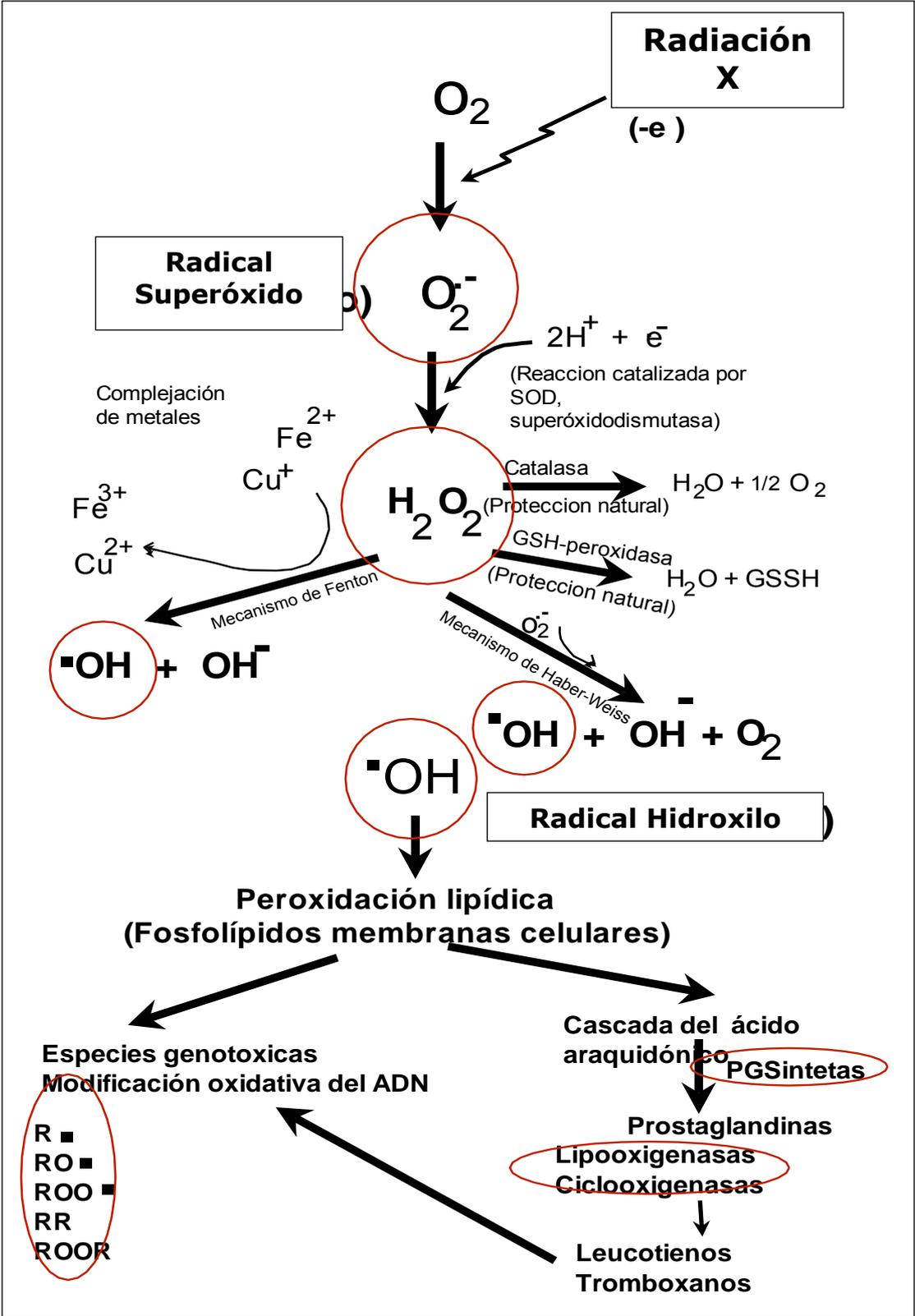
Un posible efecto protector de las sustancias antioxidantes sería debido a su capacidad eliminadora de radicales libres. Por ello, se recogen a continuación algunas características específicas de los radicales libres, que son de interés en el trabajo de investigación.

2. RADICALES LIBRES

La radiación ionizante induce daño en los tejidos vivos a través de una serie de eventos moleculares clásicos tales como los efectos fotoeléctrico, Compton y formación de pares que dependen de la energía que transporta. Debido a que los tejidos humanos contienen un 80 % de agua, el mayor daño radioinducido se debe a la formación de radicales libres acuosos generados por la acción indirecta de la radiación sobre el agua. Los radicales libres más importantes resultantes de la radiolisis del agua son OH^\bullet , H^\bullet , e_{aq}^- , HO_2 , H_3O^+ , etc. (Dragaric y Dragaric, 1971; Pradhan y cols., 1973; Scholes, 1983). Estos radicales libres reaccionan con macromoléculas celulares tales como DNA, RNA, proteínas, membranas y causan disfunción celular y mortalidad. Estas reacciones no son selectivas y tienen lugar tanto en las células tumorales como en las células normales cuando quedan expuestas a la radiación ionizante.

El efecto lesivo en una célula inducido por la radiación ionizante puede ser potenciado o atenuado por diferentes factores tales como la presencia de oxígeno, de compuestos sulfhidrilos y de otras moléculas del entorno celular (Bacq, 1965; Pradhan y cols., 1973). En presencia de oxígeno, los e_{aq}^- y los átomos de hidrógeno reaccionan con el oxígeno molecular para producir radicales tales como HO^\bullet , O_2^\bullet así como otros radicales libres acuosos (Baraboi y cols., 1994; Biakov y Stepanov, 1997). El aumento de la sensibilidad de las células a la radiación ionizante en presencia de oxígeno comparado con el mismo hecho pero en ausencia de oxígeno, se denomina "efecto oxígeno" y es conocido desde hace mucho tiempo: la relación entre la dosis de radiación requerida para obtener una supervivencia celular en ausencia de oxígeno y la dosis requerida para obtener el mismo efecto bajo condiciones oxigenadas es de 2,5-3 para radiación X y gamma. Este "efecto del oxígeno" se modifica sólo con la presión parcial del mismo en los tejidos y es independiente de la dosis de radiación ionizante administrada. El daño oxidativo en el material genético de la célula, por ejemplo DNA, juega un papel importante en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis radioinducidos. Los radicales de oxígeno altamente reactivos producidos por la radiación ionizante causan lesiones en el

DNA que pueden llevar a la muerte celular en una lesión “letal” o a las mutaciones en las lesiones denominadas “subletales”. Enzimas como la superóxido-dismutasa, la glutatión-peroxidasa y la catalasa protegen a las células de los mamíferos del daño oxidativo radioinducido (Fridovich, 1978; Utsumi y cols., 1998).



Gráfica 1. Mecanismos de acción de las sustancias radioprotectoras (Alicaraz y cols., 2013).

Durante el crecimiento tumoral, las células tumorales proliferan muy rápidamente por lo que generalmente necesitan un mayor aporte vascular, describiéndose 3 zonas diferenciadas en su crecimiento: una *externa*, con suficiente aporte sanguíneo y adecuada presión parcial de oxígeno; otra *intermedia*, con menor perfusión y mayor grado de hipoxia; y, una tercera *interna* constituida por el centro tumoral, mal perfundida y con zonas de necrosis celular entre otras razones por ser zonas anóxicas y mal irrigadas localmente (Nair y cols., 2001).

Esta situación conlleva una diferente sensibilidad celular a la radiación ionizante en cada una de esas zonas que se ha explicado en función de la diferente presión parcial de oxígeno en las mismas y la diferente potenciación que se consigue con el “efecto oxígeno”. Clásicamente, se ha considerado ésta como la causa de los escasos resultados que se obtienen en el tratamiento radioterápico de algunos tumores. Para paliar este problema es necesario administrar dosis más elevadas de radiación que permitan controlar el crecimiento tumoral. Sin embargo, esto clínicamente no es posible, ya que los tejidos normales adyacentes al tumor están bien perfundidos, bien vascularizados y permanecen bien oxigenados y, por tanto, son más sensibles al daño radioinducido, por lo que se necesita proteger las células normales adyacentes al tumor de la posible lesión radioinducida. Así, la identificación de agentes radioprotectores es un objetivo importante de los oncólogos radioterápicos y de los radiobiólogos. Los estudios sobre agentes químicos radioprotectores comenzaron hace más de 50 años en USA con el principio del “*Proyecto Manhattan*”. Debido a que la literatura disponible es enorme, nuestra revisión se centra sólo en aquellos agentes que tienen relevancia clínica y presentan un mecanismo de protección radiológica conocido (Nair y cols., 2001).

3. RADIOPROTECTORES

CLASIFICACIÓN DE LOS RADIOPROTECTORES

Los agentes radioprotectores pueden ser clasificados en 3 grupos:

1. Radioprotectores: son compuestos generalmente sulfhidrilos y otros antioxidantes (Livesey y Reed, 1987). En estos se incluyen muchos mieloprotectores, enteroprotectores y cerebroprotectores.

2. Adaptógenos: los adaptógenos actúan como estimuladores de la radiorresistencia. Estos son protectores naturales que ofrecen protección química frente a niveles bajos de radiación ionizante. Se obtienen generalmente de células vegetales y animales y tienen escasa toxicidad química. Suelen influir en el sistema regulador de los organismos expuestos, movilizando el origen endógeno de la radiorresistencia, la inmunidad e intensificando la resistencia global no específica de un organismo.

3. Absorbentes: los absorbentes protegen a los organismos de la radiación ionizante y de los agentes químicos a nivel interno. Suelen considerarse así las drogas que previenen la incorporación de radioiodo por la glándula tiroides y disminuyen la absorción de radionucleidos (^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{239}Pu) en el medio interno biológico.

La bibliografía científica disponible sobre radioprotectores es extensa. Nuestra revisión está centrada en diferentes radioprotectores (en función de su estructura molecular, su actividad terapéutica o su actividad o función metabólica) frente al daño inducido por la radiación ionizante (Tabla 3).

En nuestro estudio utilizaremos 4 sustancias con actividad radioprotectora: dos de ellos (DMSO y PTU) son sustancias azufradas con puentes químicos clásicamente considerados como los primeros

radioprotectores conocidos; los otros dos (EC y P) son sustancias polifenolicas o flavonoides con significativa capacidad antioxidante.

RADIOPROTECTORES	MECANISMO DE ACCIÓN
COMPONENTES SULFHIDRILO: cisteína, cisteamina, glutatión, AET, WR-2721 y otros componentes WR.	“Captadores” de radicales libres, donantes de átomos de hidrógeno.
ANTIOXIDANTES: tempace, Hoechst 33342, vitaminas A, E y C, TMG, melatonina, etc.	“Captadores” de radicales libres.
INHIBIDORES ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (IECAs): captopril, elanopril, penicilamina, pentoxifilina, L-158, 809, etc.	Inhibición de proteasas (a través del sistema renina-angiotensina), antioxidación, inhibición de la síntesis de colágeno.
AGENTES CITOPROTECTORES: mesna, dexrazoxane, amifostina (WR-2721).	Toxicidad reducida de fármacos quimioterápicos, disminución de la toxicidad urotelial y nefrotóxica.
METALOELEMENTOS: cloruro de manganeso, sales de cadmio, subnitrito de bismuto, etc.	Inducción metalotionina.
INMUNOMODULADORES: interferón-gamma, polisacáridos AM5 y AM218, lactobacillus sensibles al calor, Broncho-Vaxom, trealosa de dicorinomicolato, AS101.	Estimulación inmune, incremento de la producción de citoquinas
LIPOPOLISACÁRIDOS Y PROSTAGLANDINAS	Síntesis de prostaglandinas, niveles elevados de AMP c, reparación DNA.
EXTRACTOS DE PLANTAS Y COMPONENTES AISLADOS: curcumina, orientina, vicinina.	“Captadores” de radicales libres, antioxidación.

Tabla 3. Diferentes radioprotectores y su mecanismo de acción (Nair y cols., 2001).

1. Compuestos Sulfhidrilos

Desde un principio los estudios se dirigieron hacia los compuestos sulfhidrilos. Análogos de la cisteína y de la mercaptoetilamina constituyeron los pioneros compuestos que fueron ensayados en radioprotección. La síntesis de aminoetilisotiourea tuvo un importante desarrollo y la investigación sobre sus mecanismos radioprotectores ayudó a tener una mejor comprensión de las características estructurales de los compuestos sulfhidrilos que son fundamentales en radioprotección (Livesey y Reed, 1987). Los compuestos más efectivos fueron aquellos que presentaban grupos sulfhidrilos en los 2 ó 3 últimos carbonos de un extremo de la cadena y un fuerte grupo amino básico en el otro. Un gran número (> 4000 sustancias) de este tipo de compuestos fueron sintetizados en el Centro de Investigación de la Armada de Walter Reed en Estados Unidos. La mayoría de ellos, casi todos, fueron tóxicos con dosis muy pequeñas y no aptos para uso humano; además, era necesario que estuvieran dentro del organismo antes de la exposición a radiación para poder obtener un efecto protector. La síntesis de WR-2721, amifostina o ácido etiofos [S-2-(3-aminopropilamino) etilfosforotioico] fue un importante avance en el desarrollo de diferentes drogas radioprotectoras: WR-3689, WR-151327, WR-638, WR-77913 y WR-44923 y que son otros importantes radioprotectores de este mismo tipo de sustancias (Glowe y cols., 1984; Weiss, 1997). Todos son solubles en agua, lo que facilita su administración; su estructura química difiere sólo en cuanto a la longitud del grupo aminoalquilo; y se caracterizan por la presencia o ausencia de un grupo metilo en el extremo terminal y/o un grupo hidroxilo en la cadena alquilo.

Entre los mejores radioprotectores de este tipo se encuentran los aminotioles, de tal forma que los aminotioles fosforilados fueron los más eficaces en cuanto a actividad, tolerancia y duración de la acción. Sin embargo, la mayoría tuvieron importantes efectos secundarios tales como náuseas, vómitos e hipotensión (Maisin y cols., 1993; Maisin, 1998). La búsqueda de radioprotectores no tóxicos e incluso inocuos ha constituido una línea prioritaria de investigación en radiobiología.

Entre la variedad de radioprotectores sulfhidrilos, el único que ha proporcionado un gran número de ensayos clínicos y que está actualmente en uso clínico como adyuvante en radioterapia clínica es el WR-2721 (Wasserman, 1994; Tannehill y Mehta, 1996). La radioprotección selectiva de células normales conseguida por esta droga se ha relacionado con su diferente absorción según sea realizada por tejidos tumorales o normales y por los mecanismos de conversión en un compuesto sulfhidrilo activo (WR-1065) en los tejidos normales por acción de la fosfatasa alcalina (Travis, 1979; Wasserman, 1994; Valles y cols., 1995; Tannehill y Mehta, 1996).

En este sentido, el tratamiento previo de los pacientes que van a recibir radioterapia o quimioterapia con esta droga, reduce significativamente la toxicidad hematológica y renal al igual que disminuye la frecuencia de neuropatías y alteraciones en las mucosas. Esta sustancia permanece hoy en día como uno de los compuestos más prometedores en el presente en radioterapia para proteger los tejidos normales debido a su inocua y útil administración en clínica. La dosis máxima tolerada de WR-2721 en una sola dosis es sólo de 740 mg/m^2 de superficie corporal cuando se administra en un periodo de 15 minutos antes de comenzar la exposición a la radiación ionizante. Esta droga proporciona una efectiva radioprotección sólo cuando es administrada inmediatamente antes de la exposición a la radiación porque tiene una vida media plasmática de menos de 10 minutos (Tannehill y Mehta, 1996). No se ha descrito toxicidad acumulada en pacientes que recibieron una cantidad total de $6,8 \text{ g/m}^2$ en radioterapia fraccionada durante 5 semanas consecutivas (Wasserman, 1994).

El WR-2721 se ha utilizado también para reducir la toxicidad del tratamiento con cisplatino en pacientes con cáncer de mama metastásico (Ramnath y cols., 1997) pero además, protege contra la toxicidad retardada de la radiación sobre órganos pélvicos sin interferir con el efecto beneficioso de la radioterapia, disminuyendo la toxicidad hematológica y la inducción de lesiones sobre las mucosas irradiadas (Capizzi y Oster, 1995). En pacientes bajo radioterapia o quimioterapia por cáncer de pulmón no reseccable, el WR-2721

reduce la nefrotoxicidad relacionada con la administración de cisplatino y la esofagitis radioinducida (Tannehill y cols., 1997).

2. Antioxidantes y “Captadores de radicales libres”

Se ha descrito que muchos alcoholes alifáticos (incluidos el etanol, el etilenglicol, el glicerol, etc.) son buenos “captadores” de radicales libres y podrían actuar como radioprotectores en clínica. Sin embargo, los resultados ponen de manifiesto que son sólo útiles a nivel experimental o académico pero no en clínica humana debido a la enorme toxicidad que presentan a concentraciones útiles como sustancias radioprotectoras. Metodiewa y cols. (1.996) han publicado 2 compuestos (Tempace y Troxyl), derivados de 2, 2, 6, 6-tetrametil piperidine, que actúan como captadores del ión superóxido y como inhibidores de la utilización del hierro y, además, como conductores de ascorbato en la Reacción de Fenton. Estos 2 compuestos podrían ser mejorados para considerarlos prometedores antioxidantes y radioprotectores en un entorno clínico; aunque todo ello está pendiente en estos momentos de un incremento en el número de ensayos y de sus aplicaciones farmacológicas (Metodiewa y cols., 1996; Nair y cols., 2001).

Algunos estudios han puesto de manifiesto que muchos nitroxidos solubles en agua muestran protección radiológica en animales cuando los compuestos se administran antes de la exposición a la radiación (Hahn y cols., 1994; 1998). El Tempol, un nitroxido de bajo peso molecular, presentó una difusión libre a través de la membrana celular y actuó como un sinérgico o imitador de la superóxido-dismutasa (Hahn y cols., 1999). También se han descrito que nitroxilos con 6 anillos de piperidina, incluido el tempol, presentan mayor capacidad reductora que aquellos nitroxilos con 5 anillos. En todos los casos, se ha descrito que la “captación” de radicales libres y la inducción de hipotensión (disminución del flujo sanguíneo capilar) e hipoxia en la médula ósea serían los mecanismos que explicarían su capacidad radioprotectora (Hahn y cols., 1994; 1998; 1999).

Algunos antioxidantes como las vitaminas A, C y E también parecen presentar efectos de “radioprotección” porque el daño radioinducido simula el incremento del estrés oxidativo que se asocia con la toxicidad activa del oxígeno (Wilson, 1983; Konopacka, 1996). Se ha demostrado que el selenio (como Na_2SeO_3) y la vitamina E actúan solos e, incluso, de forma aditiva como agentes radioprotectores y quimioprotectores (Borek y cols., 1986). El selenio confiere protección por inducir o activar sistemas celulares de captación de radicales libres y por aumentar la descomposición del peróxido; mientras que la vitamina E parece que ofrece protección por un mecanismo complementario (Borek y cols., 1986). Las vitaminas liposolubles A, E y K, presentan una concentración local elevada en compartimentos celulares específicos y podrían ser suficientemente elevados como para ejercer un efecto protector, a diferencia de la mayoría de compuestos sulfhidrilos hidrosolubles tales como las cisteaminas (Borek y cols., 1986). Harapanhalli y cols., (1.994) ha descrito que el aceite de soja da una significativa protección contra la ^{125}I U y contra los efectos del Polonio radiactivo que se ha explicado en función de la presencia de vitamina A. Un derivado hidrosoluble de la vitamina E, el tocoferol monoglucósido, se ha mostrado muy efectivo en la protección del DNA “in vitro” y también “in vivo” en ratones tras su administración, vía oral o intraperitoneal, frente a la radiación gamma (Nair y cols., 1999).

La Melatonina (N-acetil-5-metiloxitriptamina), una hormona de la glándula pineal involucrada en la regulación del eje neuroendocrino, es un “captador” de radicales libres altamente eficiente y considerado de una elevada capacidad antioxidante (Pieri y cols., 1994; Reiter, 1995; Pierrefiche y Laborit, 1995; Vijayalaxmi y cols., 1996). Cuando se administra a ratones antes de la exposición a la radiación, la melatonina ofrece una radioprotección significativa por la disminución de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las espermatogonias y espermatocitos y por la reducción de la frecuencia de micronúcleos en las células de médula ósea (Badr y cols., 1999).

Un derivado del etinilestradiol, llamado E-838, se ha descrito como un efectivo radioprotector para el sistema hematopoyético en estudios

experimentales con ratones (Yang y cols., 1998). Presenta un significativo efecto protector en las unidades formadoras de colonias del bazo y en las células nucleadas de la médula ósea de ratones irradiados, lo que se interpreta como una potencial aplicación clínica en la leucopenia inducida por radioterapia (Yang y cols., 1998). Sin embargo, estos compuestos, si bien son altamente efectivos en estudios "in vitro", pueden encontrar poco uso en su aplicación clínica porque no discriminan entre células normales y células tumorales (Nair y cols., 2001).

Muchos extractos de plantas, preparaciones de hierbas y sustancias fitoquímicas también se han descrito por su acción radioprotectora en estudios "in vitro" e "in vivo" (Shinoda, 1995; Kumar y cols., 1996; Zhang y cols., 1997; Chaudhary y cols., 1999; Hsu y cols., 1999; Uma Devi y Ganasoundari, 1999; Uma Devi y cols., 1999; Kamat y cols., 2000; Castillo y cols., 2001; Castillo y cols., 2002; Benavente-García y cols., 2002; Acevedo, 2005; Alcaraz y cols., 2006; Del Baño y cols., 2006). Sin embargo, hasta el momento, no han sido publicados ensayos clínicos para demostrar su eficacia en clínica humana. Su capacidad radioprotectora se ha atribuido generalmente a sus propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales libres.

3. Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECAs)

Los Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECAs) y los Antagonistas del Receptor tipo I de la Angiotensina II (ARA-2) también se han descrito como efectivos en la profilaxis de la lesión renal y pulmonar radioinducida en animales de experimentación irradiados (Ward y cols., 1993; Oikawa y cols., 1997; Moulder y cols., 1998 a,b; Molteni y cols., 2000). La variedad de IECAs investigados como radioprotectores incluyen penicilamina, pentoxifilina, captopril, enalapril, etc. Los diferentes estudios han revelado que el bloqueo del receptor tipo I de la angiotensina II es suficiente para tratar la lesión renal y pulmonar radioinducida porque el sistema renina-angiotensina podría estar fundamentalmente involucrado en la patogénesis de estas lesiones (Ward y cols., 1993; Oikawa y cols., 1997; Moulder y cols., 1998

a, 1998b; Molteni y cols., 2000). El captopril (D-3-mercapto-2-metilpropanoil-L-prolina) es ampliamente utilizado como fármaco antihipertensivo (Gauras y Gauras, 1987) y ha sido utilizado para eliminar la reacción precoz del pulmón inducida por la irradiación fraccionada del hemitórax en ratas (Ward y cols., 1993). La acción terapéutica del captopril se ha adscrito parcialmente a la prevención del incremento radioinducido de la presión arterial pulmonar, consiguiendo un edema menos severo en el pulmón irradiado.

La lesión pulmonar radioinducida conlleva severas neumonitis, fibrosis intensa y se ha asociado con una disminución significativa de la enzima convertidora de angiotensina y de la función activadora del plasminógeno, así como con un marcado incremento de las prostaglandinas. Los IECAs eliminan o disminuyen estas reacciones. El captopril (IECA) y los ARA-2 parecen proteger el parénquima pulmonar de una respuesta inflamatoria intensa y posterior fibrosis pulmonar en animales irradiados. Aunque la penicilamina es un débil inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, es un fuerte agente antifibrótico y mostró unas propiedades antiinflamatorias moderadas (Ward y cols., 1983). Los IECAs que contienen grupos sulfhidrilos son más efectivos que aquéllos que no los tenían. El efecto radioprotector del captopril podría estar relacionado con una inhibición del sistema de la angiotensina II y por sus propiedades farmacológicas combinadas tales como antioxidación, “eliminadora” de radicales libres e inhibidor de proteasas (Molteni y cols., 2000).

El uso de fármacos IECAs y ARA-2 abre nuevas posibilidades en radioterapia con altas dosis de radiación ya que permite un control de los efectos indeseables relacionados con la misma. Sin embargo, la acción de estos fármacos parece ser “específica de tejido”, porque se ha descrito que el captopril no ha proporcionado protección alguna en animales irradiados con lesión gastrointestinal radioinducida (Moulder y Fish, 1.997).

4. Agentes citoprotectores utilizados en Quimioterapia

Un número de agentes citoprotectores han sido desarrollados para proteger a las células normales, pero no a las tumorales, de la toxicidad y del daño asociado con la quimioterapia y la radioterapia del cáncer. Mesna (ácido 2-mercaptoetanesulfónico), Desrazoxane y Amifostina son 3 de los agentes protectores aprobados ya por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos y poseen una potencial actividad quimioprotectora y radioprotectora en el tratamiento del cáncer (Henseley y cols., 1999; Links y Lewis, 1999; Morais y cols., 1999; Highly y cols., 1999; Kleta, 1999; Khojasteh y cols., 2000). Mesna disminuye la incidencia de toxicidad urotelial inducida por la quimioterapia en el tratamiento del cáncer; eliminando la toxicidad urotelial asociada con altas dosis de ifosfamida y ciclofosfamida (Henseley y cols., 1999; Morais y cols., 1999; Highly y cols., 1999; Kleta, 1999; Khojasteh y cols., 2000). El Dexrazoxane se ha encontrado útil como adyuvante en la quimioterapia de tumores basada en la doxorubicina (Henseley y cols., 1999; Links y cols., 1999; Morais y cols., 1999) aunque la toxicidad cardiaca y la protección también de las células tumorales son algunas de las limitaciones del uso de dexrazoxane (Henseley y cols., 1999). La Amifostina reduce la nefrotoxicidad en pacientes que reciben quimioterapia basada en cisplatino (Henseley y cols., 1999; Links y cols., 1999; Morais y cols., 1999). Sin embargo, el uso clínico de estos radioprotectores en muchos ensayos clínicos con radioterapia mostró efectos muy variados y una eficacia clínica muy limitada (Shueng y cols., 1998; Tan y cols., 1999).

5. Metaloelementos y Metalotionina

La metalotionina, proteína de bajo peso molecular de 60 aminoácidos (de los cuales una tercera parte es cisteína), ha mostrado un efecto protector contra la radiación ionizante en animales y en células expuestas ya que su administración provoca un incremento de la síntesis de esta proteína en varios tejidos (Bakka y cols., 1982; Matsubara y cols., 1987; Kagi y Schaffer, 1988; Renan y Dowmaw, 1989; Satoh y cols., 1989; Murata y

cols., 1995; Miko y cols., 1998). Está involucrada en la regulación del metabolismo de los metaloelementos ya que contribuye a la detoxificación del exceso de metaloelementos y a la captación de radicales libres (Matsubara y cols., 1987). Por otro lado, la administración oral de bismuto subnitrito a ratones redujo los efectos letales y las lesiones en médula ósea inducidas por una irradiación corporal completa; esta protección se ha atribuido a una síntesis inducida de metalotionina en las propias células de la médula ósea inducida por la administración del bismuto (Sato y cols., 1989). Igualmente, el pretratamiento de los ratones con cloruro de manganeso y sales de cadmio incrementó el nivel de metalotionina en varios tejidos disminuyendo los efectos letales de una irradiación corporal total (Matsubara y cols., 1987). Sin embargo, la inducción de metalotionina por los metaloelementos es también órgano/tejido específico, y el tratamiento con cloruro de manganeso no produce un incremento de los niveles de metalotionina en la piel o intestino delgado, por lo que no se observa ningún efecto beneficioso en estos tejidos cuando han sido expuestos a la radiación (Murata y cols., 1995). El wolframio, vanadio y las sales de molibdeno tienen un efecto similar a la insulina ya que incrementan los niveles basales de fructosa-2,6-bifosfato contrarrestando los efectos del glucagón, de la fructosa-2,6-bifosfato y de la actividad de la 6-fosfofructo-2-kinasa, estimulando el flujo glucolítico (Fillat y cols., 1992). Todas estas sales descritas también estimulan la actividad adenilciclase (Hwang y Ryan, 1981) y han mostrado que estos compuestos a niveles bajos y no tóxicos protegen a los animales expuestos de los efectos letales inducidos en el sistema hematopoyético (Zaporowska y Wasilewski, 1992; Sato y cols., 1999).

6. Citoquinas e Inmunomoduladores

Varios inmunomoduladores utilizados habitualmente en clínica junto con la radioterapia y/o quimioterapia para controlar el crecimiento tumoral tanto en animales de experimentación como en clínica humana presentan efecto radioprotector. El interferón gamma induce una respuesta inmune en humanos mediante la activación de las células T, la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y del receptor para la porción Fc de la

inmunoglobulina en los monocitos. En un estudio clínico randomizado se ha descrito que la administración de interferón gamma recombinante provoca una estimulación inmune en los pacientes que han conseguido la remisión completa de un cáncer de pulmón de células pequeñas tras la radioterapia y la quimioterapia (Pujol y cols., 1993).

Los polisacáridos asociados a proteínas, tales como AM5 y AM218, lactobacillus destruidos mediante calor, extractos bacterianos y la trealosa dicorinomicolato sintética también tienen propiedades inmunomoduladoras. Estos compuestos, además, también han mostrado tener acción radioprotectora (Real y cols., 1992; Fedorocko y cols., 1992; Fedorocko y Mackova, 1996; Guenechea y cols., 1997; Furuse y cols., 1997; Landauer y cols., 1997). El extracto bacteriano Broncho-Vaxom, cuando se administra en combinación con indometacina (un inhibidor de la producción de prostaglandina) en el ratón antes de una irradiación letal, presenta una sinergia en el efecto radioprotector conseguido (Landauer y cols., 1997).

El tricloro de amonio-(dioxietilén-0,0') telúrico (AS101) es un componente sintético que exhibe propiedades inmunomoduladoras y una mínima toxicidad en ensayos clínicos con pacientes de cáncer (Kalechman y cols., 1995a; 1995b). El AS101 presentó un efecto protector de la hematopoyesis en ratones irradiados y ratones tratados con diversas drogas quimioterápicas. Los estudios han revelado que la administración de AS101 aumentó los niveles de suero amiloide A (SAA) en el suero de los ratones tratados e incrementó los niveles de SAA, factor B y ceruloplasmina en el suero de pacientes tratados con AS101. Se demostró que la Interleukina-1 (IL-1), Interleukina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son mediadores importantes en los cambios de las concentraciones del SAA inducido por AS101 (Kalechman y cols., 1995a; 1995b). Las citoquinas IL-1, IL-6, TNF- α y el factor de la célula stem parece que intervienen de forma importante en la radioprotección por AS101, ya que la administración de anticuerpos contra los receptores de éstos, parece la vía de que el AS101 incremente la supervivencia de los ratones irradiados con dosis letales (Kalechman y cols., 1995a,b).

Incluso, la administración intraperitoneal de IL-1 consiguió proteger a ratones de los efectos letales de la radiación gamma (Neta y cols., 1986; Neta, 1988).

7. Lipopolisacáridos y Prostaglandinas

Se ha descrito que los lipopolisacáridos son agentes protectores frente a las lesiones radioinducidas en intestino y médula ósea de ratón provocadas por una exposición corporal total a la radiación (Riehl y cols., 2000). La administración parenteral de lipopolisacárido, 2-4 horas antes de la exposición a la radiación, produce un aumento del número de criptas que persisten a los 3,5 días tras una irradiación corporal total de 14 Gy de radiación gamma. Diversos estudios con inhibidores de la cicloxigenasa en ratones mutantes con un gen ausente para la cicloxigenasa-2 puso de manifiesto que el lipopolisacárido ofrecía protección a través de una vía dependiente de la prostaglandina (Riehl y cols., 2000), determinándose que la prostaglandina y la OK-432 protegen a los animales contra estas lesiones radioinducidas (Joshima y cols., 1992; Walden y Farzaneh, 1995).

Las prostaglandinas son sintetizadas en casi todos los tejidos como respuesta a un amplio rango de estímulos tales como hormonas, traumatismos, inflamaciones y reacciones alérgicas; influenciando un número de funciones celulares asociadas con circunstancias normales y patológicas (Needleman y cols., 1986). Se ha descrito que las prostaglandinas ofrecen protección en muchos tejidos, incluidos el intestino, médula ósea, folículos pilosos y epitelio germinal masculino (Walden y cols., 1987; Hanson y cols., 1988). Hanson y cols., (1995) ha publicado la acción radioprotectora del misoprostol (un análogo de la prostaglandina E1) que protege de forma selectiva las células normales mientras que carece de efecto en las células tumorales: en líneas celulares consigue la reparación de DNA de forma eficiente y en líneas con escaso nivel de este efecto es dependiente del ciclo celular lo que explicaría este efecto ambivalente (Van Buul y cols., 1999).

8. Ligandos de unión al DNA

El papel de Hoechst 33342 se ha investigado como radioprotector, al detectarse una radioprotección mediada por el incremento en la transferencia de electrones y que, incluso puede ser aumentada por la adición de sustancias “donadoras” de electrones que sustituyan al ligando (Martin y cols., 1996; Martin y Anderson, 1999). El Hoechst 33342 une el surco menor de DNA en lugares discretos caracterizados por 3-4 pares de base AT consecutivas (Martin y Holmes, 1981; Harshman y Dervan, 1985). Algunos estudios han mostrado que, aunque la máxima protección es actuando contra las roturas radioinducidas de las cadenas en sus sitios de unión, hay también alguna protección adicional en la que interviene la reducción realizada por el ligando unido de forma transitoria y oxidando las moléculas de DNA (Denison y cols., 1992; Martin y Anderson, 1999).

FLAVONOIDES

NATURALEZA Y BIOSÍNTESIS

Actualmente existe la tendencia al uso de sustancias de origen natural con efectos beneficiosos para la salud a través de la dieta. En la dieta “mediterránea” se presentan con frecuencia compuestos con dicha potencialidad. En el mundo vegetal, los flavonoides (del latín *flavus*, amarillo) o compuestos polifenólicos constituyen un importante grupo de sustancias orgánicas que han permitido desarrollar en los últimos años diversas líneas de investigación científica con interesantes descubrimientos. Constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales y le dan los colores (rojos, azules, amarillos) a las flores y a las hojas de otoño. La luz no es esencial para su formación, pero influye cuantitativamente. Su color depende del pH, son incoloros o blancos a pH ácido y de color amarillo intenso a pH básico.

Dentro de las plantas comestibles está presente una amplia variedad de flavonoides. Se han identificado en total 61 tipos diferentes de los cuales nos interesan especialmente los flavonoides de la especie *Citrus* (Horowitz y Gentili, 1977), dentro de la cual podemos distinguir cuatro tipos que son: *flavonas*, *flavononas*, *flavonoles* y *antocianinas*. De las cuales se están consolidando como fuentes de sustancias polifenólicas naturales: **los cítricos, sobre todo el limón, el romero, el olivo, la uva, la granada y el té.**

Los *cítricos* son la fuente más importante de flavonoides, siendo la base de productos farmacéuticos como la diosmina-hesperidina (daflón[®], circovenil[®], diosminil[®], insuven[®], venosmil[®], etc.) y derivados esterificados de la rutina (venoruton[®], duvaline[®], venosan[®], esberiven[®], etc.). Entre los flavonoides presentes en "*citrus*" destaca el **eriodictiol**, que es una flavonona que se encuentra glicosilada en los frutos del limón y que presenta una estructura molecular congruente con alta capacidad antioxidante.

Asimismo, se ha estudiado la capacidad radioprotectora de otros flavonoides presentes en "*citrus*" como la **Diosmina**, la **Rutina** y el **Extracto Cítrico (CE-50)**. Por otra parte, el efecto de determinadas vitaminas y precursores como son la **Vitamina C o Ácido Ascórbico** (presente en "*citrus*"), la **Vitamina E (δ-tocoferol)** y los **β-carotenos** como precursores de la vitamina A. (Alcaraz y col., 2009)

La **Quercetina**, es el polifenol-flavonoide probablemente más estudiado. La quercetina es el derivado aglicón de la rutina, cuya forma esterificada es una de las bases más utilizada en la síntesis de fármacos con propiedades vasoprotectoras periféricas y, en general, del sistema circulatorio.

El *romero* es, posiblemente, la planta labiada con mayor presencia de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante. Además de esta capacidad antioxidante el romero se ha utilizado en medicina como agente antiinflamatorio y antimicrobiano. Dentro de los compuestos presentes en el romero destacan los pertenecientes a tres familias distintas de polifenoles: dos

compuestos diterpénicos, el **Carnosol** y el **Ácido Carnósico**; y el **Ácido Rosmarínico**, un ácido polifenólico procedente de la condensación del ácido cafeico con otras estructuras; y la hispidulina-7-O-glucósido, un flavonoide muy característico de esta planta. La actividad antioxidante de los extractos de romero depende de su riqueza en compuestos fenólicos, que puede ser determinada por varios métodos en medios acuosos y lipídicos. En medios lipídicos, los extractos con mayor contenido de diterpenos fenólicos son los más efectivos, mientras que en medio acuoso el ácido rosmarínico presenta la mayor capacidad antioxidante. (Del Baño y cols., 2009)

El *olivo* presenta una composición característica en compuestos polifenólicos que no presentan otras plantas mediterráneas, distribuidos principalmente en cinco grupos de sustancias: oleuropeósicos, flavonas (**Apigenina**, entre otras.), flavonoles (rutina), flavan-3-ols (catequina) y compuestos fenólicos (**Hidroxitirosol**, ácido cafeico, etc.). Algunos compuestos polifenólicos presentes en el olivo han demostrado capacidad antioxidante y se utilizan en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Los compuestos presentes en el aceite de oliva virgen, también presentes en las hojas de olivo, presentan propiedades antiinflamatorias agudas y crónicas en modelos realizados en ratas, siendo capaces de captar aniones superóxido (O_2^-) y disminuir su producción celular, lo cual puede explicar algunos de los efectos protectores observados en estudios epidemiológicos realizados sobre enfermedades cardiovasculares.

Estudios recientes han mostrado específicamente las propiedades antioxidantes de los componentes principales de los **Extractos del Olivo**, la oleuropeina y el hidroxitirosol, que es precursor de la oleuropeina y un metabolito producido por el hombre cuando se administra la oleuropeina oralmente. Ambos presentan capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica “in vivo” en microsomas hepáticos de rata, e “in vitro” frente al estrés oxidativo del peróxido de hidrógeno o la xantina oxidasa, aumentan la resistencia del LDL a la oxidación, y reducen los niveles plasmáticos totales de colesterol libre y

esterificado. Según estos estudios, el hidroxitirosol y la oleuropeina podrían mostrar efectos beneficiosos sobre la salud debido a sus propiedades antioxidantes. (Alcaraz y cols., 2010)

También se han estudiado una serie de sustancias procedentes de la *uva* como son las procianidinas (**P55 ó GSE-PS, P120 ó GSE-I y P90,**), el **Ácido Gálico** y un **Extracto Soluble de Semilla de Uva**. Estas sustancias presentan importantes propiedades antioxidantes y son, precisamente, las causantes de los efectos beneficiosos del vino tinto descritos en diferentes estudios. (Alcaraz y cols., 2001; 2002)

De gran actualidad es el **Té Verde** por sus propiedades antineoplásicas y antioxidantes y, por ello, la luteína se ha descrito como un elemento protector en diferentes test de micronúcleos sobre médula ósea de ratón (Singh, 1995a; 1995b; Alcaraz y cols., 2000).

Además incluimos también en nuestro estudio el **Dimetilsulfóxido (DMSO)** por ser el principal disolvente de los compuestos liposolubles ensayados y, de esta forma, distinguir entre el efecto debido a la propia sustancia y/o el debido al disolvente de la misma.

La estructura química de los flavonoides surgió de forma indirecta durante la búsqueda de nuevos productos y se ha detectado su presencia en múltiples especies del reino vegetal. En un principio llamaron la atención de los investigadores y fueron clasificados como vitaminas naturales (vitamina P), pero rápidamente se desechó esta idea.

La formación de flavonoides parece estar asociada con procesos de lignificación en hojas y leños y con procesos de luz ultravioleta por las flores (Bate Smith, 1962; Thompson y cols., 1972) así como con los diversos tipos de estrés, sobre todo los sistemas inducidos a través de infecciones fúngicas y microbianas (Loschke y cols., 1983; Schemelzer y cols., 1984; Grab y cols., 1985; Dixon y cols., 1986; Ebel 1986), considerándose actualmente los

flavonoides como el sistema inmunológico de las plantas. Estos efectos se han atribuido a su influencia sobre el metabolismo del ácido araquidónico.

PROPIEDADES Y USOS DE LOS FLAVONOIDES

Está ampliamente aceptado que la fruta fresca y los vegetales tienen muchas propiedades beneficiosas para la salud. Existe una considerable bibliografía y un heterogéneo conjunto de pruebas epidemiológicas que establecen una conexión entre aquéllos que consumen una dieta rica en fruta fresca y vegetales con una disminución de las enfermedades cardiovasculares (Salah y cols., 1.995). Se ha asumido también que los polifenoles, elementos activos constituyentes de la dieta que contribuye a estos efectos protectores, son nutrientes “antioxidantes” aunque en trabajos más recientes se han señalado como agentes que, a través de otros mecanismos diferentes, contribuyen a acciones anticancerígenas o cardioprotectoras (Martínez, 2004). Según otros autores la vitamina B1 protege a los linfocitos humanos de los daños genéticos inducidos por la radiación X (Konopacka y Rogolinski, 2004).

Estos compuestos tienen incluso aplicación en la estabilización de los alimentos debido a su capacidad para protegerlos frente a procesos de peroxidación orgánica u oxigénica.

1. Actividad Antioxidante

La formación de radicales libres constituye un proceso asociado de forma natural al metabolismo normal de las células aeróbicas. El consumo de O₂ inherente al desarrollo celular, provoca la generación de una serie de radicales libres oxigénicos que son las especies más abundantes y características del fenómeno conocido como “estrés oxidativo”. De igual forma, la interacción de estas especies con moléculas de naturaleza lipídica provoca la aparición de nuevos radicales hidroperóxidos y peróxidos diversos.

Este conjunto de radicales (superóxido, hidroxilo y peróxidos lipoides) pueden actuar sobre los sistemas biológicos de forma claramente citotóxica. Estos compuestos interactúan con moléculas esenciales para la vida, como ácidos nucleicos o proteínas, sobre las que producen modificaciones oxidativas que conducen a alteraciones en la expresión genética, mutaciones y modificaciones en la función de recambio proteico, proceso fundamental cuya eficacia está supeditada a la actividad funcional de los potenciales sistemas de reparación (Sáez-Tormo y cols., 1994; Del Baño y cols., 2006; 2010).

Resulta evidente la necesidad de incentivar la investigación de los mecanismos por los que estos radicales libres pueden ser bloqueados y/o captados. En este aspecto, los compuestos fenólicos y, concretamente los flavonoides, han demostrado una importante actividad antioxidante frente a estos radicales basada principalmente en sus características estructurales; características que permiten, además de la captación electrónica, una gran estabilidad en el radical flavonoide formado. Dicha estabilidad es conseguida a través de una deslocalización tautomérica impidiendo, de este modo, la cadena de reacciones de propagación de dichos radicales. (Alcaraz y cols., 2010)

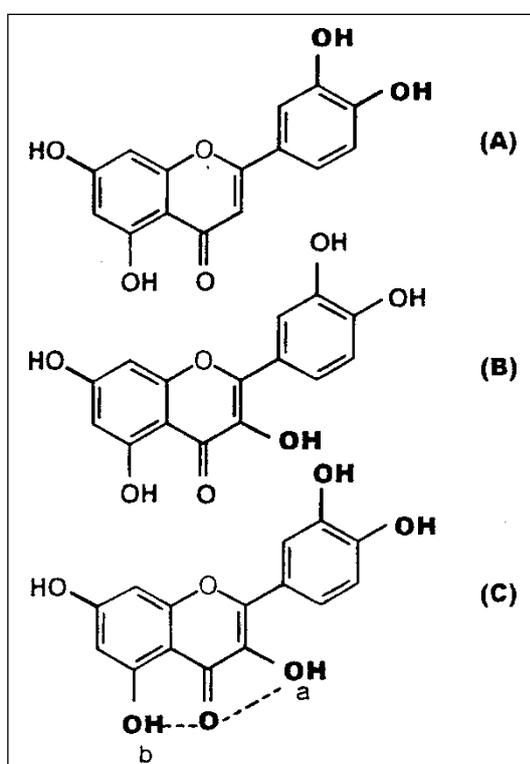
a) Relación entre estructura de los flavonoides y la actividad antirradicales libres

La capacidad antioxidante de un flavonoide, considerada en función de los estudios cinéticos de las reacciones de formación y descomposición del radical aroxil flavonoide, se encuentra estrechamente ligada a la particular estructura de estos polifenoles. En la Gráfica 2 se muestran los tres grupos estructurales más importantes para determinar esta capacidad. (Bors y cols., 1990a; 1990b; Benavente-García y cols., 1997; Redondo y cols., 1999).

A: El O-dihidroxi (catecol), estructura en el anillo B que confiere una gran estabilidad al grupo aroxilo posiblemente, a través del enlace de hidrógeno que participa en la deslocalización del electrón captado.

B: El doble enlace 2=3 conjugado con la función 4-oxo que es responsable de la deslocalización del anillo B.

C: La presencia de grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 5. Desde el punto de vista cinético, los grupos hidroxilo 3 y 5 son equivalentes dado sus enlaces de hidrógeno con el grupo 4-ceto. A pesar de esta consideración general, la presencia o ausencia del grupo 5-hidroxilo puede tener una influencia decisiva en la estabilización de los flavonoides, introduciendo un componente esteroisomérico dentro de la capacidad de deslocalización electrónica y, por consiguiente, en la estabilidad del radical aroxilo del flavonoide.



Gráfica 2. Grupos funcionales flavonoides con alta capacidad Antioxidante.

Obviamente, la capacidad antioxidante de cualquier flavonoide estará determinada por una combinación de estos elementos estructurales. Sin embargo, esta capacidad no será similar ni mostrará el mismo grado de efectividad en cada uno de los radicales mencionados anteriormente sino que dependerá de los diferentes mecanismos de acción que tienen lugar en cada caso concreto.

Estos mecanismos están influenciados por factores estructurales diferentes a los descritos, tales como: presencia o ausencia de radicales glicosilados en la estructura del flavonoide (glicósidos o aglicones), la posición del glicósido y el número y posición de los hidroxilos libres y esterificados.

b) Efectos y propiedades de los flavonoides con interés clínico y biológico

Muchas de las especies de citrus acumulan gran cantidad de flavonoides durante el desarrollo de sus diferentes órganos (Castillo y cols., 1992; 1994; Benavente-García y cols., 1993). Los flavonoides descritos en las especies del género citrus pueden clasificarse en tres grupos:

- FLAVONAS (FLO).
- FLAVONONAS (FLA).
- FLAVONOLES (FOL).

Estudios recientes acerca de la distribución cuantitativa de estos flavonoides en citrus han puesto de manifiesto que las 7-O-glicosil flavononas son los flavonoides más abundantes en todas las especies del género citrus.

Estos compuestos son intermediarios en la ruta biosintética (Lewinsohn y cols., 1989; Benavente-García y cols., 1995) de Flavonas y Flavonoles y, aunque ambos se han encontrado en bajas concentraciones dentro de los tejidos de citrus, demuestran ser en conjunto poderosos agentes antioxidantes.

c) Propiedades antioxidantes de los flavonoides de origen cítrico

El elemento estructural fundamental que permite a los flavonoides de origen cítrico la captación o complejación del singlete oxígeno es la combinación entre la conjugación del anillo B (catecol) con la función 4-oxo y la presencia del doble enlace 2=3 así como, la presencia del grupo 3-hidroxilo.

Los flavonoides son excelentes captadores del radical hidroxilo. En función de las investigaciones realizadas por diversos autores (Pincemail y cols., 1985; Darmon y cols., 1987; Cillard y Cillard, 1988; Fenech y cols., 2005), parece definirse un orden de efectividad basado también en consideraciones estructurales y que, en orden creciente de actividad, sería:



Esta ordenación está basada en la capacidad de inhibición de la formación del radical hidroxilo, y muestra la importancia del modelo binario de sustitución en el anillo B, aún tratándose de hidroxilos esterificados con grupos metilo. Resulta significativa la actividad que puede ejercer el grupo hidroxilo en el anillo B en posición 3 en compuestos monosustituídos (Flavonoles).

La actividad antioxidante de distintos flavonoides cítricos respecto a su potencial como captadores del radical superóxido ha sido estudiada utilizando diferentes métodos y con diferentes correlaciones estructurales. Estas actividades están influidas significativamente por la concentración de flavonoides en el medio, incrementando de "0" a la máxima actividad, o estando a punto de llegar a la autooxidación del flavonoide en el caso de algunos flavonoles (Darmon y cols., 1.990).

De cualquier modo, el elemento estructural dominante es la configuración del anillo C, particularmente la presencia del grupo 3-hidroxilo

activando el doble enlace 2=3. Sólo cuando la concentración de flavonoide es menor a 3 μM , la presencia de los grupos hidroxilo en el anillo B es significativa para determinar las propiedades antioxidantes de estos compuestos (Sichel y cols., 1991).

La presencia del doble enlace 2=3 (Flavonas) proporciona a la estructura del flavonoide una mayor reactividad, razón por la cual la apigenina (Flavona) es un moderado antioxidante mientras que la naringina (Flavonona) no muestra prácticamente actividad frente al radical superóxido.

Diferentes autores han demostrado que los flavonoides son excelentes agentes captadores de radical hidroxilo (Pincemail y cols., 1985; Cillard y Cillard, 1988;). Del mismo modo que en los casos anteriores, parecen poseer un grado de efectividad que resulta en función de su estructura.

Una amplia serie de estudios muestran que los flavonoides son buenos antioxidantes de diversos radicales lipídicos (Pincemail y cols., 1985; Torel y cols., 1986; Cillard y Cillard, 1988; Bors y cols., 1990a; 1990b; Das y Pereira, 1990; Wang y Zheng, 1992; Morel y cols., 1993). La reactividad de cada flavonoide está en función de la naturaleza de los diferentes radicales libres que puedan formarse en el medio (Bombardelli y Morazzoni, 1993). Dicha actividad depende de una amplia serie de factores, entre ellos, la naturaleza del sustrato orgánico susceptible de oxidación, las condiciones operativas e incluso, el método utilizado en la evaluación de este potencial.

2. Propiedades Anticancerosas

Debido a su capacidad de absorción de luz ultravioleta, los flavonoides pueden proteger al DNA de este tipo de radiación. Estos efectos son una de las funciones fisiológicas atribuidas a los flavonoides en el reino vegetal (Stapleton y Walbot, 1994), aunque también puede generalizarse a las células animales, particularmente, de mamíferos. Experimentos recientes en

plasma a temperatura ambiental sobre el DNA irradiado con UV-B demuestran los efectos protectores de la naringina y de la rutina (Kooststra, 1994). Paralelamente, los flavonoides son capaces de neutralizar los radicales libres que se generan alrededor del DNA celular y que pueden producir mutaciones. Esta capacidad de absorber los radicales libres, bien de una forma directa o bien a través de acciones moduladas por enzimas endógenos, es la responsable de los efectos protectores de los flavonoides en experiencias realizadas sobre ratones irradiados con radiación gamma (Shimoi y cols., 1994).

Además, los flavonoides también podrían proteger al DNA interaccionando directamente con los carcinógenos que escapan a los procesos de detoxificación, como ocurre en las aberraciones cromosómicas inducidas por Bleomicina (Heo y cols., 1994).

Se ha demostrado en ensayos “in vivo” e “in vitro” que algunos flavonoides inhiben el desarrollo tumoral. Los mecanismos intracelulares por los que los flavonoides llevan a cabo estos procesos son poco conocidos pero se sabe que los flavonoides podrían actuar tanto a nivel de la membrana celular como a nivel de diferentes enzimas intracelulares; en este último caso, los flavonoides pueden afectar la actividad de varios enzimas implicados en la transducción del mensaje genético (quinasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas) y que, a su vez, regulan otros enzimas importantes en el crecimiento y la proliferación celular.

Así pues, algunos de los procesos postulados en relación a la inhibición del desarrollo tumoral son: el proceso de glicolisis, la inhibición del transporte de ácido láctico o interacciones con diferentes ATP-etas de membrana.

Finalmente, se ha visto que los flavonoides pueden fortalecer los efectos de las terapias sobre el cáncer, por ejemplo: la quercitina aumenta en

gran medida la actividad inhibidora del crecimiento de la adriamicina (Scambia y cols., 1994; Critchfield y cols., 1994).

3. Propiedades Cardiovasculares. Efectos sobre la fragilidad capilar

Ciertos flavonoides han mostrado influencia sobre la pared de los vasos capilares y las funciones plaquetarias, leucocitaria, coagulante y antitrombótica, detectándose efectos beneficiosos sobre patologías coronarias.

Estos efectos fueron descritos por Szent-Gyorgyi (1938), quienes consideraron que los flavonoides tenían actividad “vitamínica”, denominándola vitamina P. Las lesiones estudiadas implicaban pérdida de plasma y sangre a través de los tejidos seguidas de reacción inflamatoria. El tratamiento actual de esta patología está basado en la utilización de medicamentos con flavonoides, sobre todo, derivados de hesperidina y rutina (más exactamente diosmina y metilchalconahesperidina) así como, hidroxietilrutosidos; todos ellos actúan primero sobre el endotelio microvascular disminuyendo la hiperpermeabilidad y el edema en pacientes con insuficiencia venosa crónica y/o diabetes. Los hidroxietilrutosidos mejoran la microcirculación y la perfusión microvascular disminuyendo la agregación eritrocítica. Este tratamiento también ha demostrado beneficios en pacientes diagnosticados de hemorroides severas (Waldworth y Faulds, 1992).

Otras actividades farmacológicas son, en primer lugar, interferencia sobre el mecanismo de los edemas y; en segundo lugar, interferencia con el fenómeno de hiperpermeabilidad inducida por la isquemia (Labrid, 1994). Algunos estudios han relacionado el incremento del tono muscular observado “in vivo” después del tratamiento con estas drogas, con la inhibición de los transportadores de aminas donde los flavonoides actúan como antagonistas de estos sobre la membrana plasmática (Sher y cols., 1992). El mecanismo vasodilatador producido por los flavonoides se ha considerado una consecuencia de la inhibición de la proteinkinasa C (Duarte y cols., 1993).

4. Efectos sobre la agregación plaquetaria

En este aspecto, los flavonoides metiloxidados (nobiletina y tangeretina) son mucho más activos que los compuestos hidroxilados y su acción pueden ser similar a la del ácido salicílico, el cual ha mostrado ser inhibidor de la agregación plaquetaria. Algunos estudios han demostrado que tanto la tangeretina como la nobiletina disminuyen la agregación plaquetaria en el rango de los 30 μM para agregación inducida por ADP y colágeno comparándolo favorablemente respecto a quercetina y fisetina; si bien, ni naringina ni hesperidina resultaron activas hasta 200 μM (Beret y Cazenave, 1988).

Otros autores han descrito que los flavonoides tienen diferentes efectos sobre la adhesión plaquetaria, la agregación plaquetaria y la secreción de serotonina; si bien, el grado de inhibición depende del tipo de inductor y de la estructura del flavonoide (Manach y cols., 1996). Sin embargo, otros flavonoides (quercetina, fisetina y myrecitina) muestran un efecto desigual frente a la agregación inducida por colágeno (Tzeng y cols., 1991). Estos diferentes efectos de los flavonoides sugieren que deben de existir varios mecanismos de actuación implicados, así por ejemplo, el enzima fosfodiesterasa puede ser uno de los mecanismos a través del cual se produce el efecto sobre el AMPc y GMPc. Otros mecanismos serían la inhibición de la cicloxigenasa como consecuencia de la depresión de la síntesis del tromboxano A₂ (Tzeng y cols., 1991) y la inhibición de la movilización intracelular del calcio (Ozaki y cols., 1993).

5. Efectos sobre la enfermedad coronaria

In vitro, los flavonoides inhiben la oxidación del LDL (lipoproteína de baja densidad) reduciendo las tendencias trombóticas que induce. El consumo de flavonoides muestra una relación inversa con la aparición de infartos de miocardio. Existen evidencias de que la oxidación por radicales libres de LDL juega un importante papel en la aterogénesis. Los flavonoides,

como se ha mencionado antes, son “bloqueadores” de radicales libres como aniones superóxido y radicales peróxido y pueden, por tanto, interrumpir las reacciones inductoras de radicales libres. In vitro, algunos flavonoides (incluyendo los flavonoides obtenidos de citrus) inhiben la modificación oxidativa del LDL por macrófagos, fundamentalmente, inhibiendo la generación de hidroperóxidos y protegiendo el α -tocoferol presente en la oxidación lipoproteica. Esta disminución de la velocidad de oxidación de ciertos compuestos permite reducir las complicaciones ateroscleróticas (Hertog y cols., 1993).

Por otra parte, los cítricos flavonoides ejercen una aparente acción reguladora sobre la agregación y concentración eritrocitaria (acción sobre el hematocrito). Sus dos principales efectos se producen sobre la viscosidad de la sangre y sobre el flujo sanguíneo (Robbins, 1976). Los compuestos metiloxidados presentan una acción antiadhesiva altamente significativa sobre los eritrocitos e inhiben la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG) mientras que, los glicósidos hidroxilados aceleran la agregación y la VSG. El efecto antiagregante de los flavonoides ha sido interpretado como un mecanismo por el cual el eritrocito es eliminado por secuestro y sacado de la circulación. Tales acciones parecen ser selectivas y similares a las de la polilisina que, con preferencia, agrega eritrocitos “viejos” con menos carga que los eritrocitos jóvenes que tienen altas cargas negativas. Los perfiles hematológicos en suero de los pacientes con enfermedades coronarias muestran valores significativamente altos de colesterol; en estos pacientes, el tratamiento con flavonoides metoxilados puede ser beneficioso, si bien, debe establecerse un control médico sobre el aumento de la viscosidad sanguínea.

6. Actividad antiinflamatoria, antialérgica y analgésica

La posible actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios y antialérgicos fue descrita por Gabor en 1986. Estudios más recientes (Galati y cols., 1994; Tordera y cols., 1994) muestran una relación

dosis/actividad de hesperidina-diosmetina (y otros flavonoides) con una influencia sobre el metabolismo del ácido araquidónico y la secreción de histamina. Estos flavonoides inhiben significativamente la secreción de enzimas en los lisosomas (inhibición de lipooxigenasa, cicloxigenasa y fosfolipasa-A2). La inhibición del ácido araquidónico en las células inflamadas puede proporcionar menos sustrato “araquidónico” para los ciclos de la lipooxigenasa y cicloxigenasa, generando una menor cantidad de endoperóxidos, prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos así como, una menor cantidad de ácidos hidroperoxi, ácido hidroxieicosatrienoico y leucotrienos. Tales efectos repercuten en la reducción del nivel de histamina que actúa en la primera fase de los procesos inflamatorios.

Otra actividad de los flavonoides relacionada con la disminución del nivel de histamina es su actividad antialérgica (Middleton y cols., 1981). Así, la quercetina (flavonol), ha demostrado un efecto inhibitorio dosis/dependiente y un efecto antagónico del calcio en la inhibición de secreción de histamina en la fiebre del heno. Otros flavonoides cítricos (hesperidina, tangeretina y nobiletina) tienen una moderada o baja actividad (Middleton y Drzewiwcki, 1982) en este sentido aunque la hesperidina muestra una significativa actividad en el bloqueo de secreción de histamina en mastocitos de rata (Matsuda, 1991).

7. Actividad antimicrobiana

Una de las propiedades de los flavonoides más relacionada con sus acciones fisiológicas en las plantas es su actividad antifúngica y antiviral. Se ha descrito una importante relación estructura/actividad frente a diferentes tipos de virus (Kaul y cols., 1985). La quercetina y hesperidina inhiben de forma importante la actividad infecciosa y/o de replicación de diversos virus (Herpes simple, polio, parainfluenza, respiratorio sincitial).

Parece existir una dependencia directa entre la concentración de quercetina y la disminución de la velocidad infectiva de cada uno de los virus

citados anteriormente, en función, de la formación de complejos flavonoides-virus que son los responsables de la disminución de la capacidad de infectar.

En suma, la investigación dentro de la actividad antiviral de los flavonoides procedentes de plantas naturales está poco desarrollada y es posible que existan compuestos en la naturaleza que tengan una relación estructural correcta y propiedades farmacocinéticas adecuadas que hagan de los flavonoides, mejores agentes antivirales que las drogas sintéticas actualmente utilizadas.

II. Objetivos

II. Objetivos.

Los **objetivos** propuestos en esta memoria de Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1°. Determinar un **posible efecto genotóxico** de los **campos electromagnéticos** propuestos mediante el ensayo de micronúcleos *in vivo*, sobre eritroblastos policromatófilos de médula ósea de roedor, e *in vitro*, sobre linfocitos humanos con bloqueo citocinético mediante citochalsina B.
- 2°. **Comparar** la capacidad genotóxica observada entre los campos electromagnéticos ensayados y el efecto genotóxico inducido por la **irradiación con rayos X**.
- 3°. **Evaluar un posible efecto protector** de algunas sustancias **antioxidantes** con capacidad radioprotectora, sobre el efecto genotóxico inducido por los campos electromagnéticos ensayados.

III. Materiales y métodos

1. MATERIAL

ANIMALES

En este experimento hemos utilizado ratones Swiss machos entre 9 y 11 semanas de vida, de aproximadamente 20-25 g de peso al inicio del estudio. Los animales se mantuvieron bajo idénticas condiciones ambientales de temperatura, luz y humedad en todo momento. Se les proporcionó alimento y agua “*ad libitum*”. Todos los animales se obtuvieron y cuidaron durante el estudio en el Servicio de Apoyo a la Experimentación (SAI) de la Universidad de Murcia (Licencia REGAES300305440012).

En todo momento se han seguido las recomendaciones éticas internacionales sobre el uso y manipulación de animales de laboratorio para investigación biomédica (*Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations*).



Figura 3. Instalaciones del SAI y características de los animales utilizados.

MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre se obtuvieron de voluntarios sin enfermedad conocida y por ello, considerados supuestamente sanos. Las muestras de sangre se recogieron en tubos cónicos estériles VENOSAFE™ (Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica) preparados al vacío que contenían heparina (Heparin sodium 5%; Lab Rovi, Madrid).

Los donantes eran no fumadores, ni padecían enfermedades conocidas; no presentaban antecedentes de exposición a agentes clastogénicos y se consideraban supuestamente individuos sanos. Todo voluntario expresó su consentimiento informado para el uso de su muestra sanguínea en esta investigación. Los donantes comprometidos se corresponden con dos mujeres de 18 y 20 años. Las muestras de sangre fueron extraídas por la mañanas del día de la experimentación y utilizada inmediatamente para el ensayo de micronúcleos citogenético (MN) siguiendo el protocolo propuesto.



Figura 4. Obtención de las muestras sanguíneas.

EQUIPOS UTILIZADOS

1. Cabina de flujo laminar de presión positiva

Se ha utilizado una cabina de flujo para conseguir un puesto de trabajo estéril. Esta cabina de flujo laminar elimina las partículas del aire para asegurar uniformidad y flujo libre de contaminación del aire utilizado.



Figure 5. Cabina de flujo laminar usada para la manipulación y cultivos de linfocitos de sangre.

2. Equipo Irradiador de Rayos X

Se ha utilizado un equipo productor de rayos X Irradiador Smart Laboratory-ray, Model 583 E, equipado con un tubo 200 E, (200 kV y 4,5 mA). (YXLON International AS Copenhagen, Dinamarca), ubicado en el Servicio de Protección Radiológica y de Gestión de Residuos del S.A.I (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia (Figura 6).

Figura 6. Equipo de rayos X utilizado.



3. Electrómetro

Para la determinación de la dosis de radiación en tiempo real, dentro de la cabina de irradiación, se ha utilizado un equipo UNIDOSE E equipado con una cámara sonda/ionización TW 30010-1 (PTW Freiburg, Alemania). Esta sonda ultra sensible posibilita la medición de dosis administradas en nuestras muestras dentro del irradiador de rayos X que se



confirmaron posteriormente con dosimetría de termoluminiscencia.

Figura 7. Electrómetro con sonda utilizado en este estudio.

4. Equipo de HPLC

Para el análisis cromatográfico de las sustancias ensayadas se ha utilizado un equipo Hewlett-Packard (HP), HPLC 1100 System (Agilent technologies, Sta. Clara, USA) equipado con detector de diodos; como fase estacionaria se utilizó una columna A C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm id) con un tamaño promedio de partículas de 5 micras. La temperatura utilizada fue de 30 °C, el flujo de 1ml/min y la longitud de onda empleada de 280 nm.



Figura 8. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

5. Microscopio óptico

Para estudiar la frecuencia de aparición de micronúcleos se usaron tres microscopios ópticos diferentes: Laborlux 12 (Leitz, Alemania), Hund V200 (Wetzlar, Alemania) y Olympus BX40 (Barcelona, España) (Figura 9).



Figura 9. Microscopio OLYMPUS BX40 (vistas lateral y frontal)



Figura 10. Análisis morfométrico utilizando análisis de imágenes para la identificación de células binucleadas (BN) y binucleadas con micronucleados (MNBN).

Además, las imágenes se escanearon para conservar una calidad de imagen de alta resolución en un equipo Leica SCN400 F. Esta técnica ha permitido un estudio doble ciego “on line” para evaluar el objetivo biológico (frecuencia de Micronúcleos) a través de la utilización de la imagen digital mediante el programa Digital Hub Management Web Service System de la Universidad de Murcia.

Figura 11. Preparaciones de genotoxicidad para microscopio virtual - digital con base de datos on line.

Link	Nombre	Type	Info
	ImageCollection_000000901_2012-05-30 13_05_04.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000902_2012-05-30 12_39_45.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000903_2012-05-30 13_36_58.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000904_2012-05-30 12_36_25.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000905_2012-05-30 14_09_04.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000906_2012-05-30 14_38_49.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000907_2012-05-30 13_34_40.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000908_2012-05-30 13_34_47.acn	LeicaSCN	
	ImageCollection_000000910_2012-05-30 14_31_24.acn	LeicaSCN	



Figura 12. Vista aumentada de un campo en el microscopio virtual digital para su estudio genotóxico.

6. Dosímetro de Termoluminiscencia (TLDs)

La determinación de la dosis de radiación ionizante administrada a las muestras de sangre estudiadas es un paso fundamental para establecer el efecto biológico buscado en este estudio y además permite la realización de la curva dosis-respuesta. Los dosímetros de termoluminiscencia se usaron para comprobar las dosis absorbidas administradas a las muestras estudiadas. Los TLDs han sido utilizados extensamente durante varias décadas y están

aceptados como la técnica más apropiada para realizar mediciones de dosis de radiación ionizante. Los TLDs son cristales de Fluoruro de Litio sensibles a la radiación tratados con Mg, Cu, P (GR-200r, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China) fueron colocados por pares en bolsas de plástico transparentes de 8x16 mm que fueron selladas y protegidas térmicamente del exterior. Las bolsas fueron codificadas y etiquetadas con tinta indeleble. El pequeño tamaño de los dosímetros facilita su proximidad a las muestras de sangre en el equipo de irradiación. Los TLDs tienen forma redondeada (pastilla) de 4-5 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Un total de 50 dosímetros se colocaron por pares en 24 bolsas individuales. Una de estas bolsas contiene dosímetros que no fueron expuestos a radiación ionizante y se utilizaron como controles.



Figura 13. Dosímetros de termoluminiscencia

Los dosímetros fueron procesados en un lector automático Harshaw 5500 TDL con un sistema programable de calefacción mediante inyección de nitrógeno caliente, a través de una programación tiempo-temperatura adaptada al perfil de los diferentes materiales termo luminiscentes. Basado en la experiencia de CIEMAT, para los cristales (LiF: Mg, Cu, P) utilizados, fue definida una lectura cíclica de los distintos temas del detector a una velocidad lineal de calefacción de 15 °C/s desde 50 °C hasta 275 °C. La temperatura fue mantenida a esta temperatura durante 12,7 segundos para un total de periodo de lectura de 26,7 segundos. Este ciclo asegura la completa lectura del detector hasta dosis altas como 1 Gy asegurando su reutilización posterior. Los dosímetros de termoluminiscencia fueron proporcionados (CIEMAT) del Ministerio de Industria y Energía quien también monitorizó las lecturas de los TLDs para determinar la dosis de radiación en este trabajo. La

evaluación de las dosis está basada en los análisis simples de curvas emitidas en los programas de ordenador desarrolladas por el CIEMAT. Unas dosis de 50 Gy y 2 Gy se establecieron como las apropiadas para los procedimientos experimentales ensayados.

SUSTANCIAS ENSAYADAS

1. Extracto cítrico soluble (CE)

El extracto cítrico soluble (CE), caracterizado por su elevada concentración de flavononas y flavonas, fue obtenido a partir de frutos inmaduros de varios cultivares característicos de tres especies del género *Citrus* de la Comunidad de Murcia: *Citrus limonia* (limón), *Citrus sinensis* (naranja dulce) y *Citrus aurantium* (naranja amarga). Los frutos inmaduros fueron recolectados directamente de los árboles tras su abscisión natural, durante la fase inicial del desarrollo del fruto. Los frutos recolectados fueron inmediatamente secados a 50 °C hasta una humedad (pérdida por secado) inferior al 8 %, siendo almacenados a temperatura ambiente hasta su uso y análisis.

Extracción y cristalización de compuestos tipo flavonona y flavona a partir de frutos inmaduros de especies cítricas:

Los frutos inmaduros secos de las especies cítricas mencionadas, se molieron para su extracción. La extracción se realizó en una proporción del 5 % peso/volumen, a temperatura ambiente y durante tres horas, empleando como solvente de extracción agua-metanol (20:80, v/v). La suspensión se filtró a través de un filtro con soporte filtrante de polipropileno. La solución polifenólica hidro-alcohólica obtenida se concentró en un rotavapor a vacío, a una temperatura máxima de 55 °C, hasta la eliminación del metanol. La solución acuosa concentrada se enfrió en agitación durante unas 24 horas, produciéndose la cristalización de los compuestos flavonoides extraídos. La suspensión se filtró y el sólido obtenido fue lavado con agua y secado en una estufa de vacío a una temperatura máxima de 55 °C. Se obtuvo un sólido final pulverulento de color beige al que se denominó extracto cítrico y que, se guardó para la realización de los correspondientes ensayos de radioprotección.

Análisis cromatográfico (HPLC) del extracto cítrico:

El extracto cítrico (CE) obtenido, se disolvió en DMSO, en una concentración analítica de 2 mg/ml. La disolución fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0,45 micras. El equipo de HPLC utilizado fue un modelo Hewlett-Packard, serie HP 1100, equipado con un detector de array de diodos. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm) con un tamaño promedio de partícula de 5 micras. La temperatura fue de 30°C, el flujo de 1 ml/min y la longitud de onda empleada de 280 nm para las flavononas y 340 nm para las flavonas.

Se emplearon como fases móviles: (A) ácido acético:agua (1:99), (B) metanol y (C) acetonitrilo. Se utilizó un método compuesto de etapas isocráticas y de gradiente lineal:

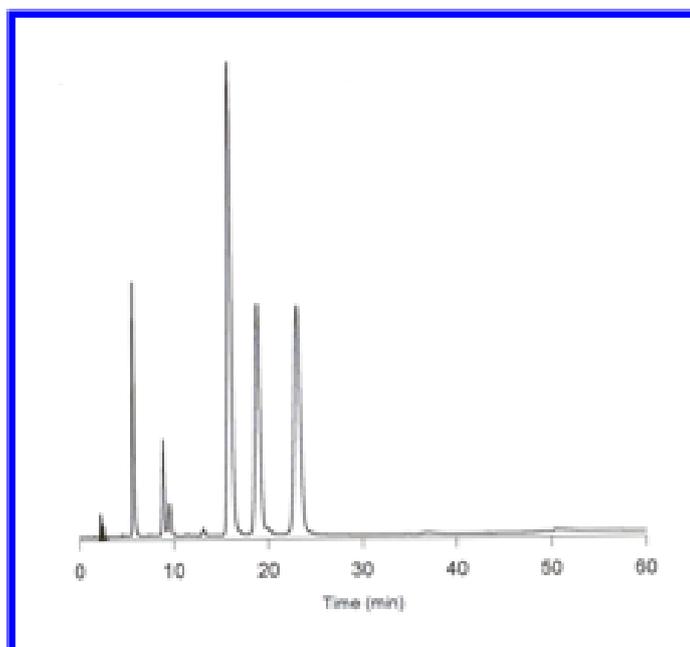
Tiempo	% (A)	% (B)	% (C)
0	70	23	7
40	70	23	7
55	55	25	20
65	55	25	20
75	70	23	7

Tabla 4. Resultados del análisis cromatográfico del CE.

El contenido absoluto de cada uno de los principales flavonoides presentes en el CE se detalla en la Tabla nº 1. Las flavononas naringina, hesperidina y neohesperidina, son los flavonoides más abundantes; no obstante, la presencia de otras flavononas como la eriocitrina y neoeriocitrina y de ciertas concentraciones de flavonas, resulta muy significativa en referencia a su potencial actividad biológica. Resulta importante resaltar la presencia del glicósido de la flavona luteolina, los dos de la flavona diosmetina (diosmina y neodiosmin), así como del neohesperidósido de la flavona apigenina, la rhoifolin.

Polifenoles	Tiempo de retención (min.)	%Absoluto
Eriocitrina	8,24	1,72
Neerocitrina	10,12	1,25
Luteolina-7-O-rutinósido	11,56	0,60
Luteolina-7-O-neohesperidósido	12,42	0,41
Isonaringina	15,23	1,10
Naringina	16,89	10,76
Hesperidina	19,96	6,68
Neohesperidina	22,35	7,65
Rhoifolina	25,31	1,62
Diosmina	30,21	0,87
Neodiosmina	36,52	0,56
Didimina	52,23	0,25

Tabla 5. Tiempo de retención y contenido absoluto por HPLC de los principales flavonoides presentes en el extracto de frutos de Citrus sp. (CE) (ver HPLC adjunto).



Gráfica 3. Análisis cromatográfico de los componentes del Extracto Cítrico Soluble (CE)

Es un extracto cítrico soluble en agua y, por ello, se ha administrado disuelto en el agua de bebida a una concentración del 0,2 % a los 7 días de haber comenzado el tratamiento con CE, este grupo de 6 animales se va a someter a una exposición de rayos X con una dosis de 50 cGy junto al resto de animales irradiados o bien "ad libitum" en los animales expuestos a campos magnéticos de 200 μ T. En el grupo de animales tratados postirradiados, estos van a ser sometidos a irradiación e inmediatamente después a la irradiación, se les va a administrar la sustancia "ad libitum".

3. Procianidina (P90)

Los extractos de semilla de uva, ricos en procianidinas (polímeros de la estructura flavan-3-ol), se han obtenido a partir de semillas de 4 diferentes variedades (cultivares) de *Vitis vinifera*, seleccionadas todas ellas de diferentes zonas de la Comunidad de Murcia: "Macabeo" y "Airén" como variedades de uva blanca; además de "Tempranillo" y "Monastrel" como variedades de uva tinta. Las uvas fueron recolectadas en su estado óptimo de maduración enológica. Las semillas fueron separadas manualmente hasta obtener un peso aproximado de 1 kg de semillas de cada cultivar. Estas semillas se secaron en una estufa de aire forzado a unos 35 °C durante 24-48 horas y se almacenaron a -30 °C hasta su uso y análisis.

Extracción y purificación de compuestos tipo flavan-3-ol (procianidinas) a partir de semillas de uva:

Los compuestos polifenólicos fueron extraídos de las semillas de uva molidas mediante una mezcla agua-metanol (25:75, v/v) en una proporción del 10 % peso/volumen, en atmósfera de nitrógeno durante una hora y a temperatura ambiente. El medio de extracción se filtró a través de un soporte filtrante de polipropileno y la solución de extracción se evaporó en un rotavapor a vacío a una temperatura máxima de 40 °C hasta sequedad, obteniendo un sólido de color marrón-rojizo. El sólido obtenido puede considerarse un extracto crudo de polifenoles y se denominó P55. El sólido llamado P55 se lavó inicialmente con n-hexano con objeto de eliminar todas las sustancias liposolubles de naturaleza no polifenólica características de este material vegetal. El sólido lavado se secó a vacío hasta la completa eliminación del

disolvente utilizado. Este sólido lavado se suspendió en agua con objeto de separar los compuestos polifenólicos de mayor peso molecular insolubles en agua. La suspensión se realizó al 5 % peso/volumen, a temperatura ambiente y durante 6 horas, filtrándose a continuación el material insoluble. Este material se filtró y seco a vacío a una temperatura máxima de 40 °C. El sólido seco obtenido, pulverulento y de color rojo, se denominó P120. La solución acuosa conteniendo los compuestos polifenólicos de menor peso molecular se pasó a través de una columna de Amberlita XAD 2, con objeto de retener dichos compuestos, separándolos del resto de componentes hidrosolubles no polifenólicos del extracto. Se utilizó metanol para la desorción de los polifenoles. El metanol se eliminó por destilación a vacío en un rotavapor a una temperatura máxima de calefacción de 40 °C, obteniéndose finalmente un sólido seco cristalino de color anaranjado oscuro, al que se denominó P90 y que, se guardó para la realización de los correspondientes ensayos de radioprotección.

Análisis cromatográfico (HPLC) de los extractos de semilla de uva

Los sólidos de los diferentes extractos obtenidos: P55, P120 y P90, se disolvieron en metanol, en una concentración analítica de 3 mg/ml. Las disoluciones fueron filtradas a través de una membrana de nylon de 0,45 micras. El equipo de HPLC utilizado fue un modelo Hewlett-Packard, serie HP 1100, equipado con un detector de diodos. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm) con un tamaño promedio de partícula de 5 micras. La temperatura fue de 30 °C, el flujo de 1 ml/min y la longitud de onda empleada de 280 nm. De los tres que se han obtenido, en este estudio sólo se utiliza el P90.

Se emplearon como fases móviles: (A) ácido acético:agua (10:90) (B) metanol y (C) acetonitrilo. Se utilizó un método de gradiente lineal:

Tiempo (min)	% (A)	% (B)	% (C)
0	90	10	0
45	30	70	0
60	22	78	0
70	0	100	0
75	0	0	100
85	0	0	100
95	90	10	0

Tabla 6: Resultados del análisis cromatográfico del extracto de uva.

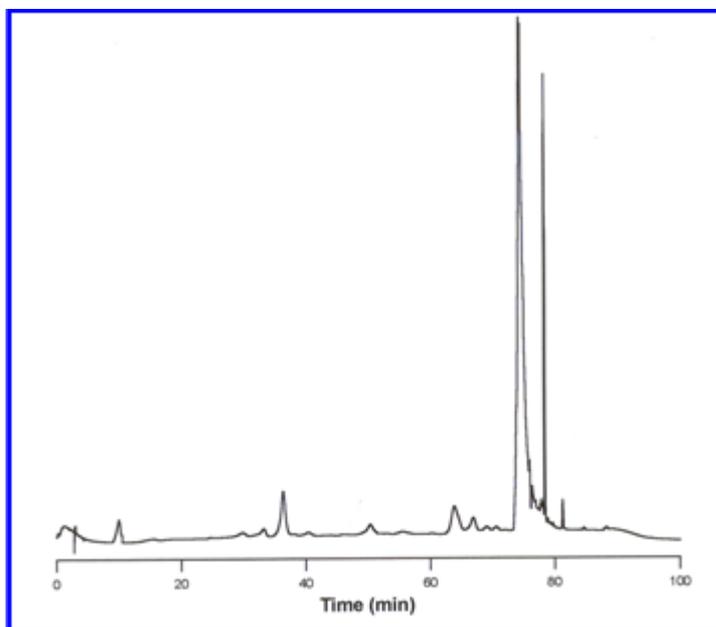
El esquema de la página siguiente muestra un cromatograma HPLC característico de un extracto de semillas de uva, correspondiendo concretamente al extracto denominado P90. La distribución relativa (valores cuantificados por normalización de área) de los principales compuestos (numerados del 1 al 11) del extracto, aparece descrita en la Tabla nº 2.

En el extracto P90, los polímeros $\geq C4$ (90,92 %) presentan una mayor concentración que en P55. Sin embargo, los monómeros se encuentran en menor proporción, siendo la (+)-catequina (2,11 %) más abundante que la (-)-epicatequina (1,06 %). La distribución de las demás procianidinas mostró ligeras diferencias respecto del extracto P55, siendo los principales los dímeros B4 (0,96 %), B3 (0,71 %), B1 (0,52 %), B2 (0,48 %) y el derivado esterificado con ácido gálico en posición 3 del dímero B1 (0,52 %).

Pico	t_R	Flavan-3-ols	% Valor Relativo P90
G	9,7	Ácido gálico	0,83
1	34,3	B3 (dímero)	0,71
2	37,6	(+)-catequina	2,11
3	40,6	B1 (dímero)	0,52
4	45,4	T2 (trímero)	0,11
5	49,9	B4 (dímero)	0,96
6	54,0	B2 (dímero)	0,48

7	59,1	B2-3'-O-gallato	0,16
8	62,9	(-)-epicatequina	1,06
9	64,4	B1-3-O-gallato	0,52
10	67,4	C1 (trímero)	0,20
11	74,4	Polímeros $\geq C_4$ unidades	90,92
Otros	--	Otros dímeros/trímeros flavan-3-ols	

Tabla 7. Tiempo de retención y contenido absoluto por HPLC de los principales flavonoides presentes en el extracto de semillas de uva P90 (ver HPLC adjunto).



Gráfica 4. HPLC del extracto de Procianidina

El flavonoide P90 es insoluble en agua, por lo que, se ha disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Madrid) en una relación de 30 mg de flavonoide/0,1 ml de DMSO. De la disolución resultante se obtienen 0,6 ml (180 mg de flavonoide/0,6 ml de DMSO) que es la dosis total administrada a cada uno de los animales.

La administración de esta sustancia se ha realizado “ad libitum”. De esta forma, se ha procedido tanto en el grupo de animales tratados preirradiación como en el grupo de animales tratados postirradiación. En los animales expuestos a campos magnéticos de 200 μ T y en los irradiados con 50 cGy la administración de la sustancia también fue realizada “ad libitum”.

4. Dimetilsulfóxido (DMSO)

El dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, USA) es una sustancia de amplio uso en cultivos celulares y que se ha utilizado como disolvente de numerosos flavonoides. Por haberse utilizado como disolvente y por sus características estructurales y antioxidantes ha debido de considerarse como un grupo de animales independientes. Su estructura química es la siguiente: C₂H₆OS.

El DMSO se ha utilizado al 5 %: 50 g de DMSO se han disuelto en 1000 ml de H₂O destilada y ha sido almacenado a 4 °C hasta su utilización. Su inclusión dentro de los grupos estudiados es doble: por un lado, es necesario conocer los posibles efectos sobre el procedimiento utilizado ya que se ha incorporado como agente indispensable para la solubilización de algunos flavonoides; por otro lado, su estructura presenta puentes disulfuro que clásicamente se aceptan como protectores frente a la radiación ionizante. Además, es un agente antioxidante que obliga a la discriminación de sus posibles efectos, ya que pueden solaparse con el de los flavonoides que vehiculiza.

5. Propiltiouracilo (PTU)

El 6n-2n-propiltiouracilo (PTU) (Sigma, Madrid) se ha utilizado tras disolver 20 mg de PTU/ml de disolución 0,15 N de NaOH, ajustando su pH a 8,5-9 mediante ClH 1N. De la disolución resultante, se extraen 25 ml que se diluyen en 225 ml de agua y se complementa con sacarosa al 1%. Esta solución se prepara a diario durante la realización de este grupo de trabajo. El PTU se ha administrado disuelto en el agua de bebida a una concentración del 0,2% durante 7 días previos a la irradiación en el grupo de animales tratados preirradiación. A los 7 días de haber comenzado el tratamiento con ECS, este grupo de 6 animales va a ser sometido a una exposición de rayos X con una dosis de 50 cGy junto al resto de animales irradiados. En el grupo de animales tratados postirradiados, estos van a ser sometidos a irradiación e, inmediatamente después de la irradiación, se les va a administrar la sustancia "ad libitum".

2. MÉTODOS

Este estudio se ha dividido en dos experimentos que pretenden evaluar un posible efecto genotóxico *“in vivo”* e *“in vitro”*, realizado sobre eritroblastos policromatófilos de médula ósea de ratón (Schmid, 1975); y en linfocitos procedentes de sangre humana (IAEA, 2011), producido por dos tipos de radiaciones diferentes: campos magnéticos y radiaciones ionizantes. Para dicha evaluación, hemos utilizado el test de micronúcleos, en dónde el incremento del número de micronúcleos expresaría el daño genético inducido por la radiación.

1. El primer estudio *“in vivo”* realizado sobre PCEs de médula ósea de roedor.

El protocolo seguido se muestra en la siguiente figura:

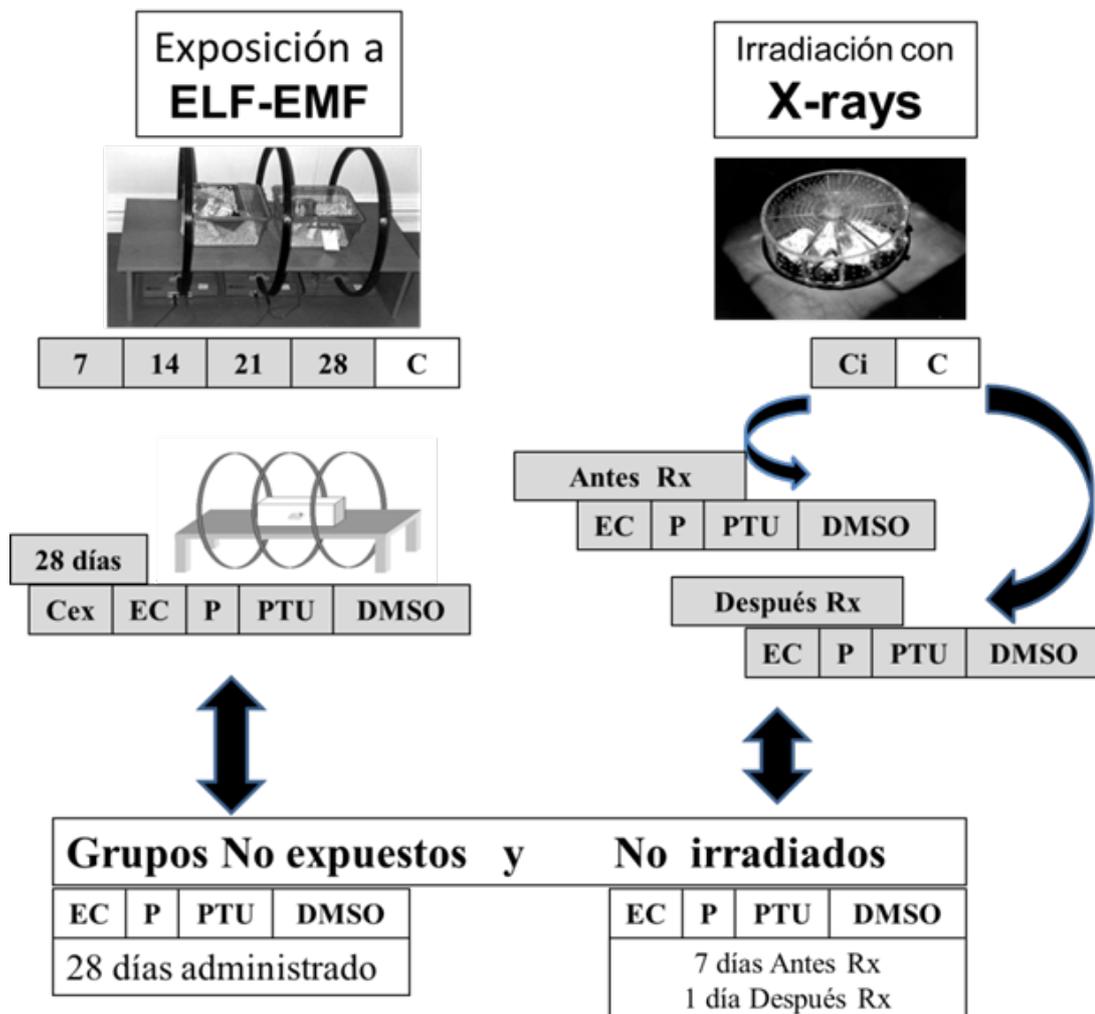


Figura 14. Protocolo de estudio de PCEs de médula ósea de ratón

Expuestos a campos magnéticos:

En este experimento se estudia la posible existencia de daño genotóxico en 162 ratones Swiss machos de idénticas características a los del experimento con radiación ionizante, pero expuestos a un campo magnético de 200 μT y que se han mantenido en unas condiciones constantes, donde la exposición se ha realizado en una cámara especial, con las condiciones ambientales controladas y con iluminación diurna-nocturna controlada, a efectos de mantener los ciclos circadianos de forma idéntica pero introducido bajo una estructura que genera el campo magnético (Fig. 15). El tiempo de exposición fue de 0, 7, 14, 21 y 28 días en grupos de 6 ratones para cada uno de los grupos estudiados (Fig.16).

Para este estudio, se ha construido un dispositivo experimental (Fig. 15) consistente en tres bobinas iguales de 100 vueltas con hilo de cobre de 1 mm de diámetro. Cada bobina tiene un diámetro de 60 cm y una anchura de 2 cm. A la frecuencia de 50 Hz, el campo creado por una bobina en su centro resulta:

$$B \text{ (en } \mu\text{T)} \approx 0,2 \times I$$

Las tres bobinas están dispuestas sobre un mismo eje a 30 cm de distancia una de otra. Alimentando las tres bobinas con la misma intensidad (conexión en serie) se consigue una región cilíndrica de unos 30 cm de diámetro y 60 cm de longitud donde la variación espacial del campo está por debajo de $\pm 10\%$. Para alimentar las bobinas se ha construido una fuente de intensidad variable a 50 Hz .



Figura 15. Dispositivo experimental para la exposición a un campo magnético.

En el experimento realizado, el sistema se ha alimentado con 700 mA lo que producía un campo magnético de $200 \pm 20 \mu\text{T}$ en toda la zona en donde se coloca la jaula con los animales. En la Figura 15 se muestra el campo magnético medido en el eje del sistema tomando como origen la posición de la bobina central. La construcción de este sistema de exposición la ha realizado la Cátedra de Electromagnetismo de la Universidad de Murcia (Prof. José Margineda).

En este experimento de exposición a campos magnéticos, los grupos de experimentación realizados han sido los siguientes:

1.- Un primer grupo constituido por 6 ratones que no se han sometido a ningún tipo de exposición y que se ha considerado como **GRUPO CONTROL**.

2.- Un segundo grupo constituido por 24 ratones que fueron expuestos a un campo magnético de $200 \mu\text{T}$ en lotes de 6 ratones utilizando el sistema que se ha descrito anteriormente y en donde cada uno de los grupos ha estado expuesto al campo magnético durante un periodo de tiempo diferente: 7 días (1 semana), 14 días (2 semanas), 21 días (3 semanas) y 28 días (4 semanas) y que ha sido considerado como **GRUPO EXPUESTO A CAMPOS MAGNÉTICOS**.

3.- Un tercer grupo constituido por 54 ratones que fueron tratados con las sustancias que se pretende evaluar para determinar un posible efecto protector frente al daño genotóxico producido por nuestro campo magnético. A su vez, este grupo se divide en los siguientes lotes de animales:

a) Grupo formado por 24 ratones que, en lotes de 6 animales, fueron tratados con las cuatro sustancias a estudiar pero que no fueron expuestos a un campo magnético, considerándose por tanto, como **GRUPO TRATADO NO EXPUESTO A CAMPOS MAGNÉTICOS**. Este grupo se considera como grupo control para cada una de las sustancias ensayadas y servirá para determinar el efecto genotóxico de dichas sustancias directamente sobre el animal sin el efecto del campo magnético.

b) Grupo formado por 30 ratones que, en lotes de 6 animales, fueron un grupo expuesto sin ser tratado y los tratados con las cuatro sustancias a estudiar y todos fueron expuestos durante 28 días (4 semanas) a un campo magnético de 200 μT , considerándose este grupo como **GRUPO TRATADO EXPUESTO A CAMPOS MAGNÉTICOS**.



Figura 16. Dispositivo experimental para la exposición a un campo magnético de 50Hz.



Figura 17. Exposición corporal total de los ratones durante 7, 14, 21, 28 días.

En este grupo de experimentación, las sustancias químicas ensayadas son las siguientes:

- **6-n-propil-2-thiouracil (PTU)** obtenido de Sigma Chemical (Madrid, España).
- **Extracto flavonoide cítrico soluble** compuesto por una mezcla de flavonas, flavononas y flavonoles (**CE**) obtenido a partir de la extracción descrita por NUTRAFUR, S.A (Alcantarilla, Murcia).
- **Procianidina (P90)** obtenido a partir de la extracción descrita por NUTRAFUR, S.A (Alcantarilla, Murcia).
- **Dimetilsulfóxido (DMSO)** (Sigma, USA).

Estas sustancias han sido administradas por vía oral a una concentración del 0,2% en todos los grupos de animales.

La irradiación con rayos X, en exposición corporal total, con los animales inmovilizados y conscientes, y se ha realizado con un aparato Andrex SMART 200E (Xylon International, Hamburg, Alemania) a 120 kV, 4,5 Ma, DFO de 74.5 cm a temperatura ambiental, con una tasa de dosis de 102 mGy/min. La dosis se monitorizó con un Dosímetro Universal UNIDOS con una cámara de ionización PTW Farmer TW 30010 (PTW-Friburg, Feiburg, Alemania) ubicada en el interior de la cabina y confirmada con dosimetría de TLD y una dosis total administrada de 50 cGy (Figs. 28) para cada animal irradiado.

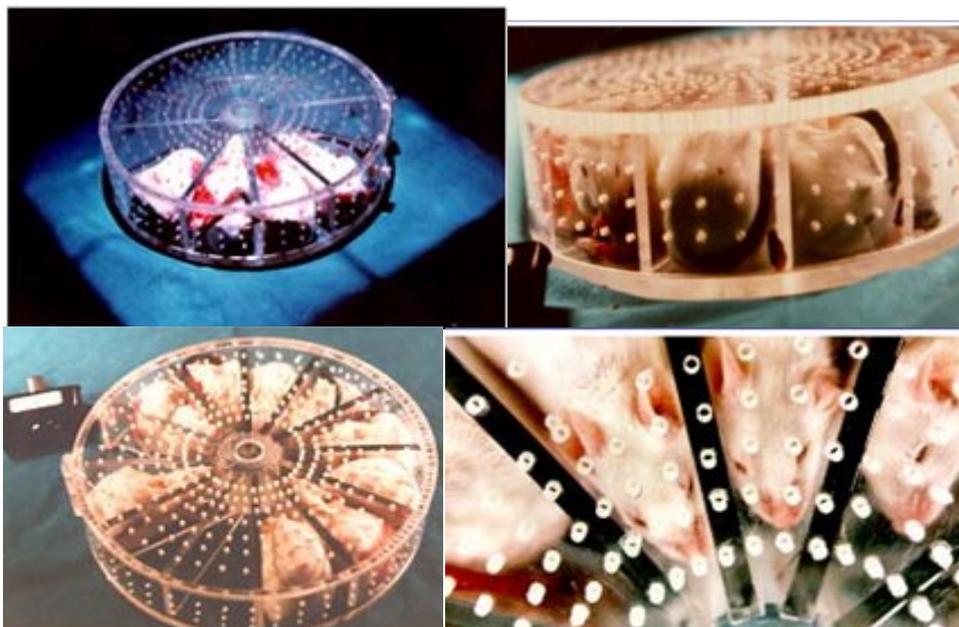


Figura 18. Detalles de la exposición de los ratones a campos magnéticos.

Los grupos de experimentación realizados han sido los siguientes:

1.- Un primer grupo constituido por 6 ratones que no se han sometido a ningún tipo de radiación y que se ha considerado como **GRUPO CONTROL**.

2.- Un segundo grupo constituido por 6 ratones que se han irradiado con una dosis de 50 cGy de rayos X utilizando el equipo cuyas características se han descrito anteriormente y que se ha considerado como **GRUPO IRRADIADO CON RAYOS X**.

3.- Un tercer grupo constituido por 72 ratones que se han tratado con las diferentes sustancias para determinar la existencia de un efecto protector frente al daño genotóxico producido por la radiación X. A su vez, este grupo se divide en los siguientes lotes de animales:

a) Grupo formado por 24 ratones que, en lotes de 6 animales para cada una de las sustancias ensayadas, fueron tratados con la sustancia pero no fueron irradiados con rayos X; considerándose, por ello, como **GRUPO TRATADO NO IRRADIADO**. Este grupo se considera como grupo control para cada una de las sustancias ensayadas y servirá para determinar el efecto genotóxico de la misma directamente sobre el animal sin el efecto de la radiación.

b) Grupo formado por 24 ratones que, en lotes de 6 animales para cada una de las sustancias ensayadas, fueron tratados antes de ser sometidos a la exposición con rayos X con las diferentes sustancias; considerándose por ello, como **GRUPO TRATADO PREIRRADIACIÓN**.

c) Grupo formado por 24 ratones que, en lotes de 6 animales para cada una de las sustancias ensayadas, fueron tratados con las sustancias vía oral "ad libitum" inmediatamente después de ser sometidos a la exposición con rayos X; considerándose por ello, como **GRUPO TRATADO POSTIRRADIACIÓN**.

Las sustancias antioxidantes administradas han sido las mismas que las ensayadas en los animales expuestos a los campos magnéticos de extemada baja frecuencia.

TEST DE MICRONÚCLEOS SOBRE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

La evaluación de los dos experimentos realizados se ha llevado a cabo mediante la utilización del test de micronúcleos “*in vivo*” sobre médula ósea de ratón, un test ampliamente utilizado para la determinación “*in vivo*” del efecto genotóxico y mutagénico de diferentes agentes químicos y físicos y que fue descrito originalmente por Schmid en 1975.

Técnica: Los animales utilizados en este experimento se han sacrificado por descerebración traumática para proceder a la exéresis de la médula ósea de ambos fémures, según la técnica descrita por Von Ledebur y Schmid (1973) y Schmid (1975) cuyos pasos se describen detalladamente a continuación:

- 1.-Los animales se sacrifican por dislocación cervical e, inmediatamente, se disecan los fémures, limpiándolos de todo resto de músculos y tendones.
- 2.-Se cortan las epífisis de los fémures y mediante una jeringa de insulina (24G), se hace fluir suero bovino fetal (Sigma, Madrid) por la diáfisis femoral de forma que arrastre la médula ósea que contiene, la cual se recoge en tubos cónicos de 15 ml de capacidad.
- 3.-Usando una pipeta Pasteur con bulbo de goma, se pipetea enérgicamente el contenido del tubo hasta obtener una suspensión celular sin grumos.
- 4.-Se deja reposar durante 5 minutos y se centrifuga, posteriormente, a 1000 rpm durante 5 minutos, en centrifuga Centromix 549 (Selecta, Madrid).
- 5.-Según el volumen de sedimento obtenido, se extrae el sobrenadante con una pipeta Pasteur hasta dejar aproximadamente 0,2 ml; posteriormente, se agita bien hasta obtener una suspensión homogénea.

- 6.-Se hace una extensión dejando caer a unos 2-3 cm una gota del líquido obtenido a modo de frotis sanguíneo.
- 7.-Se dejan secar al aire durante 24 horas.
- 8.-Se tiñen con May-Grünwald puro (Analema, Vorquímica S.L, Vigo) durante 3 minutos.
- 9.-Se retira el 50% del colorante y se reemplaza por agua destilada, dejándolo en esta solución durante 2 minutos.
- 10.-Sin lavar, se tiñen con una solución de Giemsa (Probus, Madrid) diluido 1:6 en tampón fosfato 100M, pH 6,2 y, se mantiene durante 2 minutos más.
- 11.-Se lavan los preparados sumergiéndolos uno por uno en agua destilada.
- 12.-Se limpia la parte inferior del portaobjetos con Xilol (Probus, Madrid) y las preparaciones se dejan secar al aire.
- 13.-Se montan con cubreobjetos, quedando dispuestas para su estudio microscópico.

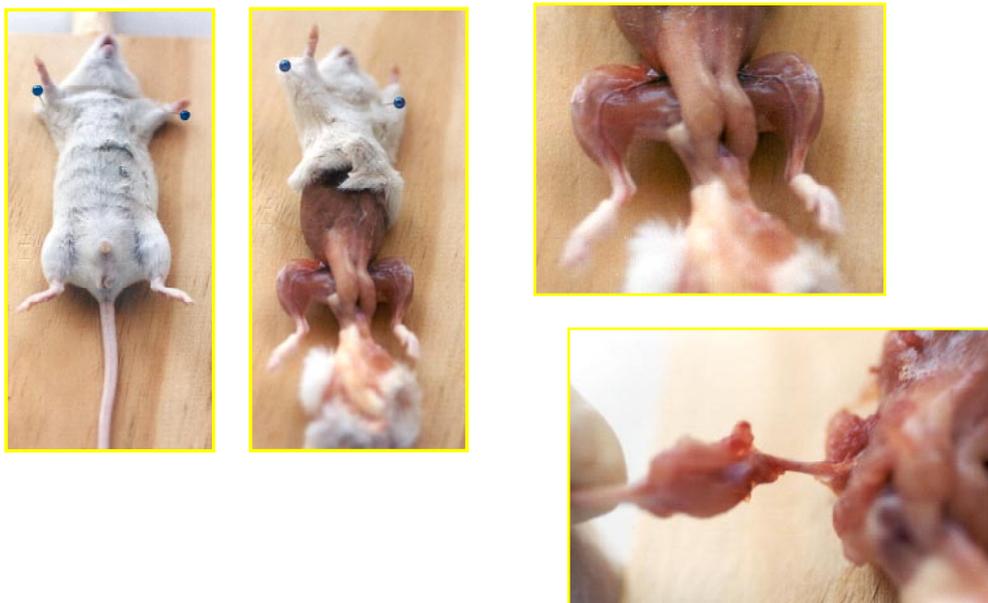


Figura 19. Técnica de disección de ambos fémures para la obtención de su médula ósea.

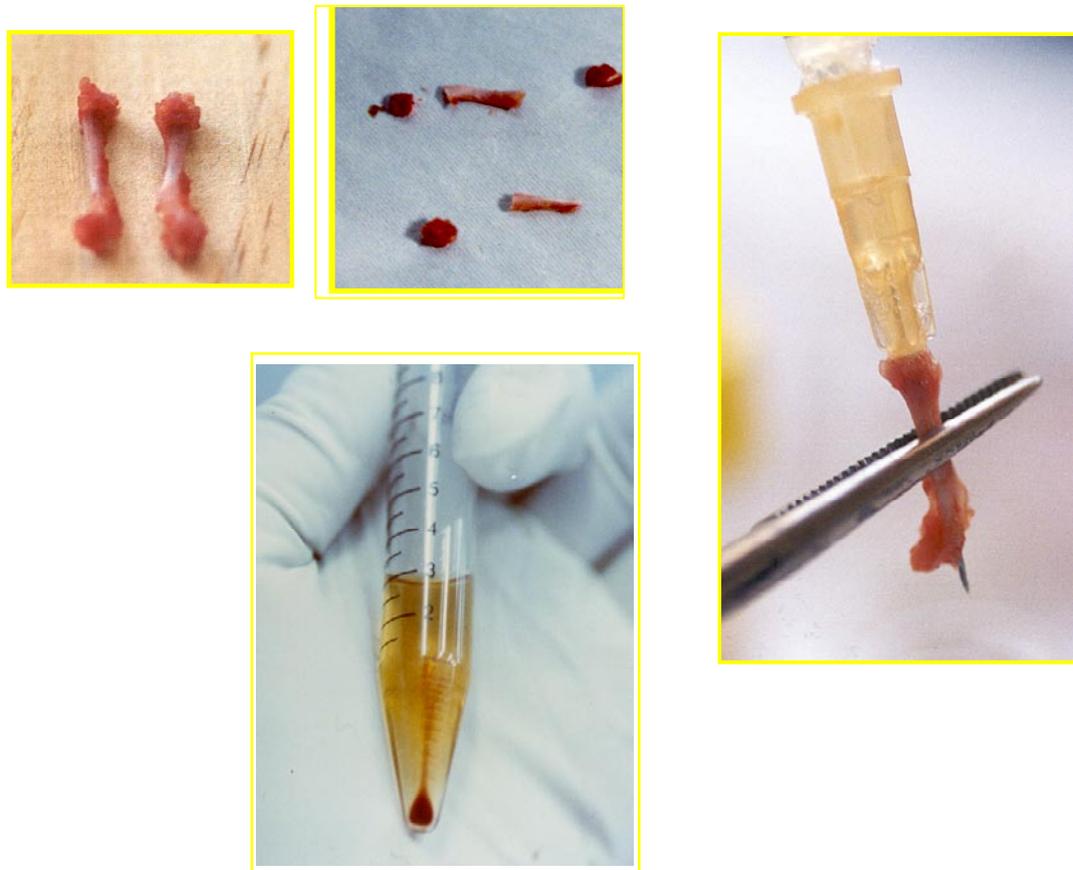


Figura 20. Detalle de los fémures disecados y tras la extracción de su médula ósea.

Determinación de la frecuencia de micronúcleos.

Las preparaciones de médula ósea obtenidas en todos los experimentos realizados se han analizado por dos observadores independientemente utilizando microscopía óptica.

Para el recuento y análisis de micronúcleos (MN) se ha empleado sistemáticamente una magnificación de 400 aumentos y, en los casos de comprobación y/o discriminación, se han utilizado 1000 aumentos con aceite de inmersión.

En los experimentos se han obtenido dos preparaciones de cada uno de los animales utilizados. En cada una de esas preparaciones se ha

procedido al recuento de 500 eritroblastos policromatófilos (PCEs) para determinar la frecuencia de aparición de micronúcleos en cada uno de los animales. Este valor se ha expresado como MN/1000 PCEs para cada uno de los animales estudiados.

El recuento se ha realizado desconociendo las características de la preparación observada, obteniéndose un único valor para cada punto que va a corresponder con la media de las lecturas para cada una de las muestras.

El ratio PCEs por NCEs (P/N) y el ratio PCEs por Eritrocitos (PCEs + NECs) (P/E) fueron determinados para evaluar el posible efecto citotóxico de los tratamientos físicos y químicos.

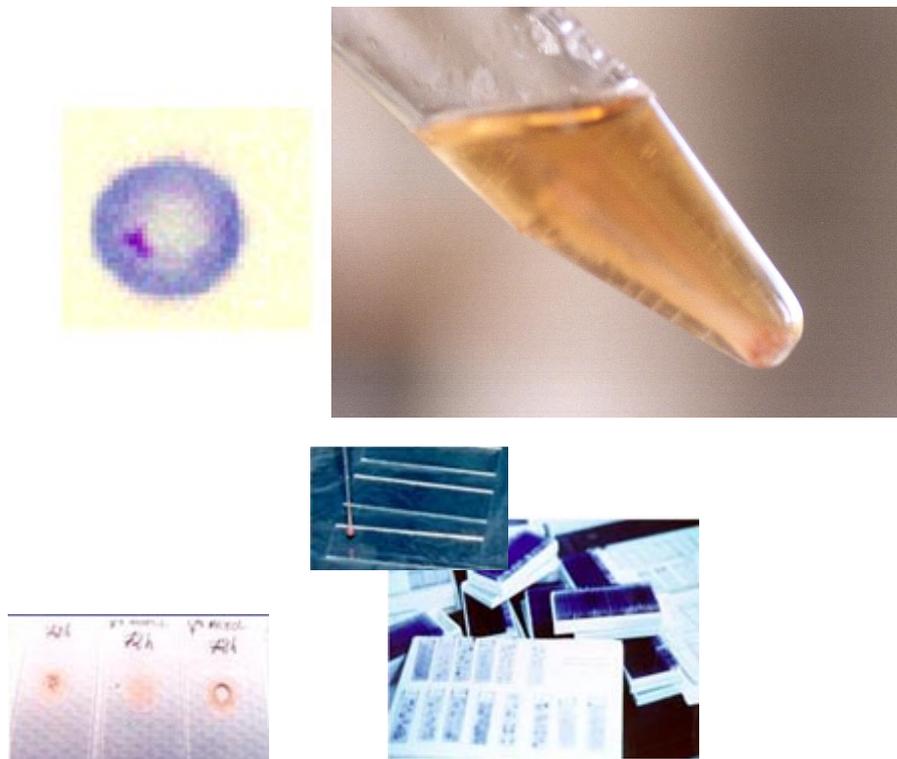


Figura 21. Detalle de la médula ósea en un momento de su obtención, y procedimiento de obtención de los frotis para el estudio de los MN en PCEs.

2. El segundo estudio “*in vitro*” realizado sobre linfocitos humanos con bloqueo citocinético.

En este segundo experimento “*in vitro*” hemos irradiado con rayos X (2 Gy) un grupo de muestras de sangre obtenida de voluntarios supuestamente sanos. Posteriormente hemos estudiado el posible efecto protector de sustancias flavonoides frente a los rayos X administradas en dos momentos diferentes (preirradiación y postirradiación). De cada muestra sanguínea obtenemos varias preparaciones que se estudian al microscopio óptico por dos observadores diferentes a doble ciego. En cada preparación contamos 500 células binucleadas determinando el número de MN/500 CB existente.

En las muestras sanguíneas **irradiadas con rayos X**. En la figura 22 se muestra el protocolo seguido con las muestras sanguíneas en el ensayo de micronúcleos con bloqueo citocinético.

En las muestras expuestas a campos magnéticos las muestras sanguíneas se expusieron durante 2 h en un campo magnético de 2 T y cuyas muestras realizadas por triplicado se han denominado Grupo expuesto al campo magnético y que se compara con las muestras controles, no expuestas ni irradiadas.

Posteriormente, otro grupo de muestras sanguíneas recibieron 25 μ l de una concentración 20 μ M de las sustancias antioxidantes estudiadas (CE, P y DMSO) y 25 μ l de una concentración al 2 % de PTU, 14 minutos antes del comienzo de la exposición durante 2 h en el campo magnético de 2 T estudiado. A este grupo de muestras se ha denominado **GRUPO TRATADO Y EXPUESTO A CAMPO MAGNÉTICO**.

Los resultados obtenidos se han comparado con otro lote de muestras sanguíneas que habiéndoles sido administradas las sustancias antioxidantes ensayadas (CE, P, PTU, DMSO) no han sido ni expuestas a

ningún campo magnético ni han sido irradiados; por lo que se les denomina **GRUPO TRATADO Y NO EXPUESTO A CAMPOS MAGNÉTICOS**.

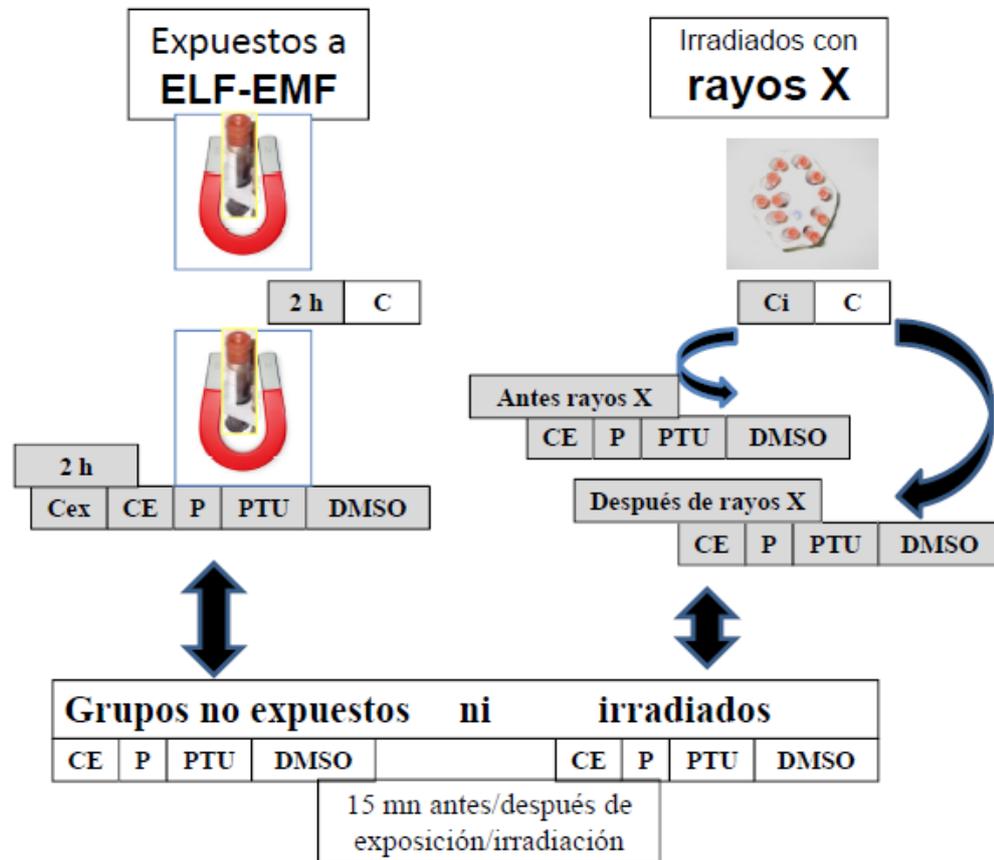


Figura 22. Protocolo de estudio de MN en linfocitos humanos con bloqueo citocinético

Expuestas a 2 Gy de rayos X. En este ensayo de radiación ionizante, los grupos de experimentación realizados han sido los siguientes:

1.- Grupo formado por muestras sanguíneas no irradiadas que determinan la frecuencia de presentación espontánea de MN/500 CB y se les denomina **GRUPO CONTROL**

2.- El **GRUPO CONTROL IRRADIADO**, formado por muestras sanguíneas irradiadas con 2 Gy en exposición única para determinar la aparición de MN como consecuencia directa de la exposición a los rayos X.

3.- GRUPO TRATADO CON SUSTANCIAS Y NO IRRADIADO, corresponde a las muestras sanguíneas a las que se les ha administrado las sustancias antioxidantes, pero no han sido irradiadas. Se utilizará para determinar la posible genotoxicidad de éstas.

4.- GRUPO TRATADO CON SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES ADMINISTRADAS PREIRRADIACIÓN. Pretende estudiar un posible efecto protector de estas sustancias frente al daño inducido por la radiación ionizante administradas antes de la radiación.

5.- GRUPO TRATADO CON SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES Y ADMINISTRADAS POSTIRRADIACIÓN. Pretende estudiar un efecto protector de las sustancias frente al daño inducido cuando se administran después de la radiación ionizante.

TEST DE MN EN LINFOCITOS HUMANOS

Este ensayo se basa en la utilización de la técnica de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica y bloqueados citocinéticamente en su primera división mitótica con citochalasin B, descrito por Fenech (1986, 1990, 2000) y considerado como el procedimiento más adecuado para el análisis citogenético del daño genotóxico inducido por radiación ionizante de forma sistemática (IAEA, 2001).

La técnica utilizada es la siguiente:

Preparación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado está compuesto por:

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

Tabla 7. Composición del medio Ham 10.

Sales inorgánicas/Concentración (mg/l)		D-Ca-pantothenate	0.715
KCl	285	Choline chloride	0.698
Na ₂ HPO ₄	154	Folic acid	1.32
KH ₂ PO ₄	83	<i>Myo</i> -inositol	0.541
CaCl ₂ · 2H ₂ O	44	Nicotinamide	0.615
MgSO ₄ · 7H ₂ O	153	Pyridoxine · HCl	0.21
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.834	Riboflavin	0.376
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.00249	Thiamine · HCl	1
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.0288	Vitamin B12	1.36
NaHCO ₃	1200	Hypoxanthine	4.1
Otros componentes/Concentración (mg/l)		Thymidine	0.73
D-glucose	1100	Lipoic acid	0.2
Na-pyruvate	110	* Liquid media contain 10 mg/l of phenol red	
Phenol red	1.2*		
Aminoácidos/Concentración (mg/l)			
L-alanine	9		
L-arginine · HCl	211		
L-asparagine	13		
L-aspartic acid	13		
L-cysteine	25		
L-glutamine	146		
L-glutamic acid	14.7		
Glycine	7.51		
L-histidine · HCl · H ₂ O	21		
L-isoleucine	2.6		
L-leucine	13		
L-lysine · HCl	29		
L-methionine	4.48		
L-phenylalanine	5		
L-proline	11.5		
L-serine	10.5		
L-threonine	3.57		
L-tryptophan	0.6		
L-tyrosine	1.81		
L-valine	3.5		
Vitaminas/Concentración (mg/l)			
Biotin	0.024		

Para realizar la técnica de micronúcleos, vamos a cultivar 1 ml de cada muestra de sangre heparinizada (irradiada o no y/o tratada o no) en frascos de cultivo de 25 cc en una estufa a 37 °C y ambiente enriquecido con CO₂ al 5 % durante 72-76 horas junto con 9 ml de medio de cultivo preparado como se ha comentado anteriormente. Esto es realizado en cabina de flujo laminar.

Transcurridas 44 horas de cultivo añadimos 150 µl de la disolución de Cytochalasina B (Cyt B) a cada cultivo. Estos 150 µl de disolución, contienen 30 µg de Cyt B (3 µg/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 1000 rpm (Heraeus, Minifuge T, Madrid).

A continuación, extraemos el sobrenadante y agregamos 8 ml de solución hipotónica de CIK. De esta forma, obtenemos 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 8 ml de fijador (Alcohol metílico: Ácido Acético Glacial, 3:1) que volvemos a centrifugar a 1000 rpm durante 5 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 (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 3 minutos.

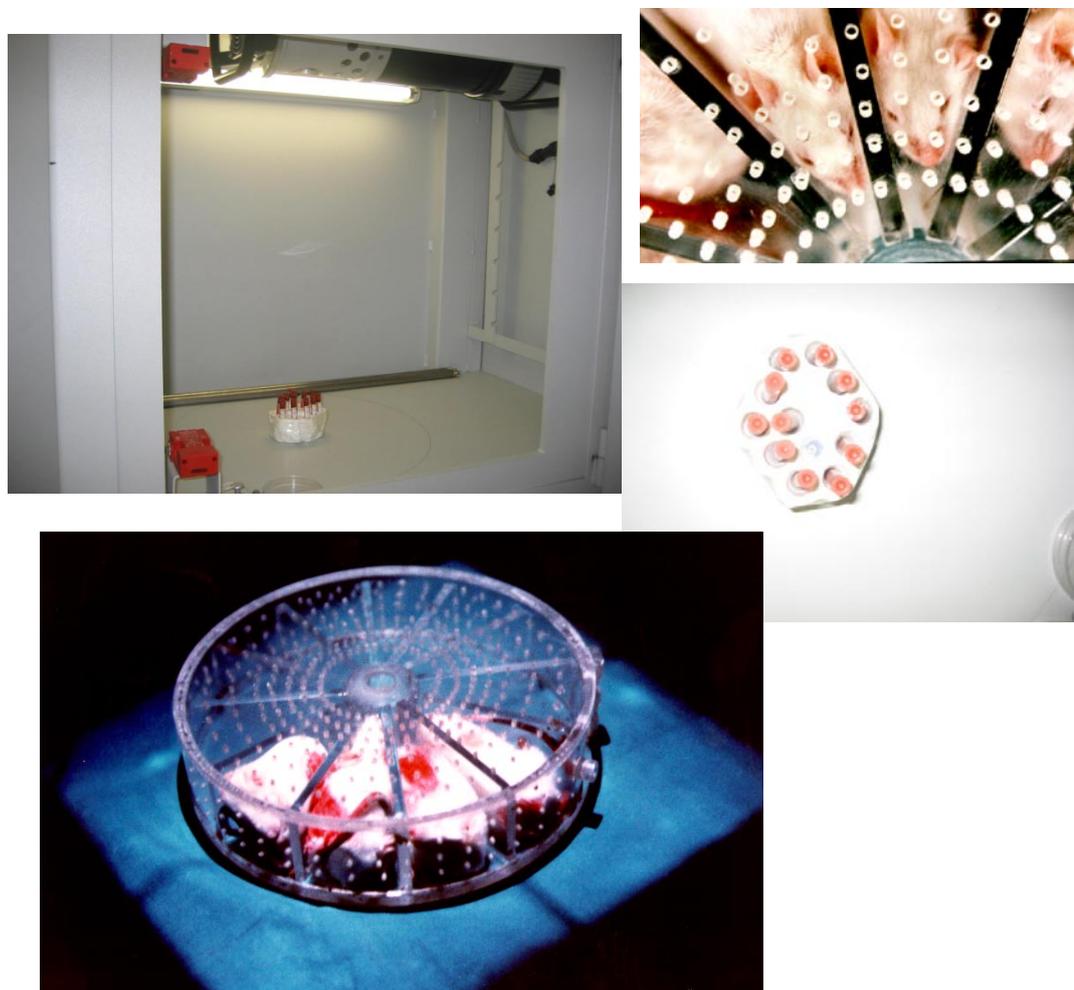


Figura 23. Detalle de la cabina en el interior del equipo de rayos X. Obsérvese la colocación de los animales inmovilizados y conscientes para una irradiación corporal total; y, la colocación de las muestras sanguíneas durante la exposición a rayos X.

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

3º) Posteriormente y sin lavarlas, las pasamos a solución Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania) 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 24. Preparaciones microscópicas tras la tinción con May-Grünwald y Giemsa obtenidas en este estudio.

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 (Sigma-Aldrich, Madrid) 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) (Sigma-Aldrich, Madrid) 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 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 (Probos, Madrid) 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:

NaH₂PO₄ 2 H₂O -----1,560 g/l

Na₂HPO₄ 7 H₂O -----2,340 g/l

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico ha consistido en comparaciones entre grupos realizando contrastes de igualdad de medias mediante análisis de varianza. Se han determinado ecuaciones polinómicas mediante análisis de regresión y correlación polinómicas y también se han aplicado análisis de regresión y correlación lineales. Se han considerado con significación estadística cuando se ha obtenido una p menor de 0,05 ($p < 0,05$).

El estudio estadístico se ha realizado en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Universidad de Murcia, utilizando el paquete BMDP Statistical Software, Inc. (Versión 1988; IBM PC/DOS).

Además, para cuantificar la capacidad protectora de las sustancias ensayadas hemos utilizado otros 2 parámetros diferentes:

1. 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:

En la que: **FP** es la magnitud de protección expresada en %, **Fcontrol** es la frecuencia de micronúcleos en las muestras controles irradiadas, y **Ftratadas** es la frecuencia de micronúcleos en las muestras irradiadas y tratadas.

2. Factor Reductor de Dosis (FRD): el Factor Reductor de Dosis definido como el cociente entre la dosis de radiación necesaria para producir un efecto dado en presencia de un compuesto radioprotector y la dosis de radiación necesaria para producir el mismo efecto en ausencia de dicho compuesto (Travis y cols., 1979), que se expresa mediante la fórmula:

$$\text{FRD} = \frac{\text{Dosis con RP para obtener } X \text{ MN}}{\text{Dosis sin RP para obtener } X \text{ MN}}$$

donde: FRD es el Factor Reductor de Dosis, RP es la sustancia empleada, y X MN es el número de micronúcleos producidos.

IV. Resultados

IV.1. Resultados morfológicos

IV.1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS

Los diferentes tipos celulares que se han estudiado para determinar la frecuencia de micronúcleos se exponen a continuación.

ANÁLISIS DE MICRONUCLEOS SOBRE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

Un frotis característico de los componentes celulares en la médula ósea de ratón puede observarse en las Figuras 25-30.

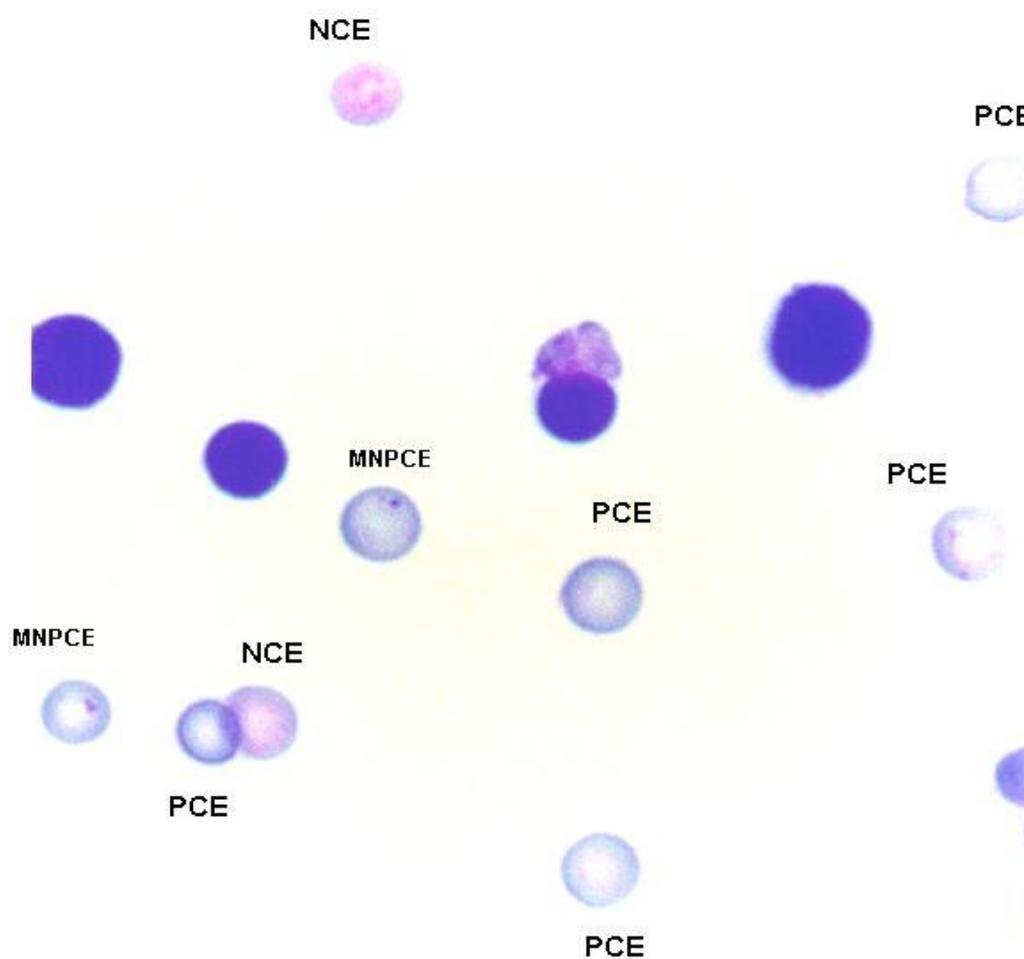


Figura 25. Imagen microscópica panorámica de un frotis de médula ósea de ratón: (NCE) eritroblastos normocromatófilos, (PCE) eritroblastos policromatófilos y (MNPCE) dos eritroblastos policromatófilos con micronúcleos en su interior (400X).

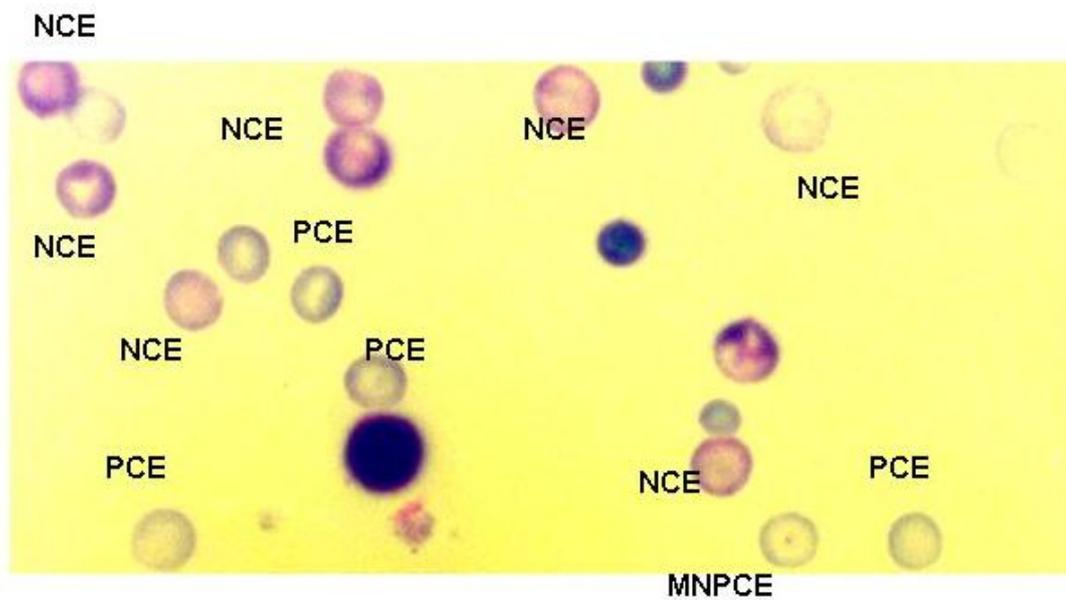


Figura 26. Frotis de médula ósea de ratón (NCE: eritroblasto normocromatófilo; PCE: eritroblasto policromatófilo; MNPCE: microneúcleo en eritroblasto policromatófilo) (600X).

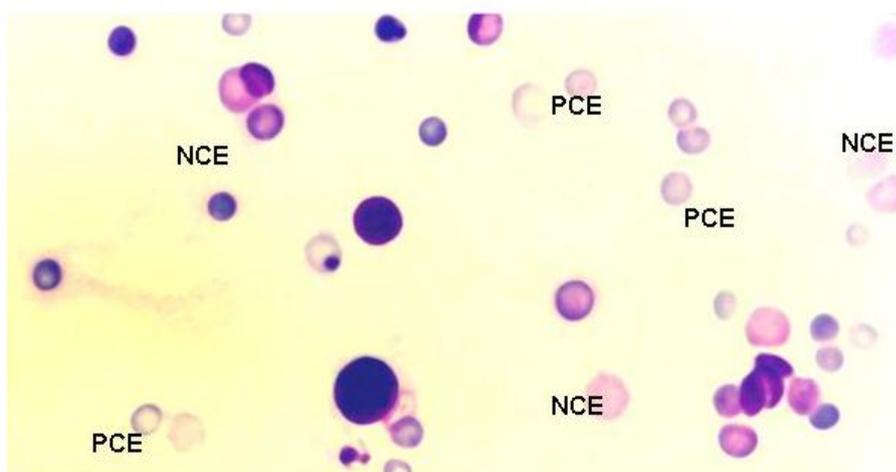


Figura 27. Microfotografía de un frotis de médula ósea (400X).

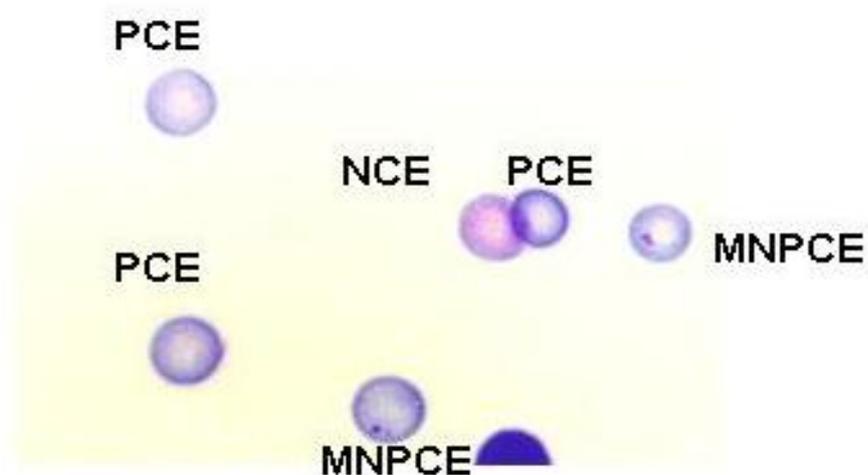


Figura 28. Detalle de las características cromáticas de las diferentes células estudiadas.

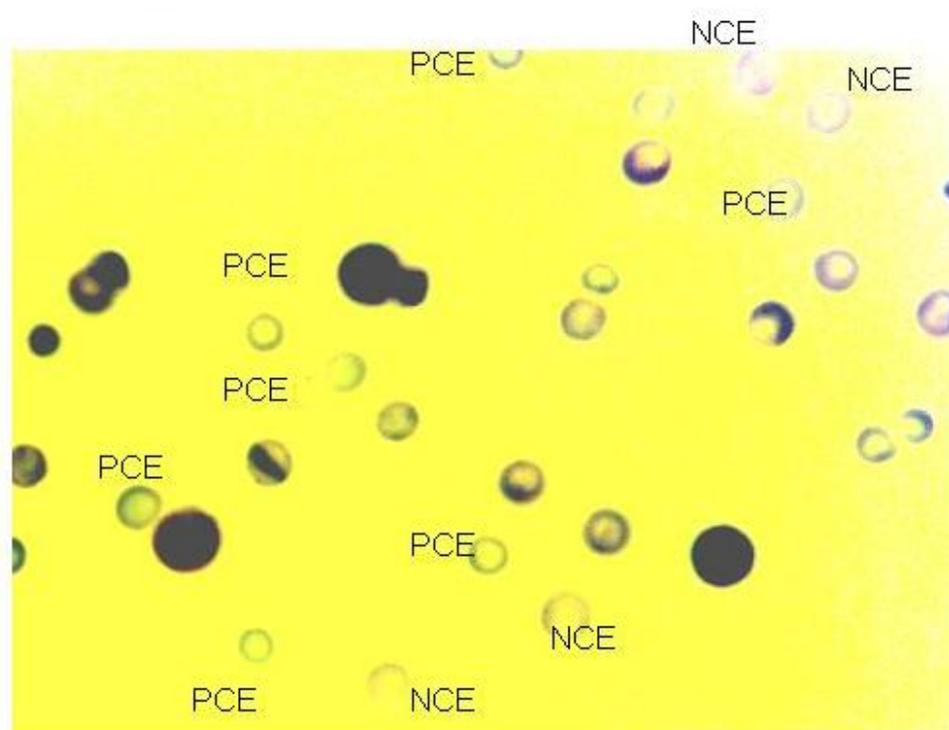


Figura 29. Frotis de médula ósea de ratón (NCE: eritroblasto normocromatófilo; PCE: eritroblasto policromatófilo; MNPCE: micronúcleo en eritroblasto policromatófilo) (400X).

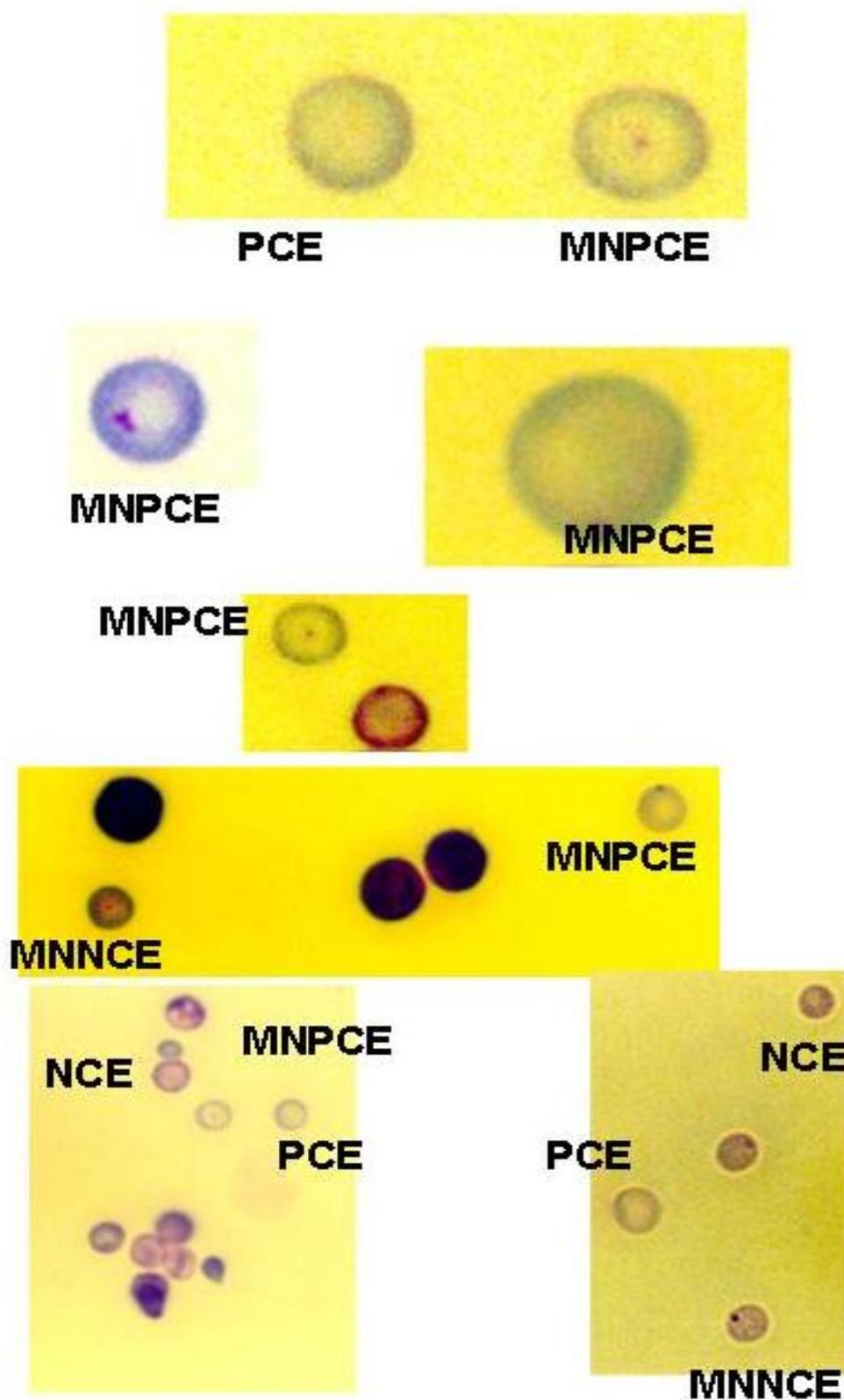


Figura 30. Diferentes tipos celulares estudiados en el frotis de médula ósea con presencia de micronúcleos en su citoplasma (1000X).

ANÁLISIS DE MICRONÚCLEOS SOBRE LINFOCITOS HUMANOS IRRADIADOS CON BLOQUEO CITOCINÉTICO

Un frotis característico de los componentes celulares en el cultivo de linfocitos con bloqueo citocinético se muestra en las figuras 31 y 32.

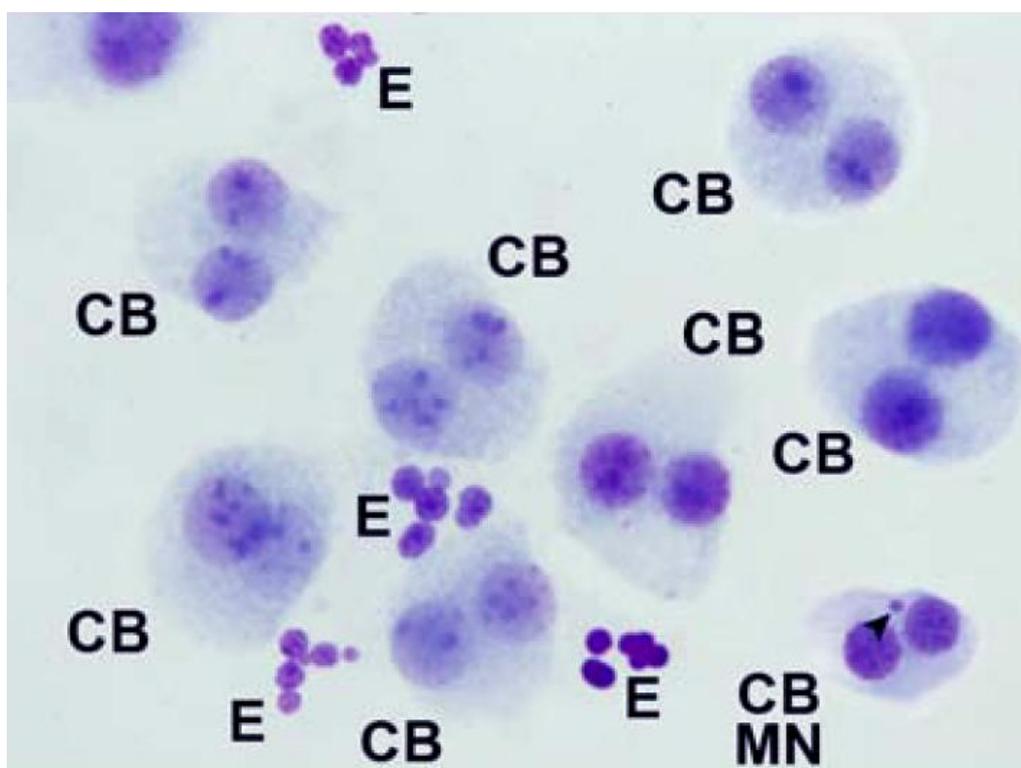


Figura 31. Fotomicrografía de un cultivo de linfocitos humanos con bloqueo citocinético teñido con la técnica de May-Grünwald-Giemsa (400X)(L: linfocito; CB: células binucleadas con bloqueo citocinético; CBMN: células binucleadas con bloqueo citocinético con micronúcleo en su citoplasma; E: restos de eritrocitos hemolizados.

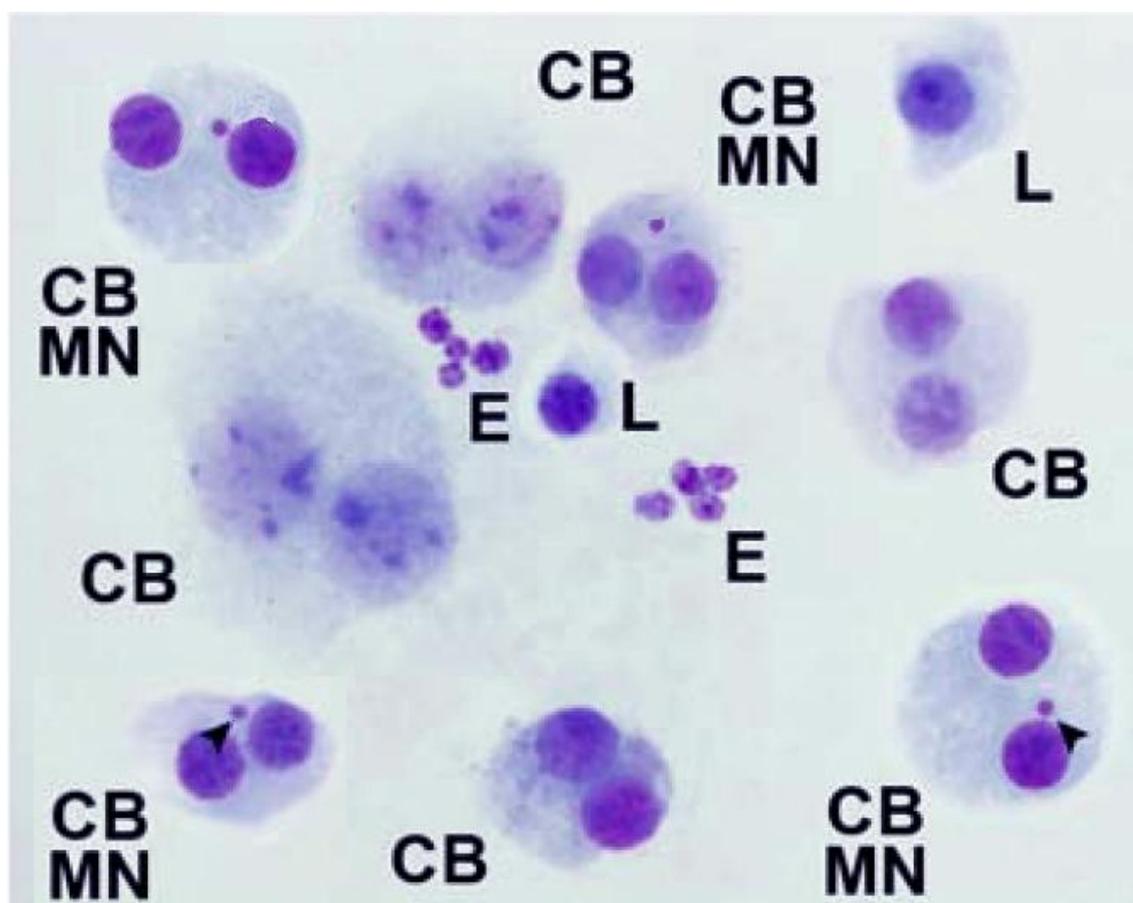


Figura 32. Fotomicrografía de un cultivo de linfocitos humanos con bloqueo citocinético teñido con la técnica de May-Grünwald-Giemsa (400X)(L: linfocito; CB: células binucleadas con bloqueo citocinético; CBMN: células binucleadas con bloqueo citocinético con micronúcleo en su citoplasma; E: restos de eritrocitos hemolizados.

IV.2. Ensayo “*in vivo*” de micronúcleos sobre médula ósea de ratón

RESULTADOS DE LA EXPOSICIÓN A CAMPOS MAGNÉTICOS

1. RESULTADOS DE MICRONÚCLEOS “IN VIVO” EN ANIMALES EXPUESTOS A ELF-EMF (50Hz)

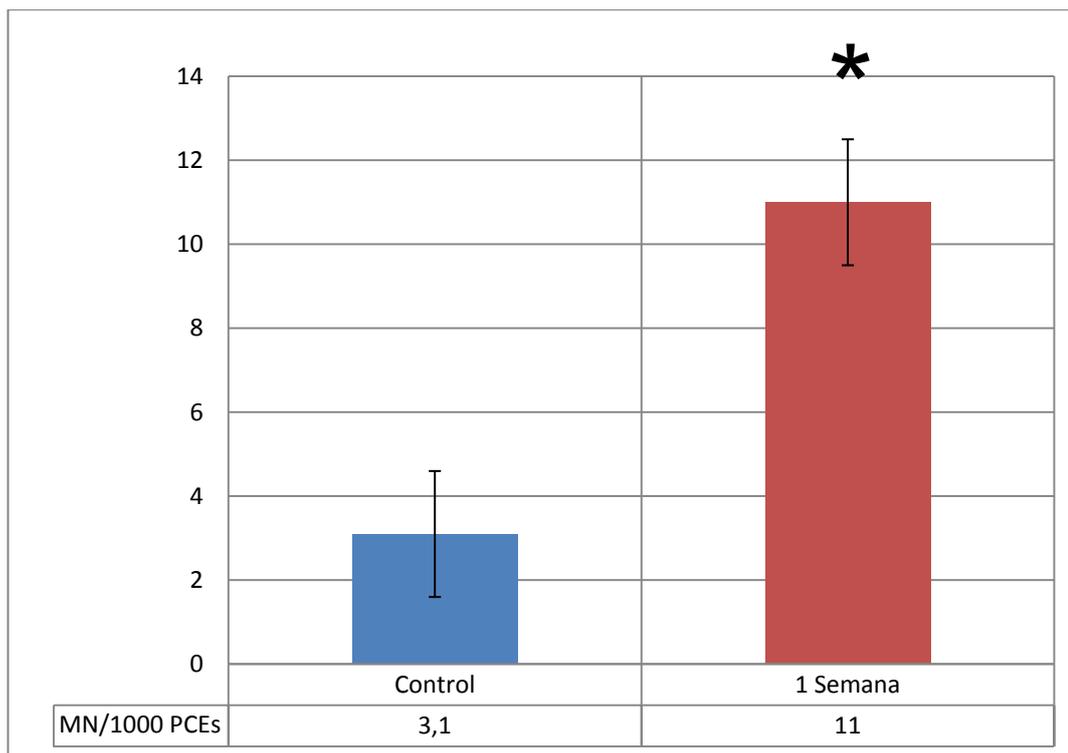
GRUPO CONTROL

Los animales del grupo control y, por ello, no expuesto a ningún campo magnético presentan una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 1 y 5 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 3,1 MN/1000 PCEs. Dicho valor se considera la frecuencia de base o frecuencia de aparición espontánea de MN en PECs de los animales sometidos a estudio (Gráfica 5).

GRUPOS EXPUESTOS A CAMPO MAGNÉTICO (ELF-EMF)

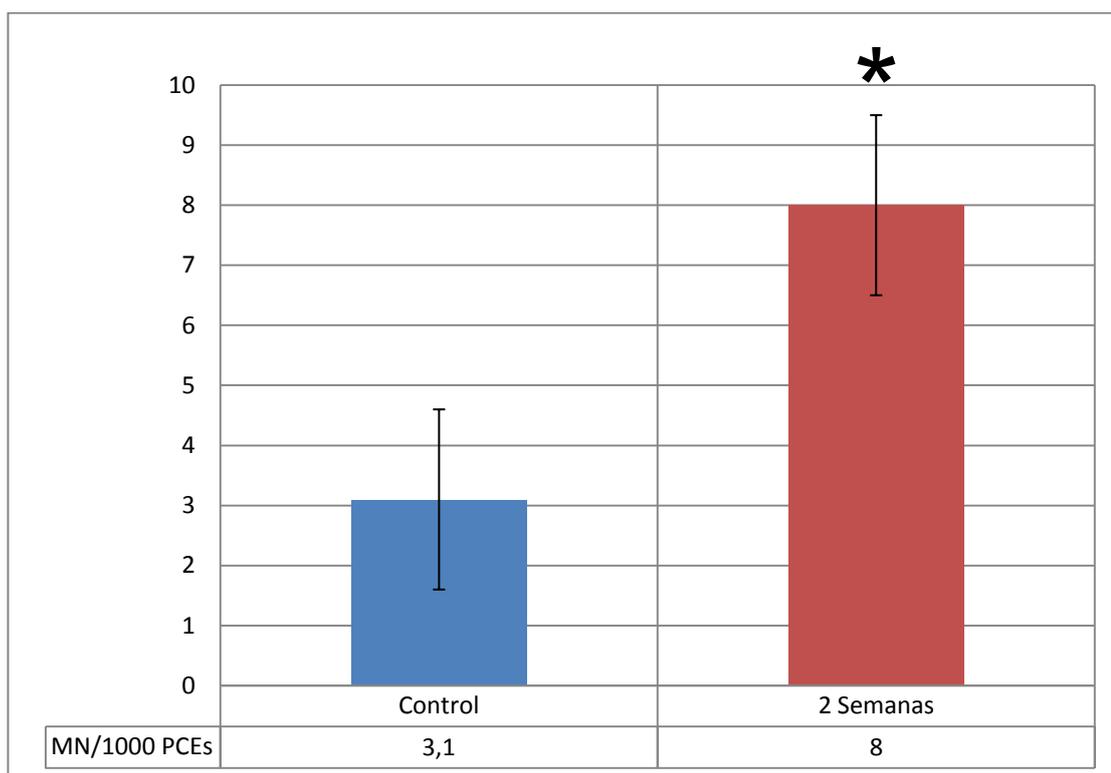
Los animales expuestos a un campo magnético de 200 μ T se han distribuido en 4 grupos diferentes de animales dependiendo del tiempo de exposición que han permanecido incluidos en dicho campo (1, 2, 3 y 4 semanas):

- **Grupo expuesto durante 7 días al campo magnético (1 semana):** los animales del grupo expuesto al campo magnético durante 7 días presentan una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 9 y 12 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 11 MN/1000 PCEs (Gráfica 5).



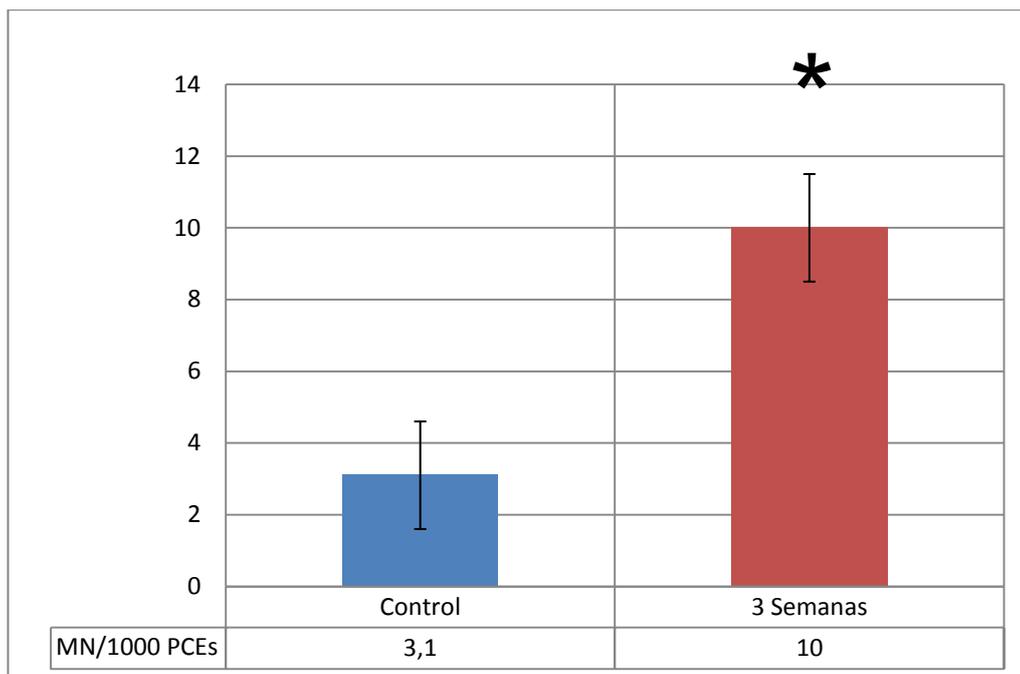
Gráfica 5. Grupo expuesto durante 7 días a campos de 200 μ T (): ($p < 0,001$) respecto al grupo control).**

- **Grupo expuesto durante 14 días al campo magnético (2 semanas):** los animales del grupo expuesto a campos magnéticos durante 14 días presentan una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 7 y 9 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 8 MN/1000 PCEs (Gráfica 6).



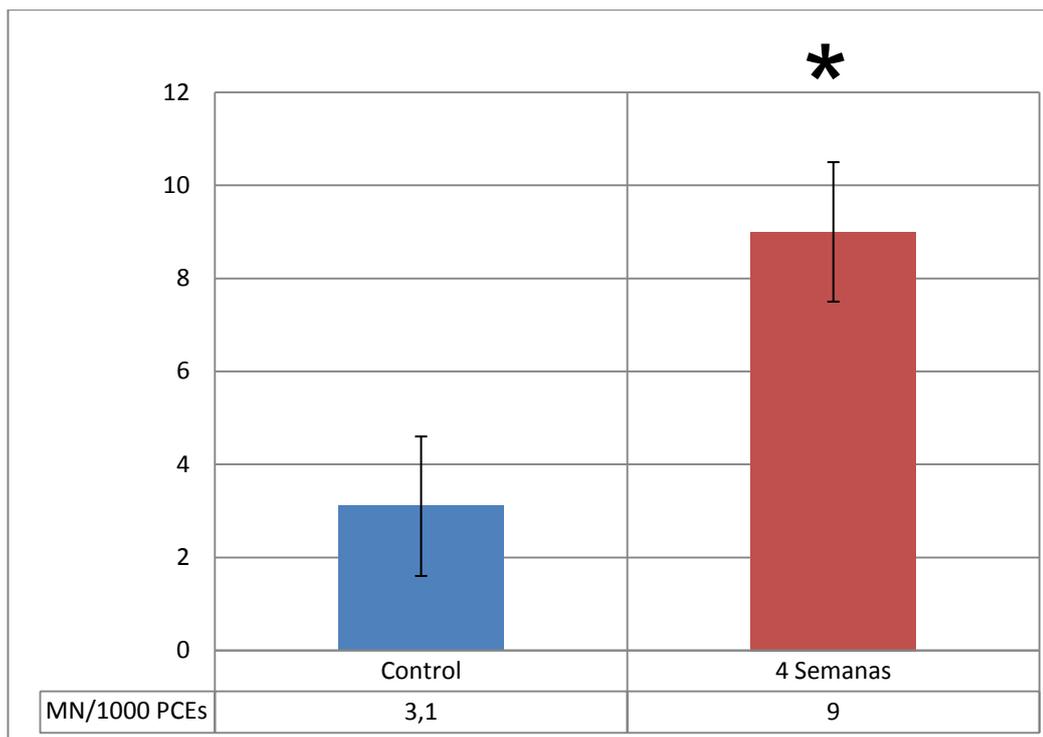
Gráfica 6. Grupo expuesto durante 14 días a un campo magnético de 200 μ T (): (p<0,001) respecto al grupo control).**

- **Grupo expuesto durante 21 días al campo magnético (3 semanas):** los animales del grupo expuesto a campos magnéticos durante 21 días presentan una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 8 y 12 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 10 MN/1000 PCEs (Gráfica 7).



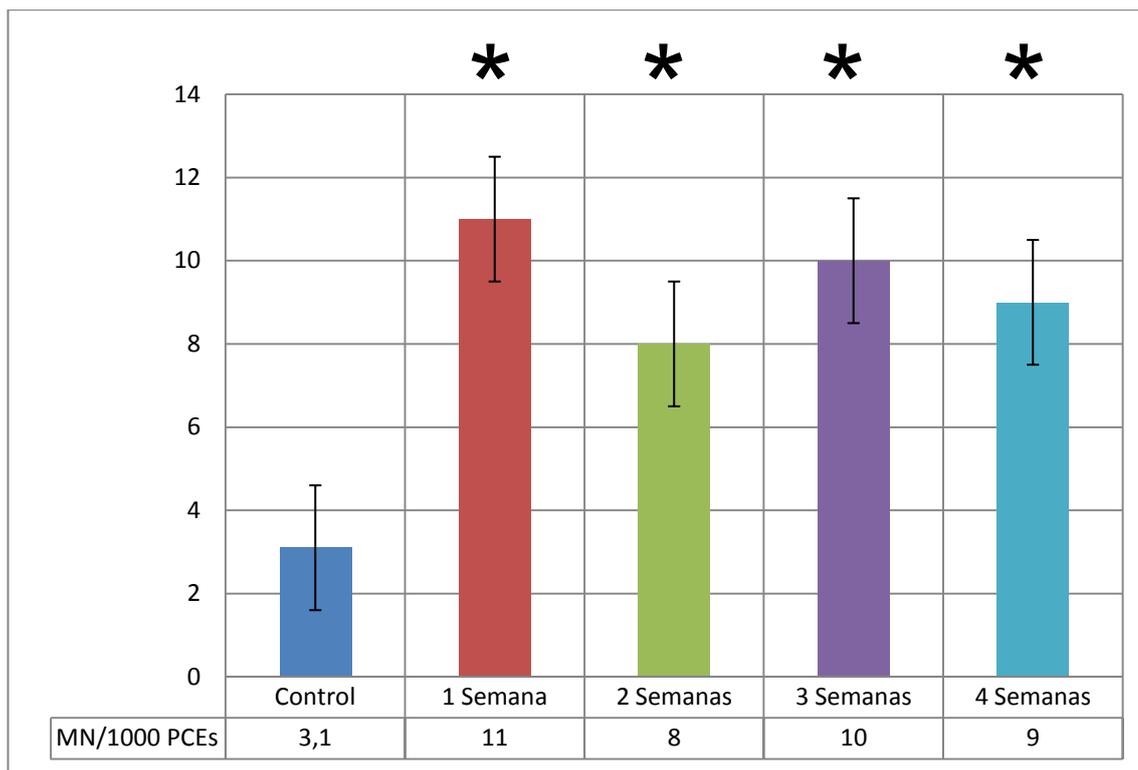
Gráfica 7. Grupo expuesto durante 21 días a un campos magnéticos de 200 μ T. ((*): ($p < 0,001$) respecto al grupo control).

- **Grupo expuesto durante 28 días al campo magnético (4 semanas):** los animales del grupo expuesto a campos magnéticos durante 28 días presentan una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 7 y 11 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media situada en 9 MN/1000 PCEs (Gráfica 8).



Gráfica 8. Grupo expuesto durante 28 días a un campo magnético de 200 μ T. ((*): ($p < 0,001$) respecto al grupo control).

En su conjunto, los resultados obtenidos de los diferentes grupos de animales expuestos al campo ELF-EMF de 200 μ T se puede observar en la Gráfica 5; pudiéndose determinar un incremento en la frecuencia de aparición de micronúcleos en todos los grupos de animales expuestos al campo magnético de extremadamente baja frecuencia estudiado (ELF-EMF 50 Hz).



Gráfica 9. Grupos de animales expuestos a un campo ELF-EMF de 200 µT durante diferentes periodos (): (p<0,001) respecto al grupo control de animales no expuestos).**

Se han determinado diferencias significativas en todos los animales expuestos al campo magnético de 200 µT y en todos los periodos estudiados respecto al grupo control de animales no expuesto ($p < 0.01$); sin embargo no se han determinado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales expuestos al campo magnético en los diferentes periodos estudiados (1, 2, 3 y 4 semanas), situación que se podrá expresar de la siguiente forma:

$$\mathbf{C < 1 S \approx 2 S \approx 3 S \approx 4 S (p < 0,01)}$$

Estos resultados muestran un incremento de la frecuencia de MN/1000 PCEs estable y continuado de la frecuencia de MN/1000 PCEs, pero en donde no se ha determinado efecto acumulativo o sinérgico alguno entre el incremento del tiempo de exposición al campo ELF-EMF ensayado y el incremento de la frecuencia de aparición de MN en los animales expuestos.

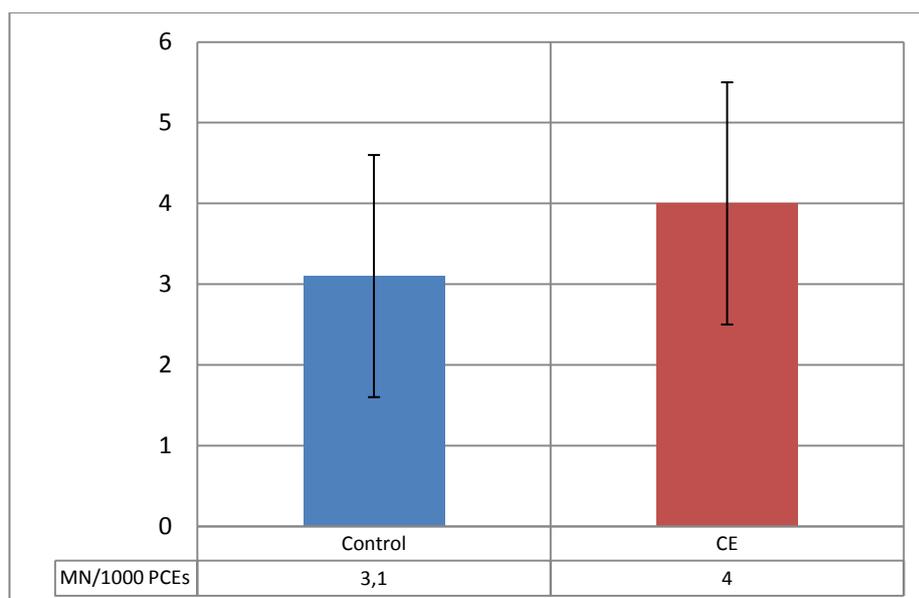
Estas diferencias estadísticamente significativas muestran la capacidad genotóxica del campo ELF-EMF de 200 μ T y 50 Hz ensayado en los animales expuestos.

2. RESULTADOS DE MICRONUCLEOS “IN VIVO” EN ANIMALES TRATADOS CON SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES.

3.1. GRUPOS EXPUESTOS AL CAMPO MAGNÉTICO ESTUDIADO (ELF-EMF).

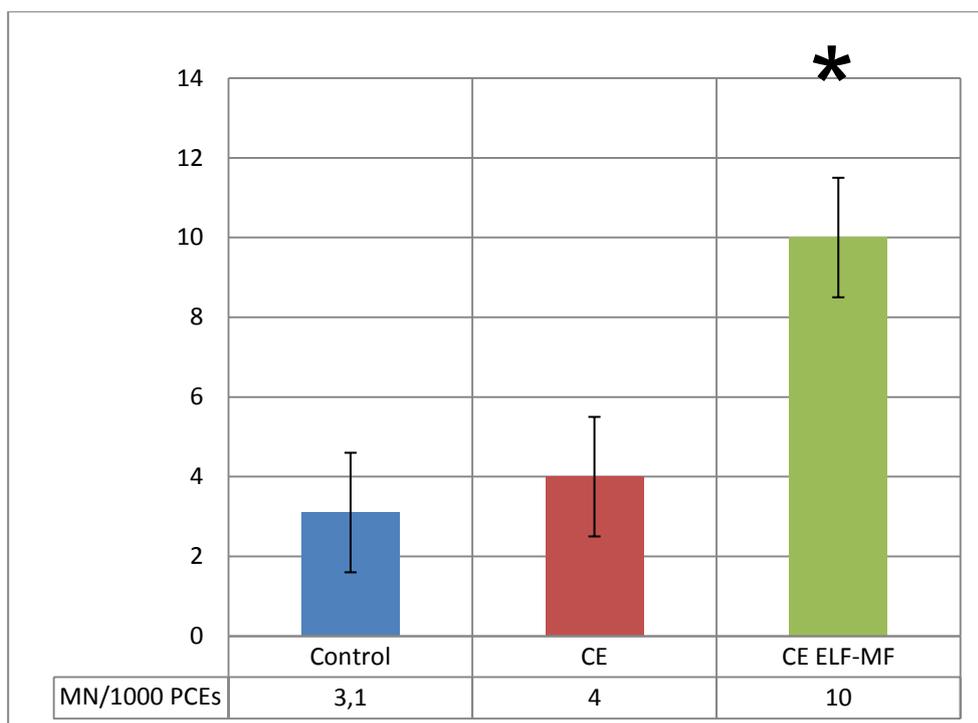
1. Animales tratados con Extracto Cítrico Soluble (CE)

Los animales tratados con **extracto cítrico soluble (CE)** y **no expuestos al campo magnético** presentan una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 2 y 6 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 4 MN/1000 PCEs. No se aprecian diferencias significativas con los animales controles cuya frecuencia de aparición de MN es de 3,1 MN/1000 PCEs. Esta situación podría expresarse diciendo que la administración de CE no induce daño cromosómico o genotóxico en los animales tratados con CE, y que por ello la sustancia ensayada (CE) no tiene actividad genotóxica (Gráfica 10).



Gráfica 10. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con CE.

El lote de **animales tratados con extracto cítrico soluble y expuesto a campos magnéticos de 200 μ T** ha presentado una frecuencia de aparición de MN entre 6 y 13 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente. La media de aparición de micronúcleos en este lote de animales expuesto es de 10 MN/1000 PCEs; lo que supone un incremento significativo ($p < 0,01$) de la frecuencia de aparición de MN en los animales tratados con la misma sustancia pero no expuestos a 200 μ T (Gráfica 11).



Gráfica 11. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con CE y expuestos a 200 μ T. ((*):(p<0,01) respecto al grupo control).

Estos resultados pueden expresarse de la siguiente forma:

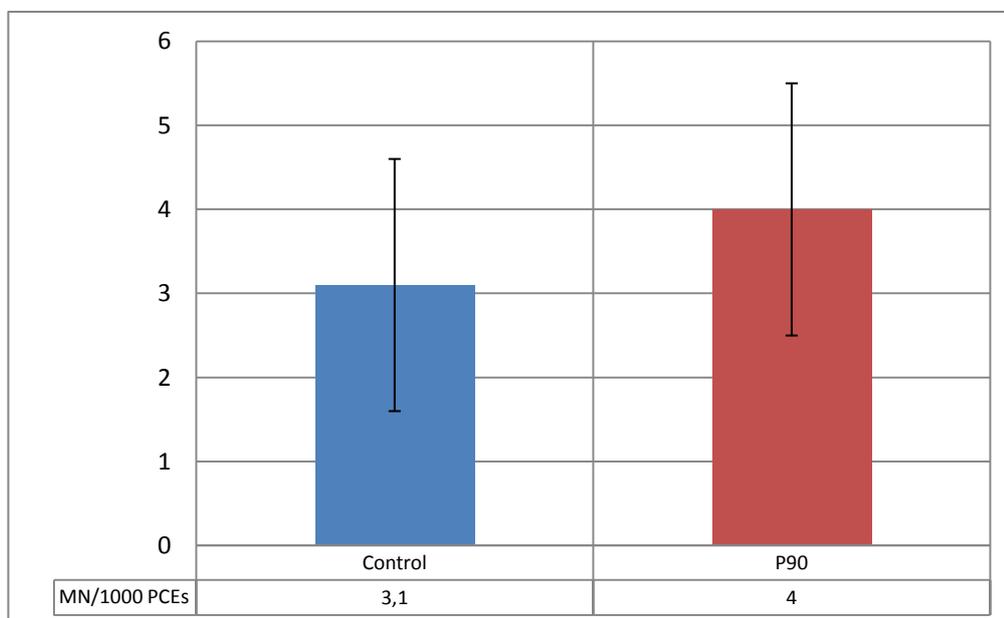
$$C \approx ECS < ECS_{\text{ELF-EMF}} \quad (p < 0,01)$$

Estos resultados muestran un efecto genotóxico inducido por la exposición de los animales tratados con CE y expuestos al campo magnético empleado de 200 μ T, en función del incremento de aparición de MN en los animales expuestos.

En estos animales se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de MN aparecida que muestra un **Factor Sensibilizante (FS)** del 150% respecto a la frecuencia de aparición en los animales controles tratados con CE y no expuestos, y del 223% respecto al de los animales del grupo control.

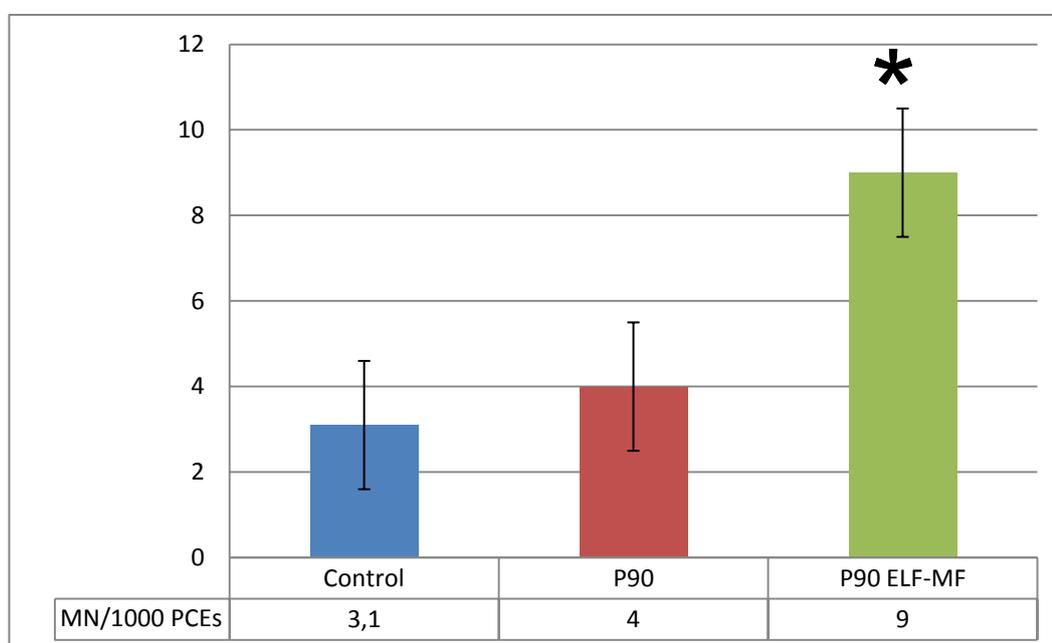
2. Animales tratados con Procianidinas (P90).

En los animales tratados con **P90 y no expuestos al campo magnético** se ha determinado una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 2 y 7 MN/1000 PCEs, como valores mínimo y máximo respectivamente, presentando una media de 4 MN/1000 PCEs, y en los que no se aprecian diferencias significativas respecto a la frecuencia de aparición de MN presentada en los animales controles cuya frecuencia de aparición de MN fue de 3,1 MN/1000 PCEs. Esta situación muestra que la administración de P90 no induce daño genotóxico detectable en los animales tratados con P90 (Gráfica 12).



Gráfica 12. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con P90.

El lote de animales **tratados con P90 y expuestos al campo magnético** de 200 μT ha presentado una frecuencia de aparición de MN que oscila entre 5 y 13 MN/1000 PCEs como frecuencias mínima y máxima respectivamente. La frecuencia media de aparición de micronúcleos en este grupo expuesto es de 9 MN/1000 PCEs; lo que supone un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN en los animales tratados con P y expuestos a 200 μT , respecto de los animales controles tratados con la misma sustancia pero no expuestos y de los animales controles no expuestos ($p < 0,01$).



Gráfica 13. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con P90.

Estas diferencias pueden expresarse como:

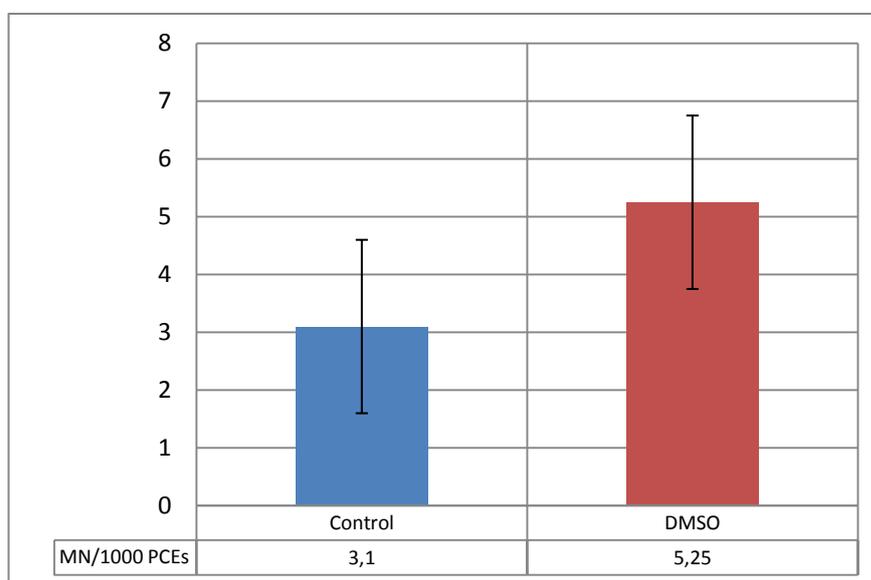
$$C \approx P90 < P90_{\text{ELF-EMF}} \quad (p < 0,01)$$

Estos resultados ponen de manifiesto el daño genotóxico inducido por la exposición de los animales tratados con P90 en el campo magnético estudiado en función del incremento en la frecuencia de MN en los animales expuestos.

En estos animales tratados con P90 y expuestos a 200 μ T se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN que muestra un **Factor Sensibilizante (FS)** del 125% respecto a la frecuencia de aparición determinada en los animales controles tratados con P90 y no expuestos a 200 μ T, y del 190% respecto al grupo control.

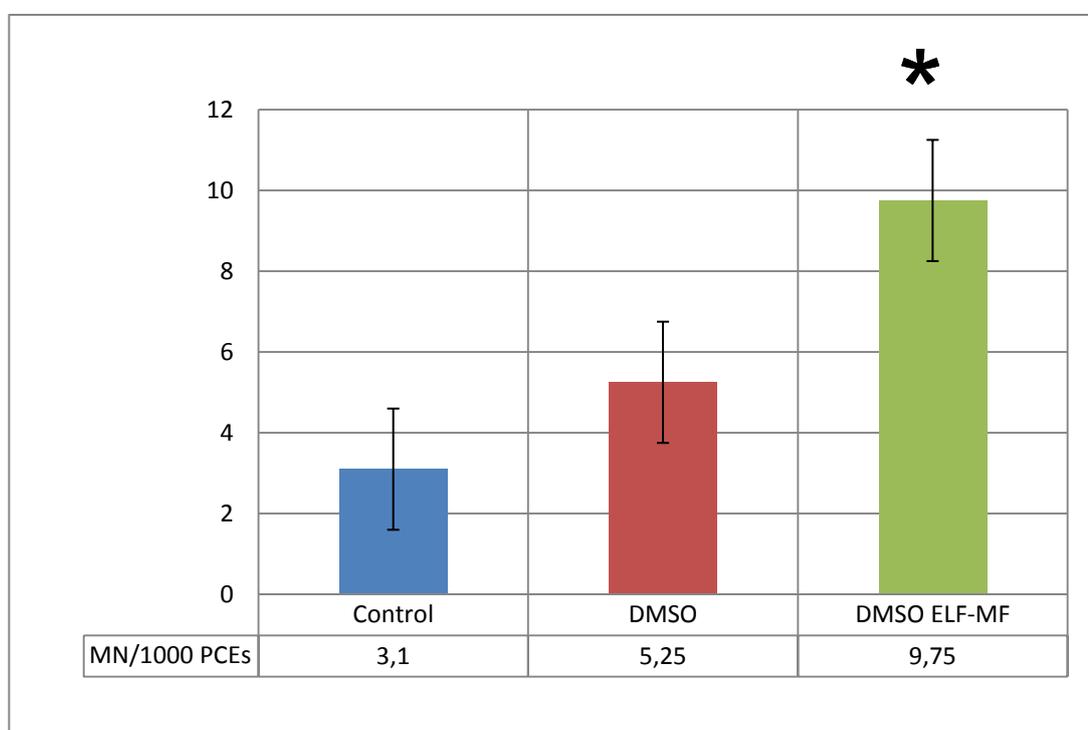
3. Animales tratados con Dimetilsulfóxido (DMSO).

Los animales tratados con **DMSO y no expuestos al campo magnético** han presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 3 y 7 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 5,25 MN/1000 PCEs. No muestran diferencias significativas con los animales controles no expuestos cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 3,1MN/1000 PCEs. Estos resultados podrían expresarse diciendo que la administración de DMSO no induce daño cromosómico o genotóxico alguno en los animales tratados con DMSO (Gráfica 14).



Gráfica 14. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con DMSO

El lote de **animales tratados con DMSO y expuesto al campo magnético de 200 μ T** ha presentado una frecuencia de aparición de MN que oscila entre 5 y 14 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente. La frecuencia media de aparición de micronúcleos en este lote de animales expuesto es de 9,75 MN/1000 PCEs; lo que no supone un incremento significativo ($p < 0,01$) de la frecuencia de aparición de MN en los animales tratados con DMSO y expuestos a 200 μ T respecto de los animales controles y de los animales tratados con la misma sustancia pero no expuestos a 200 μ T (Gráfica 15).



Gráfica 15. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con DMSO. ((*): ($p < 0,01$) respecto al grupo control).

Estos resultados pueden expresarse de la siguiente forma:

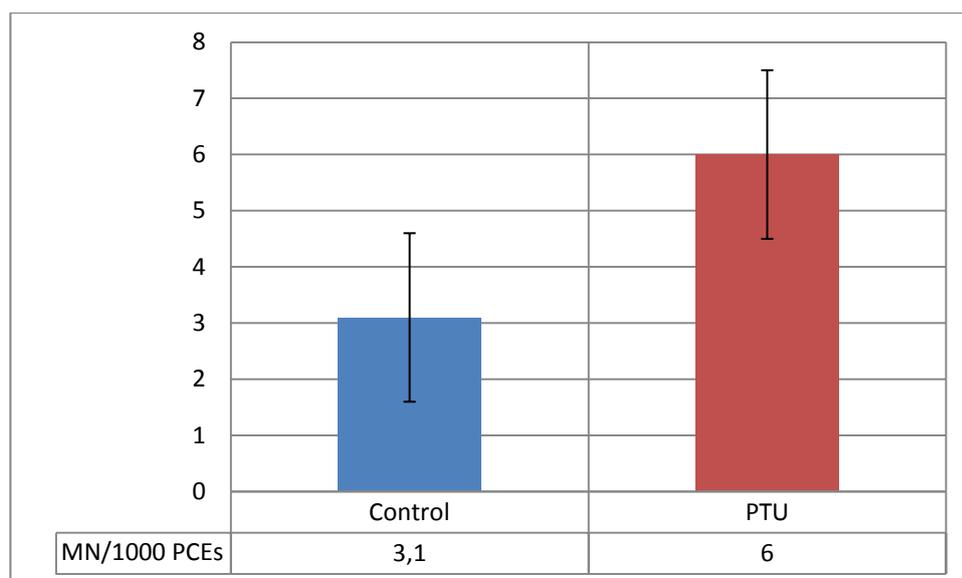
$$C \approx \text{DMSO} < \text{DMSO}_{\text{ELF-EMF}} \quad (p < 0,01)$$

Estos resultados ponen de manifiesto el daño genotóxico inducido por la exposición de los animales tratados con DMSO y expuestos al campo magnético estudiado, en función del incremento de MN en los animales expuestos.

En estos animales tratados con DMSO y expuestos a 200 μ T se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN que muestra un **Factor Sensibilizante (FS)** del 215% respecto a la frecuencia de aparición determinada en los animales controles tratados con DMSO y no expuestos a 200 μ T, y del 85,7% respecto al grupo control.

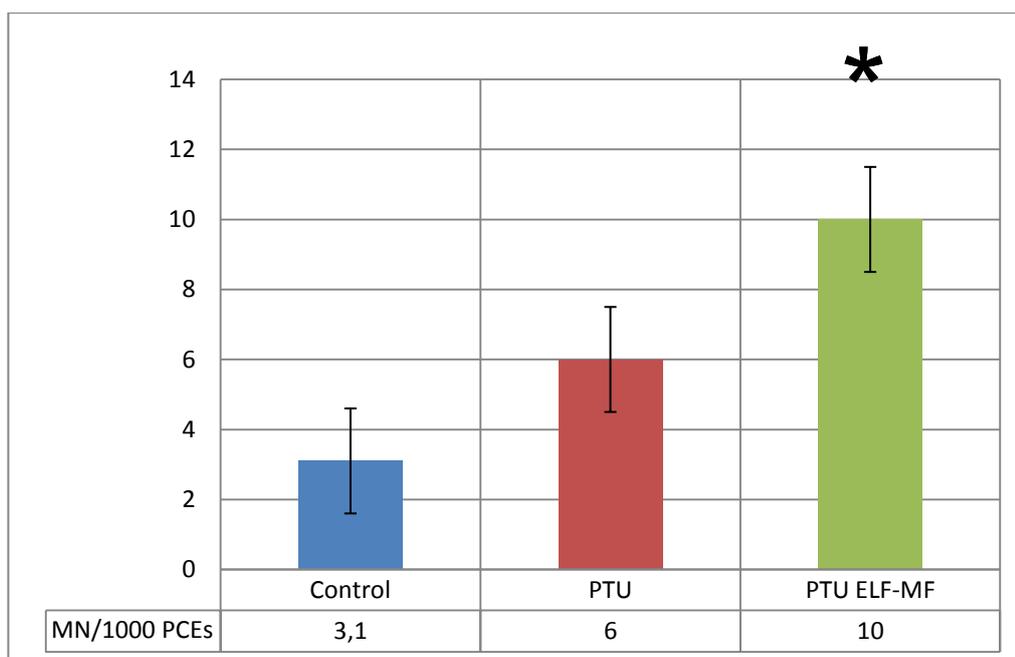
4. Grupo tratado con 6n-2n-Propylthiouracilo (PTU)

Los animales tratados con **PTU y no expuestos al campo magnético** han presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 5 y 8 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 6 MN/1000 PCEs. De forma que no muestran diferencias estadísticamente significativas con los animales controles cuya frecuencia de aparición de MN fue de 3,1MN/1000 PCEs. Esta situación podría expresarse diciendo que la administración de PTU no induce daño cromosómico o genotóxico en los animales tratados con PTU (Gráfica 16).



Gráfica 16. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con PTU.

El lote de animales **tratados con PTU y expuesto al campo magnético de 200 μ T** ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 9 y 12 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente. La media de aparición de micronucleos en este lote de animales expuesto es de 10 MN/1000 PCEs; lo que supone un incremento significativo ($p < 0,01$) de la frecuencia de aparición de MN en los animales tratados con PTU y expuestos a 200 μ T respecto de los animales controles y de los animales tratados con la misma sustancia pero no expuestos a 200 μ T (Gráfica 17).



Gráfica 17. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con PTU (): ($p < 0,01$) respecto al grupo control).**

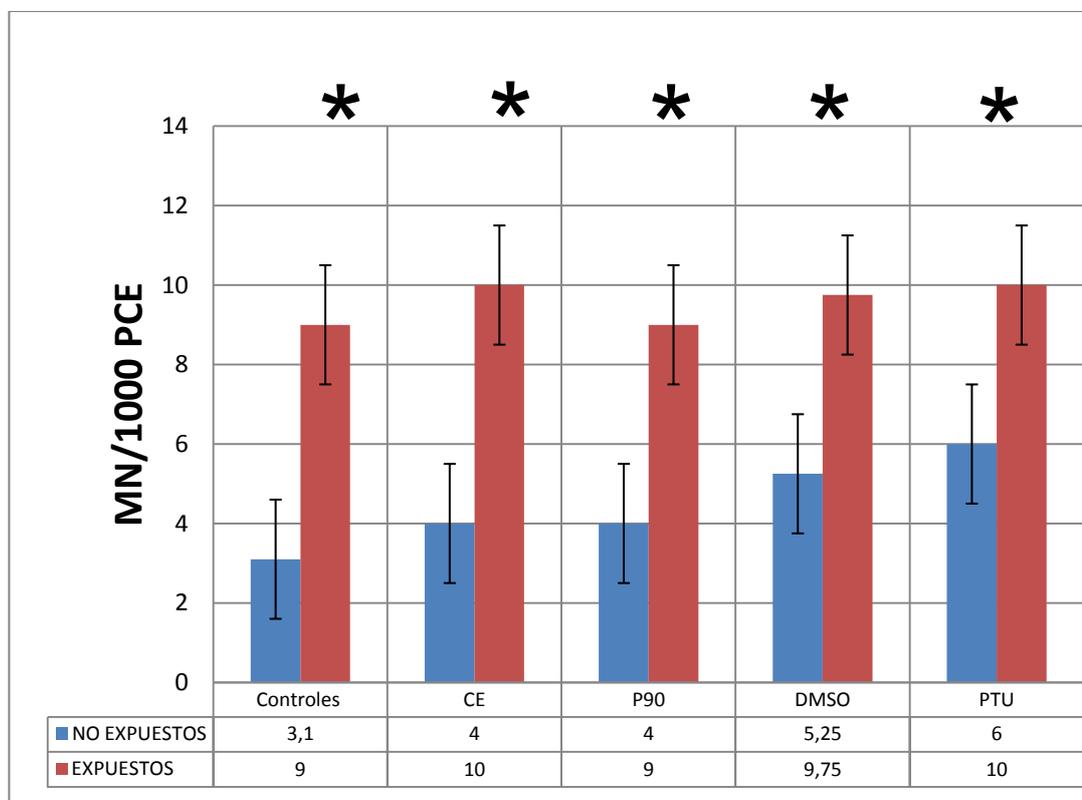
Estos resultados pueden expresarse pueden expresarse como:

$$C \approx PTU < PTU_{ELF-EMF} (p < 0,01)$$

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto genotóxico inducido por la exposición de los animales tratados con PTU y expuestos al campo magnético ensayado, en función del incremento de MN que se ha determinado en los animales expuestos.

En estos animales se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN que muestra un Factor Sensibilizante (FS) del 223% respecto a la frecuencia de aparición en los animales controles tratados con PTU y no expuestos y del 67% respecto de los animales del grupo control.

En su conjunto, estos resultados obtenidos en los diferentes grupos de animales tratados con las sustancias antioxidantes ensayadas y expuestas al campo ELF-EMF se muestran en la Gráfica 18.



Gráfica 18. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los grupos de animales tratados con las sustancias antioxidantes ensayadas y su relación con la exposición al campo ELF-EMF ensayado (*): ($p < 0,01$) respecto a los animales controles).

Estos resultados permiten determinar que la administración a animales de las sustancias antioxidantes ensayadas no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, por lo que las sustancias administradas no tienen efecto genotóxico sobre los animales tratados, pudiéndose expresar:

$$C \approx CE \approx P90 \approx DMSO \approx PTU$$

De igual forma, los resultados obtenidos permiten determinar diferencias estadísticamente significativas entre los animales expuestos al campo ELF-EMF ensayado respecto al grupo control no expuesto ($p < 0.01$). Sin embargo, los grupos expuestos al campo ELF-EMF y tratados con las sustancias antioxidantes no muestran diferencias significativas respecto al grupo control expuesto al campo ELF-EMF. Ello se podría expresar de la siguiente forma:

$$\mathbf{C < C_{ELF-EMF} \approx CE_{ELF-EMF} \approx P90_{ELF-EMF} \approx DMSO_{ELF-EMF} \approx PTU_{ELF-EMF}} \\ \mathbf{(p < 0,01)}$$

De igual forma, los resultados obtenidos muestran la ausencia de capacidad genoprotectora que presentan las sustancias antioxidantes ensayadas al no conseguir disminuir la frecuencia de aparición de MN/1000 PCEs inducida por el campo magnético ELF-EMF ensayado y que expresaría el daño cromosómico inducido por dicho campo sobre el material genético de los animales expuestos. Ello podría expresarse como:

$$\mathbf{C_{ELF-EMF} \approx CE_{ELF-EMF} \approx P90_{ELF-EMF} \approx DMSO_{ELF-EMF} \approx PTU_{ELF-EMF}}$$

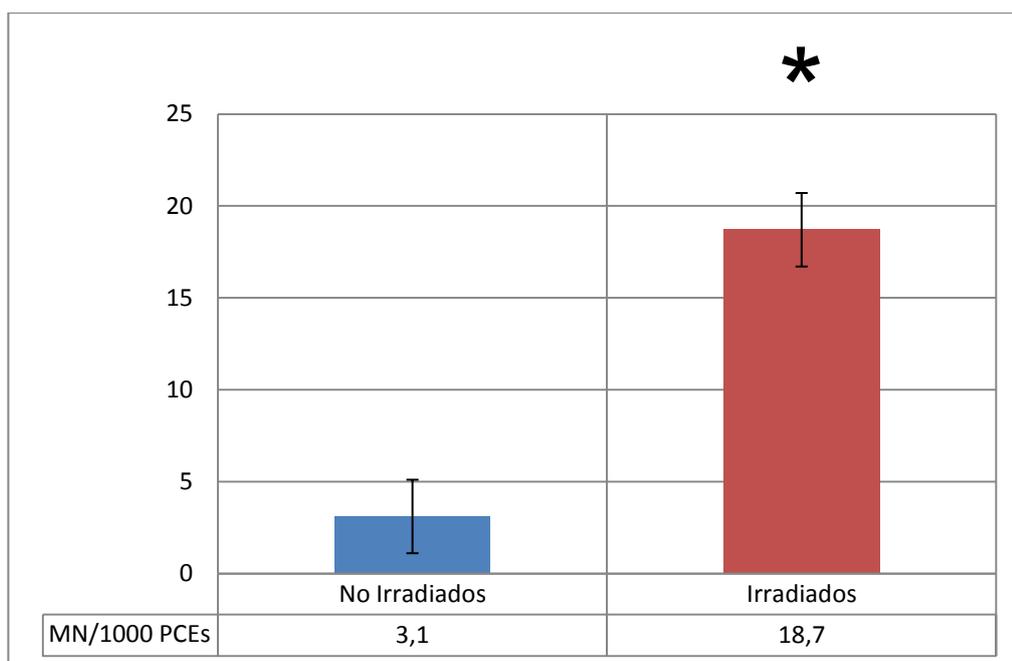
3. RESULTADOS DE MICRONUCLEOS “*IN VIVO*” EN ANIMALES EXPUESTOS A RAYOS X

GRUPO CONTROL

Los animales del grupo **control no irradiado** presentan una frecuencia de MN que oscila entre 1 y 5 MN/1000 PCEs como frecuencia mínima y máxima respectivamente, con una frecuencia media de 3,1 MN/1000 PCEs. Dicho valor corresponderá a la frecuencia de base o de aparición espontánea de MN/1000 PCEs en los animales utilizados en este grupo expuesto a rayos X.

Los **animales controles irradiados con 500 mGy** muestran un incremento en la frecuencia de aparición entre 16 y 24 MN/1000 PCEs como frecuencia mínima y máxima respectivamente, presentando una frecuencia media de 18,7 MN/1000 PCEs.

El análisis estadístico de estos resultados determina la existencia de diferencias significativas entre la frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales irradiados respecto de la frecuencia determinada y los animales no irradiados; mostrando que la exposición a la irradiación ionizante induce un incremento significativo de MN/1000 PCEs en los eritroblastos policromatófilos de los animales irradiados con rayos X y que expresaría el daño cromosómico en los animales expuestos (Gráfica 19).



Gráfica 19. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales controles e irradiados con rayos X (*): ($p < 0,001$) respecto de los animales controles no irradiados).

Este incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN/1000 PCEs muestra el daño cromosómico y genotóxico inducido por la exposición de rayos X en los animales irradiados, y que podría expresarse de la siguiente forma:

$$C > C_{RX} \quad (p \leq 0,001)$$

GRUPOS EXPUESTOS A RADIACIÓN IONIZANTE TRATADOS CON DIFERENTES SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

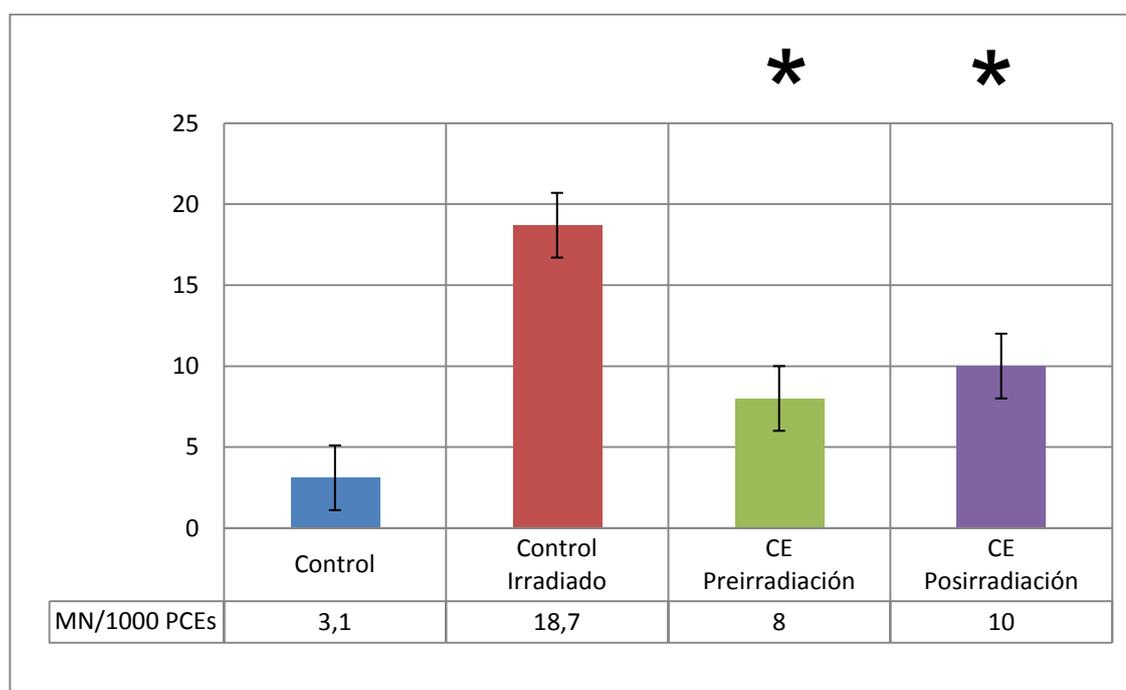
1. Animales tratados con Extracto Cítrico Soluble (CE)

Los **animales tratados con CE** presentan una frecuencia de aparición de 3 a 5 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, presentando una frecuencia media de 4 MN/1000 PCEs; y en los que no se determinan diferencias significativas respecto a animales controles no irradiados cuya frecuencia media de aparición de MN fue de

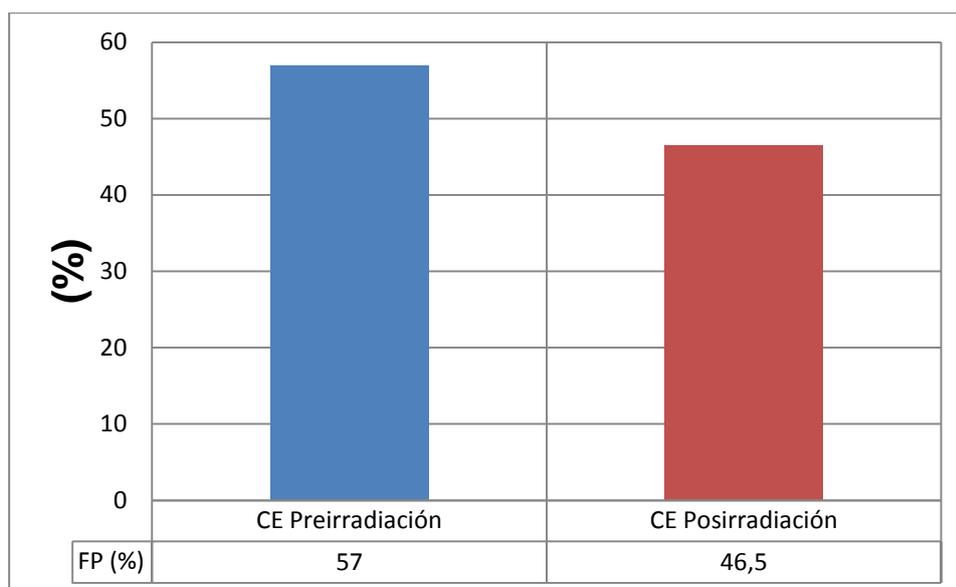
3,1MN/1000 PCEs (Gráfica 20); lo que mostraría la ausencia de efecto genotóxico inducido por el CE.

El lote de **animales tratados con CE y posteriormente irradiados** con 500 mGy de rayos X ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 7 y 10 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 8 MN/1000 PCEs, lo que supone un descenso significativo ($p<0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de los animales controles irradiados, cuya frecuencia de aparición fue de 4 MN/1000 PCEs (Gráfica 20).

El lote de **animales irradiados y posteriormente tratados** con CE ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 8 y 12 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media es de 10 MN/1000 PCEs, lo que supone un descenso significativo ($p<0,001$) de la frecuencia de aparición de MN en los animales irradiados con 500 mGy y posteriormente tratados con CE respecto de los animales controles tratados con la misma sustancia pero no irradiados, cuya frecuencia de aparición fue de 4 MN/1000 PCEs (Gráfica 16).



Gráfica 20. Frecuencia de MN/1000 PCEs en el grupo de animales tratado con CE. (): ($p<0,001$) respecto al grupo control irradiado).**



Gráfica 21. Factor de Protección obtenido en los animales expuestos a rayos X dependiendo del momento de administración de la sustancia ensayada (CE).

El Factor Protector obtenido cuando el CE se administra antes de la exposición a la irradiación es del 57 %, y cuando se administra inmediatamente después de la exposición a la irradiación es del 46,5 % (Gráfica 21).

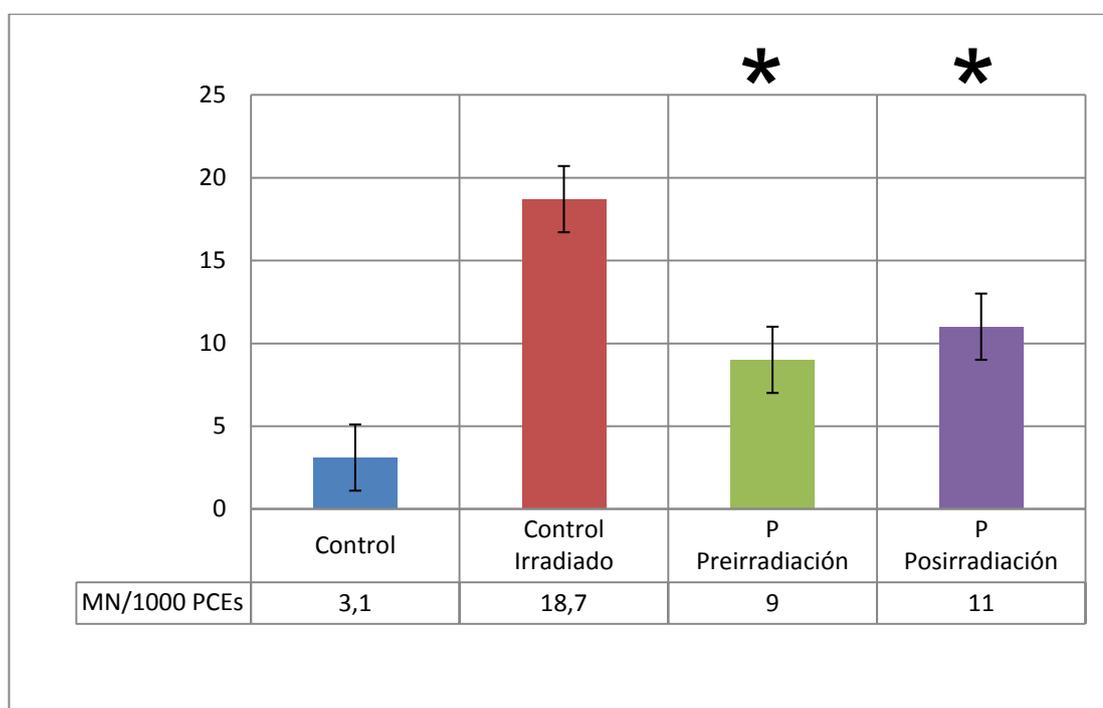
2. Animales tratados con PROCIANIDINAS (P90)

Los **animales tratados con P90** presentan una frecuencia de aparición de 3 a 6 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, presentando una frecuencia media de 4 MN/1000 PCEs; y en los que no se determinan diferencias significativas respecto a animales controles no irradiados cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 3,1MN/1000 PCEs (Gráfica 22); lo que mostraría la ausencia de efecto genotóxico inducido por el CE.

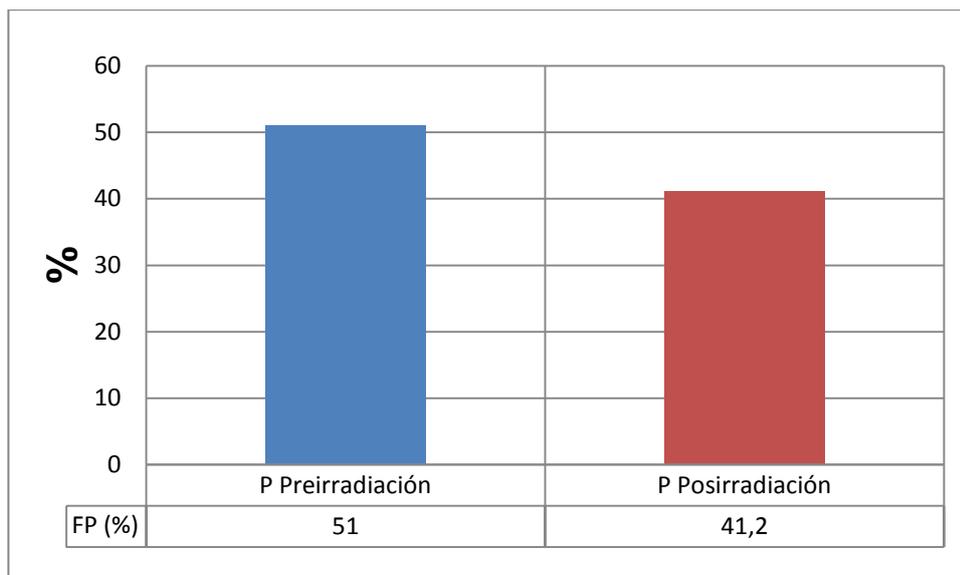
El lote de **animales tratados con P90 y posteriormente irradiados** con 500 mGy de rayos X ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 8 y 10 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 9 MN/1000 PCEs, lo que supone un

descenso significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de los animales controles irradiados, cuya frecuencia de aparición fue de 4 MN/1000 PCEs (Gráfica 22).

El lote de **animales irradiados y posteriormente tratados** con CE ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 10 y 12 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media es de 11 MN/1000 PCEs, lo que supone un descenso significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN en los animales irradiados con 500 mGy y posteriormente tratados con CE respecto de los animales controles tratados con la misma sustancia pero no irradiados, cuya frecuencia de aparición fue de 4 MN/1000 PCEs (Gráfica 18).



Gráfica 22. Frecuencia de MN/1000 PCEs en el grupo de animales tratado con P90. ((*): ($p < 0,001$) respecto al grupo control irradiado).



Gráfica 23. Factor de Protección obtenido en los animales expuestos a rayos X dependiendo del momento de administración de la sustancia ensayada (P90).

El Factor Protector obtenido cuando el P90 se administra antes de la exposición a la irradiación es del 51 %, y cuando se administra inmediatamente después de la exposición a la irradiación es del 41,2 % (Gráfica 23).

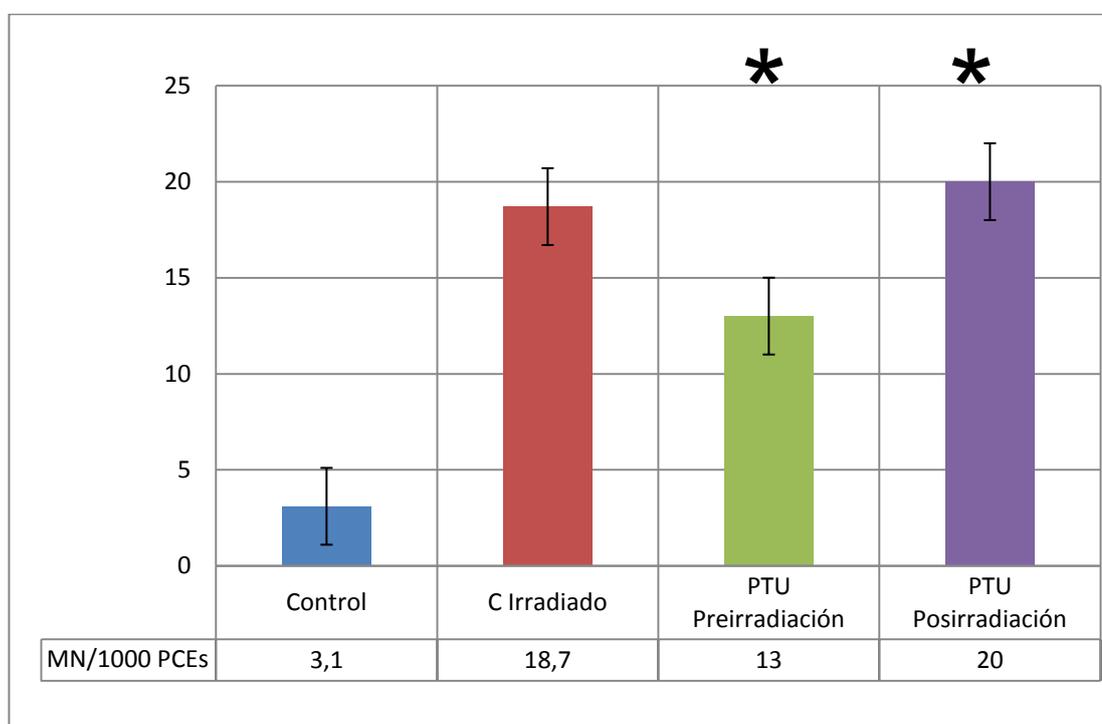
3. Grupo tratado con 6n-2n-Propylthiouracilo (PTU)

Los **animales tratados con PTU y no irradiados** presentan un intervalo desde 3 a 5 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, presentando una frecuencia media de 4,6 MN/1000 PCEs, y por lo tanto, no muestran diferencias significativas con los animales controles no irradiados cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 3,1MN/1000 PCEs (Gráfica 24); lo que mostraría la ausencia de efecto genotóxico inducido por el PTU.

El lote de **animales tratados con PTU y posteriormente irradiados** con 500 mGy de rayos X ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 12 y 15 MN/1000 PCEs como frecuencia mínima y máxima respectivamente, cuya media es de 13 MN/1000 PCEs, lo que supone

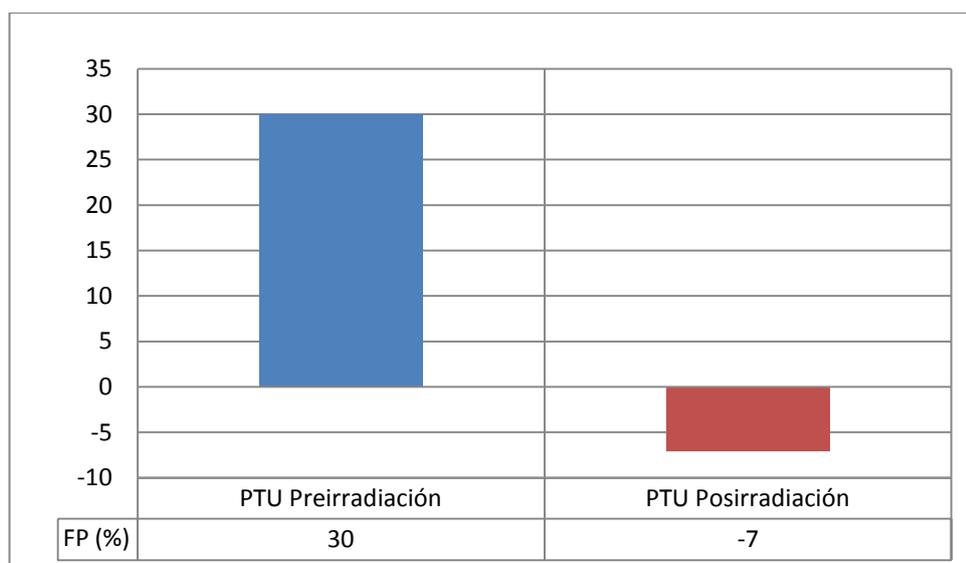
un incremento significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de los animales controles tratados con la misma sustancia pero no irradiados cuya frecuencia de aparición fue de 4,6 MN/1000 PCEs (Gráfica 24).

El lote de **animales irradiados y posteriormente tratados con PTU** e irradiados con 500 mGy de rayos X ha presentado una frecuencia media de aparición de micronúcleos entre 18 y 22 MN/1000 PCEs, cuya media es de 20 MN/1000 PCEs, lo que supone un descenso significativo ($p < 0,01$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de los animales controles irradiados cuya frecuencia de aparición fue de 3,1 MN/1000 PCEs. (Gráfica 20).



Gráfica 24. Frecuencia de MN/1000 PCEs en el grupo de animales tratado con PTU (*): ($p < 0,01$) respecto al control irradiado).

El Factor Protector obtenido cuando el PTU se administra antes de la exposición a la radiación es del 30 %, sin embargo, no hay ninguna capacidad genoprotectora cuando se administra el PTU a los animales tras la exposición a la irradiación (Gráfica 25).



Gráfica 25. Factor de Protección obtenido en los animales expuestos a rayos X dependiendo del momento de administración de la sustancia ensayada (PTU).

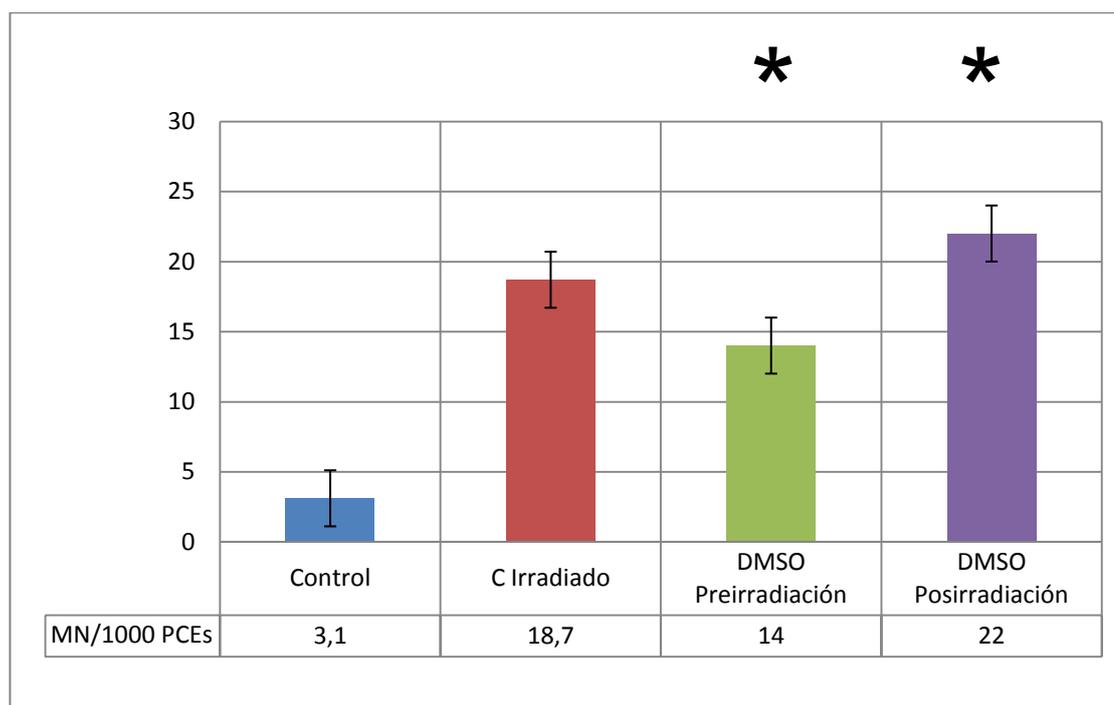
4. Grupo tratado con Dimetilsulfóxido (DMSO)

Los **animales tratados con DMSO y no irradiados** presentan un intervalo desde 4 a 6 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, presentando una frecuencia media de 5,1 MN/1000 PCEs y, por lo tanto, no muestran diferencias significativas con los animales controles no irradiados cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 3,1MN/1000 PCEs.

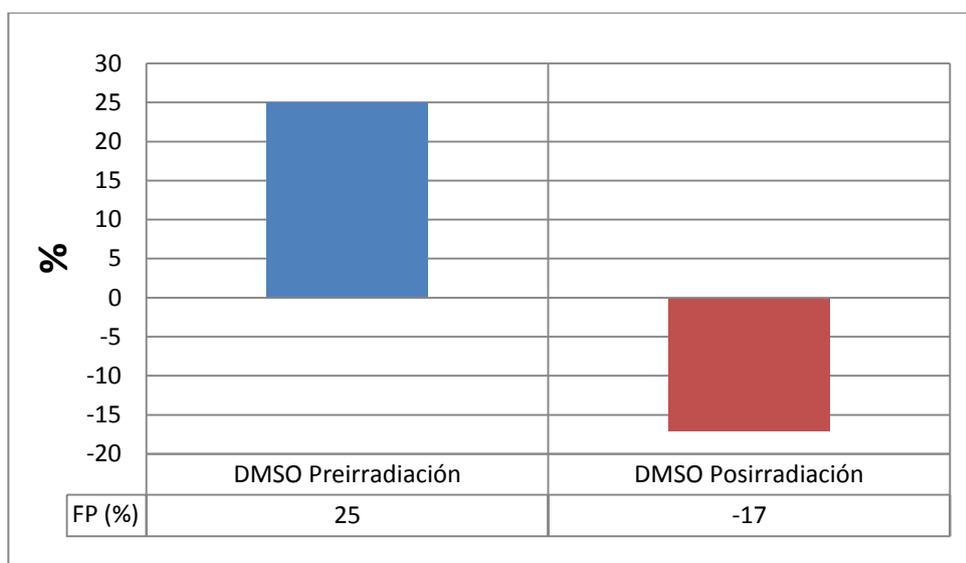
El lote de **animales tratados con DMSO y posteriormente irradiado** con 500 mGy de rayos X ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 12 y 15 MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, cuya media es de 14 MN/1000 PCEs, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de los animales controles tratados con la misma sustancia pero no irradiados cuya frecuencia de aparición fue de 5,1 MN/1000 PCEs.

El lote de **animales irradiados y posteriormente tratados con PTU** ha presentado una frecuencia de aparición de micronúcleos entre 19 y 22

MN/1000 PCEs como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media es de 22 MN/1000 PCEs, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,01$) de la frecuencia de aparición de MN en los animales postratados e irradiados con 500 mGy respecto de los animales controles tratados con la misma sustancia pero no irradiados cuya frecuencia de aparición fue de 4 MN/1000 PCEs (Gráfica 26).



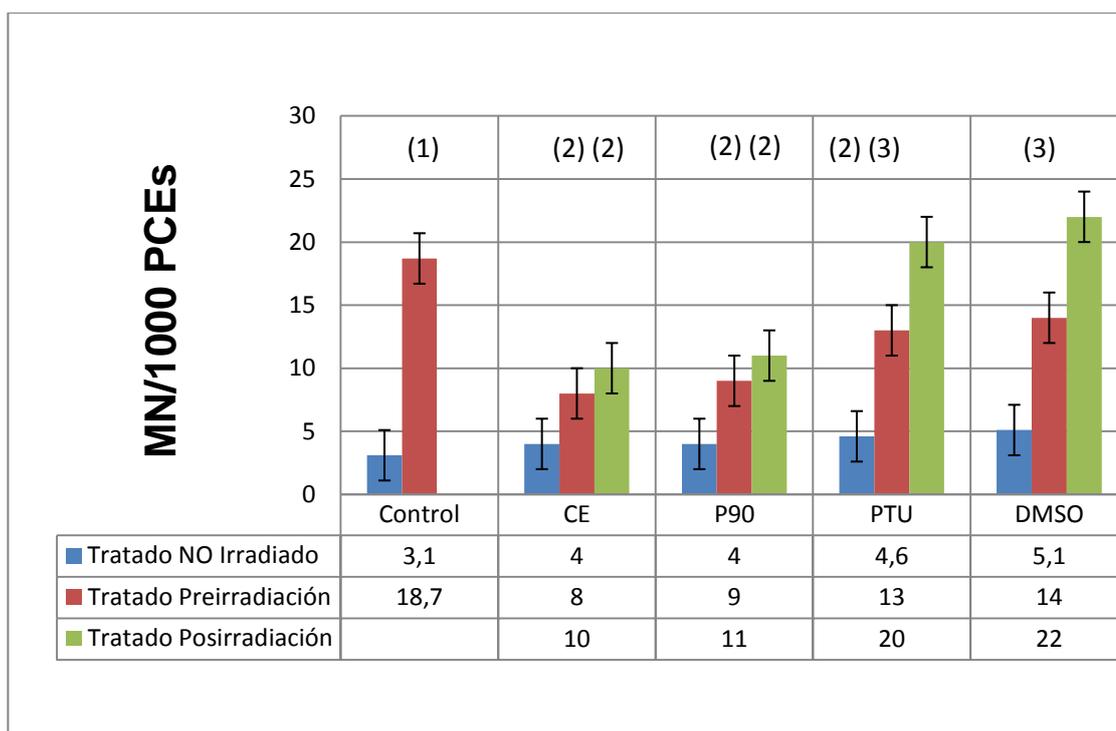
Gráfica 26. Frecuencia de MN/1000 PCEs en el grupo de animales tratado con DMSO dependiendo del incremento de administración del DMSO. ((*): ($p < 0,05$) respecto al grupo control irradiado).



Gráfica 27. Factor de Protección obtenido en los animales expuestos a rayos X dependiendo del momento de administración de la sustancia ensayada (DMSO).

El Factor de Protección obtenido cuando el DMSO se administra antes de la exposición a la radiación es del 25 %; sin embargo el DMSO cuando se administra inmediatamente después de la irradiación no muestra ninguna capacidad protectora (Gráfica 27).

En su conjunto, estos resultados obtenidos en los diferentes grupos de animales tratados con las sustancias antioxidantes ensayadas y expuestos a 500 mGy de rayos X se muestran en la Gráfica 23. Estos resultados permiten determinar que las sustancias antioxidantes ensayadas muestran un efecto radioprotector y que este efecto radioprotector es diferente dependiendo del momento de administración de las sustancias ensayadas.



Gráfica 28. Frecuencias de MN/1000 PCEs en los diferentes grupos tratados según el momento de administración de las sustancias ensayadas. (1): $p < 0,001$ respecto con los controles no irradiados; (2): $p < 0,001$ respecto a los controles irradiados; (3): $p < 0,01$ respecto a controles irradiados.

Así, cuando las sustancias se administran inmediatamente antes de la exposición a la radiación ionizante, la frecuencia de MN/1000 PCEs muestra diferencias estadísticamente significativas y podría expresarse de mayor a menor frecuencia:

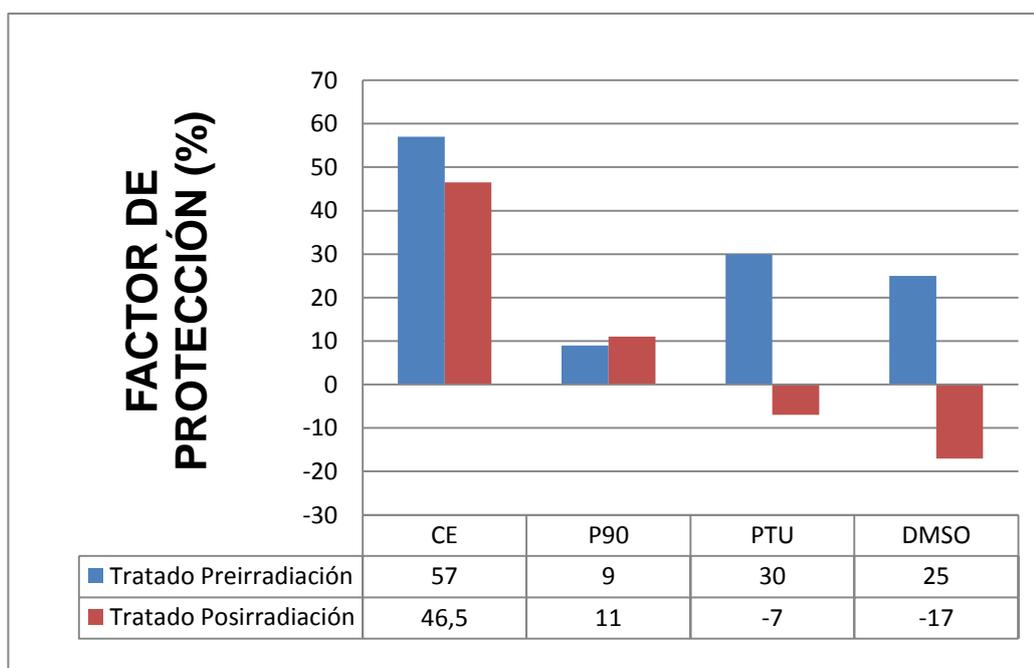
$$C_{RX} > DMSO_{RX} \approx PTU_{RX} > CE_{RX} \approx P90_{RX} (p < 0,001)$$

Sin embargo, cuando estas sustancias se administran inmediatamente tras la exposición a la radiación ionizante, las diferencias significativas varían poniéndose de manifiesto pérdida de la capacidad genoprotectora de las sustancias azufradas, pudiéndose expresar como:

$$C_{RX} \approx DMSO_{RX} \approx PTU_{RX} > CE_{RX} \approx P90_{RX} (p < 0,001)$$

Los resultados obtenidos sobre el Factor de Protección de las sustancias ensayadas varían según el momento de su administración. Así, cuando las sustancias se administran antes de la exposición a la radiación ionizante estaría entre el 57 %-60 % del P90 y de CE hasta el 30 %-25 % obtenido por el PTU y DMSO.

Sin embargo, cuando las sustancias se administran inmediatamente tras la exposición a radiación ionizante el Factor de Protección se sitúa entre el 40 %-50 % del CE y P90, y la ausencia de protección de las sustancias administradas (PTU y DMSO) cuando se administran durante este periodo (Gráfica 29).



Gráfica 29. Factor de protección determinado en los diferentes grupos de animales estudiados según el momento de administración de las sustancias (preirradiación: antes de la irradiación; postirradiación: inmediatamente después de la irradiación).

IV.3. E nsayo “*in vitro*” de micronúcleos sobre linfocitos humanos con bloqueo citocinético

RESULTADOS EN LINFOCITOS HUMANOS IRRADIADOS CON BLOQUEO CITOCINÉTICO CON CITOCHALASINA B.

MUESTRAS CONTROLES

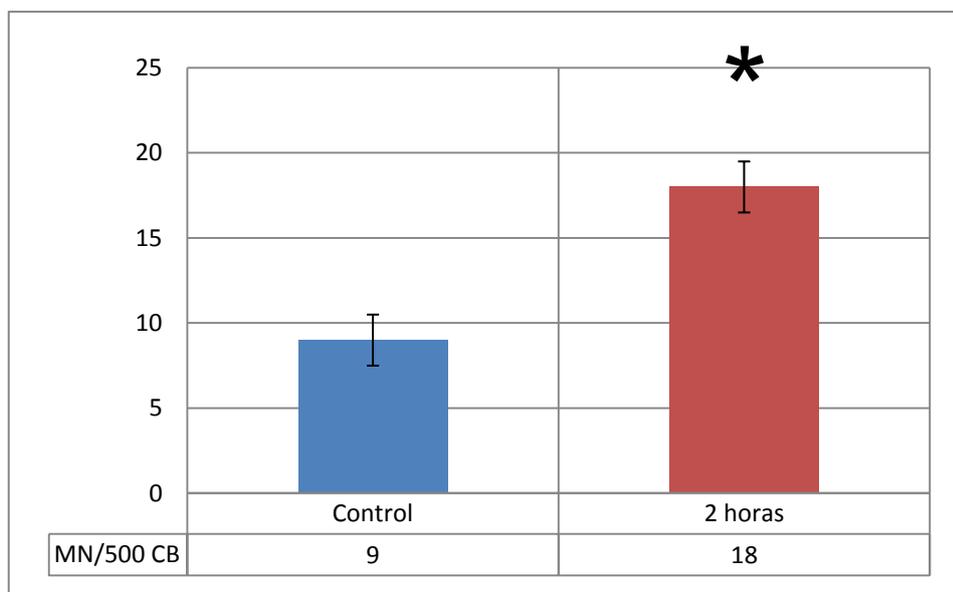
En las muestras de sangre controles no irradiadas (CONTROL) observamos 99 células positivas/500 CB. Una de las células binucleadas presentaba dos micronúcleos, mientras que las células restantes presentaban solo un micronúcleo en su citoplasma. La frecuencia de micronúcleos oscilaba entre 5 y 15 MN/500 CB con una media de 10 MN/500 CB. Este valor corresponderá a la frecuencia basal o frecuencia de presentación espontánea de micronúcleos en nuestras muestras (Tabla 8, Gráfica 30).

MUESTRA	CÉLULAS POSITIVAS	MNCB			TOTAL MN	MEDIA MN
		1 MN	2 MN	3 MN		
CONTROL 1	11	11			11	10
CONTROL 2	7	6	1		8	
CONTROL 3	13	13			13	
CONTROL 4	5	5			5	
CONTROL 5	9	9			9	
CONTROL 6	15	15			15	
CONTROL 7	12	12			12	
CONTROL 8	10	10			10	
CONTROL 9	11	11			11	
CONTROL 10	6	6			6	

Tabla 8. Frecuencia de aparición de MN/500 CB en las muestras controles no irradiadas ni expuestas a campos magnéticos (Muestras Controles).

3.1 MUESTRAS EXPUESTAS AL CAMPO MAGNÉTICO (ELF-EMF)

Los resultados del análisis obtenido de las muestras controles mantenidas durante 2 h en un campo magnético de 2 Teslas (C_{EXP}) presentaron una frecuencia de micronúcleos que oscilaba entre 16 y 21 MN/500 CB con una media de 18 MN/500 CB. Este valor es significativamente mayor que la frecuencia de aparición de micronúcleos en las muestras controles que era de 10 MN /500 CB ($p < 0,001$); y supone un incremento significativo de la frecuencia de MN en las muestras expuestas al campo magnético estudiado, lo que podría poner de manifiesto la capacidad genotóxica del campo magnético, (Gráfica 30).



Gráfica 30. Muestras expuestas durante 2 h al campo magnético de 2 Teslas (*): ($p < 0,01$) respecto al grupo control).

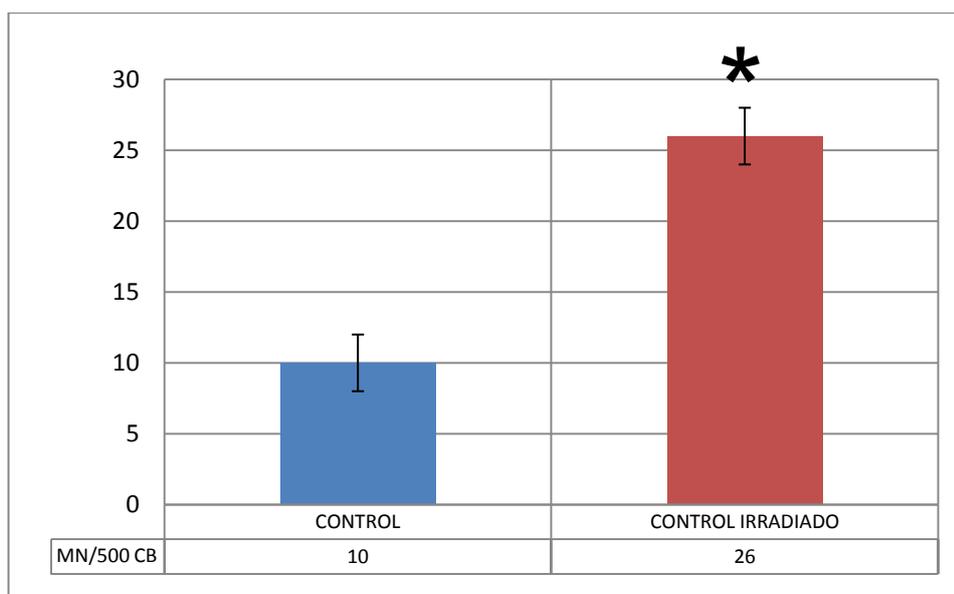
3.2 MUESTRAS EXPUESTAS A RADIACIÓN IONIZANTE

Las muestras controles irradiadas con 2 Gy (C_{RX}) presentaban un incremento estadísticamente significativo del número de células positivas respecto a la frecuencia de MN/500 CB determinados en los controles no

irradiados, con un total de 250 células positivas/5000 CB, de las que 242 presentaban un micronúcleo, 6 presentaban dos micronúcleos y 2 presentaban tres micronúcleos. Asimismo, observamos un aumento de la frecuencia de presentación de micronúcleos que oscilaba entre 11 y 32 MN/500 CB como valores mínimo y máximo respectivamente con una media de 26 MN/500 CB ($p < 0,001$) (Tabla 9; Gráfica 31).

MUESTRA	CÉLULAS POSITIVAS	MNCB			TOTAL MN	MEDIA MN
		1 MN	2 MN	3 MN		
CI 1	29	29			29	26
CI 2	25	22	2	1	29	
CI 3	31	31			31	
CI 4	23	21	1	1	26	
CI 5	30	29	1		31	
CI 6	29	29			29	
CI 7	32	32			32	
CI 8	27	27			27	
CI 9	13	11	2		15	
CI 10	11	11			11	

Tabla 9. Frecuencia de aparición de MN en las muestras sanguíneas irradiadas con 2 Gy.



Gráfica 31. Frecuencia de MN/500 CB en las muestras controles no irradiadas (CONTROL) y en las muestras controles irradiadas con 2 Gy de rayos X (*):($p < 0,001$) respecto a los controles no irradiados).

3.3 RESULTADOS DE MICRONUCLEOS “*IN VITRO*” EN LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS/IRRADIADOS CON BLOQUEO CITOCINETICO Y TRATADOS CON SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES,

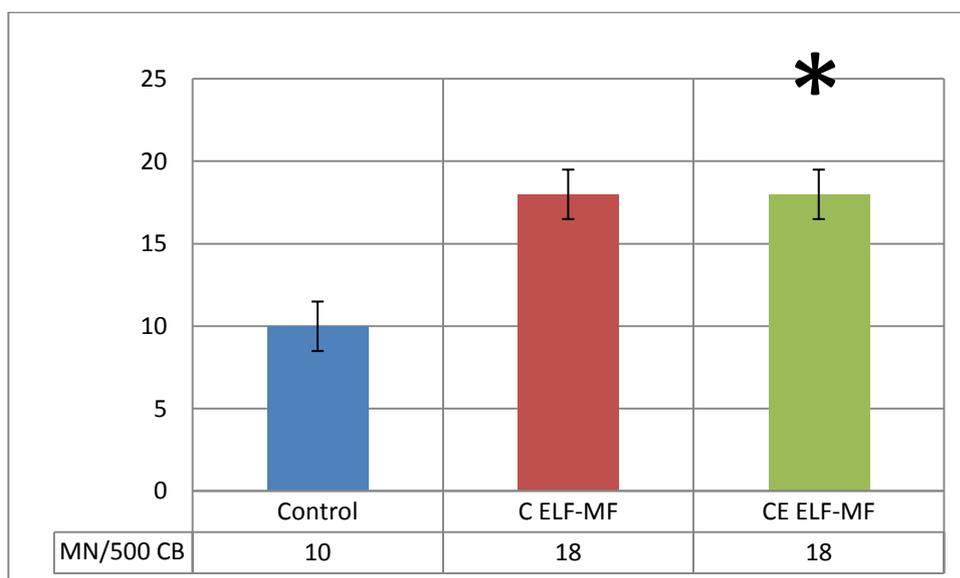
MUESTRAS EXPUESTAS AL CAMPO MAGNÉTICO ESTUDIADO (2 T).

1. Muestras tratadas con Extracto Cítrico Soluble (CE)

En las muestras tratadas con **CE** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 8 y 11MN/500 CB con una media de 10 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las muestras controles cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

En las muestras tratadas con **CE** y expuestas durante dos horas al campo magnético de 2 T se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 16 y 20 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 18 MN/500 CB, lo que supone que no existen diferencias

significativas respecto de sus muestras controles expuestas al campo magnetic outilizado cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 17 MN/500 CB. Resultados que ponen de manifiesto la ausencia de un efecto protector sobre la frecuencia de micronúcleos esperada por la exposición al campo magnético



Gráfica 32. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con CE ():(p<0,01) respecto al grupo control no expuesto).**

Estos resultados pueden expresarse como:

$$C \simeq CE < C_{ELF-EMF} \simeq CE_{ELF-EMF} (p < 0,01)$$

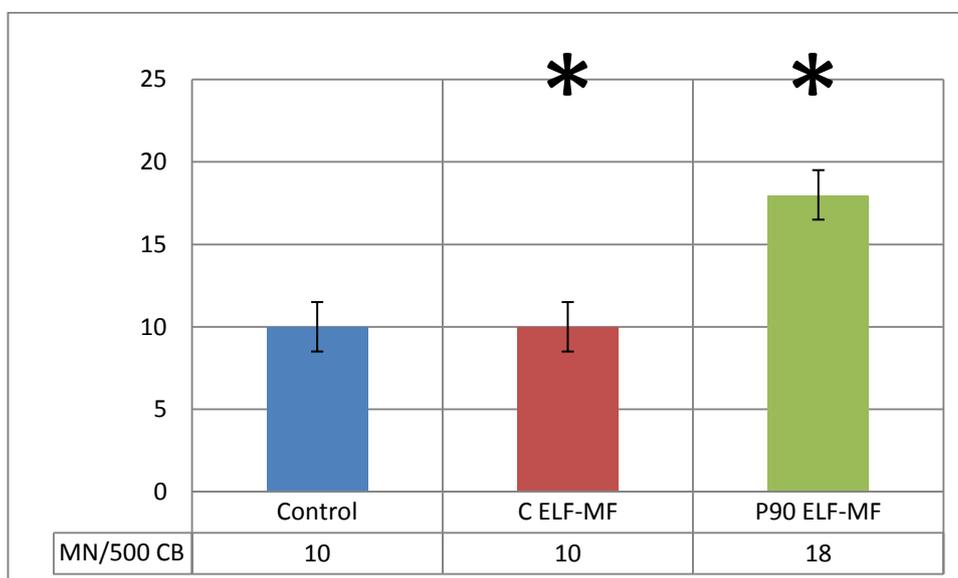
Estos resultados ponen de manifiesto el efecto genotóxico inducido por la exposición al campo magnético ensayado.

En estas muestras se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de MN determinada que muestra un **Factor Sensibilizante (FS)** del 180 % respecto en la frecuencia de aparición de las muestras controles tratadas con CE y no expuestas, así como de los controles no expuestos.

2. Animales tratados con Procianidinas (P90).

En las muestras tratadas con **P90** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 8 y 13MN/500 CB con una media de 11 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las muestras controles cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

En las muestras tratadas con **P90** y expuestas durante dos horas al campo magnético de 2 T se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 15 y 21 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 16 MN/500 CB, lo que supone que no existen diferencias significativas respecto de sus muestras controles expuestas al campo magnético utilizado cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 17MN/500 CB. Resultados que ponen de manifiesto la ausencia de un efecto protector sobre la frecuencia de micronúcleos esperada por la exposición al campo magnético



Gráfica 33. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con P90 ():(p<0,01) respecto al grupo control no expuesto).**

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto genotóxico inducido por la exposición al campo magnético ensayado y que podría expresarse como:

$$C \approx P_{90} < C_{\text{ELF-EMF}} \approx P_{90 \text{ ELF-EMF}} \quad (p < 0,01)$$

Estos resultados ponen de manifiesto el daño genotóxico inducido por la exposición de las muestras tratadas con P90 en el campo magnético estudiado.

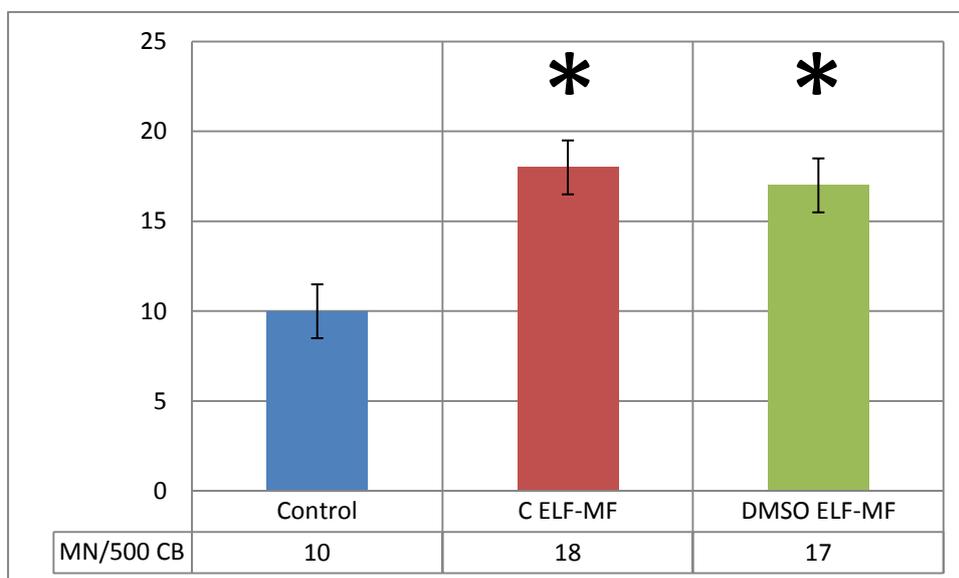
En estas muestras tratadas con P90 y expuestas a 2 T se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN que muestra un **Factor Sensibilizante (FS)** del 125% respecto a la frecuencia de aparición determinada en las muestras controles tratadas con P90 y no expuestas a 2 T, y del 190% respecto al grupo control.

3. Animales tratados con Dimetilsulfóxido (DMSO).

En las muestras tratadas con **DMSO** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 8 y 15 MN/500 CB con una media de 12 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las muestras controles cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

En las muestras tratadas con **DMSO** y expuestas durante dos horas al campo magnético de 2 T se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 18 y 23 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 19 MN/500 CB, lo que supone que no existen diferencias significativas respecto de sus muestras controles expuestas al campo magnético utilizado cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 17MN/500 CB. Resultados que ponen de manifiesto la ausencia de un efecto

protector sobre la frecuencia de micronúcleos esperada por la exposición al campo magnético.



Gráfica 34. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con DMSO ((*):(p<0,01) respecto al grupo control).

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto genotóxico inducido por la exposición al campo magnético ensayado y que podría expresarse como:

$$C \approx \text{DMSO} < C_{\text{ELF-EMF}} \approx \text{DMSO}_{\text{ELF-EMF}} \quad (p < 0,01)$$

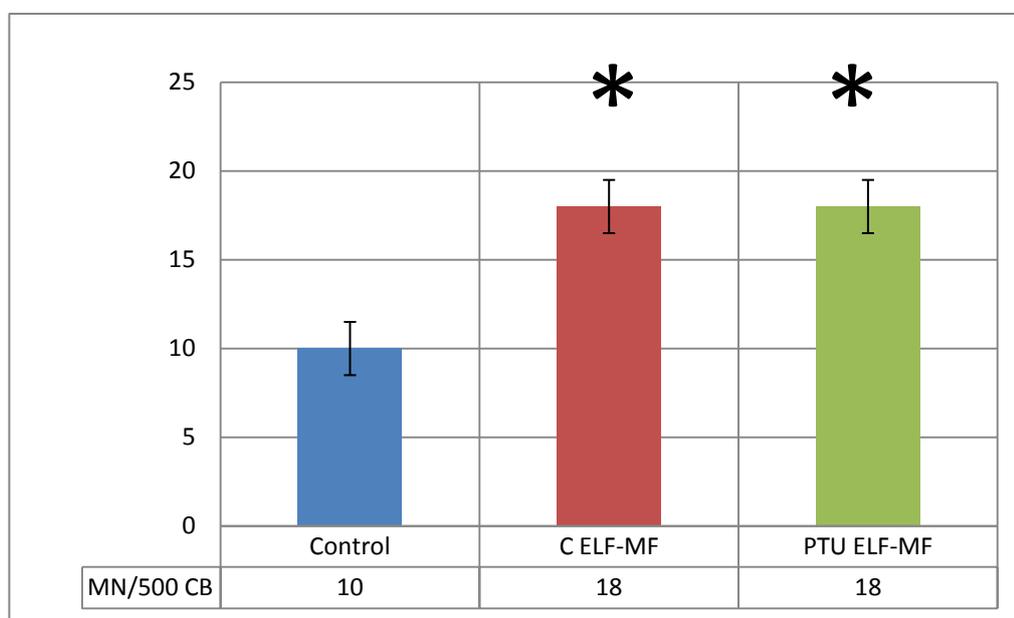
Estos resultados ponen de manifiesto el daño genotóxico inducido por la exposición de las muestras tratadas con DMSO en el campo magnético estudiado.

En esta muestras tratados con DMSO y expuestos a 2 T se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN que muestra un **Factor Sensibilizante** (FS) del 125 % respecto a la frecuencia de aparición determinada en las muestras controles tratadas con P y no expuestos a 2 T, y del 190 % respecto al grupo control.

4. Grupo tratado con 6n-2n-Propylthiouracilo (PTU)

En las muestras tratadas con **PTU** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 9 y 14 MN/500 CB con una media de 12 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las muestras controles cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

En las muestras tratadas con **DMSO** y expuestas durante dos horas al campo magnético de 2 T se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 18 y 23 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 18 MN/500 CB, lo que supone que no existen diferencias significativas respecto de sus muestras controles expuestas al campo magnético utilizado cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 17MN/500 CB. Resultados que ponen de manifiesto la ausencia de un efecto protector sobre la frecuencia de micronúcleos esperada por la exposición al campo magnético



Gráfica 35. Frecuencia de MN/1000 PCEs en los animales tratados con PTU ((*):(p<0,01) respecto al grupo control).

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto genotóxico inducido por la exposición al campo magnético ensayado y que podría expresarse como:

$$\mathbf{C \approx PTU < C_{ELF-EMF} \approx PTU_{ELF-EMF} (p < 0,01)}$$

Estos resultados ponen de manifiesto el daño genotóxico inducido por la exposición de las muestras tratadas con DMSO en el campo magnético estudiado.

En estas muestras tratadas con DMSO y expuestas a 2 T se ha determinado un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN que muestra un **Factor Sensibilizante (FS)** del 125% respecto a la frecuencia de aparición determinada en las muestras controles tratadas con P y no expuestas a 2 T, y del 190% respecto al grupo control.

En resumen, estos resultados obtenidos en los diferentes grupos de animales tratados con las sustancias antioxidantes ensayadas y expuestas al campo ELF-EMF se muestran en la Gráfica 15.

Estos resultados permiten determinar que las sustancias antioxidantes ensayadas no muestran ningún efecto genotóxico sobre los animales tratados, pudiéndose expresar:

$$\mathbf{C \approx CE \approx P \approx DMSO \approx PTU}$$

De igual forma, los resultados obtenidos permiten determinar un efecto genotóxico estadísticamente significativo que podría expresarse de la siguiente forma:

$$\mathbf{C < C_{ELF-EMF} \approx CE_{ELF-EMF} \approx P_{ELF-EMF} \approx DMSO_{ELF-EMF} \approx PTU_{ELF-EMF} (p < 0,01)}$$

De igual forma, los resultados obtenidos muestran la ausencia de capacidad genoprotectora que presentan las sustancias antioxidantes ensayadas al no conseguir disminuir la frecuencia de aparición de MN/1000

PCEs inducida por el campo magnético ELF-EMF ensayado y que expresaría el daño cromosómico inducido por dicho campo sobre el material genético de los animales expuestos.

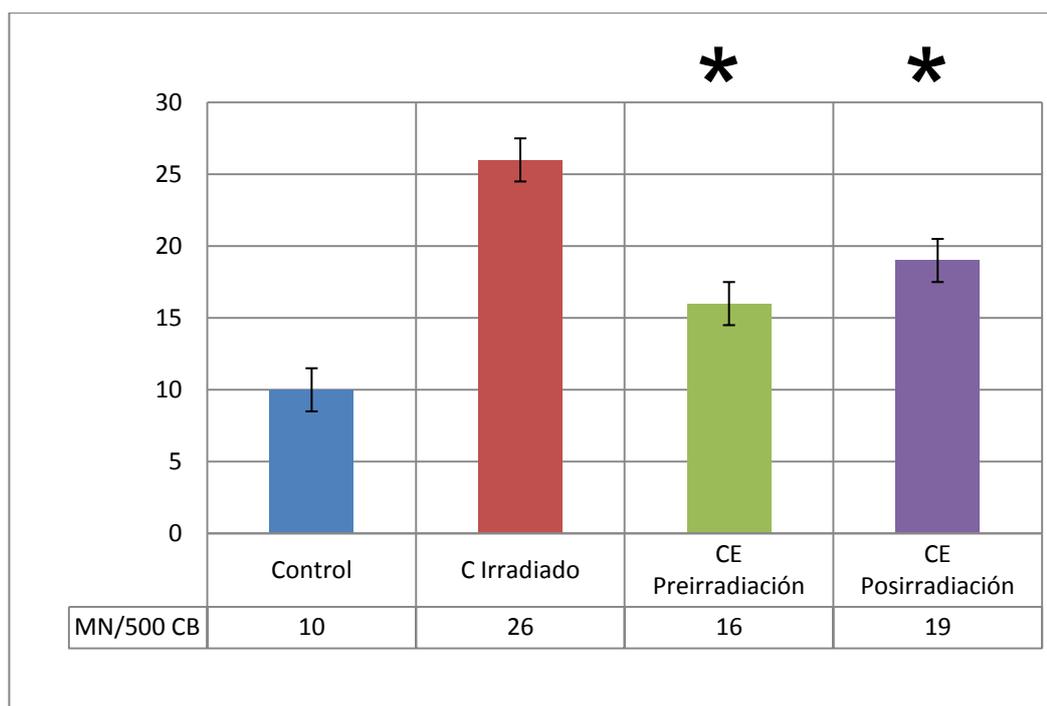
MUESTRAS EXPUESTAS A RADIACIÓN IONIZANTE (2 Gy).

1. Muestras tratadas con Extracto Cítrico Soluble (CE)

- En las **muestras tratadas con CE** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 8 y 12 MN/500 CB con una media de 10 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las **muestras controles no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con CE antes de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 13 y 20 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 16 MN/500 CB, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,05$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de sus **muestras controles tratadas con la misma sustancia pero no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con CE después de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 16 y 22 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 19 MN/500 CB, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,01$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de sus **muestras controles tratadas con la misma sustancia pero no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

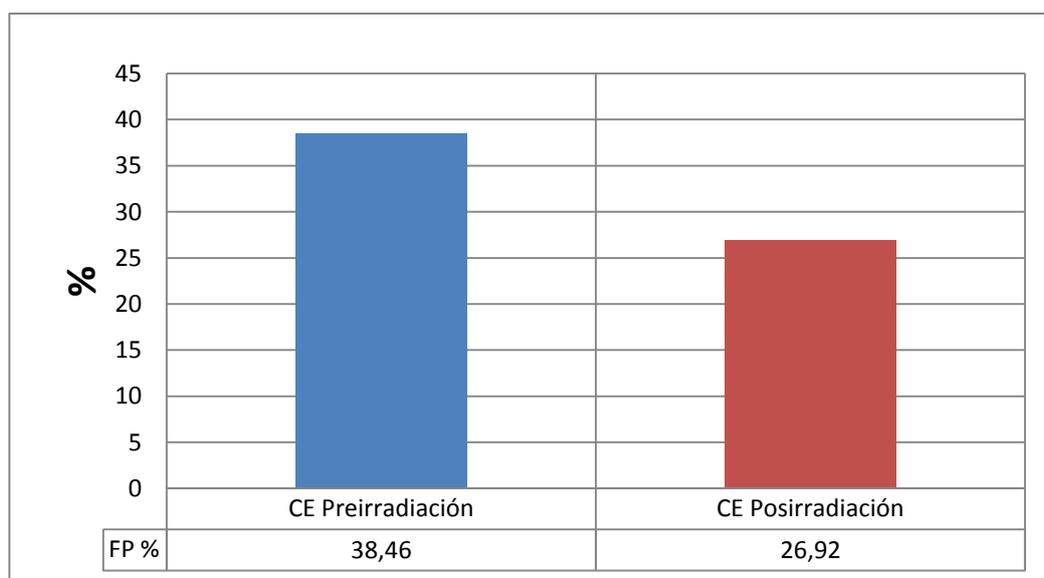


Gráfica 36. Frecuencia de aparición de MN/500 CB en las muestras tratadas con CE. (): ($p < 0,001$) respecto a los controles no irradiados).**

- En las **muestras tratadas con CE antes de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de micronúcleos de 16 MN/500 CB. El análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas previamente con CE, refleja una disminución significativa ($p < 0,001$) respecto de las **muestras controles irradiadas** (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento con CE antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia de MN esperados y supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

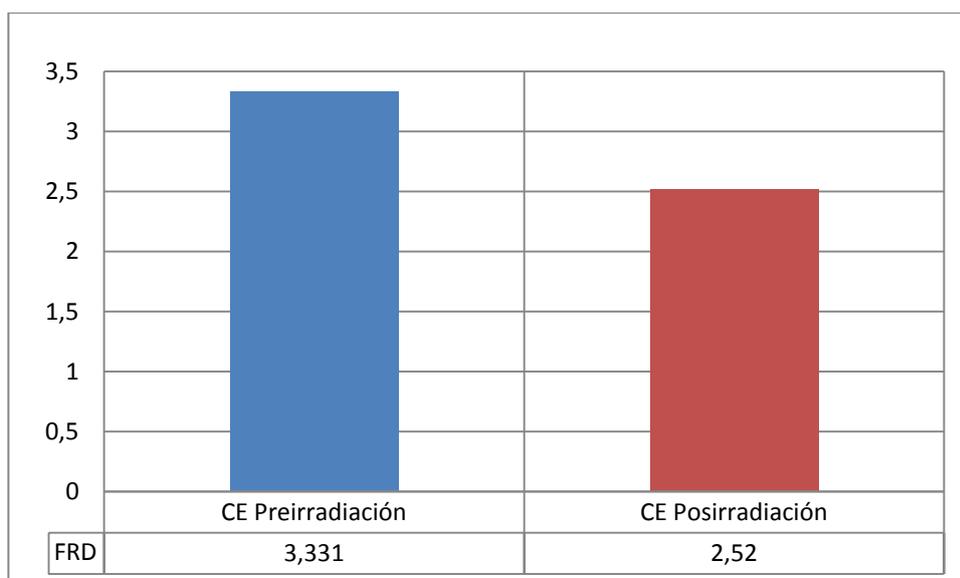
- En las **muestras tratadas con CE después de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de MN de 19 MN/500 CB y el análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas posteriormente con CE-50, refleja una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto de las **muestras controles irradiadas** (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento postirradiación con CE-50 disminuye la frecuencia de MN esperados y supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

El **Factor de Protección (FP)** de las muestras tratadas con **CE** antes de la irradiación osciló entre el 23,08 % y el 50 % como valores mínimo y máximo respectivamente; sin embargo, el FP de las muestras tratadas con CE después de la exposición a la radiación varió entre el 15,4 % y el 38,5 % como valores mínimo y máximo respectivamente. Al utilizar diferentes concentraciones, consideramos el valor medio de los MN obtenidos pre y postirradiación que fueron de 16 y 19 MN/500 CB, respectivamente. Por tanto, se calculó un FP Preirradiación medio del 38,46 % mientras que el FP Postirradiación medio fue del 26,92 % y estos valores son los que tomamos para su representación.



Gráfica 37. Factor de Protección obtenido en las muestras tratadas con CE.

El **Factor Reductor de Dosis (FRD)** de las muestras tratadas con **CE** preirradiación es de 3,331 mientras que el FRD obtenido en las muestras tratadas postirradiación es de 2,52.



Gráfica 38. Factor Reductor de Dosis obtenido para las muestras tratadas con CE según el momento de su administración

FRD	
Preirradiación	Postirradiación
3,331	2,52

Tabla 10. Factor Reductor de Dosis obtenido para las muestras tratadas con CE según el momento de su administración.

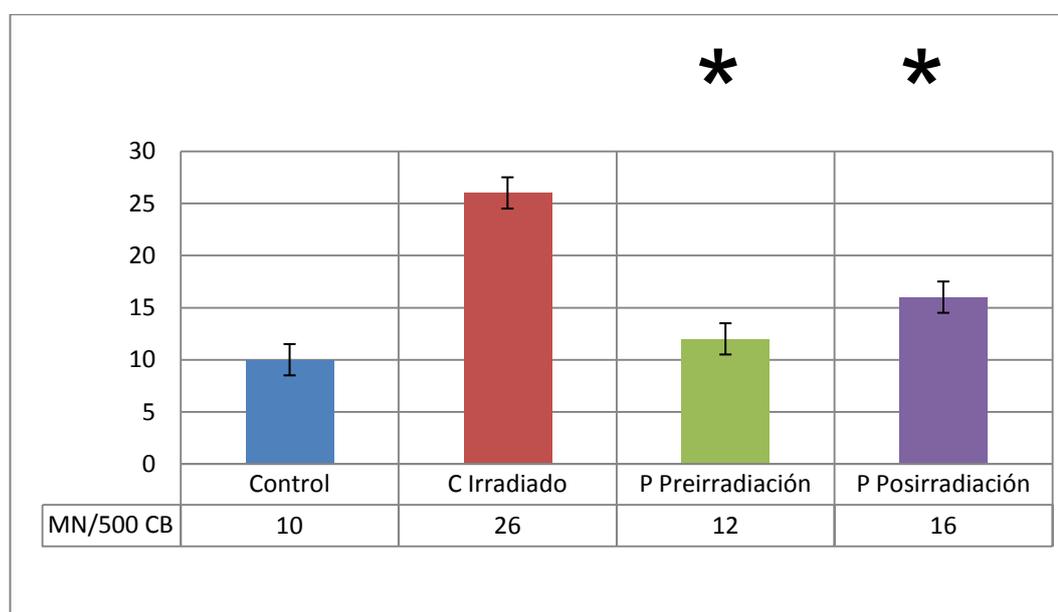
2. Muestras tratadas con Procianidinas (P90)

- En las **muestras tratadas con P90** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 6 y 12 MN/500 CB con una media de 9 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las **muestras controles no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con P90 antes de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 7 y 25 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 12 MN/500 CB, lo que supone que no existen diferencias significativas respecto de

sus **muestras controles tratadas con la misma sustancia pero no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 9 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con P90 después de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 10 y 22 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 16 MN/500 CB, lo que supone que no existen diferencias significativas respecto de sus **muestras controles tratadas con la misma sustancia pero no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 9 MN/500 CB.

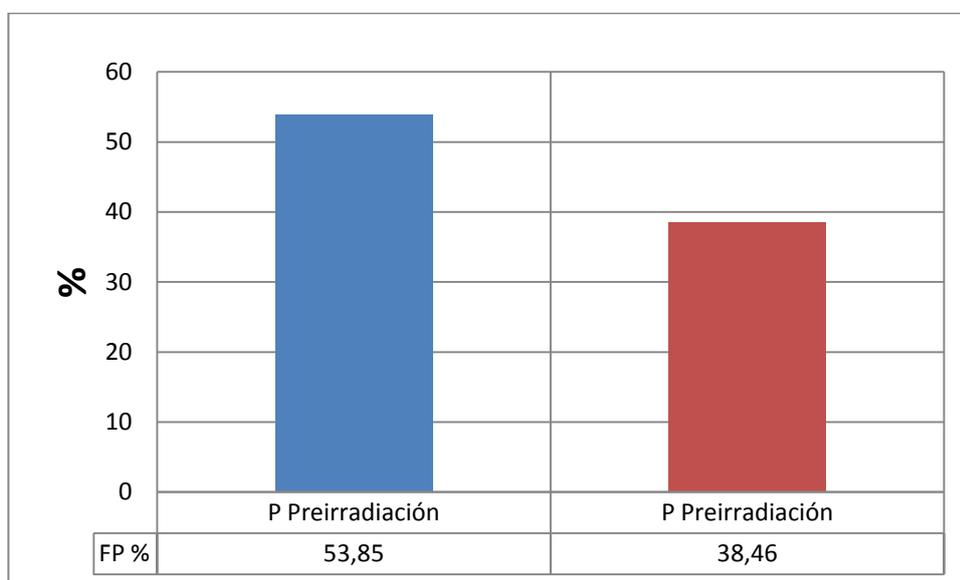


Gráfica 39. Frecuencia de MN/500 CB en las muestras tratadas con P90 (): ($p < 0.001$) respecto a las muestras controles irradiadas).**

- En las **muestras tratadas con P90** antes de la exposición a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de micronúcleos de 12 MN/500 CB. El análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas previamente con P90, refleja una disminución significativa ($p < 0,001$) respecto de las **muestras controles irradiadas** (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento con P90 antes de la exposición a la radiación disminuye la frecuencia de MN esperados y supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

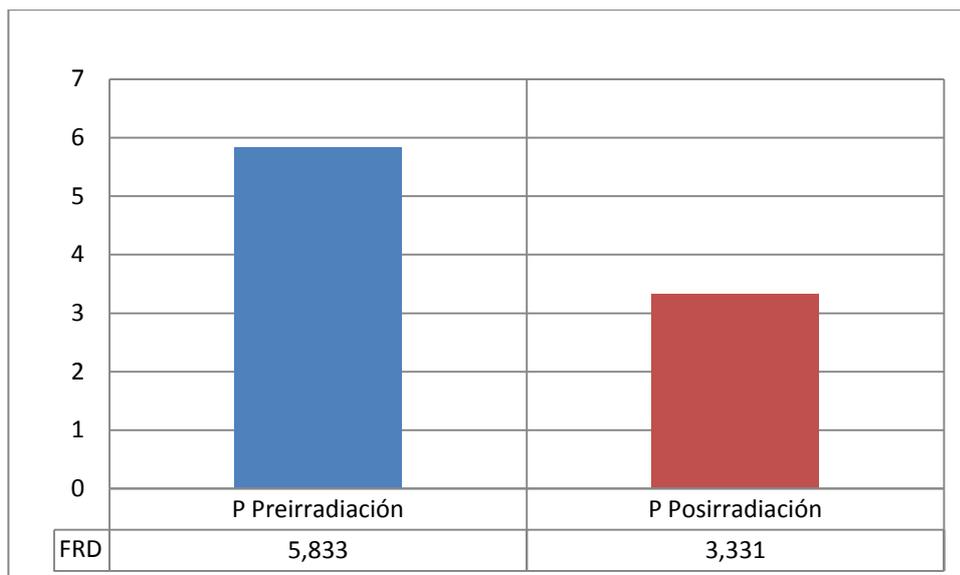
- En las muestras tratadas con **P90** después de la exposición a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de MN de 16 MN/500 CB y el análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas posteriormente con P90, refleja una disminución significativa ($p < 0,001$) respecto de las **muestras controles irradiadas** (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento postirradiación con P disminuye la frecuencia de MN esperados y supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

El **Factor de Protección (FP)** de las muestras tratadas con **P90** antes de la irradiación fue del 53,85 %; sin embargo, las muestras tratadas con P90 después de la exposición a la radiación presentaron un FP del 38,46 %.



Gráfica 40. Factor de Protección determinado en las muestras tratadas con P90, según el momento de su administración.

El **Factor Reductor de Dosis (FRD)** de las muestras tratadas con **P90** preirradiación es de 5,833 mientras que el FRD obtenido en las muestras tratadas postirradiación es de 3,331.



Gráfica 41. Factor Reductor de Dosis obtenido para las muestras tratadas con P90 según el momento de su administración.

FRD	
Preirradiación	Postirradiación
5,833	3,331

Tabla 11. Factor Reductor de Dosis obtenido para las muestras tratadas con P90 según el momento de su administración.

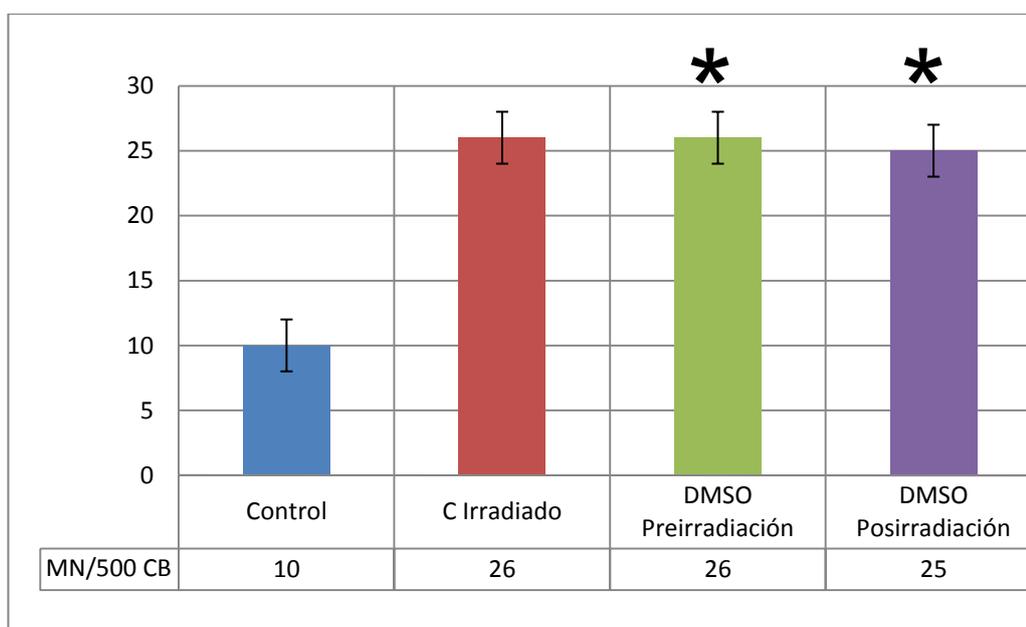
3. Muestras tratadas con Dimetilsulfóxido (DMSO)

- En las **muestras tratadas con DMSO** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 10 y 12 MN/500 CB con una media de 11 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las **muestras controles no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con DMSO antes de la exposición a la radiación** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que

osciló entre 12 y 34 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 26 MN/500 CB, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de **sus muestras controles tratadas con la misma sustancia pero no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 11 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con DMSO después de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 11 y 32 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 25 MN/500 CB, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de sus **muestras controles tratadas con la misma sustancia pero no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 11 MN/500 CB.



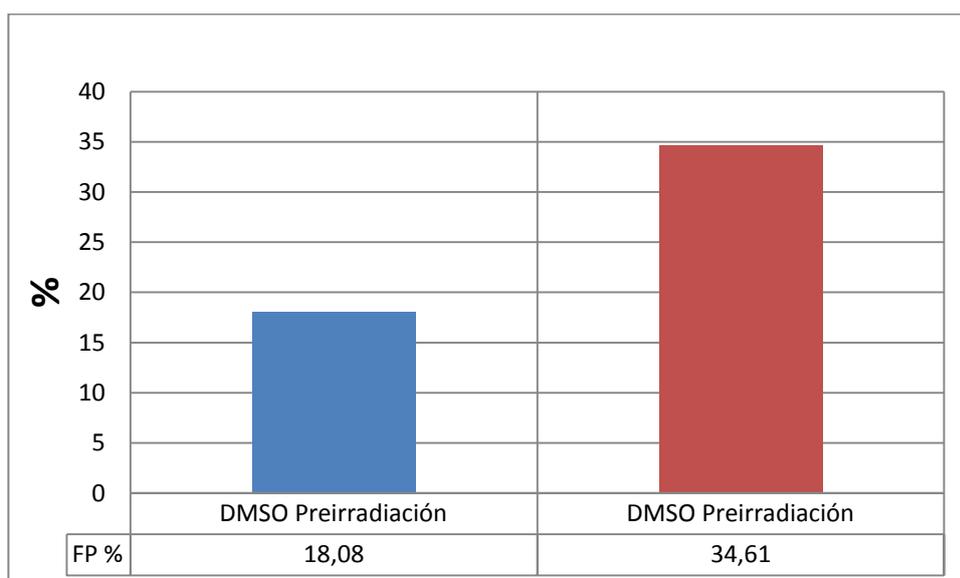
Gráfica 42. Frecuencia de MN/500 CB en las muestras tratadas con DMSO e irradiadas ((*): ($p < 0,01$) respecto a las muestras controles irradiadas).

- En las **muestras tratadas con DMSO antes de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de micronúcleos de 26 MN/500 CB. El análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas previamente con DMSO, refleja que no existen diferencias significativas respecto de las **muestras controles**

irradiadas (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento preirradiación con DMSO no disminuye la frecuencia de MN esperados y no supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

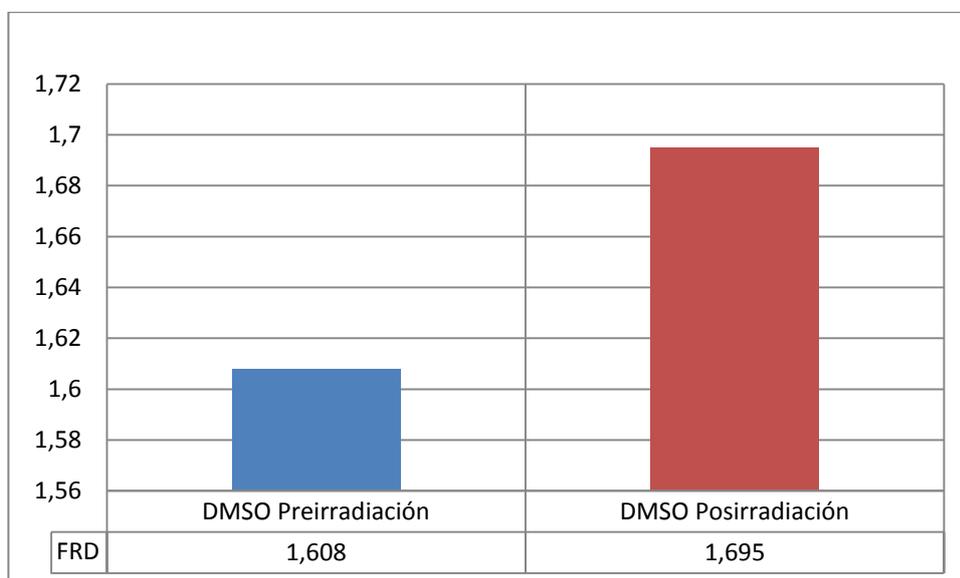
- En las **muestras tratadas con DMSO después de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de MN de 25 MN/500 CB y el análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas posteriormente con DMSO, refleja que no existen diferencias significativas respecto de las **muestras controles irradiadas** (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento postirradiación con DMSO no disminuye la frecuencia de MN esperados y no supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

El **Factor de Protección (FP)** de las muestras tratadas con **DMSO** antes de la irradiación osciló entre $-17,69\%$ y $53,85\%$, como valores mínimo y máximo respectivamente; sin embargo, el FP de las muestras tratadas con DMSO después de la exposición a la radiación varió entre $-23,08\%$ y $57,69\%$ como valores mínimo y máximo respectivamente. Al utilizar diferentes concentraciones, consideramos el valor medio de los MN obtenidos pre y postirradiación que fueron de 26 y 25 MN/500 CB, respectivamente.



Gráfica 43. Factor de Protección determinado en las muestras tratadas con DMSO, según el momento de su administración.

El **Factor Reductor de Dosis (FRD)** de las muestras tratadas con **DMSO** preirradiación es de 1,608 mientras que el FRD obtenido en las muestras tratadas postirradiación es de 1,695.



Gráfica 44. Factor Reductor de Dosis obtenido para las muestras tratadas con DMSO según el momento de su administración.

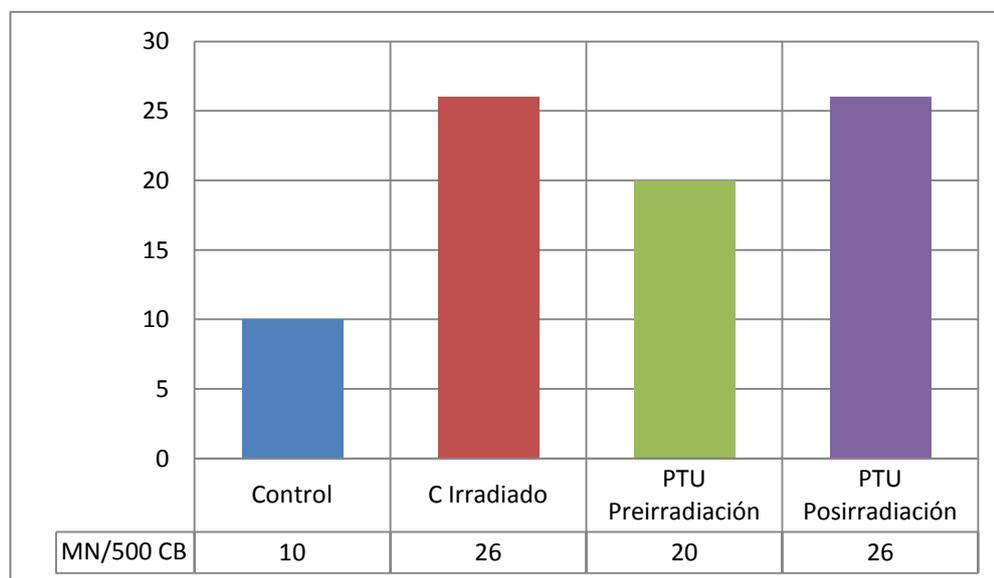
4. Muestras tratadas con Propiltiouracilo (PTU)

- En las **muestras tratadas con PTU** se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 10 y 12 MN/500 CB con una media de 11 MN/500 CB y, por tanto, se puede decir que no muestran diferencias significativas con las **muestras controles no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 10 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con PTU antes de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 12 y 34 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 26 MN/500 CB, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de **sus muestras controles tratadas**

con la misma sustancia pero no irradiadas cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 11 MN/500 CB.

- En las **muestras tratadas con PTU después de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia de presentación de MN que osciló entre 11 y 32 MN/500 CB con una frecuencia media de aparición de MN de 25 MN/500 CB, lo que supone un incremento significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia de aparición de MN respecto de sus **muestras controles tratadas con la misma sustancia pero no irradiadas** cuya frecuencia media de aparición de MN fue de 11 MN/500 CB.



Gráfica 45. Frecuencia de MN/500 CB en las muestras tratadas con PTU e irradiadas ():** ($p < 0,01$) respecto a las muestras controles irradiadas).

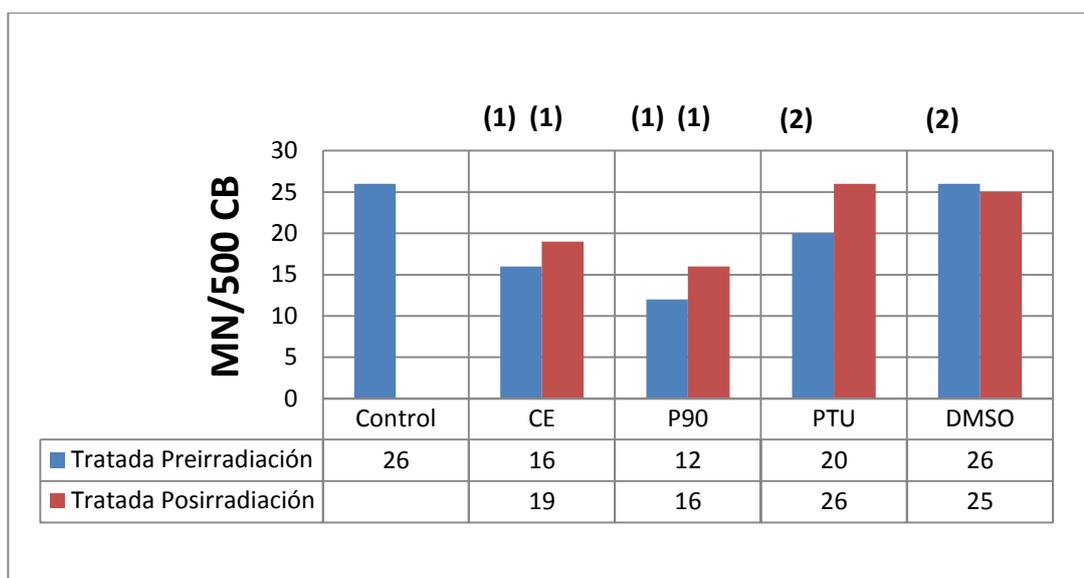
- En las **muestras tratadas con PTU antes de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de micronúcleos de 20 MN/500 CB. El análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas previamente con PTU, refleja que no existen diferencias significativas respecto de las **muestras controles irradiadas** (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento preirradiación con PTU no disminuye la frecuencia de MN esperados y no supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

- En las **muestras tratadas con PTU después de la exposición** a la radiación se ha determinado una frecuencia media de aparición de MN de 25 MN/500 CB y el análisis estadístico de la frecuencia de MN en estas muestras irradiadas y tratadas posteriormente con PTU, refleja que no existen diferencias significativas respecto de las **muestras controles irradiadas** (26 MN/500 CB), lo que significa que el tratamiento postirradiación con PTU no disminuye la frecuencia de MN esperados y no supone, por tanto, una protección frente al daño inducido por la radiación.

El **Factor de Protección (FP)** de las muestras tratadas con **PTU** antes de la irradiación osciló entre 25% y el 30 % como valores máximo y mínimo respectivamente; sin embargo, el FP de las muestras tratadas con PTU después de la exposición a la radiación es de 0%.

El **Factor Reductor de Dosis (FRD)** de las muestras tratadas con **PTU** preirradiación es de 1,608 mientras que el FRD obtenido en las muestras tratadas postirradiación es 0.

En resumen, los resultados obtenidos en los diferentes cultivos celulares tratados con las sustancias antioxidantes ensayadas y expuestas a 2 Gy de rayos X se muestran en la Gráfica 36. Estos resultados permiten determinar que las sustancias ensayadas muestran un efecto radioprotector y que es diferente según el momento de administración de las sustancias.



Gráfica 46. Frecuencia de aparición de MN/500 CB en los diferentes grupos tratados según el momento de administración de las sustancias ensayadas; (1):(p<0,001) respecto a los controles irradiados; (2):(p<0,01) respecto a los controles irradiados.

Así, cuando las sustancias se administran antes de la exposición a la radiación ionizante, la frecuencia de MN/500 CB varía y podría expresarse de mayor a menor frecuencia:

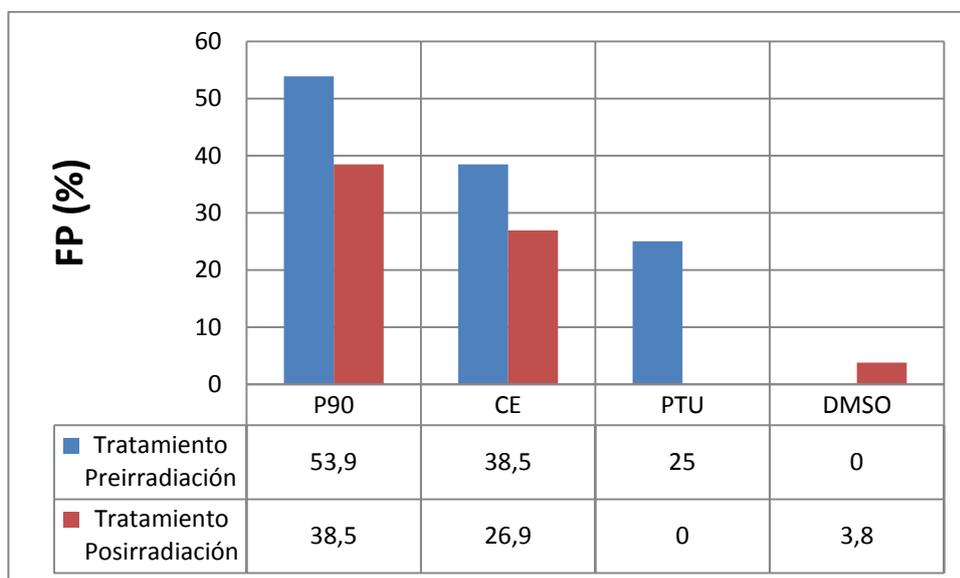
$$C_{RX} > DMSO_{RX} \approx PTU_{RX} > CE_{RX} \approx P_{RX} (p < 0,001)$$

Sin embargo, cuando las sustancias se administran inmediatamente después de la exposición a rayos X, las frecuencias de MN/500 CB aportan resultados diferentes, y podrían expresarse:

$$C_{RX} \approx DMSO_{RX} \approx PTU_{RX} > CE_{RX} \approx P_{RX} (p < 0,001)$$

Los resultados obtenidos sobre el Factor de Protección de las sustancias ensayadas también varían según el momento de su administración. Así, cuando las sustancias se administran antes de la exposición a radiación ionizante estaría entre el 25 % y el 57 % según la sustancia ensayada (Gráfica 37). Sin embargo, cuando las sustancias se administran tras la exposición a

rayos X el Factor de Protección se sitúa en el 46,5 % para el CE, y el 0% determinado para las sustancias azufradas (PTU y DMSO) (Gráfica 37).



Gráfica 47. Factor de Protección determinado en los diferentes grupos tratados según el momento de administración de las sustancias ensayadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS “*IN VIVO*” SOBRE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

- Exposición a campos electromagnéticos de extremada baja frecuencia ELF-EMF

La frecuencia de MNPCEs/1,000 PCEs en nuestros animales controles es de $3,1 \pm 1,1$. La exposición a 50 Hz ELF-EMF produce un aumento de MNPCEs/1000 PCEs) mostrando que **C < 7d = 14d = 21d = 28d (p<0,01)**, lo que expresa que los ELF-EMF utilizados tienen efecto genotóxico, aunque no se aprecia diferencias significativas durante los diferentes tiempos ensayados entre sí (Gráfica 5).

La frecuencia de MNPCEs/1.000 PCEs en los animales tratados con las sustancias antioxidantes no muestra diferencias con la frecuencia de los animales controles no expuestos, lo que expresa ausencia de genotoxicidad de dichas sustancias.

La administración de las sustancias durante 28 días en los animales expuestos a ELF-EMF muestra un incremento de MNPCEs respecto a los animales controles; pero no muestra diferencias respecto a los animales expuestos a ELF-EMF, pudiendo expresarse como **C < C_{ex} = P90_{ex} = CE_{ex} = DMSO_{ex} = PTU_{ex} (p<0,01)**, lo que muestra una ausencia de efecto protector de las 4 sustancias ensayadas.

- Exposición a rayos X

La irradiación con rayos X produce un aumento de MNPCEs/1000 PCEs en los animales irradiados respecto de los animales controles; que podría expresarse como: **C < C_{RX} (p<0,001)**; y que muestra el daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre los animales expuestos a radiación

ionizante y los expuestos a ELF-EMF pudiendo expresarse como **ELF-EMF < RayosX (p<0,01)**; lo que muestra mayor capacidad mutagénica de la radiación ionizante que la presentada por los ELF-EMF ensayados.

Los animales tratados con las sustancias antioxidantes e irradiados con rayos X muestran un descenso en la frecuencia de MNPCEs/1000 PCEs respecto a la presentada por los animales irradiados y no tratados, tanto si las sustancias se administran antes de la irradiación: **C_{RX} > PTU_{RX} ≈ DMSO_{RX} (p<0,01) > CE_{RX} ≈ P90_{RX} (p<0,001)**; como después de la irradiación **C_{RX} ≈ PTU_{RX} ≈ DMSO_{RX} > CE_{RX} ≈ P90_{RX} (p<0,01)**. Estos resultados muestran que la capacidad de protección de las 4 sustancias antioxidantes es mayor cuando las sustancias se administran antes de la irradiación alcanzando hasta el 70 % de reducción del daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS “IN VITRO” EN LINFOCITOS HUMANOS CON BLOQUEO CITOCINÉTICO CON CITOCHALASINA B

Exposición a campos electromagnéticos de extremada baja frecuencia (ELF-EMF).

La frecuencia de MN/500 CB en las muestras sanguíneas controles es de $10 \pm 2,5$ MN/500 CB. La exposición a ELF-EMF 50Hz produce un incremento de MN/500 CB mostrando que $C < C_{\text{ELF-EMF}}$ ($p < 0,01$), lo que expresa que los ELF-EMF estudiados tienen efecto genotóxico.

La frecuencia de aparición de MN/500 CB en las muestras sanguíneas tratadas con las sustancias antioxidantes NO muestra diferencias significativas con la frecuencia de MN/500 CB de las muestras controles no expuestas, lo que expresa la ausencia de genotoxicidad de dichas sustancias.

La administración de las sustancias antes de la exposición a ELF-EMF en las muestras sanguíneas muestra un incremento de MN/500 CB respecto a las muestras controles, pero no muestra diferencias respecto a las muestras controles expuestas a ELF-EMF, pudiéndose establecer que: $C < C_{\text{ELF-EMF}} \approx P90_{\text{ELF-EMF}} \approx CE_{\text{ELF-M}} \approx \text{DMSO}_{\text{ELF-M}} \approx \text{PTU}_{\text{ELF-M}}$ ($P < 0,01$); lo que determinaría la ausencia de efecto protector de las 4 sustancias ensayadas.

Irradiación con rayos X

La irradiación con rayos X produce un incremento de MN/500 CB que podría expresarse como: $C < C_{\text{EX}}$ ($p < 0,01$); y que muestra el daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre las muestras expuestas a radiación ionizante y las expuestas a ELF-EMF pudiéndose expresarse como: **ELF-EMF < Rayos X** ($p < 0,01$); lo que muestra la mayor capacidad mutagénica de la radiación ionizante que la presentada por los campos ELF-EMF ensayados.

Las muestras tratadas con sustancias antioxidantes e irradiadas con rayos X muestran un descenso estadísticamente significativo en la frecuencia de MN/500 CB respecto a la presentada por las muestras irradiadas y no tratadas, tanto si las sustancias se administran antes de la irradiación ($C_{RX} > PTU_{RX} \approx DMSO_{RX} (p < 0,01) > CE_{RX} \approx P90_{RX} (p < 0,001)$); como después de la irradiación ($C_{RX} \approx PTU_{RX} \approx DMSO_{RX} > CE_{RX} \approx P90_{RX} (p < 0,001)$). Estos resultados muestran que la capacidad de protección de estas 4 sustancias antioxidantes es mayor cuando las sustancias se administran antes de la irradiación alcanzando hasta un 53,9 % de reducción del daño genotóxico inducido por la radiación ionizante.

V. Discusión

V. **Discusión**

1. **Experiencias con radiación ionizante**

La radiación ionizante tiene aplicaciones muy importantes en la medicina, incluyendo el diagnóstico radiológico, medicina nuclear y la radioterapia (radiación Oncológica), sin embargo, los efectos biológicos perjudiciales inducidos por la exposición abierta de los tejidos del cuerpo a la radiación ionizante se ha reconocido desde hace tiempo. Por lo tanto, siempre hay una relación beneficio riesgo cuando se aplica la radiación ionizante en los entornos médicos. Este desafío radiobiológico ha estimulado el interés en el desarrollo de agentes químicos que podrían ser utilizados como agentes de protección para los tejidos normales contra el efecto dañino (radioprotector) o mejorar el daño por radiación a los tumores (radiosensibilizador) sin afectar los tejidos normales durante la radioterapia y durante los escenarios de exposición a la radiación. Por lo tanto, el aumento del uso industrial de la energía nuclear, el riesgo de accidentes/eventos nucleares y ataques nucleares mediados por terroristas, y los profesionales expuestos a la radiación ha aumentado el interés en este aspecto de la radiobiología (Weiss, 1997; Prasad y cols., 2004; Alcaraz y col., 2011).

Numerosos estudios han intentado proporcionar guías sobre la manera de reducir los daños causados por las radiaciones ionizantes a los pacientes que reciben radioterapia, los trabajadores y las víctimas de accidentes de radiación (Alcaraz y cols., 2010; 2011) y exposiciones a radiación profesional. Además, hay muchas publicaciones en la literatura científica que se esfuerzan por demostrar las capacidades de protección de diversas sustancias contra los daños inducidos por la exposición a la radiación ionizante (Konopacka y Rezeszowska-wolny, 2001; Greenrod y Fenech, 2003; Lee y cols., 2004).

La absorción de la radiación ionizante en el cuerpo no depende solo del tipo de radiación y la calidad de ésta, sino también de la sensibilidad del tejido que está siendo irradiado. La radiación es de naturaleza aleatoria y la

energía depositada por longitud de onda en el tejido biológico crea una multitud de ionizaciones y excitaciones en el que las moléculas de agua están siempre implicadas. Esto provoca por lo menos dos tipos de alteraciones moleculares: por los efectos directos imprevisibles o estocásticos en muchos componentes moleculares diferentes de las células y la matriz extracelular, y por transferir su energía a las partículas cargadas (proceso de dos pasos) número de especies moleculares que conducen a la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generados a partir de la hidrólisis de agua (Alcaraz et al., 2009a).

Cuando las radiaciones ionizantes (RI) pasan a través de los tejidos biológicos grandes cantidades de radicales libres de oxígeno, también conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS), se generan *in vivo* mediante la escisión del agua corporal (radiolisis). Estas especies reactivas de oxígeno son los radicales hidroxilo $\text{OH}\cdot$, aniones superóxido, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{HO}_2\cdot$ o RO_2 y electrones hidratados $e(\text{aq})$. El peróxido de hidrógeno endógeno también se forma por reducción del anión superóxido a través de dos mecanismos: los modelos de la Haber-Weiss y Fenton. El radical hidroxilo es el más citotóxico de todos estos radicales mencionados, con una vida media estimada de 10^{-9} segundos, la alta reactividad de estos radicales implica reacción inmediata en el lugar de generación (Schwartz y Charranes, 1992; Munné-Bosch y cols., 1999; Masuda y cols., 2001). Por lo tanto, en el caso de una generación masiva de radicales hidroxilo durante la irradiación de rayos X, el efecto citotóxico se potencia a través de la interacción de estos radicales con las estructuras celulares ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), tales como fosfolípidos de membrana celular, donde las reacciones de activación a la exposición de la radiación puede inducir reacciones en cadena de peroxidación de lípidos, tanto dentro como fuera a la membrana (Lamaison y cols., 1991; Munné-Bosch y cols., 1999; Alcaraz y cols., 2009a; Sánchez-Campillo y cols., 2009; Kiang y cols., 2012).

Altas cantidades de ROS en cualquier sistema biológico conduce a estrés oxidativo y bajo tales condiciones de estrés oxidativo, cuando los sistemas antioxidantes endógenos están saturados o los agentes exógenos defectuosos, se pueden usar como complementos potentes captadores de radicales libres. Las capacidades de barrido de estos agentes propuestos

dependen de alta afinidad específica por los diferentes radicales libres y un alto grado de estabilidad de los radicales intermedios formados que requiere que tanto el sistema operativo y antioxidantes estén relacionados a través de su estructura molecular, propiedades físicas y la biodisponibilidad (Gábor, 1986; Zafirov y cols., 1990; Terencio y cols., 1991; Alcaraz y cols., 2010).

La capacidad de diferentes sustancias para prevenir el daño genotóxico y citotóxico se mide en términos de su capacidad para absorber el exceso de ROS⁻ generado por la radiólisis del agua (Alcaraz y cols., 2009). Anteriormente se utilizó la prueba de MN para evaluar las capacidades genoprotectoras de varios compuestos. Además, también hemos demostrado que algunos flavonoides puros (por ejemplo, diosmina y apigenina) y algunos extractos polifenólicos de origen vegetal expresaron mayores capacidades radioprotectoras que algunos radioprotectores tradicionales, por ejemplo, compuestos de sulfhidrilo (DMSO y AMF), contra los rayos X tanto “*in vivo*” (Castillo y cols., 2000; Benavente-García y cols., 2002; 2005) e irradiación- y “*in vitro*” (Benavente-García y cols., 2005). Hemos descrito cómo estas capacidades de protección dependen del grado de polimerización y la solubilidad (hidrofobicidad) de las sustancias ensayadas, para modificar su biodisponibilidad (Castillo y cols., 2000; 2001). Informes de otros autores demuestran que los extractos antioxidantes polifenólicos procedentes de diferentes plantas tales como hoja de olivo (*Olea europaea*) y cítricos (citroflavonoides) (Castillo y cols., 2000; 2002; 2010; Benavente y cols., 2002; Benavente-García y cols., 2005) proporcionan alta protección cuando se administra sola.

El ensayo de mutagenicidad “*in vivo*” de micronúcleos de médula ósea del ratón (Takechi y cols., 1985) y el ensayo “*in vitro*” de bloqueo citocinético de micronúcleos con linfocitos humanos irradiados (Gábor, 1986) son dos ensayos citogenéticos basados en el aumento de la frecuencia de micronúcleos. Estos ensayos son las herramientas analíticas más comunes empleadas para evaluar la capacidad mutagénica de una sustancia química o agentes genotóxicos físicos.

El ensayo del bloqueo citocinético de micronúcleos realizado en cultivos directos de los linfocitos humanos descritos por Fenech y Morley (1985), que fue fundado en algunas observaciones iniciales hechas por Carter (1967), parece, en la actualidad a ser una de las mejores pruebas de MN para los fines del establecimiento de dosis de radiación absorbidas en los seres humanos (Kormoš y Köteles, 1988; Ramalho y cols., 1988; Prosser y cols., 1988; Balasem y Ali, 1991; Gatenberg y cols., 1991; Ban y cols., 1993; Kim y cols., 1993; Wuttke y cols., 1993; Fenech, 2000; OIEA, 2011). El ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón “*in vivo*” es uno de los ensayos más ampliamente utilizados para evaluar la genotoxicidad y mutagenicidad en estudios de toxicología a corto plazo (Schmid, 1976; Mazur, 1995b).

El uso de estos dos ensayos y el efecto protector de los diferentes compuestos se pueden evaluar en los modelos experimentales mediante el análisis de la medida en que reducen la frecuencia de MN producido cuando los modelos de prueba están expuestos a diferentes agentes genotóxicos, tales como la radiación ionizante, como llevadas a cabo en este estudio (OCDE, 2004; Stone y cols., 2004; IAEA, 2011). Anteriormente, el equipo utilizó la prueba de MN para demostrar que las lesiones genotóxicas no fueron inducidas en pacientes de medicina nuclear siguiendo procedimientos diagnósticos y terapéuticos, y también para identificar los efectos genotóxicos en dosis más altas en comparación con las dosis utilizadas en los tratamientos de ablación para el cáncer de tiroides o exámenes de radiodiagnóstico complejos.

Recientemente, varios investigadores han aceptado la evaluación de la frecuencia de micronúcleos por el método de micronúcleos con bloqueo citocinético en linfocitos humanos como una herramienta bastante precisa como un dosímetro biológico “*in vivo*” de la exposición a la radiación ionizante (Alcaraz y cols., 2000; Armero y cols., 2000; OIEA, 2011). Esto se convirtió en la aceptación de la recomendación del estudio de micronúcleos después de la primera división mitótica (Fenech, 1993a, 1993b), y también de la obra de diversos autores que establecen relación dosis-efecto sobre la exposición de

los cultivos celulares a diferentes dosis de radiación ionizante (Almássy y cols., 1987a; Ban y cols., 1993).

En este estudio, la frecuencia espontánea o basal de micronúcleos que se encuentra en los linfocitos de sangre periférica no irradiadas fue de 0,02 MN/célula binucleada. Esta tasa espontánea es consistente con el observado por algunos autores (Balasem y Ali, 1991; Kim y cols., 1993), pero algo mayor que el observado por otros (Krepinsky y Heddle, 1983; Aghamohamadi y cols., 1984; Fenech y Morley, 1985a, 1985b). Sin embargo, la mayoría de los estudios revisados recomiendan que los micronúcleos se deben contar en al menos 500 células bloqueadas citocinéticamente con el fin de minimizar estas diferencias (Gatenberg y cols., 1991). En este estudio, la frecuencia de MN espontánea en las muestras control fue de 10 MN/500 CB, coherente con la descrita en varios estudios anteriores (Kim y cols., 1993; Fenech, 2000).

En cuanto a la frecuencia de MN espontánea o basal establecida en eritrocitos policromáticos "*in vivo*", las frecuencias de MN son siempre menos de 5 MN/1000 PCE en los animales control no irradiados y, a menudo se considera como el parámetro de control de calidad de estas preparaciones (Schmid, 1976; Abraham y cols., 1993; Sarma y Kesavan, 1993; Bisht y Uma Devi, 1995; Mazur, 1995a; Singh y cols., 1995a; Henning y cols., 1996). La tasa de MN basal determinada en animales control no irradiados en este estudio fue 3 MN/1000 PCE por lo tanto está dentro de los límites aceptados de esta técnica.

Una extensa revisión de la literatura sobre los ensayos de MN "*in vivo*" retrata tanto la dosis y la respuesta en función del tiempo de inducción de micronúcleos por irradiación. Por lo tanto, uno puede encontrar un trabajo anterior sobre células de médula ósea de ratones irradiados con diferentes dosis de radiación gamma (Jagetia, 1990; Uma Devi y Sarma, 1990; Abraham y cols., 1993), otros en los eritrocitos policromáticos de cerdo (Ludewig y cols., 1991) y la médula ósea de ratón (Lenarczyk y Slowikowska 1995; Mazur, 1995b) irradiados con rayos-X.

En general, las dosis de radiación utilizados en la experimentación son diferentes, pero son por lo general relativamente altas; 0,25 Gy (Singh y cols., 1995; Henning y cols., 1996), 0,5 Gy (Lenarczyk y Slowikowska, 1995; Singh y cols., 1995b), 1 Gy (Sarma y Kesavan, 1993; Bisht y Uma Devi, 1995; Shimoi y col, 1996), 2 Gy (Mazur, 1995b; Singh y cols., 1995b), 6 Gy (Mazur, 1995a) e incluso 8 Gy (Henning y cols., 1996).

En estudios se ha demostrado, aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos inducidos por la exposición a ambos, rayos-X (Mazur, 1995a; 1995b; 2000), y rayos- γ (Brown y cols., 1982; Abraham y cols., 1993; Sarma y kesavan, 1993; Bisht y Uma Devi, 1995; Singh y cols., 1995; Shimoi y col., 1996).

El uso "*in vivo*" de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) en médula ósea de ratón como herramienta, complementa los resultados "*in vitro*" obtenidos con el bloqueo citocinético de micronúcleos ensayado en linfocitos humanos irradiados. La técnica "*in vivo*" permite la evaluación "*in vivo*" de la capacidad de protección de las sustancias ensayadas, teniendo en cuenta las respuestas biológicas en los organismos vivos y las cuestiones de biodisponibilidad. El ensayo de micronúcleos "*in vivo*" fue ideado principalmente para la detección de productos químicos para sus efectos en cromosomas. Las sustancias de ensayo se aplican normalmente subaguda para los mamíferos pequeños y sus efectos se leen en frotis directos en las preparaciones de médula ósea. Fue utilizado anteriormente para determinar los efectos genotóxicos de los agentes físicos tales como RI (Almássy y cols., 1987) y los campos magnéticos (Vijayalaxmi y OBE, 2005). El ensayo de MN en eritrocitos policromáticos de médula ósea (PCE) en ratones que fue desarrollado originalmente por Schmid (1975), es actualmente probablemente el uso más frecuente de pruebas de genotoxicidad "*in vivo*" a corto plazo. Los micronúcleos en eritrocitos policromatófilos (MNPCEs) en células de médula ósea proporcionan un método sencillo y rápido para la detección de daño cromosómico inducido por agentes químicos y físicos (Heddle y Salamone, 1981; Almássy y cols., 1987; Mavournin y cols., 1990; Mazur, 1995a) y los resultados obtenidos en esta prueba son probablemente los más significativos en términos de potencial de riesgo humano (Ashby y

cols., 1997). Un aumento en la frecuencia de MNPCs es una indicación de la inducción de aneuploidía o clastogénico. Por esta razón, los micronúcleos han sido ampliamente utilizados “*in vivo*” e “*in vitro*” para detectar la rotura cromosómica y la pérdida de cromosomas (Kiersch-Volders y cols., 1997; Morita y cols., 2011).

Por esta razón, los resultados obtenidos con respecto a la magnitud de la protección ofrecida por los diferentes tratamientos que se administran antes y después de la exposición de rayos X sugieren la probable existencia de diferentes mecanismos de radioprotección en cada caso. En los tratamientos preirradiación, los efectos radioprotectores (actividad antimutagénica) de compuestos fenólicos se basa teóricamente, como se mencionó anteriormente, en la capacidad de eliminación contra el ROS generado durante la exposición a la radiación, especialmente el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), cuya generación es masiva durante la irradiación de rayos X. A partir de las consideraciones estructurales anteriores, la actividad antimutagénica de los compuestos ensayados dadas como tratamientos de preirradiación es consistente con sus propiedades antioxidantes y afinidades específicas a los radicales libres.

Cuando las sustancias ensayadas se añaden después de la irradiación con rayos X, la probabilidad de que ROS este presente en las células, de acuerdo con la vida media de anión superóxido y radicales hidroxilo, son los radicales lipoperoxy ($\text{R-OO}\bullet$), que son principalmente responsables del daño oxidativo cromosómico continuo. Además, la radiación ionizante aumenta la secreción de enzimas lisosomales y la liberación de ácido araquidónico de las membranas a través de lipo-oxigenasa, la ciclooxigenasa y actividades fosfolipasa lo que aumenta la respuesta inflamatoria celular. Bajo estas condiciones de estrés oxidativo complejas, es muy difícil determinar los elementos estructurales responsables de los datos experimentales obtenidos para la actividad antimutagénica de diferentes tratamientos de postirradiación, aunque algunas consideraciones son posibles (Alcaraz y cols., 2009a).

Todas las sustancias ensayadas (flavonoides y compuestos orgánicos de azufre) parecen actuar a través de su acción antioxidante al eliminar los radicales libres en el medio inducido por la radiación ionizante cuando se aplica a los compuestos orgánicos de azufre sustancias especialmente con puentes disulfuro (SS).

La protección selectiva de las células no cancerosas contra el daño por radiación (efectos radioprotectores) encontrado ha sido atribuida a varios factores. Los mecanismos precisos por los cuales los aminotioles ejercen su acción protectora sobre los tejidos normales no se conocen bien, a pesar de que estos mecanismos pueden ser múltiples. Por lo tanto, hay varios mecanismos propuestos o combinaciones de mecanismos para explicar el efecto protector de los agentes de tiol:

- A nivel molecular ejerce su efecto citoprotector eliminando los radicales libres de oxígeno, mediante la donación de iones de hidrógeno a los radicales o tioles libres y la unión e inactivación de los fármacos citotóxicos (Mazur, 1995a).
- Los tumores son relativamente hipovasculares lo que a nivel fisiológico, induce el agotamiento de oxígeno (hipoxia), hipotermia o shock, bajo pH intersticial y una menor expresión de la fosfatasa alcalina.
- A nivel celular, estimula la recuperación de las células madre hematopoyéticas (Mazur, 1995a; Culy y Spencer, 2001).

Otras sustancias orgánicas de azufre evaluadas fueron la tiourea, 6-n-propiltiouracilo (PTU) y dimetilsulfóxido (DMSO). La capacidad antioxidante de DMSO ha sido ampliamente reconocida y se sabe que es un potente neutralizador y eliminador de los radicales libres inducidos por la radiación, especialmente radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Sus propiedades radioprotectoras también se cree que están mediadas a través de la facilitación de la reparación del ADN de doble filamento roto (Kashino y cols., 2010). DMSO resulta que es más "líquido" que el agua y por lo tanto puede penetrar en los lugares del cuerpo más rápido. El enlace DMSO-agua es 1,3 veces más fuerte que el vínculo agua-agua. Este atributo de unión con agua mejor que las moléculas de agua en sí mismas es altamente significativo. El DMSO como sustituto para el

agua, se mueve rápidamente a través de las membranas celulares y por lo tanto pueden recoger fácilmente los radicales libres, incluso en el nivel intracelular (Szmant y cols., 1975).

En general, más de 300 sustancias diferentes que contienen azufre se ha demostrado que poseen un cierto nivel de protección radiológica. Estos compuestos poseen ciertas características peculiares, con características similares que probablemente representan su capacidad para proteger contra el daño inducido por la radiación ionizante. Estas características incluyen, pero no se limitan a:

1. Son análogos químicos de cisteína (un grupo tiol que contiene aminoácidos). Similar a cisteína con el grupo sulfhidrilo protegido por un fosfato.
2. Estas sustancias tienen su grupo SH separados por dos a tres átomos de carbono del grupo amino básico.
3. Después de haber otro grupo amino separado de la primera por tres átomos de carbono.
4. 600mg/ kg dosis media real.
5. Soluble en agua destilada a un pH de 6, lo cual es indicativo de un alto valor de pKa. (Brown, 1967; Brown et al, 1982).

Sin embargo DMSO y PTU no representan todas estas propiedades que probablemente representan los factores de protección significativamente más bajos. Desafortunadamente, las dosis eficaces radioprotectoras son generalmente tóxicas para los tejidos animales en las dosis recomendadas y se deben administrar antes de la exposición a la radiación. Además, se encontraron diferencias significativas en la radioprotección en la administración después de la irradiación de sustancias. Por ejemplo, cuando la amifostina se administró inmediatamente después de la exposición a los rayos X, que no tenía ningún efecto protector ni DRF.

En principio, todas las sustancias ensayadas parecen actuar como antioxidantes mediante la neutralización de los radicales libres inducidos por la radiación ionizante. De acuerdo con nuestros resultados.

Otros autores son de la opinión de que esta reducción de los radicales peroxi generados durante la radiación por las vitaminas aplicadas sugiere que algún otro tipo de mecanismo de protección está en funcionamiento (Ricardo Da Silva y cols, 1991; Salah y cols., 1995)

Los resultados obtenidos sugieren que esta vía de eliminación radical lipoperóxido es cuantitativamente mayor cuando los compuestos antioxidantes se administran inmediatamente después de la exposición a la radiación ionizante. La distinción entre las actividades antirradicales (vs anión superóxido y radicales hidroxilo) y antilipoperoxidante (vs lipoperoxy radicales) propuestas por Pincemail y cols., (1989) parece razonable, de acuerdo con los datos obtenidos en los modelos pre y postirradiación, y podría ser utilizado para explicar los diferentes comportamientos de los compuestos ensayados en términos de los procesos de peroxidación de lípidos. La actividad antilipoperoxidante de compuestos fenólicos y flavonoides depende de manera compleja de diversos factores, incluyendo la naturaleza del sustrato de lípidos susceptibles a la oxidación, condiciones de cultivo celular e incluso el método utilizado para la evaluación. Los resultados obtenidos muestran que los únicos compuestos con una capacidad radioprotector antimutagénica significativa fueron los compuestos liposolubles.

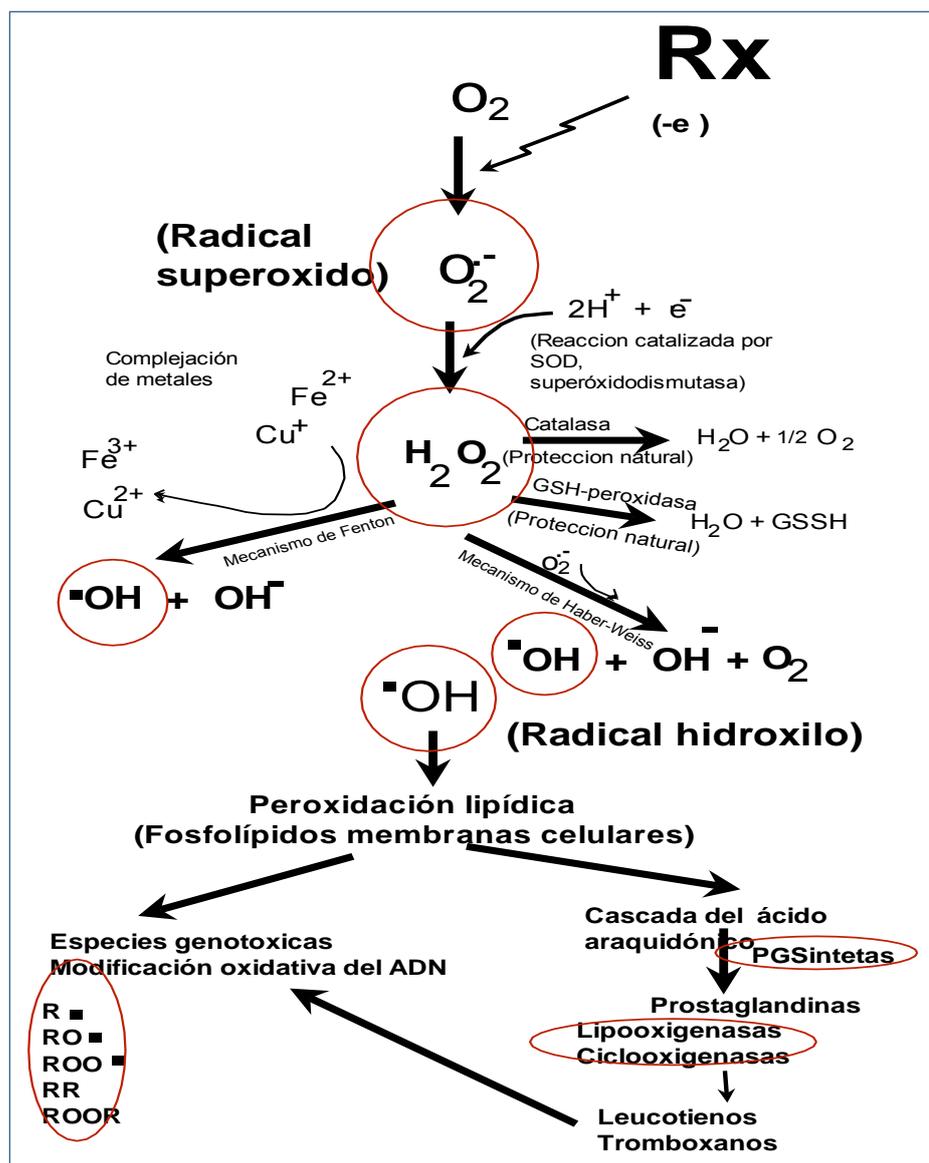


Figura 48. Esquema representativo de los mecanismos de acción y los posibles lugares de acción de antioxidantes (Alcaraz *et al.*, 2013)

Resultados similares con respecto a la reducción del daño cromosómico inducido por radiación ionizante por estas sustancias se han descrito en la literatura usando la misma prueba de micronúcleo de médula ósea con la administración de antioxidantes como la vitamina E (Sarma y Kesavan, 1993), β -caroteno (Abraham y cols., 1993), los extractos de ajo fresco (Singh y cols., 1995b) e incluso otros aglutinantes (Lobachevsky y cols., 2011; Maurya y Devasagayam, 2011). Los acontecimientos recientes en lo que se refiere al desarrollo radioprotector ha demostrado en la capacidad radioprotectora de la luteolina, un flavonoide derivado de plantas de té

utilizando el ensayo de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica (MnRETs) que es una variación de la médula ósea de micronúcleos.

La radioprotección conferida por sustancias después de la exposición a la radiación ionizante no se ha considerado tradicionalmente posible (Travis, 1979) ya que ninguno de los compuestos radioprotectores entonces conocidos (básicamente la aminotioles) fueron capaces de demostrar esta capacidad. Algunos de nuestros resultados son consistentes con los informes de los Konopacka y Rzeszowska-Wolny (2001), que mostró un efecto radioprotector de vitaminas C y E hacia linfocitos expuestos a la radiación de rayos X si se administra antes o después de la irradiación. Sin embargo, se observa el efecto máximo cuando se administra dentro de las primeras horas después de la irradiación.

Los resultados obtenidos con las procianidinas (P90) son consistentes con los resultados obtenidos por otros investigadores y afirman que los principales componentes fenólicos en el vino alcohólico (P90) pueden reducir el daño del ADN inducido por radiación ionizante y peróxido de hidrógeno (Greenrod y Fenech, 2003).

En los estudios llevados a cabo, se han encontrado reducciones similares de la radiación inducida por daño en los cromosomas, utilizando el ensayo de micronúcleo "*in vitro*" y en ensayos de médula ósea de ratón "*in vivo*" debido a la administración de antioxidantes como la vitamina E (Sarma y Kesavan, 1993), β -caroteno (Abraham y cols., 1993), extractos de ajo (Singh y cols., 1995b) e incluso aglutinantes de ADN (Zimmer y Wahnert, 1986; Denison y cols., 1992; Wang y Zheng, 1992; Martin y cols., 2004; 1996). En estos informes, se han demostrado ampliamente diferentes grados de reducción en la ocurrencia de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MnPCEs) de médula ósea de ratón y linfocitos de sangre periférica humana (CBMN).

Algunos flavonoides como la luteolina, quercetina y rutina, conocidas por presentar algunas actividades antioxidantes se han demostrado capaces de inhibir o minimizar los efectos perjudiciales causados por la

radiación ionizante a través de la compactación de los radicales libres inducidos por la radiación (Shimoi y col., 1996). Más recientemente usando el ensayo de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica (MnRETs) de ratas, se ha demostrado el efecto radioprotector de luteolina, un flavonoide derivado de té (Lee y cols., 2004).

Los mecanismos de acción de estos compuestos están influenciados por factores estructurales tales como la presencia o ausencia de azúcar en uno de los grupos hidroxilo (formas glicosiladas), el número total de posiciones hidroxilados, y la existencia de grupos hidroxilo metilados. Estos elementos estructurales de los flavonoides son esenciales para la activación y/o inhibición de múltiples sistemas de enzimas que participan en las cascadas de enzimas en la regulación metabólica, por ejemplo, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, fosfolipasa y sintetasas de prostaglandina (Martínez y cols., 2002b).

Las propiedades antioxidantes y la capacidad de captación de radicales libres de los flavonoides en general se han atribuido principalmente a la presencia de los tres principales elementos estructurales químicos:

1. La presencia de la estructura de ortodifenol en el anillo B del esqueleto de flavonoides (grupo catecol), que confiere una mayor estabilidad a la aroxiloradical formado (ARO•).
2. El doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C en conjugación con la función 4-oxo. La presencia de dos anillos de catecol, conjugados con un grupo de ácido carboxílico es, probablemente, el elemento estructural más importante en la actividad antioxidante de este compuesto (Del Baño y cols., 2003b).
3. La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 de los anillos C y A, respectivamente.

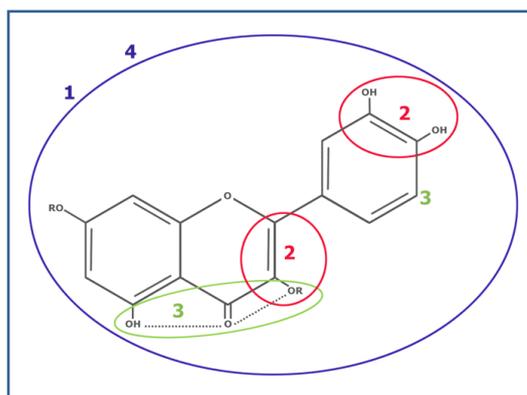


Figura 49. Posibles mecanismos de acción de los ensayos de flavonoides:

1. La nube de electrones puede romper la cadena de reacción de los radicales libres atrapando radicales libres.
2. El grupo Catecol en el anillo B y doble esqueleto C2-C3 puede capturar radicales libres.
3. Los grupos Hidroxil en las posiciones 3 y 5 del anillo C y A respectivamente pueden facilitar o promover la complejación de metales.
4. Algunos compuestos flavonoides y fenoles son conocidos por inhibir la actividad de la síntesis de prostaglandinas.

Las capacidades de eliminación de radicales libres, las capacidades de complejación de metales y las propiedades generales de los flavonoides antioxidantes vendrían por lo tanto determinadas por una combinación de estos tres elementos estructurales básicos. Además, otros elementos pueden participar como la presencia de tres grupos hidroxilo adyacentes en la estructura flavonoide que permite la conjugación de esqueletos flavonoides adyacentes para formar polímeros.

Los resultados sugieren que ninguna estructura química única puede estar relacionada únicamente con las capacidades genoprotectoras de los compuestos ensayados. Esto sugiere que los efectos observados antimutagénicos de alguna forma, son proporcionales a la capacidad antioxidante, a pesar de que también son dependientes de las propiedades de biodisponibilidad de la sustancia de ensayo en el medio de ensayo. En consecuencia, se observó que la flavan-3-oles mostró la capacidad de protección más alta de todos los polifenoles ensayadas (Castillo y cols., 2000; 2001), mientras que otros flavonoides con una alta capacidad antiproliferativa y antineoplásicos mostraron una menor capacidad antimutagénica (Yañez y cols., 2004; Benavente-García y cols., 2005; Martínez-Conesa y cols., 2005a).

Cuando se administran agentes protectores antes de la irradiación de muestras de sangre, la capacidad radioprotectora parece estar dictada por la capacidad antioxidante del compuesto, independientemente de los parámetros estructurales que confieren esta propiedad para el compuesto. Sin embargo, cuando el tratamiento se administra después de la irradiación de muestras de sangre, la eficacia radioprotectora parece ser debida a la lipofilia del compuesto, además de sus propiedades antioxidantes.

Los requisitos básicos de un radioprotector ideal son ser menos tóxico y altamente eficaz a dosis no tóxicas, con efecto antioxidante y la capacidad de captación de radicales libres junto con una buena biodisponibilidad y propiedades de solubilidad. Ellos deben ser capaces de actuar a través de múltiples mecanismos y no estar limitados por el tiempo de aplicación.

Cuando estas sustancias se administran después de la exposición a la radiación ionizante, los radicales hidroxilo y superóxido han desaparecido del entorno biológico debido a sus vidas medias extremadamente cortas, causando una cascada de eventos que conducen a la lesión por radiación, por lo tanto, se buscan algunas de estas características adicionales en los radioprotectores. Los resultados obtenidos muestran que los lípidos antioxidantes son capaces de atrapar los radicales peroxi formados en las membranas celulares y produciendo de ese modo un mayor grado de protección contra el daño inducido por la radiación ionizante. De esta manera, estas sustancias pueden trabajar en contra de la eliminación del producto en la peroxidación de lípidos y reducir sus efectos perjudiciales mediante la producción de productos menos dañinos cuando reaccionan con los radicales libres asociados con la peroxidación de lípidos.

Cuando los compuestos polifenólicos se añaden después del tratamiento de rayos-X, la única ROS que estará presente en las células de acuerdo con la vida media de anión superóxido y radicales hidroxilo son los radicales lipoperoxido $R-OO\cdot$, que son responsables del daño oxidativo cromosómico continuo. Además, la radiación ionizante aumenta la secreción de

la enzima lisosomal y libera ácido araquidónico de las membranas a través de lipo-oxigenasa, ciclo-oxigenasa y actividades fosfolipasa, el aumento de la respuesta de las células inflamatorias. Las lipoxgenasas y ciclooxigenasas están involucradas en otros procesos tales como la formación de endoperóxido, prostaglandinas, leucotrienos, etc

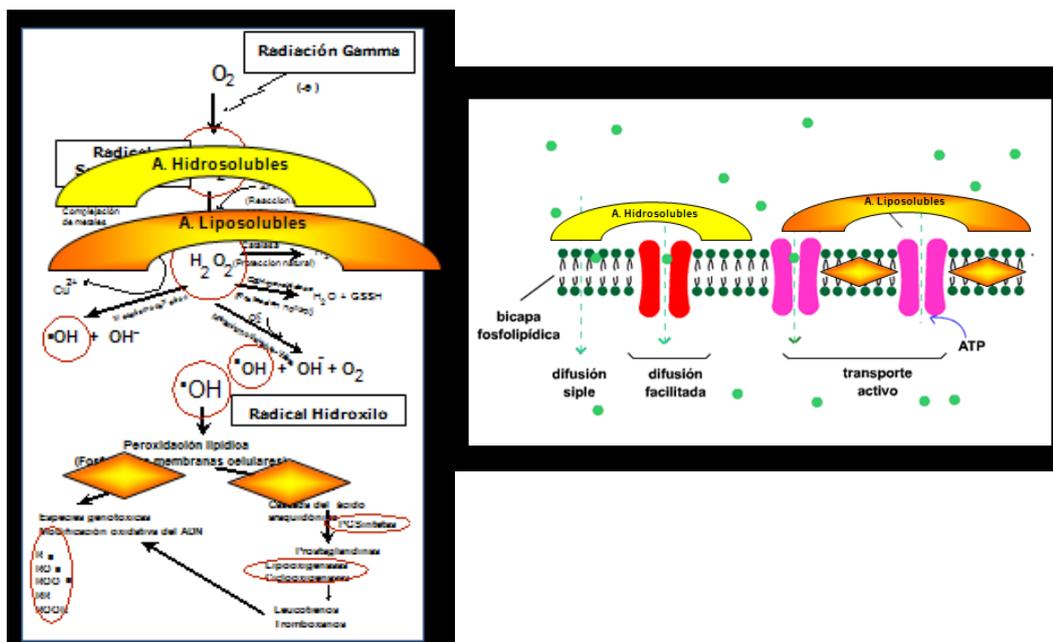


Figura 50. Esquema representativo de localización y mecanismos de acción por los cuales las sustancias antioxidantes reducirían el daño inducido por la radiación ionizante.

2. EXPERIENCIAS CON CAMPOS MAGNÉTICOS (ELF-MF)

Nuestro objetivo fundamental ha sido utilizar la experiencia de nuestro equipo de investigación en el uso del test de micronúcleos, tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, en la determinación del daño cromosómico inducido por la radiación ionizante en el análisis y determinación de un posible efecto genotóxico similar inducido por la exposición a campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja.

Nuestro **primero objetivo** ha sido establecer un protocolo experimental que permitiera detectar un posible efecto genotóxico por la exposición a este tipo de campo magnético. En la introducción hemos comentado las dos limitaciones más importantes del test de MN en su utilización experimental:

1. Sensibilidad limitada con un umbral de detección (20 cGy con respecto a la radiación ionizante).
2. Limitación a estudios de exposiciones cortas (sólo horas o semanas, dependiendo de las características del ensayo de MN utilizado).
3. Además, la revisión bibliográfica de la literatura científica añade una tercera característica: escasa, pequeña o limitada capacidad genotóxica de los campos magnéticos ELF-EM con múltiples resultados positivos y/o negativos descritos de forma intermitente, en función del protocolo experimental ensayado.

Por todo ello, en nuestra primera experiencia hemos seleccionado el grado máximo de exposición que nos ha sido posible en función de las técnicas que disponemos:

1. La técnica de Micronúcleos en médula ósea de ratón permite la exposición de los animales entre la 9ª y 12ª semana de vida según los requisitos del test; permite en ratones un máximo de

4 semanas de experimentación continuadas frente a sólo unas 2-4 horas del test “*in vitro*” sobre linfocitos humanos con bloqueo citocinético.

2. El máximo campo magnético obtenido (200 μ T), con la menor variabilidad ($\pm 10\%$), lo hemos utilizado en exposición corporal total durante 24 horas continuadas.

En estas condiciones nuestros resultados muestran un incremento significativo en la frecuencia de aparición de MN en los PCEs de médula ósea, que expresa el daño cromosómico inducido por el campo electromagnético ensayado en nuestras condiciones experimentales. Nuestros resultados confirman los resultados previamente descritos por Udroui y cols., (2006) al emplear campos magnéticos de 650 mT en exposiciones continuas intraútero de embriones de rata durante 21 días; con los descritos por Singh y cols., (1997) en pequeñas exposiciones de 2,1 mT en ratas durante 3 días, con sólo 1mT en exposiciones de 4 horas diarias durante 45 días (Erdal y cols., 2007) o 4-5 microteslas en ratones expuestos durante 40 días (Okudan y cols., 2011). También apoyan los resultados obtenidos en exposiciones con densidad de flujo mucho mayores (3 - 4,7 T) en médula de ratón expuesto de 1 a 3 días (Suzuki y cols., 2001).

Por el contrario, sólo Fralem y cols., (2006) y Reddy y cols., (2010) no describen ningún incremento en la frecuencia de micronúcleos tras una exposición corta de 2 días o 56 días a un campo de 1 mT.

Nuestros resultados también muestran que el incremento en la aparición de MN no presenta un carácter acumulativo con el tiempo de exposición. Las exposiciones durante los periodos estudiados (1, 2, 3 y 4 semanas) no muestran diferencias significativas entre sí, mostrando un incremento continuado de la frecuencia de MN determinada pero no un incremento progresivo o acumulativo no parece dependiente del tiempo de exposición utilizado.

Nuestros resultados parecen mostrar una respuesta orgánica a una estimulación crónica que permanece estable durante el tiempo de

exposición y que, posiblemente pueda cesar tras la exposición como han descrito algunos autores (Lee y cols., 2011) en pacientes expuestos a Resonancia Magnética. Sin embargo, no hemos encontrado referencias previas en la literatura científica en animales de experimentación comparable que permita confirmar esta situación.

Posteriormente, hemos pretendido comprobar nuestros resultados con el otro test de MN en linfocitos con bloqueo citocinético. La manipulación de las muestras de sangre, desde la obtención en el donante sano hasta la realización del cultivo sólo permite unas 4 horas de tiempo máximo para su uso experimental sin un deterioro apreciable de la muestra sanguínea.

Estas características de manipulación del test, han limitado en nuestro medio el tiempo de exposición a 2 horas en el interior del campo magnético. Sin embargo, el campo magnético máximo disponible alcanza una intensidad 10 veces mayor (2 T) que el ensayo con el test de médula ósea “*in vivo*” (200 mT).

Los resultados que hemos obtenido confirman los previamente descritos en médula ósea; ya que determinamos un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN en las muestras expuestas durante 2 horas a un campo de 2 T, lo que expresaría el daño cromosómico inducido por el campo magnético utilizado y, por tanto, también la capacidad genotóxica del mismo en estas condiciones experimentales.

Nuestros resultados confirman el efecto genotóxico descrito por otros autores al utilizar el test de MN sobre linfocitos expuestos a campos magnéticos ELF-MF con 5 mT (Scasselatti y cols., 2004), 1500 mT (Simi y cols., 2008) o 3000 mT (Lee y cols., 2011), 2,5 mT (Zeni y cols., 2002); y en el test de MN sobre otro tipo de células como las epiteliales de tráquea en rata (Paile y cols., 1995), escamosas de cáncer humano (Simkó y cols., 1998), líquido amniótico humano (Simkó y cols., 1999b), células Jurkat (Pasquini y cols., 2002), fibroblastos humanos (Winker y cols., 2005); e, incluso utilizando

otras técnicas de MN utilizadas para valoraciones medio-ambientales sobre células vegetales (Trad-MN) (Fatigone y cols., 2005).

Nuestros resultados también parecen apoyar los resultados de genotoxicidad previamente descritos en trabajadores expuestos crónicamente a campos magnéticos durante actividades industriales (Celikler y cols., 2009), o en exposiciones con fines diagnósticos en pacientes estudiados con Resonancia Magnética (Simi y cols., 2008; Lee y cols., 2011).

Nuestro **segundo objetivo** trata de relacionar el efecto genotóxico inducido por la radiación ionizante con el posible efecto genotóxico, si lo podíamos detectar, inducido por la exposición a los campos magnéticos de extremadamente baja frecuencia ELF-MF.

Nuestros resultados muestran diferencias significativas entre la capacidad genotóxica inducida por las radiaciones ionizantes respecto a la inducida por los campos magnéticos utilizados en este estudio. Sin embargo, lo que expresan nuestros resultados con claridad es que si la interpretación de los resultados obtenidos en la irradiación con rayos X es adecuada; los resultados obtenidos en la exposición a estos campos magnéticos de extremadamente baja frecuencia también inducen lesión cromosómica y daño genotóxico; abriendo todas las posibilidades de interpretación en el significado y posibles consecuencias que estas lesiones puedan inducir en el organismo expuesto.

Numerosas teorías e hipótesis se han descrito durante las últimas décadas que pudieran constituir posibles mecanismos de acción mediante los cuales pudieran explicarse estos efectos biológicos sobre las células, tejidos y organismos expuestos a estos campos magnéticos ELF-MF.

Muchos investigadores han publicado en revistas internacionales de prestigio haber observado efectos celulares (Nordenson y cols., 1984; 1988; 1994; Cohenetal 1986a; 1986b; Rosenthal y Obe, 1989; García-Sagredo y Monteagudo, 1991; KhalilandQassem, 1991; Lai y Singh, 1997a, 1997b y

1997c) y, de hecho en todo el organismo con efectos ELF-EMF (Milham, 1982; NRPB, 1992, Theriault y cols., 1994), lo que inevitablemente da lugar a la pregunta sobre el mecanismo subyacente por lo que los ELF-EMF ejercen su efecto. Nuestro conocimiento de la física no es suficientemente adecuado para determinar mecanismos; somos expertos en citogenética. Sin embargo, podemos enunciar un conocimiento básico de las distintas ideas y modelos que han sido propuestas para explicar los efectos biológicos que se han observado. Por ello, sólo pretendemos enumerar los mecanismos más significativos que se han propuesto.

Una de las principales áreas de controversia involucra efectos "térmicos" vs "no térmicos". Todos los sistemas vivos poseen energía térmica cinética, que es la energía de fondo del movimiento de las moléculas dentro de las células que están involucrados en los procesos vitales. Está universalmente aceptado que la kT dentro de una célula es inferior a la de los campos electromagnéticos ELF, y si se observa un efecto, probablemente habría que descartar cualquier modelo térmico como una explicación para cualquier efecto biológico. Esto significaría que se ha de buscar un modelo "no térmico", que es donde surgen los problemas y controversias. En nuestro estudio, en condiciones medioambientales totalmente controladas, no se ha producido ninguna variación térmica que pudiera explicar estos efectos biológicos (Abdul Wahab, 2005).

Se ha propuesto otra serie de modelos innovadores en el transcurso de las últimas décadas. Uno de los que ha recibido una atención especial son los modelos basados en la resonancia.

Resonancia ciclotrón de iones (modelo de Liboff)

El término "ciclotrón" en sí se deriva de la llamada acelerador ciclotrón - una herramienta familiar en la física atómica desde la década de 1930 - en el que las partículas cargadas se mueven en el interior de una cámara evacuada montado entre los polos de un imán. Bajo la influencia de la MF, la partículas circulan en espiral a una frecuencia fija (la frecuencia de ciclotrón) mientras que reciben impulsos de aceleración regulares a partir de un

campo eléctrico aplicado en el mismo punto en cada órbita de modo que su energía aumenta de una manera resonante (Hombre, 1992; Abdul Wahab, 2005).

El modelo de resonancia implica la acción combinada de los campos geomagnéticos estáticos y ELF- MF (GMFs). Liboff (1985) propuso por primera vez el modelo ICR como un mecanismo que podría facilitar el movimiento de iones tales como Ca^{++} a través de canales de la membrana en presencia de la GMF y un débil ELF- MF sintonizado a la frecuencia de ICR. Para el valor típico de la GMF sobre la superficie de la tierra (50 ILT), las frecuencias de resonancia de muchos iones biológicamente importantes tales como Na^+ , K^+ , y Ca^{++} caen dentro de la gama ELF. Esto ha dado base para asumir que una resonancia ciclotrón podría provocar a los fenómenos observados. Muchos autores desarrollaron el tema de resonancia en magnetobiología (Liboff y cols., 1987; Smith y cols., 1987; Parkinson y Hanks, 1989; Liboff y Parkinson, 1991; Durney y cols., 1992; Gait y cols., 1993; Coulton y cols., 1993). Sin embargo, no han recibido con reconocimiento claro debido a la falta de una correcta justificación física. Aunque, por otro lado, estos experimentos mostraron el papel esencial de los iones, especialmente Ca^{++} , en magnetobiología (Abdul Wahab, 2005).

Modelo de resonancia paramétrico o pulsos quantum

Lednev (1991) propuso este modelo, en el que combinan estática y campos ELF que afectan a los niveles de energía vibracional y las probabilidades de transición de iones determinada (por ejemplo, Ca^{++} iones unidos a calmodulina). Shuvalova y cols., (1991) han descrito los datos sobre el efecto de los campos combinados en la tasa de fosforilación dependiente de calmodulina en la miosina, que parece apoyar las predicciones del modelo Lednev. Sin embargo, otro estudio que utilizó una técnica óptica para estudiar Ca^{++} de unión a la calmodulina para colorantes metalocrómicos, no encontró ningún efecto de los campos estáticos y variables en el tiempo combinados bajo las condiciones de resonancia descritos por el modelo de Lednev (Bruckner-Lea y cols., 1992). Blanchard y Blackman (1994) afirmaron que el

modelo original Lednev contenía errores matemáticos que daban lugar a una predicción incorrecta en la probabilidad de transición de iones entre los niveles de energía. Su revisión del modelo Lednev, presentó un razonable buen ajuste de los datos sobre los efectos inhibitorios combinados estáticos y EMF en el crecimiento de neuritas en cultivos de células PC-12 estimuladas por el factor de crecimiento nervioso (Blackman y cols., 1994). Estas diferencias en el modelo de Lednev original, exigen nuevas investigaciones; sin embargo, independientemente de los detalles, otros autores se han opuesto firmemente a este modelo Adair (1992a).

Modelo resonancia ión ciclotrón de Zhadin y Fesenko

Zhadin y Fesenko (1990) propusieron este modelo en el que los niveles de energía de rotación de iones enlazados son bombeados por un combinado estático y ELF-MFs. Argumentos similares, a los presentados contra del modelo Lednev se podrían plantear contra el modelo Zhadin y Fesenko (1990). Además, la tasa de transición de un ión enlazado a un estado excitado que se predijo mediante el modelo Zhadin y Fesenko es tan baja que una transición se producirá sólo una vez en varios meses según los niveles de los campos magnéticos ambientales .

Modelo de resonancia estocástico

El concepto de resonancia estocástica se presentó por primera vez en el documento de Benzi y cols., (1981); se ha propuesto como un posible mecanismo mediante el cual los campos electromagnéticos débiles podrían ser detectados en los sistemas biológicos (Kruglikov y Dertinger, 1994). La Resonancia estocástica sería el fenómeno por el cual la adición de un nivel óptimo de ruido a una entrada de información que se transporta débil para ciertos sistemas no lineales puede aumentar el contenido de información en sus salidas. Por ejemplo, en algunos sistemas, como los receptores de radio, subir el volumen para poder escuchar una señal débil en medio de tanto ruido por lo general, sólo da lugar a subir el ruido también. Sin embargo, en otros sistemas, el aumento de la cantidad de ruido ambiental en realidad aumenta (hasta cierto punto) la relación de señal-ruido a través de una cooperación no

lineal complicada entre el sistema y el detector. Este efecto, conocido para operar en las neuronas y los láseres, se ha denominado resonancia estocástica. Las fluctuaciones del ruido podría ser estocástico (es decir, totalmente al azar), pero la OFA detección de la señal deseada puede ser maximizado mediante la regulación del ruido.

En este sentido, los experimentos preliminares con células de cangrejos de río han dado pruebas de la detección mejorada de los estímulos débiles en la presencia de ruido aleatorio (Wiesenfeld y Moss, 1995). Se ha sugerido que la resonancia estocástica sería la base para este efecto, y tal vez estaría presente en muchos otros ejemplos de detección de la señal débil en los sistemas sensoriales (Douglas y cols., 1993). También se ha argumentado que la resonancia estocástica es un mecanismo plausible para la detección de campos electromagnéticos periódicos en condiciones en las que la relación de señal-ruido es menor (Kruglikov y Dertinger, 1994). En estos momentos, esta hipótesis merece una evaluación y pruebas experimentales en sistemas biológicos que permitan confirmar estos resultados.

Magnetita biogénica

Las magnetitas biogénicas son cristales microscópicos naturales de magnetita que están dentro del cuerpo de algunos animales y bacterias, y que son capaces de ser magnetizados. Un campo magnético externo influiría en tales cristales por lo que tendrían a cambiar su orientación. Por consiguiente, los cristales ejercerían presión sobre el tejido adyacente y causarían una respuesta biológica. En numerosos casos, es posible explicar por este motivo la recepción biológica de un campo magnético débil estático. Una serie de cadenas de partículas de magnetita de dominio único, de tamaño uniforme, incrustados en el tejido etmoidal en la parte frontal del cráneo de peces de salmón se ha utilizado para una navegación precisa (Kirschvink y cols., 1992). Cristales microscópicos de magnetita se encuentran también en el cerebro de algunas aves que son conocidas por navegar bien en el GMF (Kirschvink y cols., 2001). Trazas de la magnetita también se han encontrado en bacterias magnetotáticas (Blakemore, 1982; Torres de Araujo, 1986).

Contaminación magnética

La contaminación ferromagnética es una de las ideas de la zona de magnetobiología propuesta por Kobayashi y cols., (1995). Estos autores sugirieron que las pequeñas partículas magnéticas contaminantes están presentes no sólo en el polvo del aire, sino también depositadas en la superficie de los dispositivos de laboratorio; y penetran en plásticos, vidrios, productos químicos e incluso en agua purificada. Su tamaño medio es de aproximadamente 10^{-5} cm. Las partículas se componen de elementos que poseen una capacidad de magnetización espontánea. Los autores han descrito que los procedimientos de laboratorio de rutina, como vertido o/y aclarado, dan lugar al enriquecimiento de los cultivos celulares por contaminantes. El número de partículas en los cultivos podría ser 10 veces más que en las células. Los autores postularon que la partícula magnética absorbida por una membrana celular podría transferir su energía a las estructuras adyacentes biofísicas pudiendo con ello, por ejemplo, activar los canales iónicos mecánicamente.

Estos mecanismos propuestos para explicar los efectos magnetobiológicos están muy fragmentados y no resuelven el problema biológico básico. De hecho, muchos organismos unicelulares, en el que la magnetita está ausente, son capaces de reaccionar a los campos magnéticos. La respuesta en muchos casos es de características compleja “no lineal”, dependiendo de los parámetros del campo ensayado

Otros mecanismos de interacción propuestos

La evidencia actual sugiere que los procesos celulares pueden ser influenciados por los campos electromagnéticos débiles (Nair y cols., 1989; Adey, 1990; Anderson, 1991; Tenforde, 1992). También se considera establecido que los efectos representan una perturbación débil del estado homeostático, y que los campos electromagnéticos parecen provocar un estrés al que la célula se puede adaptar, en la mayoría de los casos, sin consecuencias catastróficas. Sin embargo, no hay dudas de cambios en la membrana citoplasmática, que representa el límite entre el ambiente externo y

el interior del organismo. Estos cambios son medibles y caracterizan la respuesta celular a ciertos campos electromagnéticos débiles (Azanza y Del Moral, 1993; Goodman y cols., 1995). Lawrence y Adey (1982) han descrito que en la membrana celular existen receptores estratégicamente situados, donde actúan como detectores de mensajes eléctricos y químicos que llegan a la superficie celular; la transducción de ellos y su transmisión al interior de la célula. A través de estos receptores las membranas celulares desempeñarían un triple papel en la detección de la señal, su amplificación y la transducción al interior de la célula.

Así, la cuestión más importante estaría en la comprensión de las vías por las que las señales ELF-EMF pueden influir en la membrana y en las funciones celulares por los que estos campos son transducidos dentro de la membrana celular. Una posibilidad es considerar las vías bioquímicas complejas que se han descrito como mecanismos por los que una célula viva se comunica con su entorno extracelular. Clásicamente se ha descrito que Tenforde (1993), la unión de una sustancia mensajera a un receptor específico dentro de la membrana desencadena una cascada de eventos que involucra cambios conformacionales en proteínas asociadas a la membrana. Estos eventos, a su vez conducen a la transducción de señales y a la amplificación en la producción de segundos mensajeros citoplasmáticos y efectores internos como conexión Ca^{++} y quinasas que regulan la transcripción del ADN y la biosíntesis de proteínas (Aikon & Rasmussen, 1988; Luben 1991; Tenforde, 1993). Por ello, del mismo modo, la interacción de los campos EMF con las membranas biológicas podría, en principio, dar lugar a alteraciones en cada componente del proceso de señalización que se produce en las células vivas.

Una hipótesis, Tenforde (1993), es que los campos y las corrientes inducidas, en particular por una EMF aplicada, inician eventos electroquímicos dentro de la membrana celular, que son elementos importantes de la transducción de la señal primaria y producirían un proceso de amplificación. Estos eventos bioquímicamente mediados, producirían respuestas frente al segundo mensajero que desencadenarían cambios en la

biosíntesis de macromoléculas, y tal vez, alteraciones en el crecimiento celular, la diferenciación celular, y en las capacidades funcionales (Tenforde, 1993).

Al examinar las respuestas “*in vivo*” e “*in vitro*” de las células a los campos electromagnéticos de extremada baja frecuencia existe un creciente consenso respecto a la secuencia de acontecimientos que llevan a la transducción celular de señales EMF y su amplificación a nivel celular. Luben y cols., (1982) han descrito que los campos electromagnéticos pulsados con frecuencias de repetición de EMF inhiben la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en las células óseas en su respuesta a la hormona paratiroidea (PTH) en los receptores de superficie. Por otra parte, Cain y cols., (1987) describieron que la acción PEMF puede provocar la incapacidad de la unión PTH-receptor para activar la subunidad alfa de la proteína G; lo que interfiere con la secuencia de sucesos que activan la adenilato ciclasa en la interfase de la membrana citoplasmática. Byus y cols., (1984) en linfocitos humanos describieron que la exposición a campos de microondas con modulación de amplitud en frecuencias ELF provoca la inhibición de las no-AMPC-quinatas dependientes de las histonas.

Algunos otros modelos de interacción se han propuesto para explicar posibles interacciones entre los campos electromagnéticos y los sistemas biológicos; pero ninguno ha obtenido mayor relevancia como modelo de trabajo: 1) las corrientes parásitas eléctricas, inducidas por la alternancia de MF (Lerchl y cols., 1990; Schimmelpfeng y cols., 1997); 2) la interferencia de los estados cuánticos de los iones y electrones enlazados (Binhi, 1997, 1997a); 3) excitaciones coherentes (Frohlich y Kremer, 1983), y 4) reacciones de radicales libres magnetosensibles y otros mecanismos de "Spin" (Grundler y cols., 1992).

Muy recientemente, Simko y cols., (2004) han propuesto un mecanismo de genotoxicidad tras la exposición a campos electromagnéticos que se deberían a mecanismos inducidos secundarios, tales como la producción de radicales libres, los cuales deben ser inducidos por diferentes

vías de transducción de señales. Los radicales libres serían productos intermedios en los procesos naturales y son liberados durante el metabolismo celular normal. Estos productos intermedios se producen en la respiración mitocondrial y constituyen también una característica clave en el proceso de fagocitosis celular. Especulan sobre la base de estudios en ratas que los campos electromagnéticos pueden ser un estímulo para inducir un "estado activado" de la célula, como la fagocitosis; que aumentaría la liberación de radicales libres, y a su vez, conduciría a los eventos genotóxicos. Se prevé que la exposición a campos electromagnéticos aumentaría los niveles de radicales libres que éstos podrían causar lesiones agudas y crónicas en diferentes procesos celulares. Las vías que se proponen serían: 1) la activación directa de macrófagos (u otras células) por la exposición a corto plazo a los CEM conduce a la producción de radicales libres; 2) Un aumento en el tiempo de actividad de los radicales libres producidos por los EMF que conduciría a la persistencia de elevadas concentraciones localizadas de radicales libres. 3) la exposición a CEM a largo plazo podría conducir a un aumento crónico de nivel de radicales libres, causando posteriormente una inhibición de la secreción de melatonina. Tomados en conjunto, que describen que podrían conducir a una mayor incidencia de daño en el ADN y, por tanto, a un aumento del riesgo de desarrollo de tumores.

A pesar de todos estos mecanismos descritos, también se ha propuesto que los potenciales efectos biológicos inducidos por los ELF-EMF no estarían soportados, si existieran por ninguno de estos mecanismos físicos conocidos (Valsers y cols., 1997; Alcaraz y cols., 2012; 2013).

Con todo lo anterior, siguiendo con nuestra experiencia con las radiaciones ionizantes, hemos podido ensayar algunas sustancias antioxidantes que disminuyen el efecto genotóxico inducido por éstas al conseguir eliminar los radicales libres radioinducidos y considerados como el mecanismo lesivo conocido mediante el cual causarían estas lesiones las radiaciones ionizantes (Alcaraz y cols., 2009; 2010).

Pensábamos que si también conseguíamos disminuir la frecuencia de MN inducidos por los campos magnéticos ELF-EMF mediante la administración de alguna de estas sustancias antioxidantes, podríamos poner de manifiesto que también su capacidad lesiva (o mecanismo de acción) podría ser a través de la producción de radicales libres.

Desde el punto de vista biológico, está ampliamente aceptado que los ELF-EMF son incapaces de transferir energía a las células en cantidades suficientes para romper los enlaces químicos y con ello lesionar directamente el ADN (Valberg y cols., 1997; Alcaraz y cols., 2013). Por esta razón, los ELF-EMF no se consideran agentes genotóxicos directos. Su contribución al desarrollo del cáncer y de otras lesiones podría explicarse al inducir acontecimientos indirectos o secundarios dentro del organismo vivo (Valberg y cols., 1997; Vijayalaxmi y Obe, 2005).

Numerosos estudios describen mecanismos a través de los cuales los ELF-EMF pueden ejercer sus efectos biológicos: originando situaciones de estrés oxidativo (Okano, 2008; Yocus y cols., 2008; Amara y cols., 2009; Kocacic y Somanathan, 2010; Emre y cols., 2011; Ganj-Vrhovac y cols., 2011), incrementando la producción o la actividad de radicales libres (Simkó y cols., 1998), activando enzimas antioxidantes (Politanski y cols., 2010), modulando la activación de otras enzimas (Vijayalaxmi y Obe, 2005), reforzando la proliferación celular (Verheyen y cols., 2003; Trillort y cols., 2012), alterando el ciclo celular (Erdal y cols., 2007) o incrementando la apoptosis celular (Emre y cols., 2011; Garj-Vrhovac y cols., 2011).

Nosotros hemos estudiado sustancias antioxidantes con significativa capacidad antimutagénica y genoprotectora contra el daño cromosómico inducido por la radiación ionizante, esperando encontrar un efecto protector similar contra el daño genotóxico inducido por ELF-EMF.

Si la producción de radicales libres o el incremento de su actividad o incluso la inducción de un estrés oxidativo fueran la causa o el mecanismo responsable mediante el cual los campos ELF-EMF tienen capacidad genotóxica, nosotros hubiéramos encontrado un efecto protector similar al descrito previamente frente al daño genotóxico inducido por la radiación

ionizante. Sin embargo, nuestro estudio ha puesto de manifiesto que estas sustancias no tienen ninguna capacidad genoprotectora contra el daño cromosómico inducido por ELF-EMF, sugiriendo por ello que probablemente se produce por un mecanismo de acción lesivo diferente (Alcaraz y cols., 2012; 2013).

En estos momentos está en discusión el auténtico significado de estos incrementos inducidos por agentes físicos y químicos en la frecuencia de MN como resultados de los diferentes tests o ensayos de genotoxicidad. Actualmente se acepta que un incremento en el nivel o número de alteraciones cromosómicas (y en nuestro caso eso es lo que significa el incremento de MN) puede ser indicativo de un incremento en el riesgo de padecer cáncer. Por ello, algunos autores resaltan que estos estudios deberían ser cuidadosamente considerados en la evaluación de un posible daño genotóxico tras la exposición a campos magnéticos (Navarro y cols., 2004; Serna y cols., 2008; Alcaraz y cols., 2011). Sin embargo, los resultados de otros estudios epidemiológicos indican que estas alteraciones cromosómicas no tienen necesariamente que ir asociadas con un incremento demostrado de cáncer (Navarro y cols., 2008). Por ello, aún cuando el test detecta un incremento en la frecuencia de MN, y por tanto, incremento en el daño cromosómico de los animales o de las células expuestas, queda por determinar cuáles podrían ser las consecuencias biológicas reales en cuanto al riesgo de padecer una lesión tardía, y que estarían sin establecer todavía (Navarro y cols., 2004; Alcaraz y cols., 2013). En estos momentos, el incremento de MN podría considerarse como un biomarcador predictivo de susceptibilidad que manifiesta un incremento de riesgo para padecer algunas enfermedades (El-Zen y cols., 2011).

Con todo, lo que muestran nuestros resultados es que al menos una de las posibles vías de promoción de cáncer, como es el incremento de las lesiones en el material genético, está relacionada con la exposición a campos magnéticos débiles de extremada baja frecuencia (ELF-EMF) (Alcaraz y cols., 2012; 2013).

VI. Conclusiones

VI. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en esta memoria de Tesis Doctoral son las siguientes:

1. Se ha determinado un **efecto genotóxico inducido por los campos electromagnéticos ensayados**, ya que el incremento de la frecuencia de micronúcleos muestra el daño cromosómico producido.
2. La capacidad genotóxica inducida por los campos electromagnéticos ensayados **es menor que la inducida por las dosis de radiación administrada**, y no muestra un efecto acumulativo con el incremento del tiempo de exposición en ellos.
3. Las **sustancias antioxidantes** con capacidad genoprotectora frente al daño inducido por radiación ionizante **no muestra efecto protector** frente al daño genético inducido por los campos electromagnéticos ensayados; lo que sugiere un mecanismo lesivo **diferente a la producción de radicales libres** para inducir el daño cromosómico determinado.

VII. Resumen

VII. Resumen.

Se estudia un posible efecto genotóxico inducido por campos electromagnéticos de extremada baja frecuencia (ELM-EMF) mediante el aumento de lesiones cromosómicas inducidas determinadas por el incremento de la frecuencia de aparición de micronúcleos tanto *in vivo*, sobre eritroblastos policromatófilos en médula ósea de roedor, como *in vitro* sobre linfocitos humanos con bloqueo citocinético con citochalasina B; comparándolo con el daño genotóxico inducido por rayos X. Posteriormente se han administrado sustancias antioxidantes con capacidad radioprotectora (dimetilsulfóxido, 6-n-propil-2-tiouracilo, procianidinas y un extracto de flavonoides cítricos) para cuantificar un posible efecto protector también en el daño inducido por la exposición a los campos electromagnéticos ensayados. Nuestros resultados muestran un efecto genotóxico inducido por los campos electromagnéticos ensayados que no disminuye con la administración de los antioxidantes y sugieren un mecanismo lesivo sobre el material genético diferente al de la producción de radicales libres inducido por los campos electromagnéticos ensayados.

VII. Abstract.

A possible genotoxic effect induced by extremely low-frequency electromagnetic fields (ELM-EMF) on chromosome damage determined by measuring the increase in the induction of micronuclei formation both *in vivo*, in rodent bone marrow polychromatophilic erythroblasts, and *in vitro*, in cytokinesis-blocked human lymphocytes, is presented; comparing these with the genotoxic damage induced by X-rays. Subsequently, antioxidant substances with radioprotective capacities (dimethylsulphoxide, 6-n-propyl-2-thiouracil, procyanidins and an extract of citrus flavonoids) were administered in order to quantify the possible protective effects of these substances against the damage induced by exposure to the electromagnetic fields tested. Our results shows a genotoxic effect induced by electromagnetic fields that does not decrease with administration of antioxidants and thus suggest a different mechanism of damage on genetic material produced by free radical from that caused by the electromagnetic field tested.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. ABDUL W.M. (2005). Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on human chromosomes. Thesis Doctor of Philosophy in Genetics. Institute of Molecular BioSciences Massey University, New Zealand.
2. ABRAHAM S.K., SARMA L., KESAVAN P.C. (1993). Protective effects of chlorogenic acid, curcumin in P-carotene against γ -radiation-induced in vivo chromosomal damage. **Mutat. Res.** **303:109-112.**
3. ACEVEDO C. (2005). Efecto protector de diferentes flavonoides frente al daño genotóxico inducido por radiación electromagnética. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
4. ADAIR R. (1992a). Criticism of Lednev's mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 13:231-235.
5. ADEY WR. (1990). Nonlinear electrodynamics in cell membrane transductive coupling. In "Membrane Transport and Information Storage" (Aloria RC, Curtain CC, & Gordon LM. eds.), pp. 1-27. Alan R. Liss, New York.
6. AGHAMOHAMMADI S.Z., HENDERSON L., COLE R.J. (1984). The human lymphocyte micronucleus assay. Response of cord blood lymphocytes to gamma irradiation and bleomycin. **Mutat. Res.** **130:395-401.**
7. ALBERT G.C., MCNAMEE J.P., MARRO L., BELLIER P.V., PRATO F.S., THOMAS A.W. (2009). Assessment of genetic damage in peripheral blood of human volunteers exposed (whole-body) to a 200 microT, 60 Hz magnetic field. **Int. J. Radiat. Biol.** **85 (2):144-152.**
8. ALCARAZ M., ACEVEDO C., CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., ARMERO D., VICENTE V., CANTERAS M. (2009). Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. **Br. J. Radiol.** **82:605-609.**
9. ALCARAZ M., ACEVEDO C., VICENTE V., CASTILLO J., BENAVENTE-GARCÍA O., HERNÁNDEZ H., ARMERO D., SERNA A. (2006). Protective effects of carnosic acid against chromosomal damage induced in human lymphocytes by radiation gamma. **Radioprotección** **49(XIII):23-25.**
10. ALCARAZ M., ANDREU-GÁLVEZ M., SÁNCHEZ-VILLALOBOS J.M., ACHEL D.G., OLMOS E., MARTÍNEZ-HERNANDEZ C.M. (2011a). Genotoxicidad y campos magnéticos-ELF: una revisión a través del ensayo de micronúcleos. **Radioprotección** **71:29-33.**
11. ALCARAZ M., ARMERO D., MARTÍNEZ-BENEYTO Y., CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., FERNANDEZ H., ALCARAZ-SAURA M., CANTERAS M. (2011b). Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. **Dentomaxillofac Radiol.** **40:310-314.**
12. ALCARAZ M., GÓMEZ-MORAGA A., DATO M.J., NAVARRO J.L., CANTERAS M. (2002). Efecto genotóxico inducido por la exposición a rayos X durante exploraciones complejas de radiodiagnóstico médico. **Oncología** **25(3):159-168.**
13. ALCARAZ M., ROSA B., NAVARRO J.L., DATO M.J., ACEVEDO C., CANTERAS M. (2001). Citokinesis Block micronucleus in human lymphocytes: Effect of low dose radiation in vascular radiology. Conferencia internacional sobre la protección radiológica en los pacientes. 26-30 de Marzo, Málaga, p.803-805.
14. ALCARAZ M. y VELASCO E. (2013). Bases físicas y biológicas del Radiodiagnóstico Médico. Servicio de Publicaciones Universidad de Murcia, Murcia.
15. ALKON D.L. y RASMUSSEN H. (1988). A spatial-temporal model of cell activation. **Science** **239:998-1005.**

16. ALMASSY Z., KREPINSKY A.B., BIANCO A., KOTELES G.J. (1987). The present state and perspectives of micronucleus assay technique in radiation protection. **Int. J. Rad. Appl. Instrum.** **38(4):241-249.**
17. AMARA S., DOUKI T., GAREL C., FAVIER A., SAKLY M., RHOUMA K.B., ABDELMELEK H. (2009). Effects of static magnetic field exposure on antioxidative enzymes activity and DNA in rat brain. **Gen Physiol Biophys.** **28(3):260-265.**
18. ANDERSON LE. (1991). ELF: Exposure levels, bioeffects, and epidemiology. *Health Phys.* 61:41-46.
19. ARMERO D., BERNAL F., ROSA B., GOMEZ-MORAGA A., FELICES J.M., ALCARAZ M. (2000). Test de micronúcleos en linfocitos de pacientes irradiados durante exploraciones de radiología vascular. XII Congreso Nacional de Enfermería Vascular, 31 de mayo y 1-3 de Junio, Barcelona, p.72.
20. ASHBY J., FLETCHER K., WILLIAMS C., ODUM J., TINWELL H (1997). Lack of activity of estradiol in rodent bone marrow micronucleus assays. **Mutat. Res.,** **395,83-88.**
21. AZANZA M.S. y DEL MORAL A. (1994). Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to Biomagnetism. *Prog. Neurobiol.* 44:517-601.
22. BACQ Z.M. (1965). **Chemical protection against ionizing radiation**, Charles C Thomas, Springfield, IL.
23. BADR F.M., EL HABIT O.H.M., HARRAZ M.M. (1999). Radioprotective effect of melatonin assessed by measuring chromosomal damage in mitotic and meiotic cells. **Mutat. Res.** **444:367-372.**
24. BAKKA A., JOHNSEN A.S., ENDRESSEN L., RUGSTAD H.E. (1982). Radioreistance in cells with high content of metallothionine. **Experientia** **38:381-383.**
25. BALASEM A.N. y ALI A.S. (1991). Establishment of dose-response relationship between dosis of Cs 137 gamma rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. **Mutat. Res.** **259:133-138.**
26. BAN S., DONOVAN M.P., COLOGNE J.B., FUJITA S., AWA A.A. (1993). Radiosensitivity of atomic bomb survivors as determined with a micronucleus assay. **Radiol. Res.** **134:170-178.**
27. BARABOI V.A., BELOSHISKII P.V., KRASIUK A.N., KORKACH V.I. (1994). Oxygen dependent processes in the irradiated organisms. **Fiziol. Zh.** **40:116-128.**
28. BATE SMITH E.C. (1962). **Phytochemical Ecology**. Academic Press (J:B.Harbone, ed.), London, pp.:45-56.
29. BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., DEL RIO J.A (1993). Changes in Neodiosmin levels during the development of citrus aurantium leaves and fruits. Postulation of a Neodiosmin Biosynthetic Pathway. **J. Agric. Food Chem.** **41:1916-1919.**
30. BENAVENTE-GARCÍA O., CASTILLO J., LORENTE J., ALCARAZ M. (2002). Radioprotective Effects In vivo of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves Against X-Ray Induced Chromosomal Damage: Comparative Study versus several Flavonoids and Sulfur-Containing compounds. **J. Med. Food.** **5 (3):123-133.**
31. BENAVENTE-GARCÍA O., CASTILLO J., LORENTE J., ALCARAZ M., YAÑEZ J., MARTÍNEZ C., VICENTE V., LOZANO J.A. (2005). Antiproliferative activity of several

phenolic compounds against melanoma cell lines: relationship between structure and activity. **Cancer Prevention 16 (4):30-34.**

32. BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., SABATER F., DEL RIO J.A. (1995). Characterization of a S-adenosyl-L-methionine: Eriodictyol 4'-O-methyltransferase from citrus aurantium. **Plant. Physiol. Bioch. 33:263-271.**
33. BENAVENTE-GARCÍA O., CASTILLO J., SABATER F., DEL RIO J.A. (1997). 4'-O-methyltransferase from citrus. A comparative study in citrus aurantium, c.paradisi and tangelo nova. **Plant. Physiol. Siochem 36:789-794.**
34. BENZI R., SUTERA A., VULPIANI A. 1981. The mechanism of stochastic resonance. *J. Phys.A* 14:453-458.
35. BIAKOV V.M. y STEPANOV S.V. (1997). Mechanism of primary radiobiologic action. **Radiat. Biol. Radioecol. 37:469-474.**
36. BINHI V.N. (1997a). The mechanism of magnetosensitive binding of ions by some proteins. *Biophysics* 42(2):317-322.
37. BISHT K.S. y UMA DEVI P. (1995). Modification of radiation induced chromosomal damage and micronucleus induction in mouse bone marrow by misonidazole and hyperthermia. **Acta Oncol. 34:913-918, 1995.**
38. BLACKMAN C.F., BLANCHARD J.P., BENANE S.G., HOUSE D.E. 1994. Emperical test of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with PC-12 cells. *Bioelectromagnetics* 15:239-260.
39. BLAKEMORE R.P. 1982. Magnetotactic Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 36:217-238.
40. BLANCHARD J.P. y BLACKMAN C.F. 1994. Clarification and application of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with biological systems. *Bioelectromagnetics* 15:217-238.
41. BOMBARDELLI E. y MORAZZONI P. (1993). The flavonoids. New pespectives in biological activities and therapeutics. **Chim. Oggi 3:25-28.**
42. BOREK C., ONG A., MASON H., DONAHUE L., BIAGLOW J. (1986). Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83:1490-1494.**
43. BORS W., HELLERS W., MICHEL C., SARAN M. (1990a). Radical hemistry of flavonoids antioxidant. In: *Antioxidants in therapy and preventive medicine*; Emerit, Ed. Pienun Press; New York 1:165-170.
44. BORS W., HELLERS W., MICHEL C., SARAN M. (1990b). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In: *Methods in enzymology*, Packer, L., Glazer, A. N., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 186:343-355.
45. BROWN D.Q., PITTOCK J.W., RUBINSTEIN J. (1982). Early results of the screening program for radioprotectors. **Int. J. Radiat. Biol. Phys. 5:565-570.**
46. BROWN, P.E. (1967).- Mechanism of action of aminothioli radioprotectors. **Nature., 213:363-364.**
47. BRUCKNER-LEA C., DURNEY C.H., JANATA J., RAPPAPORT C., KAMINSKI M. 1992. Calcium binding to metallochromic dyes and calmodulin in the presence of combined AC-DC magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 13:147-162.
48. BYUS C.V., LUNDAK R.L., FLETCHER R.M., ADEY W.R. 1984. Alteration in protein

kinase activity following exposure of cultured human lymphocytes to modulated microwave fields. *Bioelectromagnetics* 5:341-351.

49. CAIN C.D., ADEY W.R., LUBEN R.A. 1987. Evidence that pulsed electromagnetic fields inhibit coupling of adenylatecyclase by parathyroid hormone in bone cells. *J. Bone Mineral Res.* 2:437-441.
50. CAPIZZI R.L. y OSTER W. (1995). Protection of normal tissue from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine: clinical experiences. **Eu. J. Cancer** 31(1):S8-13.
51. CARTER L.J. (1967). Environmental pollution: scientists go to court. **Science** 158 (808):1552-1556.
52. CASTILLO J., ALCARAZ M., BENAVENTE-GARCÍA O. (2010). Antioxidant and Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract. In: Preedy VR and Watson RR (ed). *Olives and Olive oil in Health and disease prevention*. Oxford: Academic Press, pp. 951- 958.
53. CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA J., DEL BAÑO J.M., LORENTE J., ALCARAZ M., DATO M.J. (2001). Radioprotective effects against to chromosomal damage induced in Human Lymphocytes by X-rays as a function of polymerisation grade of grape seed extracts. **J. Med. Food** 4(2):117-123.
54. CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., DEL RIO J.A. (1992). Naringin and Neohesperidin levels during development of leaves, flower buds and fruits of citrus aurantium. **Plant. Physiol.** 99:67-73.
55. CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., DEL RÍO J.A. (1994). Study and optimization of citrus flavonone and flavones elucidation by reverse phase HPLC with several mobile phases: Influence of the structural characteristics. **J. Liquid Chrom.** 17:1497-1523.
56. CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., LORENTE J., ALCARAZ M., REDONDO A., ORTUÑO A., DEL RIO J.A. (2000). 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.** 4:1730-1745.
57. CASTILLO J., PIEDAD M., MARCHANTE C., DEL BAÑO M.J., LORENTE J., BENAVENTE-GARCÍA O., ALCARAZ M. (2002). Citroflavonoids and flavan-3-ols. High radioprotective capacity and prospects for health. **Nutrafoods** 1(1):27-39.
58. CELIKLER S., AYDEMIR N., VATAN O., KURTULDU S., BILALOGLU R. (2009). A biomonitoring study of genotoxic risk to workers of transformers and distribution line stations. **Int J Environ Health Res.** 19(6):421-430.
59. CHAUDHARY D., CHANDRA D., KALE R.K. (1999). Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. **J. Ethnopharmacol.** 64:1-7.
60. CHO Y.H. y CHUNH M.V. (2003). The effect of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) on the frequency of micronuclei and sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by benzo(a)pyrene. **Toxicol Lett.** 143:37-44.
61. CHO Y.H., JEON H.K., CHUNG H.W. (2007). Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on delayed chromosomal instability induced by bleomycin in normal human fibroblast cells. **J. Toxicol. Environ. Health. Part A.** 70 (15-16):1252-1258.
62. CILLARD J. y CILLARD P. (1988). Composés phenoliques et radicaux libres. **Pharma Sci** 4:592-596.

63. COHEN M.M., KUNSKA A., ASTEMBORSKI L.A., MCCULLOCH D., PASKEWITZ D.A. (1986b). The effect of low-level 60-Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. 1. Mitotic rate and chromosome breakage in human peripheral lymphocytes. *Bioelectromagnetics* (N.Y.) 7:415-423.
64. COULTON L.A. y BERKER A.T. 1993. Magnetic fields and intracellular calcium: Effects on lymphocytes exposed to conditions for ' cyclotron resonance'. *Physics in Medicine and Biology* 36(3):347-360.
65. COUNTRYMAN P.I. y HEDDLE J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.** **41:321-332**.
66. CRITCHFIELD J.W., WELSH C.I., PHANG J.M., YEH G.C. (1994). Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT15 colon cells. Activation Of P-glycoprotein as a Putative mechanism. **Siochem. Pharmacol.** **48:1437-1445**.
67. CULY C.R. y SPENCER C.M (2001). Amifostine: An update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving Chemotherapy or Radiotherapy and its Potential Therapeutic Application in myelodysplastic syndrome. **Drugs.** **61(5):641-684**.
68. DARMON N., FERNANDEZ Y., CAMBON-GROS C., MITJAVILA S. (1990). Quantification of the scavenger capacity of different flavonoids with regard to the superoxide ion. **Food Addit. Contam.** **7(1):S60-3**.
69. DARMON N., FERRANDIZ V., CANAL M.T., MITJAVILLA S. (1987). Activite antiradicalaire de flavonoides vis-à-vis de l'anion superoxide et du radical hydroxyle. **Liaison Grupe Polyphenols Bull,** **3:158-162**.
70. DAS N.P y PEREIRA T.A. (1990).- Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: Structure-activity relationships. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** **4:255-258**.
71. DEL BAÑO M.J., CASTILLO J., BENAVENTE-GARCÍA O., LORENTE J., MARTÍN-GIL R., ACEVEDO C., ALCARAZ M. (2006). Radioprotective-antimutagenic effects of Rosemary Phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma rays. **J.Agric.Food. Chem.** **54 (6):2064-2068**.
72. DENISON L., HAIGH A., D'CUNHA G., MARTIN F. (1992). DNA ligands as radioprotectors: molecular studies with Hoechst 33342 and Hoechst 33258. *Int. J. Radiat. Biol.* **61:69-81**.
73. DIXON R.A., DEY P.M., WHITHEAD I.M. (1986). Purification and properties of chalcone isomerase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. **Biochem. Biophys. Acta** **715:25-33**.
74. DOUGLAS J.K., WILKINS L., PANTAZELOU E., MOSS E. 1993. Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptor by stochastic resonance. *Nature* 365:337-340.
75. DRAGARIC I.G. y DRAGARIC Z.D. (1971). **The radiation chemistry of water**. pp. 256, Academic Press, New York.
76. DUARTE J., PEREZ-VIZCAINO F., ULTRILLA P., JIMENEZ J., TAMARGO J., ZARZUELO A. (1993). Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* 24:857-862.
77. DUMEY C.H., KAMINSKI M., ANDERSON A.A., BRUCKNER-IEA C., JANATA J., RAPPAPORT C. (1992). Investigation of AC-DC magnetic field effects in planar phospholipid bilayers. *Bioelectromagnetics* 13:19-33.

78. DURANTE M., GEORGE K., YANG T.C. (1996). Biological dosimetry by interphase chromosome painting. **Radiat. Res.** **15:53-60.**
79. EBEL J. (1986). Hytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Ann. Rev. Phytopathol.** **24:235-264.**
80. ELHAJOUJI A., TIBALDI F., KIRSCH-VOLDERS M. (1997). Indication for tresholds of chromosome non- disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 12:133-140.
81. EL-ZEN R., VRAL A., ETZEL C.J. (2011). Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis.** **26:101-106.**
82. EMRE H., CETINER S., ZENCIR S., UNLUKURT I., KATHRAMAN Y., TOPEN Z. (2011). Oxidative stress and apoptosis in relation to exposure to magnetic fields. **Cell Biochem Biophys.** **59:71-77.**
83. ERDAL N., GÜRGÜL S., CELIK A. (2007). Cytogenetic effects of extremely low frequency magnetic field on Wistar rat bone marrow. **Mutat Res.** **630(1-2):69-77.**
84. FATIGONI C., DOMINICI L., MORETTI M., VILLARINI M., MONARCA S. (2005). Genotoxic effects of extremely low frequency (ELF) magnetic fields (MF) evaluated by the Tradescantia micronucleus assay. **Environ Toxicol.** **20(6): 585-591.**
85. FEDOROCKO F. y MACKOVA O. (1996). Radioprotective effects of combination broncho-vaxom, a macrophage activator and indomethacin, an inhibitor of prostaglandin production: relationship to myelopoiesis. **Eur. J. Haematol.** **56:54–61.**
86. FENECH M. (1993a). The citokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutat. Res.** **285(1):35-44.**
87. FENECH M. (1993b). The citokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. **Environ. Health. Perspect.** **285(3):101-107.**
88. FENECH M. (2000). The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.** **455(1-2):81-95.**
89. FENECH M. (2007). Cytokinesis block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc.** **2007 (5):1084-104.**
90. FENECH M., BAGHURST P., LUDERER W., TURNER J., RECORD S., CEPPI M., BONASSI S. (2005). Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis** **26(5):991-999.**
91. FENECH M., BONASSI S., TURNER J., LANDO C., CEPPI M., CHANG W.P., HOLLAND N., KIRSCH-VOLDERS M., ZEIGER E., BIGATTI M.P., BOLGNESI C., CAO J., DE LUCA G., DI GIORGIO M., FERGUSON L.R., FUCIC A., LIMA O.G., HADJIDEKOVA V.V., HRELIA P., JAWORSKA A., JOKSIC G., KRISHNAJA A.P., LEE T.K., MARTELLI A., MCKAY M.J., MIGLIORE L, MIRKOVA E., MULLER W.U., ODAGIRI Y., ORSIERE T., SCARFI M.R., SILVA M.J., SOFUNI T., SURALLES J., TRENTA G., VOROBTSOVA I., VRAL A., ZIJNO A. (2003). Human MicroNucleus Project. Intra and interlaboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. **Mutat. Res.** **534(1-2):45-64.**
92. FENECH M. y MORLEY A.A. (1985a). Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.** **147:29-36.**

93. FENECH M. y MORLEY A.A. (1985b). The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. **Mutat. Res.** **148:99-105.**
94. FERREIRA A.R., KNAKIEVICZ T., PASQUALI M.A., GELAIN D.P., DAL-PIZZOL F., FERNÁNDEZ C.E., DE SALLES A.A., FERREIRA H.B., MOREIRA J.C. (2006). Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring. **Life Sci.** **80(1):43-50.**
95. FILLAT C., RODRIGUES-GIL J.E., GUINOVRT J.J. (1992). Molybdate and tungstate act like vanadate on glucose metabolism in isolated hepatocytes. **Biochem. J.** **282:659-663.**
96. FRAHM J., LANTOW M., LUPE M., WEISS D.G., SIMKO M. (2006). Alteration in cellular functions in mouse macrophages after exposure to 50 Hz magnetic fields. *J. Cell. Biochem.* 99(1):168-177.
97. FRIDOVICH I. (1978). **The biology of oxygen radicals.** *Science* 201:875-880.
98. FROHLICH H. y KREMER F. 1983. (Eds.) *Coherent Excitations in Biological Systems.* Springer-Verlag, New York.
99. FURUSE M., TSUNEOKA K., UCHIDA K., NOMOTO K. (1997). Acceleration of granulocytic cell recovery in irradiated mice by a single subcutaneous injection of a heat killed *Lactobacillus casei* preparation. **J. Radiat. Res.** **38:111-120.**
100. GABOR M. (1986). Anti-inflammatory anti-allergic properties of flavonoids. *Progress in Clinical and Biological Research* 213, 471-480. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships;* Cody, V., Middleton E., Harborne J.B., Beretz A., Eds.; *Progress in Clinical and Biological Research* 213; Alan R. Liss Inc.: New York; pp. 471-480.
101. GAIT S., SANDBLOM J., MAMNERIUS Y., HOJEVIK P., SAALMAN E., RAPPAPORT C. (1993). Experimental search for combined AC and DC magnetic field effects on ion channels. *Bioelectromagnetics* 14:315-327.
102. GALATI E.M., MONFORTE M.T., KIRJAVAINEN S., FORESTIERI A., TROVATO A., TRIPODO M.M. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I) Antiinflammatory and analgesic activity. **Farmacol,** **40:709-712.**
103. GARAJ-VRHOVAC V. (1999). Micronucleus assay and lymphocyte mitotic activity in risk assessment of occupational exposure to microwave radiation. **Chemosphere** **39(13):2301-2312.**
104. GARAJ-VRHOVAC V., FUCIC A., HORVAT D. (1992). The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vivo. **Mutat. Res.** **281:181-186.**
105. GARCIA-SAGREDO J.M., MONTEAGUDO J.L. (1991). Effect of low-level pulsed electromagnetic fields on human chromosomes in vitro: analysis of Chromosomal aberrations. *Hereditas* 115:9-11.
106. GARJ-VRHOVAC V., GAJSKI G., PAZANIN S., SAROLIC A., DOMIJAN A.M., FLAJS D., PERAICA M. (2011). Assessment of cytogenetic damage and oxidative stress in personnel occupationally exposed to the pulsed microwave radiation of marine radar equipment. **Int J Hyg Environ Health.** **214:59-65.**
107. GATENBERG H.W., WUTTKE K., STREFFER C., MULLER W.U. (1991). Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. **Radiat. Res.** **128:276-281.**

108. GAURAS I. y GAURAS H. (1987). The use of ACE inhibitors in hypertension. In: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, Eds. J.B. Kostis and E. De Felice, pp 93–122, Liss, New York.
109. GLOWE P.J., GLICK J.H., WEILER C. (1984). Phase I trials of WR 2721 and cisplatinum. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** **10:1781–1787.**
110. GOODMAN E.M, GREENEBAUM B., MARRON M.T. (1995). Effects of Electromagnetic Fields on Molecules and Cells. *Int. Rev. Cytol.* **158:279-338**
111. GRAB D., LOYAL R., EBEL J. (1985). Elicitor induced phytoalexin synthesis in soybean cells: changes in the activity of chalcone synthase mRNA and the total population of traslatable mRNA. **Arch. Biochem. Biophys.** **243:523-529.**
112. GREENROD W. y FENECH M. (2003). The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide -and ionizing radiation- induced DNA damage in vitro. **Mutagenesis** **18(2):119-126.**
113. GRUNDLER W., KAISER F., KEILMANN F., WALLECZEK J. (1992). Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems. *Naturwissenschaften* **79:551-559.**
114. GUENECHEA G., ALBELLA B., BUEREN J.A., MAGANTO G., TUDURI P., GUERREO A., PIVEL J.P., REAL A. (1997). AM218, a new polyanionic polysaccharide, induces radioprotection in mice when administered shortly before irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **71:101–108.**
115. HAHN S.M., DeLUCA A.M., COFFIN D., KRISHNA C.M., MITCHELL J.B. (1998). In vivo radioprotection and effects on blood pressure of the stable free radical nitroxides. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** **42:839–842.**
116. HAHN S.M., KRISHNA C.M., SAMUNI A., DEGRAFF W., CUSCELA D.O., JOHNSTONE P., MITCHELL J.B. (1994). Potential use of nitroxides in radiation oncology. **Cancer Res.** **54(7):2006–2010.**
117. HAHN S.M., SULLIVAN F.J., DeLUCA A.M., BACHER J.D., LIEBMANN J., KRISHNA M.C., COFFIN D., MITCHELL J.B. (1999). Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. **Radical. Biol. Med.** **27:529-535.**
118. HANSON W.R., HOUSEMAN K.A., COLLINS P.W. (1988). Radiation protection in vivo by prostaglandins and related compounds of the arachidonic acid cascade. **Pharmacol. Ther.** **39: 347–356.**
119. HANSON W.R., ZHEN W., GENG L., HUNTER N., MILAS L. (1995). The prostaglandin E1 analog, misoprostol, a normal tissue protector, does not protect four murine tumors in vivo from radiation injury. **Radiat. Res.** **142:281–287.**
120. HARAPANHALLI R.S., NARA V.R., YAGHMAI V., AZURE M.T., GODDU S.M., HOWELL R.W., RAO D.V. (1994). Vitamins as radioprotectors in vivo: II Protection by vitamin A and soyabeen oil against radiation damage caused by internal radionucleides. **Radiat. Res.** **139:115–122.**
121. HARSHMAN K.D. y DERVAN P.B. (1985). Molecular recognition of B-DNA by Hoechst 33258. **Nucleic Acids Res.** **13:4825–4835.**
122. HAYASHI M., SOFUNI T., ISHIDATE M. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutat. Res.** **120:241-243.**
123. HEDDLE J.A. y CARRANO A.V. (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragment. **Mutat. Res.** **44:63-69.**

124. HEDDLE J.A. y SALOMONE M.F. (1981). Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity. **Environ. Health. Persp.** **39:23-27.**
125. HENNIG U.G., WANG Q., GEE N.H., VON BORSTEL R.C., HENNING U.G (1996). Protection and repair of gamma-radiation-induced lesions in mice with DNA or deoxyribonucleoside treatments. **Mutat Res.**, **350(1):247-54.**
126. HENSELEY M.L., SCHUCHTER L.M., LINDLEY C., MEROPOL N.J., COHEN G.I., BORDER G., GRADISHAR W.J., GREEN D.M., LANGDON R.J., MITCHELL R.B., NEGRIN R., SZATROWSKI T.P., THIGPEN J.T., VON HOFF D., WASSERMAN T.H., WINER E.P., FISTER D.G. (1999). American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for use of chemotherapy and radiotherapy protectants. **J. Clin. Oncol.** **17:3333-3355.**
127. HEO H.Y., LEE S.J., KWON C.H., KIN S.W., SOHN D.H., AU W.W. (1994). Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. **Mutat. Res.** **311:225-229.**
128. HERTOOG M.G.L., FESKEENS E.J.M., HOLLMAN C.H., KATAN M.B., KROMHOUT D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases: de Zutphen elderly study. **Lancet** **342:1007-1011.**
129. HIGHLY M.S., UNDERHILL C.R., PARNIS F.X., KARAPETIS C., RANKIN E., DUSSEK J., BRYANT B., ROWLAND C., HODSON N., HUGHES J., HARPER P.G. (1999). Treatment of invasive thymoma with single agent ifosfamide. **J. Clin. Oncol.** **17:2737-2744.**
130. HOGSTEDT B. (1984). Micronuclei in lymphocytes which preserve cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. **Mutat. Res.** **130:63-72.**
131. HOROWITZ R. y GENTILI B. (1977). Flavonoids constituents of Citrus. In: Citrus Science and Technology, 397-426.
132. HSU H.Y., YANG J.J., HO Y.H., LIN C.C. (1999). Difference in the effects of radioprotection between aerial and root parts of Lycium chinese. **J. Ethanopharmacol.** **64:101-108.**
133. HWANG P.L. y RYAN R.J. (1981). Tungstate stimulates adenylate cyclase. **Endocrinology** **108:435-439.**
134. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. (2001). **Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual.** Technical Reports. Series N° 405. IAEA, Viena.
135. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. (2011). **Cytogenetic Dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies,** IAEA, Vienna.
136. JAMMET H.P., BERNHARDT J.H., BOSNJAKOVIC B.F.M., CZERSKI P., GRANDOLFO M., HARDER D., KNAVE B., MARSHALL J., REPACHOLI M.H., SLINEY D.H., STOLWIJK D.H. (1990). Interim guidelines on limits of exposure to 50/60 Hz electric and magnetic fields. **Health Phys.** **58:113-122.**
137. JAGETIA G.C. (1990). Frequency of micronucleated cells in the mouse bone marrow after exposure to various doses of γ -irradiation. **Mutat Res.** **230:45-48**
138. JOSHIMA H., OHARA H., AOKI Y. (1992). The effect of OK-432 upon erythropoietic recovery in sub-lethally irradiated mice: A preliminary report. **J. Radiat. Res.** **33:290-300.**
139. KAGI J.H.R. y SCHAFFER A. (1988). Biochemistry of metallothioneine. **Biochemistry** **27:8509-8515.**

140. KALECHMAN Y., SHANI A., ALBECK M., SREDNI B. (1995a). Induction of acute phase proteins in mice and humans by treatment with AS101, an immunomodulator with radioprotective properties. **Immunopharmacol** **29:149–158**.
141. KALECHMAN Y., ZULOFF A., ALBECK M., STRASSMANN G. (1995b). Role of endogenous cytokines secretion in radioprotection conferred by the immunomodulator Ammonium trichloro-(dioxethylene-0,0')tellurate. **Blood** **85:1555–1561**.
142. KAMAT J.P., BOLOOR K.K., DEVASAGAYAM T.P.A., VENKATACHALAM S.R. (2000). Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by gamma-radiation in rat liver mitochondria. **J. Ethnopharmacology** **71:425–435**.
143. KASHINO G., LIU Y., SUZUKI M., MASUNAGA S-i., KINASHI Y., ONO K., TANO, K., WATANABE M. (2010). An Alternative Mechanism for Radioprotection by Dimethyl Sulfoxide; Possible Facilitation of DNA Double-strand Break Repair. **J. Radiat. Res.**, **51:733–740**.
144. KAUL T.N., MIDDLETON E., OGRA P.L. (1985). Antiviral effects of flavonoids on human viruses. **J.Med.Virol.** **15:71-79**.
145. KHALIL A.M. y QASSEM W. 1991. Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetics. *Mutation Res.* 247:141-146.
146. KHOJASTEH N.H., ZAKERINIA M., RAMZI H., HAGHSHENAS M. (2000). A new regimen of MESNA (2-mercaptoethanesulfonate) effectively prevents cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplant recipients. **Transplant. Proc.** **32:596**.
147. KIANG J.G., FUKUMOTO R., NIKOLAI GORBUNOV V. (2012). Lipid peroxidation after ionizing leads to apoptosis and autophagy. In: *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, Lipid Peroxidation, A Catala* (ed). pp. 261–278. ISBN 978-953-51-0716-3, DOI: 10.5772/48189.
148. KIM S.H., CHO C.K., KIM T.H., YOO S.Y., KOH K.H., YUN H.G. (1993). Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast neutron irradiations. **Anticancer. Res.** **13:1587-1591**.
149. KIRSCHVINK L.L., KOBAYASHI-KIRSCHVINK A., KIRSCHVINK S.I. (1992). Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc. Nat. Acad Sci. USA* **89:7683-7687**.
150. KIRSCHVINK L.L., WALKER M.M., DIEBEL C.E. (2001). Magnetite-based magnetoreception. *Current Opinion in Neurobiology* **11(4):462-467**.
151. KLETA R. (1999). Cyclophosphamide and mercaptoethanesulfonate therapy for minimal lesion glomerulonephritis. **Kidney Int.** **56:2312–2313**.
152. KOBAYASHI A.K., KIRSCHVINK J.L., NESSON M.H. (1995). Ferromagnetism and EMFs. *Nature* **374(6518):123**.
153. KOCACIC P. y SOMANATHAN R. (2010). Electromagnetic fields: mechanism, cell signaling, other bioprocesses, toxicity, radicals antioxidants and beneficial effects. **J Recept Signal Transduct Res.** **30:214-226**.
154. KONOPACKA M. (1996). Vitamines as radioprotectors of normal cells. **Postepy Hig. Med. Dosw.** **50:145–156**.

155. KONOPACKA M. y REZESZOWSKA-WOLNY J. (2001). Antioxidant vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. **Mutat. Res.** **491(1-2):1-7.**
156. KONOPACKA M. y ROGOLINSKI J. (2004). Thiamine prevents X-ray induction of genetic changes in human lymphocytes in vitro. **Acta Biochim. Pol.** **51 (3):839-843.**
157. KOOSTSTRA M. (1994). Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. **Plant. Mol. Biol.** **26:771-774.**
158. KORMOS C. y KOTELES G.J. (1988). Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. **Mutat. Res.** **199:31-35.**
159. KREPINSKY A.B. y HEDDLE J.A. (1983). Micronuclei as rapid and inexpensive measure of radiation induced chromosomal aberrations. En: Radiation Induced Chromosomal Damage in Man (Eds. Ishihara T. y Sasaki m.s.), Alan R. Liss Ins., New York, p. 93-109.
160. KRUGLIKOV I.L. y DERTINGER H. 1994. Stochastic resonance as a possible mechanism of amplification of weak electric signals in living cells. *Bioelectromagnetics* 15:539-547.
161. KUMAR P., KUTTAN R., KUTTAN G. (1996). Radioprotective effect of Rasayanas. **Ind. J. Exp. Biol.** **34:848-850.**
162. LABRID C. (1994). Pharmacologic properties of Daflon 500 mg. **Angiology** **45:524-530.**
163. LAHDETIE J. y PARVINEN M. (1981). Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. **Mutat. Res.** **81:103-107.**
164. LAI H. y SINGH N.P. (1997a). Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 18:156-165.
165. LAI H. y SINGH NP. (1997b). Melatonin and N-tert-butyl-a-phenylnitron block 60 Hz magnetic field- induced DNA single and double strand breaks in rat brain cells. *J. Pineal Res.* 22:152-162.
166. LAI H. y SINGH N.P. (1997c). Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 18(6):446-454.
167. LAMAISON J.L., PETITJEAN-FREYTET C., CARNAT, A. (1991). Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. **Pharm. Acta. Helv.**, **66(7):185-188.**
168. LANDAUER M.R., MCCHESENEY D.G., LEDNEY G.D. (1997). Synthetic trehalose dicorynomycolate (S-TDCM): behavioral effects and radioprotection. **J. Radiat. Res.** **38:45-54.**
169. LAWRENCE A.F. y ADEY W.R. (1982). Nonlinear wave mechanisms in interactions between excitable tissues and electromagnetic fields. *Neurol. Res.* 4:115-153.
170. LEDEBUR M. y SCHMID W. (1973). The micronucleus test. Methodological aspects. **Mutat. Res.** **19:109-117.**
171. LEDNEV V.V. (1991). Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 12(2):71-75.

172. LEE J.W., KIM M.S., KIM Y.J., CHOI Y.J., LEE Y., CHUNG H.W. (2011). Genotoxic effects of 3T magnetic resonance imaging in cultured human lymphocytes. **Bioelectromagnetics** 32:535-542.
173. LEE T.K., ALLISON R.R., O'BRIEN K.F., KHAZANIE P.G., JONKE R.M., BROWN R., BLOCH R., BLOCH R.M, TATE M.L., DOBBS L.J., KRAGEL P.J. (2004). Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. **Mutat. Res.** 557:75-84.
174. LENARZYK M. y SLOWIKOWSKA M. (1995). The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from X-ray-exposed mice. **Mutat. Res.** 335:229-234.
175. LERCHL KO., NONAKA., REITER RI. (1990). Pineal gland "magnetosensitivity" is a consequence of induced electric currents. *J. Pineal Res.* 10:109-116.
176. LEWINSOHN E., BRITSCH L., MAZUR Y., GRESSEL J. (1989). Flavanone glycoside biosynthesis in citrus: chalcone synthase, UDP-glucose: flavanone-7-O-glucosyl-transferase and-Rhamnosyl-transferase activities in cell free. **Plant. Physiol.** 91 (4):1323-1328.
177. LIBOFF A.R. (1985). Geomagnetic cyclotron resonance in living cells. *J. Bio. Phys.* 13:99.
178. LIBOFF A.R. y PARKINSON W.C. (1991). Search for ion cyclotron resonance in an Na⁺ - transport system. *Bioelectromagnetics* 12:77-83.
179. LIBOFF A.R., ROZEK R.J., SHERMAN M.L., MCLEOD B.R., SMITH S.D. (1987). ⁴⁵Ca⁺⁺ cyclotron resonance in human lymphocytes. *J. Bioelectricity* 6:13- 22.
180. LIMING S. (1985). The micronucleus test of immature cell in ejaculated human sperm. En: *Proc. Conference Environ Mutagen Society, Stockholm*, pp:236.
181. LINKS M. y LEWIS C. (1999). Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficiency. **Drugs** 57:293-308.
182. LIVESEY J.C. y REED D.J. (1987). Chemical protection against ionizing radiation. **Adv. Radiat. Res.** 13:285-353.
183. LOBACHEVSKY P., IVASHKEVICH A., MARTIN O.A., MARTIN R.F (2011). DNA-Binding Radioprotectors. In: *Selected Topics in DNA Repair*, Chen, C. C ed. University of California San Diego, USA. DOI: 10.5772/23156
184. LOSCHKE D.C., HADWIGER L.A., WAGONER W. (1983). Comparison of mRNA populations coding for phenylalanine ammonia-lyase and others peptides from pea tissue treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. **Physiol. Plant. Pathol.** 23:163-173.
185. LUBEN R.A. (1991). Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. *Health Phys.* 61:15-28.
186. LUBEN R.A., CAIN C.D., CHEN M.C.Y., ROSEN D.M., ADEY W.R. (1982). Inhibition of parathyroid hormone actions on bone cells in culture by induced low energy electromagnetic fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4180-4184.
187. LUDEWIG E., KOCH F., KAMPRAD F., MELZER R. (1991). The micronucleus test in pigs: induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes by various doses of X-rays. **Mutat Res.**, 249(1):1-6.
188. MA T.H. (1979). Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*-A promising mutagen test system. **Mutat. Res.** 64:307-311.

189. MA T.H. (1981). Tradescantia-micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberrations test for in vitro monitoring and mutagen screening. **Environ. Health Perspectives** **37:85-87**.
190. MA T.H., HARRIS M.M., ANDERSON A., AHMED I., MAHAMMAD K., BARE J.L., LIN G. (1984). Tradescantia micronucleus test/Trad-MCN/ on 140 health related agents. **Mutat.Res.** **138:157-159**.
191. MAISIN J.R. (1998). Bacq and Alexander award lecture-chemical radioprotection : past present and future. **Int. J. Radiat. Biol.** **73:443-450**.
192. MAISIN J.R., ALBERT C., HENRY A. (1993). Reduction of short term radiation lethality by biological response modifiers given alone or in association with other chemical protectors. **Radiat. Res.** **135:332-337**.
193. MALE J.C. (1992). Biological effects of magnetic fields: a possible mechanism? *Biologist* **39(3):87-89**.
194. MANACH C., REGERAT F., TEIXER O., AGULLO G., DEMIGNE C., REMESY C. (1996). Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. **Nutr. Res** **16:517-544**.
195. MARTIN R.F., BROADHURST S., D'ABREW S., BUDD R., SEPHTON R., REUM M., KELLY D.P. (1996). Radioprotection by DNA ligands. **Br. J. Cancer Suppl.** **27:S99-101**.
196. MARTIN R.F. y HOLMES N. (1981). Use of ¹²⁵I labeled ligand to probe DNA structure. **Nature** **302:452-454**.
197. MARTIN R.F., BROADHURST S., REUM M.E., SQUIRE C.J., CLARK G.R., LOBACHEVSKY P.N., WHITE J.M., CLARK C., SY D., SPOTHEIM-MAURIZOT M., KELLY D.P. (2004). *In vitro* Studies with Methylproamine: a potent new radioprotector. **Cancer Res.**, **64:1067-1070**.
198. MARTÍNEZ C. (2004). Tratamiento del melanoma metastásico pulmonar: Modelo experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
199. MARTÍNEZ C., CASTILLO J., ALCARAZ M., MARTÍNEZ C., BENAVENTE-GARCÍA O., YÁÑEZ J., CASTELLS M.T., ORTEGA V.V. (2005a). The effect of the flavonoid diosmin, grape seed extract and red wine on the pulmonary metastatic B16F10 melanoma. **Histol Histopathol.** **20:1121-1129**.
200. MARTÍNEZ C., YÁÑEZ J., ALCARAZ M., CANTERAS M, VICENTE V. (2002b). Anticlastogenetic activity of several plant polyphenols against chromosomal damage induced .in vivo. by X-rays. XXVIII European Workshop of Drug Metabolism. Valencia.
201. MASUDA T., MAEKAWA T., HIDAHA K., BANDO H., TAKEDA Y., YAMAGUCHI H. (2001). Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. **J Agric Food Chem.**, **49(5):2539-2547**. doi: [10.1021/jf001442x](https://doi.org/10.1021/jf001442x).
202. MATSUBARA J., TAJIMA Y., KARASAWA M. (1987). Metallothioneine induction as a potent means of radiation protection in mice. **Radiat. Res.** **111:267-275**.
203. MATSUDA H. (1991). Pharmacological study on citrus fruits. Antiallergic effects of fruits of Citrus unshiu Markovich (2) on flavonoid components. **Yakugaku Zasshi** **111:193-198**.
204. MAURYA D.K. y DEVASAGAYAM T.P.A (2011). Role of radioprotectors in the inhibition of DNA damage and modulation of DNA repair after exposure to gamma-

radiation, Selected Topics in DNA Repair, Prof. Clark Chen (Ed.), ISBN: 978-953-307-606-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/selected-topics-in-dna-repair/role-of-radioprotectors-in-the-inhibition-of-dnadamage-and-modulation-of-dna-repair-after-exposure>.

205. MAVOURNIN K.H., BLAKEY D.H., CIMINO M.C., SALOMONE M.F., HEDDLE J.A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood, a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.** **239:29-80**.
206. MAZUR L. (1995a). Induction micronucleated erythrocytes by MEA, AET, WR-2721 and X-rays. **Mutat. Res** **334:317-322**.
207. MAZUR L. (1995b). Frequency of Micronuclei in mouse peripheral blood erythrocytes following WR-2721 application and X-Irradiation. **Folia Biol** **43:3-4**.
208. METODIEWA D., SKOLIMOWSKI J., KAROLCZAK S. (1996). Tempace and troxyl—novel synthesized 2,2,6,6tetramethylpiperidine derivatives as antioxidants and radioprotectors. **Biochem. Mol. Biol. Int.** **40:1211–1219**.
209. MIDDLETON E. y DRZEWIWCKI G. (1982). Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophils. **Biochem. Pharmacol.** **31(1):1449-1453**.
210. MIDDLETON E., DRZEWIWCKI G., HRISHNARAO D. (1981). Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. **J. Inmunol.** **27(2):546-550**.
211. MIKO S., YANAI T., HASEGAWA H., AKATA N., KANAIWA-KUDO S., MATSUMOTO T., NODA Y., OTSU H., SATO F. (1998). Concentration of metallothionin in mice livers after small dose of irradiation. **J. Radiat. Res.** **39:239–242**.
212. MILHAM S. (1982). Mortality from Leukemia in Workers Exposed to Electric and Magnetic Fields. **New EnglandJ. Medicine** **307:249-250**.
213. MONTOYA I., ALCARAZ-SAURA M., ALCARAZ M., OLMOS E., MONTALBAN F., SANCHEZ-VILLALOBOS J.M. (2011). Efecto genotóxico inducido por un campo magnético de 200 microteslas: modelo experimental in vivo. II Congreso Conjunto SEFM-SEPR. **Radioprotección** **68: 609-614**.
214. MOLTENI A., MOULDER J.E., COHEN E.F., WARD W.F., FISH B.L., TAYLOR J.M., WOLFE L.F., MOLTENI L.B., VENO P. (2000). Control of radiation induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II type I receptor blocker. **Int. J. Radiat. Biol.** **76:523–532**.
215. MORAIS M.M., BELARMINO F.J.N., BRITO G.A., RIBEIRO R.A. (1999). A phase II study of ifosfamide, 5fluorouracil and leucovorin in induced hemorrhagic cystitis—comparison of the effects of dexamethasone and mesna. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **32:1211–1215**.
216. MOREL I., LESCOAT G., COGREL P., SERGENT O., PASDECOP N., BRISSOT P., CILLARD P., CILLARD J. (1993). Antioxidant and ironchelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol.** **1:13-19**.
217. MORITA T., HONMA M., MORIKAWA K. (2012). Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. **Mutat Res.**, **741(1-2):32-56**. doi: **10.1016/j.mrgentox.2011.10.005**. Epub 2011.

218. MOULDER J.E. y FISH B.L. (1997). Angiotensin converting enzyme inhibitor captopril does not prevent acute gastrointestinal radiation damage in the rat. **Radiat.Oncol.Investig. 5:50–53.**
219. MOULDER J.E., FISH B.L., COHEN E.F. (1998a). Angiotensin II receptor antagonists in treatment and prevention of radiation nephropathy. **Int. J. Radiat. Biol. 73:415–421.**
220. MOULDER J.E., FISH B.L., COHEN E.F. (1998b). Brief pharmacological intervention in experimental radiation nephropathy. **Radiat. Res. 150:535–541.**
221. MUNNE'-BOSCH S., SCHWARZ K., ALEGRE L. (1999). Response of abietane diterpenes to stress in *Rosmarinus officinalis* L.: New insights into the function of diterpenes in plants. **Free Radical Res 31:107–112.**
222. MURATA R., NISHIMURA Y., HIRAOKA M., ABE M., SATOH M. (1995). Manganese chloride treatment does not protect against acute radiation injury of skin or crypt cells. **Radiat. Res. 143:316–319.**
223. NAIR C.K.K., RAJAGOPALAN R., WANI K., HUILGOL N.G., KAGIYA V.T., KAPOOR S. (1999). Mechanism of radioprotection by TMG-a water soluble vitamin E. **J. Radiat. Res. 40:451.**
224. NAIR C.K.K., PARIDA D.K., NOMURA T. (2001). Radioprotectors in Radiotherapy. **J. Radiat. Res 42:21-37.**
225. NAIR I., MORGAN M.G., FLORIG H.K. (1989). Biological effects of power frequency electric and magnetic fields. Rep. No. OTA-BP-E-53, Office of Technology Assessment, V.S. Government Printing office, Washington, DC.
226. NAKAHARA T., YAGUCHI H., YOSHIDA M., MIYAKOSHI J. (2002). Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. **Radiology. 224 (3):817-822.**
227. NEEDLEMAN P., TURK J., MORRISON A.R., LETKOWITH J.B. (1986). Arachidonic acid metabolism. **Ann. Rev. Biochem. 55:69–102.**
228. NETA R. (1988). Role of cytokines in radiation protection. **Pharmacol. Ther. 39:261–266.**
229. NETA R., DOUCHES S.D., OPPENHEIM J.J. (1986). Interlukin I is a radioprotector. **J. Immunol. 136:2483–2485**
230. NORDENSON I., HANSSON KM., NORDSTROM S., SWEINS A., BIRKE E. (1984). Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency electric fields: in vivo and in vitro studies. **Radiat. Environ. Biophys. 23:191-201 .**
231. NRP (National Radiological Protection Board), UK. (1992). Electromagnetic fields and the risk of cancer: Report of an advisory group on non-ionizing radiation. (Vol.3, No.1). Chilton, England.
232. OECD, 2004. *In Vitro* Micronucleus Test. Guideline 487. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
233. OIKAWA T., FREEMAN M., LOW W., VAUGHAN D.E., FOGO A. (1997). Modulation of plasminogen activator inhibition in vivo: a new mechanism for the antifibrotic effect of renin angiotensin inhibition. **Kidney Int. 51:164–172.**
234. OKANO H. (2008). Effects of static magnetic fields in biology: role of free radicals. **Frot Biosci. 134:6106-6125.**

235. OKUDAN N., CELIK I., SALBACAK A., CICEKCIBASI A.E., BUYUKMUMCU M., GÖKBEL H. (2010). Effects of long-term 50 Hz magnetic field exposure on the micro nucleated polychromatic erythrocyte and blood lymphocyte frequency and argyrophilic nucleolar organizer regions in lymphocytes of mice. **Neuro Endocrinol Lett.** **31(2):208-214.**
236. OZAKI Y., YATOMI Y., JINNAI Y., KUME S. (1993). Effects of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on platelet functions. Genistein attenuates thrombin-induced Ca²⁺ mobilization in human platelets by affecting polyphosphoinositide turnover. **Biochem. Pharmacol.** **46:395-403.**
237. PAILE W., JOKELA K., KOIVOSTENEN A., SALOMA S. (1995). Effects of sinusoidal magnetic fields and spark charges on human lymphocytes in vitro. **Bioelectrochem Bioenerg.** **36:15-22.**
238. PARKINSON W.C. y HANKS C.T. (1989). Search for cyclotron resonance in cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 10:129-145.
239. PASQUINI R., VILLARINI M., SCASSELLATI SFORZOLINI G., FATIGONI C., MORETTI M. (2003). Micronucleus induction in cells co-exposed in vitro to 50 Hz magnetic field and benzene, 1,4-benzenediol (hydroquinone) or 1,2,4-benzenetriol. **Toxicol. In Vitro** **17(5-6):581-586.**
240. PIERI C., MARRA M., MORONI F., RECCHIONI R., SELLI F.M. (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci.** **15:271-276.**
241. PIERREFICHE G. y LABORIT H. (1995). Oxygen free radicals, melatonin and aging. **Exp. Gerontol.** **30:213-227.**
242. PINCEMAIL J., DEBY C., LION Y., BRAGUET P., HANS P., DRIEN K., GOUTIER R. (1985). Role of flavonoids in lipoperoxidation and radical reactions. In: *Flavonoids and Bioflavonoids. VII Symposium Hungaro sobre flavonoides. 1985.* (Farkas L. Gabor M. Kallay F.) Eds; Elsevier Science Publishers: New York, 423-436.
243. PINCEMAIL J., DUPUIS M., NASR C., HANS P., HAAG-BERRURIER M., ANTON R., DEBY C. (1989) Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. **Experientia.** **45(8):708-712.**
244. POLITAWSKI P., RAJKOWSKA E., PAWLACZYK-LUSZCZYNSKA M., DUDAREWICZ A., WITOREK-SMAGUR A., SLIWINSKA-KOWALSKA M., ZMYSLONI M. (2010). Static magnetic field affects oxidative stress in mouse cochlea. **Int J Occup Med Environ Health.** **23:377-384.**
245. PRADHAN D.S., NAIR C.K.K., SREENIVASAN A. (1973). Radiation injury repair and sensitization of microorganisms. **Proc. Ind. Natl. Sci. Acad.** **39B:516-530.**
246. PRASAD K.N., COLE W.C., HAASE G.M. (2004). Radiation protection in humans: extending the concept of as low as reasonably achievable (ALARA) from dose to biological damage. **Br J Radiol.,** **77:97-99.**
247. PROSSER J.S., MOQUET J.E., LLOYD D.C., EDWARDS A.A. (1988). Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. **Mutat. Res.** **199:37-45.**
248. PUJOL J.L., GIBNEY D.J., SU J.Q., MAKSYMIAK A.W., JER J.R. (1993). Immune response induced in small cell lung cancer by maintenance with interferon gamma. **J.Natl.Cancer Inst.** **85:1844-1850.**
249. RAMALHO A., SUNJEVARIC I., NATARAJAN A.T. (1988). Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-rays induced chromosomal

aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. **Mutat. Res.** **207:141-146.**

250. RAMNATH N., LO RUSSO P., SIMON M., MARTINO S. (1997). Phase II evaluation of cisplatin and WR 2721 for refractory metastatic breast cancer. **Am. J. Clin. Oncol.** **20:368-372.**
251. REAL A., GUENECHEA G., BUEREN J.A., MAGANTO G. (1992). Radioprotection mediated by the haemopoietic stimulation conferred by AM5: a protein-associated polysaccharide. **Int. J. Radiat. Biol.** **62:65-72.**
252. REDDY S.B., WELLER J., DESJARDINS-HOLMES D., WINTERS T., KEENLISIDE L., PRATO F.S., PRIHODA T.J., THOMAS V., THOMAS A.W. (2010). Micronuclei in the blood and bone marrow cells of mice exposed to specific complex time-varying pulsed magnetic fields. **Bioelectromagnetics.** **31(6):445-453.**
253. REDONDO A., ALCARAZ M., CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., GOMEZ-MORAGA A., CANTERAS M. (1999). Efecto protector in vivo de compuestos polifenólicos naturales. XIII Congreso Español de Toxicología, Facultad de Medicina, 22-24 de septiembre del 1999, Granada, 52.
254. REITER R.J. (1995). Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. **Front. Neuroendocrinol.** **16:383-415.**
255. RENAN M.J. y DOWMAW P.I. (1989). Increased radioresistance of tumour cells exposed to metallothioneine inducing agents. **Radiat. Res.** **120:442-455.**
256. RICARDO da SILVA J.M., RIGAUD J., CHEYNIER V., CHEMINAT A., MOUTOUNET M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. **Phytochemistry.**, **(30):1259-1264.**
257. RIEHL T., COHEN S., TESSNER T., SCHOLEMANN S., STENSON W.S. (2000). Lipopolysaccharide is radioprotective in mouse intestine through a prostaglandin mediated mechanism. **Gastroenterology** **118:1106-1116.**
258. ROBBINS R.C. (1976). Regulatory action of phenylbenzo-Y-pyrone (PBP) derivatives on blood constituents affecting rheology in patients with coronary heart disease (CHD). **Int. J. Vit. Nutr. Res.** **46:338-347.**
259. ROSENTHAL M., y OBE G. (1989). Effects of 50 Hz electromagnetic fields on proliferation and Chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. **Mutation Res.** **210:329-335.**
260. SAEZ-TORMO G., OLIVA M.R., MUÑIZ P., VALLS V., IRADI A., RAMOS M., CLIMENT J. (1994). Oxidative stress and genetic damage. Health and Orange; Fundación Valenciana de Estudios Avanzados: Valencia, Spain, pp:51-60.
261. SALAH N., MILLER N.J., PAGANGA G., TIJBURG L., BOLWELL G.P., RICE-EVANS C. (1995). Polifenolic flavonoid as scavenger of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Arch. Biochem. Biofis.** **2:339-346.**
262. SANCHEZ-CAMPILLO M., GABALDON J.A., CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., DEL BAÑO M.J., ALCARAZ M., VICENTE V., ALVAREZ N., LOZANO, J.A (2009). Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food Chem Toxicol.**, **47:386-392.**
263. SARI-MINODIER I., ORSIERE T., BELLON L., POMPILI J., SAPIN C., BOTTA A. (2002). Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. **Mutat. Res.** **521(1-2):37-46.**

264. SARMA L y KESAVAN P.C. (1993). Protective effects of vitamins C and E against y-ray-induced chromosomal damage in mouse. **Int. J. Radiol. Biol.** **63:759-764.**
265. SASAKI M.S. y NORMAN S. (1966). Proliferation of human lymphocytes in culture. **Nature** **210:913-914.**
266. SATO K., ICHIMASA M., MIYAHARA K., SHIOMI M., NISHIMURA Y., ICHIMASA Y. (1999). Radioprotective effects of sodium tungstate on hematopoietic injury by exposure to ⁶⁰Co γ-rays in Wistar rats. **J. Radiat. Res.** **40:101-113.**
267. SATOH M., MIURA N., NAGANUMA A., MATSUZAKI N., KAWAMURA E., IMURA N. (1989). Prevention of adverse effects of gamma ray irradiation after metallothioneine induction by bismuth subnitrate in mice. **Eur. J. Canc. Clin. Oncol.** **25:1729-1731.**
268. SCAMBIA G., RANELLETI F.O., BENEDETTI-PACINI P., DE VINCENZO R., BONANNO G., FERRANDINA G., PIANTELLI M., BUSSA S., RUMI C. y CIANFRIGLIA M. (1994). Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breastcancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. **Cancer Chemother. Pharmacol.** **34:459-464.**
269. SCASSELLATI-SFORZOLINI G., MORETTI M., VILLARINI M., FATIGONI C., PASQUINI R. (2004). Evaluation of genotoxic and/or co-genotoxic effects in cells exposed in vitro to extremely-low frequency electromagnetic fields. **Ann Ig.** **16(1-2):321-340.**
270. SCHEMELZER E., BÖRNER H., GRISEBACH H., EBEL J., HAHLBROCK K. (1984). Phytoalexin synthesis in soybean (*Glycine max*). Similar time courses of mRNA induction in hypocotyls infected with a fungal pathogen and in cell cultures treated with fungal elicitor. **F.E.B.S.** **172:59-63.**
271. SCHIMMELPFENG J., y DERTINGER H. 1997. Action of a 50 Hz magnetic field on proliferation of cells in culture. *Bioelectromagnetics* 18:177-183 .
272. SCHMID W. (1975a). The micronucleus test. **Mutat. Res.** **31:9-15.**
273. SCHMID W. (1976b). En: *Chemical Mutagens IV* (Ed. Hollaender A.), Plenum Press, New York, pp:31-53.
274. SCHOLES G. (1983). Radiation effects on DNA: The Silvanus Thomson memorial lecture. **Br. J. Radiol.** **56:221-231.**
275. SCHWARZ K. y TERNES W. (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung.** **195:99-103.**
276. SERNA A., ALCARAZ M., NAVARRO J.L., ACEVEDO C., VICENTE V., CANTERAS M. (2008). Biological dosimetry and Bayesian analysis of chromosomal damage in thyroid cancer patients. **Radiat Prot Dosimetry.** **129(4):372-380.**
277. SHER E., CODIGNOLA A., BIANCARDI E., COVA D., CLEMENTI F. (1992). Amine uptake inhibition by diosmin and diosmetin in human neuronal and neuroendocrine cell lines. **Pharmacol. Res.** **26:395-399.**
278. SHIMOI K., MASUDA S., FUROGORI M., ESAKI S., KIANE N. (1994). Radioprotective affect of antioxidative flavonoids in gamma ray irradiated mice. **Carcinogenesis** **15:2669-2672.**

279. SHIMOI K., SHUICHI M., BINGRONG S., MICHIYO F., NAOHIDI K. (1996). Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. **Mutat. Res.** **350:153-161.**
280. SHINODA M. (1995). Studies on chemical radioprotectors against X-irradiation used by soft X-ray accelerator. **Yakugaku Zasshi** **115:24-41.**
281. SHUENG P.W., HSU W.L., JEN Y.M., WU C.J., LIU H.S. (1998). Neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy should not be a standard approach for locally advanced cervical cancer. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** **40:889-896.**
282. SHUVALOVA L.A., OSTROVSKAYA M.V., SOSUNOV V.A., y LEDNEV V.V. (1991) . Influence of a weak magnetic field under conditions of paramagnetic resonance on the rate of calmodulin-dependent phosphorylation of myosin in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USSR* **317:227.**
283. SICHEL G., CORSARO C., SCALIA M., Di BILIO A.J., BONOMO R. (1991). In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanin against O₂. **Free Radical Biol. Med.** **11:1-8.**
284. SIMI S., BALLARDIN M., CASELLA M., DE MARCHI D., HARTWIG V., GIOVANNETTI G VANELLO N, GABBRIELLINI S., LANDINI L., LOMBARDI M. (2008). Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. **Mutat Res.** **645(1-2):39-43.**
285. SIMKÓ M., DOPP E., KRIEHLER R. (1999). Absence of synergistic effects on micronucleus formation after exposure to electromagnetic fields and asbestos fibers in vitro. **Toxicol Lett.** **108(1):47-53.**
286. SIMKÓ M., KRIEHLER R., LANGE S. (1998). Micronucleus formation in human amnion cells after exposure to 50 Hz MF applied horizontally and vertically. **Mutat Res.** **418(2-3):101-111.**
287. SIMKÓ M., KRIEHLER R., WEISS D.G., LUBEN R.A. (1998). Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and nontransformed human cell lines. **Bioelectromagnetics** **19(2):85-91.**
288. SIMKO M, y MATTSSON MO. (2004). Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: Possible immune cell activation. *JCellBiochem.* **93(1):83-92.**
289. SIMKÓ M., RICHARD D., KRIEHLER R., WEISS D.G. (2001). Micronucleus induction in Syrian hamster embryo cells following exposure to 50 Hz magnetic fields, benzo(a)pyrene, and TPA in vitro. **Mutat Res.** **495(1-2):43-50.**
290. SINGH S.P., GRAHAM M.M., SINGH V., KHAN A. (1995a). Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of gamma-rays. **Int. J. Radiat. Biol.** **68:563-569.**
291. SINGH S., KHANDUJA K.L., MITTAL P.K. (1997). Mutagenic potential of benz(a)pyrene and Nitrosodiethylamine is not affected by 50-Hz sinusoidal electromagnetic field. **Electro Magnetobiol.** **16:169-175.**
292. SINGH S.P., ABRAHAM S., KESAVAN P.C. (1995b). In vivo radioprotection with garlic extract. **Mutat. Res.** **345:147-153.**
293. SMITH SD., MCLEOD BR., LIBOFF AR., COOKSEY K. 1987. Calcium cyclotron and diatom mobility. *Bioelectromagnetics* **8:215-227.**
294. STAPLETON A.E. y WALBOT V. (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. **Plant. Physiol.** **105: 881-889.**

295. STICH H.F. y ROSIN M.P. (1983). Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **Int. J. Cancer** **31:305**.
296. STICH H.F., STICH W., PARIDA B.B. (1982). Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer; Betel quid chewers. **Cancer Lett.** **17(2):125-134**.
297. STICH H.F., STICH W., PARIDA B.B. (1982). Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer; Betel quid chewers. **Cancer** **17: 125**.
298. STONE H.B., MOULDER J.E., COLEMAN C.N., ANG K.K., ANSCHER M.S., BARCELLOS-HOFF M.H., DYNAN W.S., FIKE J.R., GRDINA D.J., GREENBERGER J.S., HAUER-JENSEN M., HILL R.P., KOLESNICK R.N., MACVITTIE T.J., MARKS C., McBRIDE W.H., METTING N., PELLMAR T., PURUCKER M., ROBBINS M.E., SCHIESTL R.H., SEED T.M., TOMASZEWSKI J.E., TRAVIS E.L., WALLNER P.E., WOLPERT M., ZAHAREVITZ D. (2004). Models for evaluating agents intended for the prophylaxis, mitigation and treatment of radiation injuries. Report of an NCI Workshop, December 3-4, 2003. **Radiat Res.**, **162:711-728**.
299. STRONATI L., TESTA A., VILLANI P., MARINO C., LOVISOLO G.A., CONTI D., RUSSO F., FRESEGNA A.M., CORDELLI E. (2004). Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration, micronucleus, and sister chromatid exchange analyses. **Bioelectromagnetics.** **25(1):41-48**.
300. SUZUKI Y., IKEHATA M., NAKAMURA K., NISHIOKA M., ASANUMA K., KOANA T., SHIMIZU H. (2001). Induction of micronuclei in mice exposed to static magnetic fields. **Mutagenesis.** **16(6):499-501**.
301. SZENT-GYORGYI A. (1938). Methoden zur Herstellung von Citdn. **Psychiol. Chem.** **255:128-131**.
302. SZMANT H.H (1975). Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems, Biological Actions of Dimethyl Sulfoxide. Stanley W. Jacob and Robert Herschler eds. New York: New York Academy of Sciences. pp. 20-23.
303. TAKECHI M., TANAKA Y., NONAKA G.I., NISHIOKA I. (1985). Structure and antiherpetic activity among the tannins, **Phytochemistry.** **(24):2245-2250**.
304. TAN E.H., WEE J., ANG P.T., FONG K.W., LEONG S.S., KHOO K.S., TAN T., LEE K.S., ENG P., HSU A., TAN Y.K., CHUA E.J., ONG Y.Y. (1999). Induction of chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy in stage III unresectable non-small cell lung cancer. **Acta Oncol.** **38:1005-1009**.
305. TANNEHILL S.P. y MEHTA M.P. (1996). Amifostine and radiation therapy: past, present and future. **Semin. Oncol.** **23(8):69-77**.
306. TANNEHILL S.P., MEHTA M.P., LARSON M., STORER B., PELLET J., KINSELLA T.J., SCHILLER J.H. (1997). Effect of amifostine on toxicities associated with sequential chemotherapy and radiation therapy for unresectable non small cell lung cancer. Results of a phase II trial. **J. Clin. Oncol.** **15:2850-2857**.
307. TENFORDE T.S. (1992). Biological interactions and potential health effects of extremely-low-frequency magnetic fields from power lines and other common sources. **Ann Rev Publ Health.** **13:173-196**.
308. TENFORDE T.S. (1993). Cellular and molecular pathways of extremely low frequency electromagnetic field interactions with living systems, In Martin Blank, (Ed),

Electricity and Magnetism in Biology and Medicine. San Francisco Press, Inc., pp.936.

309. TERENCE M.C., SANZ M.J., PAYA M. (1991). Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*, *J. Ethnopharmacol.*, **(31):109-114**.
310. THERIAULT G., GOLDBERG M., MILLER A.B., ARMSTRONG B., GUENEL P., DEADMAN J., IMBERNON E., TO T., CHEVALIER A., CYR D., WALL C. (1994). Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic field among electric utility workers in Ontario and Quebec, Canada and France: 1970- 1989. *Am. J. Epidemiol.* 139:550-572.
311. THOMPSON W.R., MEINWALD J., ANESHANSLEY D., EISNER T. (1972). Flavonols, pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. *Science*, **177:528-530**.
312. TORDERA M., FERRANDIZ M.L., ALCARAZ M.J. (1994). Influence of antiinflammatory flavonoids on granulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Z. Naturforsch. C.* **49:235-240**.
313. TOREL J., CILLARD J., CILLARD P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemi* **2:383-385**.
314. TORRES DE ARAUJO F.F., PIRES M.A., FRANKEL R.B., BICUDO C.E.M. (1986). Magnetite and Magnetotaxis in Algae. *Biophys. J.* 50:375-378.
315. TRAVIS E.L. (1979). *Radiología Médica*. Editorial A.C., Madrid.
316. TZENG S.H., KO W.C., KO F.N., TENG C.M. (1991). Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res.* **64:91-100**.
317. UDROIU I., CRISTALDI M., IERADI L.A., BEDINI A., GIULIANI L., TANZARELLA C. (2006). Clastogenicity and aneuploidy in newborn and adult mice exposed to 50 Hz magnetic fields. *Int J Radiat Biol.* **82(8):561-567**.
318. UMA-DEVI P. y GANASOUNDARI A. (1999). Modulation of antioxidant enzymes by *Ocimum sanctum* and its role in protection against radiation injury. *Ind. J. Exp. Biol.* **37:262-268**.
319. UMA-DEVI P., GANASOUNDARI A., RAO B.S.S., SRINIVASAN K.K. (1999). In vivo radioprotection by *Ocimum flavanoids*: survival of mice. *Radiat. Res.* **151:74-78**.
320. UMA DEVI P. y SHARMA A.S (1990). Mouse bone-marrow response to low doses of whole-body gamma irradiation: induction of micronuclei. *Int J Radiat Biol.*, **57(1):97-101**.
321. UTSUMI H., KODAMA S., TANO K., HASHIMOTO M.W., WATANABE H. (1998). Establishment and characterization of a hypocatalasemic mouse cell strain. *J. Radiat. Res.* **39:165-174**.
322. VALBERG P.A., KAVET R., RAFFERTY C.N. (1997). Can low-level 50/60-Hz electric and magnetic fields cause biological effects. *Radiat Res.* **148:2-21**.
323. VALLES E.G., DE CASTRO C.R., CASTRO J.A. (1995). Radioprotectors as late preventive agents against carbon tetra chloride induced liver necrosis: protection by 2-(3-aminopropylamino) ethyl phosphorothioic acid (WR 2721). *Exptl. Molec. Pathol.* **63:101-109**.
324. VAN BUUL P.P.W., VAN DUYN-GOEDHART A., SANKARANARAYANAN K. (1999). In vivo and in vitro radioprotective effects of prostaglandin E1 analogue misoprostol in DNA repair-proficient and-deficient rodent cell systems. *Radiat. Res.* **152:398-403**.

325. VERHEYEN G.R., PAUWELS G., VERSCHAEVE L., SCHOETERS G. (2003). Effects of coexposure to 50 Hz magnetic fields and an aneugen of human lymphocytes, determined by the cytokinesis block micronucleus assay. **Bioelectromagnetics** 24 (3):160-164.
326. VIJAYALAXMI, GUENTER OBE G. (2005). Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation: a review and future research recommendations. **Bioelectromagnetics**. 26:412-430.
327. VIJAYALAXMI, HERMAN T.S., MELTZ. (1996). Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. **Mutat. Res.** 371:221–228.
328. WALDEN T.L. y FARZANEH N.K. (1995). Radioprotection by 16,16-dimethyl prostaglandin E2 is equally effective in male and female mice. **J. Radiat. Res.** 36:1–7.
329. WALDEN T.L., PATCHEN N., SNYDER S.L. (1987). 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 increases survival in mice following irradiation. **Radiat. Res.** 109:440–448.
330. WALDWORTH A.N. y FAULDS D. (1992). Hydroxyethylrutosídes: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in venous insufficiency and relates disorders. **Drugs** 44:1013-1032.
331. WANG P.F. y ZHENG R.L. (1992). Inhibition of the autoxidation of linoleic acids flavonoids in micelles. **Chem. Phys. Lipids** 63:37-40.
332. WARD W.F., LIN P.J.P., WONG P.S., BEHNIA R., JALALI N. (1993). Radiation pneumonitis in rats and its modification by angiotensin converting enzyme inhibitor captopril evaluated by high resolution computed tomography. **Radiat. Res.** 135:81-87.
333. WASSERMAN T.H. (1994). Radiotherapeutic studies with amifostine (Ethyol). **Semin. Oncol.** 21 (11):21– 25.
334. WEISS J.F. (1997). Pharmacologic approaches to protection against radiation induced lethality and other damage. **Environ. Health Perspect.** 105:1473–1478.
335. WIESENFELD K. y MOSS F. (1995). Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and squids. *Nature* 373:33-36.
336. WILSON R.L. (1983). Free radical repair mechanisms and the interaction of glutathione and vitamin C and E. In: Radioprotectors and anticarcinogens, Eds. O. F. Nygaard and M. G. Simic, pp. 1–23, Academic Press, New York.
337. WINKER R., IVANCSITS S., PILGER A., ADLKOFER F., RÜDIGER H.W. (2005). Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. **Mutat Res.** 585(1-2):43-49.
338. WUTTKE K., STREFFER C., MUELLER W.U. (1993). Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. **Mutat. Res.** 286:181-188.
339. YANEZ J., VICENTE V., ALCARAZ M., CASTILLO J., BENAVENTE-GARCIA O., CANTERAS M., TERUEL J.A. (2004). Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. **Nutr Cancer.**, 49:191-199.
340. YANG F., WANG R., ZHAO Y. (1998). Radioprotective effect of E838 to hemopoietic system. **Zhongguo-Zhongliu-Linchuang** 25:832–833.

341. YOCUS B., AKDAS M.Z., DASDAY S., CAKIR D.U., KIZIL M. (2008). Extremely low frequency magnetic fields cause oxidative DNA damage in rats. **Int J Radiat Biol.** **84:789-795.**
342. ZAFIROV D., BREDY-DOBREVA G.; LITCHEV V., PAPASOVA M. (1990). Antiexudative and capillarytonic effects of procyanidines isolated from grape seeds (*V. vinifera*), **Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.** (16):50-54.
343. ZAPOROWSKA H. y WASILEWSKI W. (1992). Haematological results of vanadium intoxication in Wistar rats. **Comp. Biochem. Physiol.** **101C:57-61.**
344. ZENI O., BERSANI F., SCARFI M.R. (2002). Radiological workers sensitivity to 50 Hz pulsed magnetic fields: preliminary results. **Radiat. Environ. Biophys.** **41(4):275-279.**
345. ZHADIN M.N., y FESENKO E.E. 1990. Ionic cyclotron resonance in biomolecules. *Biomrd. Sci.*1:245.
346. ZHANG C., ZHENG S., ZHANG Y., LUO C., GUO C. (1997). The protective effective polysaccharide and C-phycocyanin from *Spirulina platensis* on acute radiation injury in mice. **Acta Nutrim. Sinica** **18:327-331.**