



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Acción del Ácido Carnósico frente al Melanoma: una estrategia para la radiosensibilización selectiva con protección de las células no tumorales.

AUTOR/A M.^a Isabel de la Fuente Muñoz.

DIRECTOR/ES Amparo Olivares Rueda.
Miguel Alcaraz Baños.

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Acción del Ácido Carnósico frente al Melanoma: una estrategia para la radiosensibilización selectiva con protección de las células no tumorales.

AUTOR/A M.^a Isabel de la Fuente Muñoz.

DIRECTOR/ES Amparo Olivares Rueda.
Miguel Alcaraz Baños

2025



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR/A

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D^a. M^a Isabel de la Fuente Muñoz, habiendo cursado el Programa de Doctorado 872 - PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD (PLAN 2013) de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

ACCIÓN DEL ÁCIDO CARNÓSO FRENTE AL MELANOMA: UNA ESTRATEGIA PARA LA RADIOSENSIBILIZACIÓN SELECTIVA CON PROTECCIÓN DE LAS CÉLULAS NO TUMORALES.

y dirigida por:

D.: MIGUEL ALCARAZ BAÑOS
D.: AMPARO OLIVARES RUEDA
D.:

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a (fecha completa)

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.



AGRADECIMIENTOS:

A mis **directores de tesis, Amparo Olivares y Miguel Alcaraz**, por su guía invaluable, por despertar en mí de nuevo la ilusión por investigar y por enseñarme a tender un puente entre las ciencias básicas y mi visión clínica de la medicina. Gracias por su infinita confianza y paciencia; con vuestra ayuda, he podido alcanzar un sueño que en otras ocasiones parecía inalcanzable.

A todos mis **compañeros del Servicio de Oncología Radioterápica**, por compartir conmigo sus conocimientos, su entusiasmo y su forma de entender la medicina como una profesión de ayuda a los demás.

A mis amigos y hermanos de Murcia, **Ángel y Mari**, que me han hecho descubrir esta tierra y a la gente buena que vive en ella. Gracias por su amistad.

A mis amigos del "café mañanero", **Marta, Clara y Juan**, por animarme a retomar este proyecto y por su apoyo incondicional en los momentos que más lo necesité.

Al **Dr. Juan Antonio Encarnación Navarro**, por ser un ejemplo de trabajo y constancia, por contagiarme su ilusión por la investigación y, lo más importante, por su amistad.

A **mis padres y a mi hermana**, la familia de la que vengo, por darme una infancia feliz, por ser una parte tan importante de mi vida y por inculcarme el valor del esfuerzo, el trabajo y la perseverancia. Sus lecciones son el cimiento de todo lo que soy.

A mi familia, **mis hijos, David y Alejandro**, quienes han tenido que vivir con una madre "poco convencional". Espero haberles transmitido el espíritu de la constancia, el empeño y, sobre todo, la importancia de ser buenas personas.

Y a **Julio, mi compañero de vida**. Por tu apoyo constante en este y en todos los proyectos en los que me embarco. Por tu crítica constructiva, tu cariño y por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía.

"Nada en la vida debe ser temido, solo comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos."

Marie Skłodowska-Curie

ÍNDICE

- **I. INTRODUCCIÓN.-----20**
 - LA RADIACIÓN IONIZANTE
 - Los albores de la radiobiología: del descubrimiento a la aplicación médica.
 - Efecto de la radiación ionizante a nivel celular.
 - Efecto de la RI sobre el ADN.
 - Efectos de la RI sobre estructuras extranucleares.
 - El efecto de la RI adyacente y distante al foco de irradiación.
 - Efecto bystander (espectador) (RIBE).
 - Efecto abscopal (EA).
 - Efectos clastogénicos.
 - EL MELANOMA.
 - Datos mundiales y en España.
 - Subtipos de Melanoma y Características.
 - Variantes Poco Comunes.
 - Tratamiento del Melanoma.
 - Radioterapia (RT) en el tratamiento del Melanoma.
 - Radiobiología del melanoma.
 - LOS POLIFENOLES VEGETALES.
 - Clasificación.
 - Actividad antitumoral.
 - Polifenoles en el melanoma.
 - Los polifenoles como radioprotectores y antimutagénicos.
 - Los polifenoles como radiosensibilizadores.
 - Efecto paradójico de los polifenoles: radioprotector y radiosensibilizador.
- **II. OBJETIVOS.-----120**

•	III. MATERIAL Y MÉTODOS.	123
○	MATERIAL.	
▪	Muestras de sangre.	
▪	Modelos animales.	
▪	Líneas celulares.	
▪	Equipamiento.	
▪	Sustancias químicas y biológicas empleadas en el estudio.	
▪	Conservación y acondicionamiento de los reactivos para su empleo en los análisis	
○	MÉTODO.	
▪	ACTIVIDAD GENOPROTECTORA.	
▪	ACTIVIDAD CITOTOXICIDAD.	
▪	NIVELES DE GLUTATIÓN INTRACELULAR (GSH Y GSSG).	
▪	DETECCIÓN DE APOPTOSIS.	
▪	ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.	
▪	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	
•	IV. RESULTADOS.	180
○	ENSAYO DE GENOTOXICIDAD. ENSAYOS IN VIVO E IN VITRO.	
○	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD. ENSAYOS DE MTT Y XTT.	
○	ENSAYO DE APOPTOSIS. ANEXINA V.	
○	ANÁLISIS CICLO CELULAR.	
○	DETERMINACIÓN GLUTATIÓN. GSH-GSSH	
•	V. DISCUSIÓN.	231
•	VI. CONCLUSIONES.	264
•	VII. RESUMEN.	267
•	VIII. BIBLIOGRAFÍA.	271
•	IX. ANEXOS.	317

ÍNDICE DE TABLAS.

- **Tabla 1.** de supervivencia (%) en cultivos de PNT2 sometidos a 25 μ M de AC y una irradiación de 20 Gy. Datos fueron registrados tras 24 y 48 horas de incubación.
- **Tabla 2.** Porcentaje de supervivencia celular (%) en cultivos de la línea B16F10, tras ser sometidos al tratamiento con Ácido Carnósico (AC, 25 μ M) y a una irradiación de 20 Gy. Las mediciones fueron realizadas a las 24 y 48 horas.
- **Tabla 3.** Porcentaje de supervivencia celular (%) en melanocitos murinos Melan-A6 tratados con AC (25 μ M) y expuestos a 20 Gy de rayos X. Los datos fueron registrados a las 24 y 48 horas post-tratamiento.
- **Tabla 4.** Porcentaje de supervivencia celular (%) en la línea de melanoma humano SKMEL-1 después del tratamiento combinado con AC (25 μ M) y una dosis de 20 Gy de radiación. La evaluación se realizó a las 24 y 48 horas.
- **Tabla 5.** Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en células PNT2 tratadas con Ácido Carnósico, 20 Gy de radiación o combinación.
- **Tabla 6.** Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en cultivos B16F10 tratadas con Ácido Carnósico, 20 Gy de radiación o combinación.
- **Tabla 7.** Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en cultivos de células Melan-A6 tratadas con Ácido Carnósico, 20 Gy de radiación o combinación.
- **Tabla 8.** Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en cultivos de células SKMEL-1 tratadas con Ácido Carnósico, 20 Gy de radiación o combinación.
- **Tabla 9.** Resultados del ensayo de Apoptosis por línea celular y tratamiento.

- **Tabla 10.** Datos en porcentaje de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea PNT2 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico.
- **Tabla 11.** Datos en porcentajes de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea B16F10 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico.
- **Tabla 12.** Análisis de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de aneuploides y diploides de la línea Melan A6 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico.
- **Tabla 13.** Análisis de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea SK-MEL1 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico.
- **Tabla 14.** Resultados de luminiscencia de los cultivos de PNT2, B16F10, SKMEL1 y MELAN A6 en las distintas condiciones ensayadas.
- **Tabla 15.** Resultados de la ratio GSH/GSSG (%) del cultivo celular PNT2 en condiciones basales (C), con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC).
- **Tabla 16.** Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular B16F10 en condiciones basales (C) , con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC).
- **Tabla 17.** Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular MELAN A6 en condiciones basales (C) , con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC).
- **Tabla 18.** Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular SKMEL-1 en condiciones basales (C) , con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC).

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Estimación incidencia, supervivencia y mortalidad del melanoma.
- **Figura 2.** 2018 WHO Clasificación del melanoma.
- **Figura 3.** Comparación de patrones histológicos de los cuatro principales subtipos de melanoma.
- **Figura 4.** Estructura general de los flavonoides.
- **Figura 5.** Interacción de los flavonoides en la vía de la melanogénesis.
- **Figura 6.** Mecanismos de los polifenoles como radioprotectores y radiosensibilizadores.
- **Figura 7.** Proceso de extracción de sangre.
- **Figura 8.** Células epiteliales normales de próstata humana PNT2.
- **Figura 9.** Células de la línea B16F10, de melanoma metastásico murino, observadas a un aumento de 200X.
- **Figura 10.** Equipo de rayos X Smart Laboratory-ray, Model 583 E.
- **Figura 11.** Electrómetro UNIDOS E.
- **Figura 12.** TLD: técnica más adecuada para medir dosis de RI.
- **Figura 13.** Microscopio OLYMPUS BX40
- **Figura 14.** Puesto de medición biométrica
- **Figura 15.** Preparaciones en microscopio virtual digital.
- **Figura 16.** Detalle ampliado de un campo visualizado en un microscopio virtual digital.
- **Figura 17.** Equipo de cromatografía HPLC.
- **Figura 18.** Espectrofotómetro FLUOstar Galaxy.
- **Figura 19.** Espectrómetro FLUOstar Omega.

- **Figura 20.** Citómetro BD LSRFortessa™ X-20.
- **Figura 21.** Citómetro BD FACSCalibur™.
- **Figura 22.** Cabina de seguridad biológica y química Clase II, tipo A2. TELSTAR Mod. Bio II Advance.
- **Figura 23.** Observación microscópica (400x, tinción May-Grünwald-Giemsa) de dos linfocitos binucleados (CB) con citoplasma conservado, donde uno de ellos presenta un micronúcleo (MNCB) en el citoplasma.
- **Figura 24.** Esquema del protocolo experimental del ensayo de CBMN.
- **Figura 25.** Animales de experimentación expuestos a RI.
- **Figura 26.** Equipo de rayos X que ilustra la irradiación simultánea de animales de experimentación y muestras sanguíneas.
- **Figura 27.** Disección de los fémures para conseguir medula ósea.
- **Figura 28.** Extracción de medula ósea tras la disección de fémures.
- **Figura 29.** Guía del proceso de análisis de micronúcleos en ratones.
- **Figura 30.** Guía del proceso de análisis de micronúcleos en ratones con citometría de flujo.
- **Figura 31.** Esquema del protocolo del test MTT y XTT.
- **Figura 32.** Reacciones para medir glutatión total y oxidado (kit GSH/GSSG-Glo Assay).
- **Figura 33.** Kit de glutatión de Promega.
- **Figura 34.** Protocolo de determinación de glutatión: Irradiación (20 Gy) y medición de glutatión en células PNT2, SKMEL1, MELAN A6 y B16F10.
- **Figura 35.** Etapas de la Apoptosis: Una Representación Visual.
- **Figura 36.** Protocolo de análisis del ciclo celular: Irradiación (10 Gy) en células PNT2, SKMEL1, MELAN A6 y B16F10.
- **Figura 37.** Frecuencia de micronúcleos en células binucleadas.

- **Figura 38.** Frecuencia de micronúcleos en eritroblastos policromatófilos de medula ósea.
- **Figura 39.** Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos en sangre periférica.
- **Figura 40.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de PNT2.
- **Figura 41.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de B16F10.
- **Figura 42.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de MELAN-A6.
- **Figura 43.** Curvas de supervivencia celular de los cultivos de SKMEL 1.
- **Figura 44.** Evaluación mediante citometría de flujo de la apoptosis celular.
- **Figura 45.** Ensayo de Apoptosis en cultivos de células PNT2.
- **Figura 46.** Ensayo de Apoptosis en cultivos de B16F10.
- **Figura 47.** Ensayo de Apoptosis en cultivos de células Melan-A6.
- **Figura 48.** Ensayo de Apoptosis en cultivos de células SKMEL-1.
- **Figura 49.** Resultados del ensayo de Apoptosis por línea celular y tratamiento.
- **Figura 50.** Análisis del ciclo celular en la línea celular PNT2 mediante citometría de flujo.
- **Figura 51.** Gráfico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea PNT2.
- **Figura 52.** Análisis del ciclo celular en la línea celular B16F10 mediante citometría de flujo.
- **Figura 53.** Gráfico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea B16F10.
- **Figura 54.** Análisis del ciclo celular en la línea celular Melan-A6 mediante citometría de flujo.
- **Figura 55.** Gráfico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea Melan-A6.

- **Figura 56.** Análisis del ciclo celular en células de melanoma humano SKMEL mediante citometría de flujo.
- **Figura 57.** Gráfico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea SKMEL-1.
- **Figura 58.** Curva dosis-respuesta de Glutación.
- **Figura 59.** Resultados de Glutathione total de los cultivos de PNT2, B16F10, SKMEL1 y MELAN A6.
- **Figura 60.** Resultados de Glutathione total del cultivo celular PNT2.
- **Figura 61.** Resultados de Glutathione total del cultivo celular B16F10.
- **Figura 62.** Resultados de Glutathione total del cultivo celular SKMEL.
- **Figura 63.** Resultados de Glutathione total del cultivo celular MELAN A6.
- **Figura 64.** Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular PNT2.
- **Figura 65.** Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular B16F10.
- **Figura 66.** Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular MELAN A6.
- **Figura 67.** Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular SKMEL-1.

ABREVIATURAS

AC – Ácido Carnósico

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

Akt – Proteína quinasa B (PKB)

AL – Células híbridas humano-hámster

ANOVA – Análisis de la Varianza

ARE – Elemento de Respuesta Antioxidante

ATCC – Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection)

B16F10 – Línea celular de melanoma murino

Bax – Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2

Bcl-2 – Proteína anti-apoptótica (B-cell lymphoma 2)

C – Control (usado como grupo de referencia)

Caspasa-3 – Cisteinil-aspartato proteasa-3 (proteína ejecutora de la apoptosis)

CAT – Catalasa

CBMN – Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis

CHO – Células de Ovario de Hámster Chino

CI – Control Irradiado

CI50 – Concentración Inhibitoria 50

Cito-B – Citocalasina-B

CO₂ - Dióxido de Carbono

COX-2 – Ciclooxygenasa-2

DCFH-DA – Diclorofluoresceína diacetato

DE – Desviación Estándar

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetil sulfóxido

DSB – Roturas de cadena doble (Double-Strand Breaks)

EDTA – Ácido Etilendiaminotetraacético

ERK – Quinasas reguladas por señales extracelulares (Extracellular signal-regulated kinases)

et al. – y otros (del latín *et alii*)

FBS – Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)

FP- Factor de protección

Fig. – Figura

GJIC – Uniones gap (Gap Junction Intercellular Communication)

GPx – Glutación peroxidasa

GR – Glutación reductasa

GSH – Glutación

GST – Glutación S-transferasas

Gy – Gray (unidad de dosis de radiación absorbida)

h – Horas

H₂O₂ – Peróxido de Hidrógeno

HO-1 – Hemo oxigenasa-1

HR – Recombinación homóloga (Homologous Recombination)

HRP – Peroxidasa de rábano picante (Horseradish Peroxidase)

I+AC – Irradiado + Ácido Carnósico

IC – Índice de Citotoxicidad

IDC – Índice de Muerte Celular

IDN – Índice de División Nuclear

IL – Interleucina

IMN – Índice de Micronúcleos

iNOS – Óxido nítrico sintasa inducible

IP – Índice de Proliferación

kDa – kilodalton (unidad de masa molecular)

LED – Diodos emisores de luz (Light Emitting Diode)

LET – Transferencia Lineal de Energía

MAPK – Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MDA – Malondialdehído

min – Minutos

MM – Melanoma Maligno

MTT – Ácido 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio

NAC – N-acetilcisteína

NF- κ B – Factor Nuclear kappa B

NHEJ – Unión de extremos no homólogos (Non-Homologous End Joining)

n.s. – No significativo

NQO1 – NAD(P)H quinona oxidorreductasa 1

Nrf2 – Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2

p53 – Proteína supresora de tumores p53

PBS – Solución salina de fosfato (Phosphate-Buffered Saline)

PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PNT2 – Línea celular de próstata humana normal inmortalizada

RE – Retículo Endoplasmático

RFU – Unidades relativas de fluorescencia (Relative Fluorescence Units)

RI – Radiación Ionizante

RIBE – Efecto espectador inducido por la radiación (Radiation-Induced Bystander Effect)

RIPA – Tampón de lisis celular (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

RNS – Especies Reactivas de Nitrógeno

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno

rpm – Revoluciones por minuto

RT – Radioterapia

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SOD – Superóxido dismutasa

SSB – Roturas de cadena simple (Single-Strand Breaks)

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBS-T – Solución salina tamponada con Tris y Tween 20

TGF- β – Factor de Crecimiento Transformante beta

TNF- α – Factor de Necrosis Tumoral alfa

UV – Radiación Ultravioleta

vs. – versus

WB – Western Blot

μ L – Microlitro

μ M – Micromolar

I.INTRODUCCIÓN.

El melanoma es el tumor con la tasa de mortalidad más alta entre los pacientes con cáncer de piel a nivel mundial. El enfoque terapéutico actual para el melanoma incluye la cirugía como primera línea de tratamiento en estadios localizados, mientras que en fases avanzadas se utilizan la inmunoterapia, las terapias dirigidas y, en casos seleccionados, la radioterapia adyuvante o paliativa. Sin embargo, el melanoma es notoriamente resistente a la quimioterapia y tiene una respuesta limitada a la radioterapia convencional, lo que justifica la búsqueda de nuevas estrategias para mejorar la radiosensibilidad tumoral .

En el contexto experimental, se han usado líneas celulares de melanoma para evaluar la respuesta a la radiación ionizante (RI) y a otros agentes moduladores. Diversos estudios han demostrado que estas células se caracterizan por una alta radiorresistencia atribuida a su capacidad antioxidante endógena y a la activación de mecanismos de reparación del daño en el ADN . Sin embargo, se ha descrito que la administración de ciertas sustancias polifenólicas con efecto antioxidantes y radioprotectoras conocidas, como el carnosol, el ácido rosmarínico y el ácido carnósico, que paradójicamente, no confieren radioprotección a las células del melanoma sino que por el contrario, pueden ejercer un efecto radiosensibilizador.

Este fenómeno paradójico se ha relacionado con la activación de la melanogénesis y la alteración del sistema redox intracelular, especialmente el agotamiento del glutatión, lo que compromete las defensas antioxidantes endógenas, favoreciendo el daño oxidativo letal inducido por la RI. Este efecto radiosensibilizador paradójico también se ha relacionado con las adaptaciones metabólicas asociadas a la alta capacidad metastásica de estas células, a características específicas de su producción enzimática, a su enorme proliferación celular e incluso al cambio en el pH microambiental producido por la necrosis tumoral asociada a su rápido crecimiento.

En este estudio se pretende evaluar la existencia de este efecto radiosensibilizador paradójico en distintas líneas celulares de melanocitos murinos normales y en células de melanoma metastásico humano. La

investigación de compuestos capaces de modular las respuestas a la radiación ionizante —mejorando la radiosensibilidad tumoral mientras se protegen selectivamente las células normales— representa una estrategia prometedora para optimizar la eficacia terapéutica en el melanoma. Este enfoque abre nuevas vías para la radioterapia personalizada al aumentar el daño tumoral sin elevar la toxicidad en los tejidos sanos .

Para ponernos en el contexto de este trabajo debemos conocer los efectos radiobiológicos de la RI, la situación actual del tratamiento del melanoma y los estudios de sustancias vegetales polifenólicas usadas para modular la respuesta a la RI.

LA RADIACIÓN IONIZANTE

Los albores de la radiobiología: del descubrimiento a la aplicación médica

El descubrimiento de la radiación a finales del siglo XIX marcó un hito en la historia de la ciencia y la medicina. Casi simultáneamente, Wilhelm Conrad Röntgen, Henri Becquerel y Marie Skłodowska Curie, junto con su esposo Pierre Curie, realizaron hallazgos cruciales que revelaron la existencia y las propiedades de los rayos X y la radiactividad (1895-1898) (1–3).

La aplicación médica de la radiación no se hizo esperar. Casi inmediatamente después de su descubrimiento, los rayos X se utilizaron para la obtención de imágenes médicas, dando origen a la radiología y para el tratamiento de enfermedades, marcando el inicio de la radioterapia (RT)(1–4). Sin embargo, en sus inicios, la RT se aplicaba con rayos X de baja energía, sin una dosificación precisa, con equipos que carecían de la capacidad de dirigir la radiación de forma precisa y sin una planificación del tratamiento adecuada (5). A lo largo de los últimos 120 años, se ha producido un desarrollo continuo de conceptos y tecnologías para optimizar la aplicación de la radiación en la imagen médica y el tratamiento del cáncer, buscando mejorar la administración, reducir los efectos adversos y optimizar los resultados.

A finales de la década de 1890, Emil Grubbé, un estudiante de medicina con un interés en la electrónica experimentó con el tubo de rayos X de Röntgen, descubriendo que los rayos X podían causar daño tisular significativo, como lo evidenció en su propia mano. Grubbé postuló, que, si los rayos X dañaban los tejidos normales, también podrían dañar las células tumorales. En 1896, aplicó este principio al tratar a una paciente con cáncer de mama metastásico con rayos X (6), marcando un hito en la historia de la RT y el uso de la radiación en el tratamiento del cáncer (7,8).

La radiobiología, la ciencia que estudia los efectos biológicos de la radiación, también tiene sus raíces en esta época. Investigadores pioneros como Hermann Muller, en la década de 1920, demostraron los efectos genéticos de los rayos X en moscas de la fruta, sentando las bases para la comprensión del daño

celular inducido por la radiación. La Segunda Guerra Mundial y la era nuclear, especialmente tras los bombardeos atómicos de Hiroshima y Nagasaki, intensificaron el interés científico en la radiobiología, impulsando la investigación sistemática de los mecanismos de daño celular por radiación ionizante.

Efecto de la radiación ionizante a nivel celular.

La radiación ionizante (RI) se define como aquella energía transmitida por partículas u ondas electromagnéticas de alta frecuencia con la capacidad de ionizar átomos y romper los enlaces químicos que mantienen la integridad de las moléculas en las células.

En RT, se emplean RI de baja Transferencia Lineal de Energía (LET), que liberan aproximadamente 0,2 keV/mm. Estas radiaciones producen ionizaciones y excitaciones dispersas a lo largo de su trayectoria, generando lesiones en su mayoría reparables. Al depositar su energía en un volumen extenso, las partículas de baja LET inducen un daño homogéneo a escala celular.

La ionización y excitación de átomos y moléculas resultan en la ruptura de enlaces químicos y la generación de radicales libres. La radiación modifica los componentes biológicos de las células a través de dos mecanismos principales.

- **Efecto directo:** la radiación impacta directamente en el ADN, causando roturas y otras lesiones.
- **Efecto indirecto:** la RI fragmenta las moléculas de agua , intracelular generando Especies Reactivas de Oxígeno (ROS del inglés Reactive Oxygen Species), como los radicales hidroxilos ($\text{OH}^\cdot$), hidrógeno ($\text{H}^\cdot$) y electrones hidratados ($\text{e}^{\cdot\text{aq}}$). El radical hidroxilo, altamente reactivo, puede capturar átomos de hidrógeno de biomoléculas, oxidar grupos funcionales y romper enlaces covalentes. Las ROS, en conjunto con las especies reactivas de nitrógeno (RNS), causan daño oxidativo al ADN, proteínas y lípidos, desencadenando una cascada de eventos que pueden culminar en muerte celular, mutaciones y otros efectos biológicos adversos (9).

Tradicionalmente, se ha considerado que la radiación de baja LET ejerce sus efectos principalmente a través de mecanismos indirectos mediados por ROS (70%), mientras que los efectos directos representan el 30% restante. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren la necesidad de reevaluar estas proporciones.

La interacción de la radiación con la materia biológica desencadena una serie de eventos que se desarrollan en cuatro etapas:

- **Etapla física:** etapa inicial, de muy corta duración, en la que la energía de la radiación se transfiere a los electrones de átomos y moléculas, causando ionización y excitación. Los iones generados inician una cascada de reacciones químicas.
- **Etapla fisicoquímica:** los iones se difunden en el medio, dando lugar a la formación de radicales de oxígeno y nitrógeno, especies altamente reactivas debido a la presencia de electrones desapareados.
- **Etapla química:** los radicales e iones interactúan con moléculas orgánicas esenciales, como el ADN, lípidos y proteínas, causando daño estructural que compromete su función. En el ADN, las reacciones con las bases nitrogenadas, la desoxirribosa o el grupo fosfato pueden provocar roturas y recombinaciones, generando moléculas anormales.
- **Etapla biológica:** puede extenderse desde minutos hasta décadas, se caracteriza por la propagación de reacciones químicas que afectan diversos procesos biológicos. La eficiencia de los mecanismos de reparación del daño celular influye en la aparición y la gravedad de los efectos biológicos. La duración de esta etapa depende del tipo de radiación, la dosis, la tasa de dosis y la radiosensibilidad del tejido.

Efecto de la RI sobre el ADN

Cuando la radiación impacta directamente en las moléculas esenciales de una célula, su estructura molecular puede alterarse, comprometiendo su función. Si bien todos los componentes celulares, son susceptibles al daño por radiación, el ADN nuclear se considera el blanco más crítico. A diferencia de otras biomoléculas

como proteínas, lípidos y carbohidratos, de las que existen múltiples copias en la célula, el ADN nuclear está presente en una única copia, lo que lo convierte en un blanco especialmente vulnerable.

El ADN puede sufrir oxidación por mecanismos directos e indirectos. Los radicales libres hidroxilos ($\text{OH}^\cdot$), generados por la radiólisis del agua, son los principales agentes oxidantes. Estos radicales atacan los azúcares, grupos fosfato y bases del ADN, causando una variedad de lesiones, incluyendo roturas de cadena simple (SSB), roturas de cadena doble (DSB), daño o pérdida de bases y entrecruzamientos con proteínas (10,11). Se estima que con 1 Gy de rayos X, se producen aproximadamente 1000 SSB, 40 DSB y 10.000 daños en bases por célula(12,13).

Las DSB son las lesiones más graves, ya que comprometen la integridad del genoma y la viabilidad celular. Para contrarrestar el daño al ADN inducido por la radiación, las células han desarrollado mecanismos de reparación.

Existen dos vías principales para la reparación de las DSB:

- **Recombinación homóloga** (HR-Homologous recombination): opera principalmente en las fases S y G2 del ciclo celular, cuando el ADN se está replicando. Utiliza la cromátida hermana intacta como molde para la reparación, asegurando una alta fidelidad.

El proceso de HR implica la formación de un filamento de RAD51 que busca una región homóloga en la cromátida hermana. Esta región se utiliza como plantilla para la reparación de la DSB, evitando la introducción de errores.

- **Unión de extremos no homólogos** (NHEJ-Non-homologous end joining): predomina en la fase G1 del ciclo celular. Es un proceso rápido que une directamente los extremos rotos del ADN, pero puede introducir errores en la secuencia. Tras la rotura, la proteína Ku70/80 se une a los extremos del ADN y recluta otras proteínas que facilitan la unión directa de los extremos.

Ambos mecanismos de reparación dependen de complejos proteicos clave:

- Complejo Ku70/80/ADN-PKcs (ADN-PK): participa en la unión de los extremos del ADN en el mecanismo NHEJ.
- Complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN): desempeña un papel en la detección y procesamiento de las DSB, participando tanto en HR como en NHEJ (14,15).

Efectos de la RI sobre estructuras extranucleares

En las últimas dos décadas, la radiobiología ha experimentado un cambio de paradigma, transitando de la teoría del blanco celular a una visión más holística. Esta nueva perspectiva reconoce la influencia del microambiente celular en la respuesta a la radiación y la importancia de considerar blancos extranucleares, además del ADN, en el desencadenamiento de la muerte celular.

La elaboración de procedimientos como la irradiación con microhaces ha permitido dirigir la radiación a compartimentos subcelulares específicos, revelando la vulnerabilidad de las estructuras extranucleares a los efectos de la RI.

-Membranas celulares: compuestas por lípidos, proteínas y carbohidratos, son susceptibles al daño inducido por la radiación. Los radicales libres generados por la RI pueden peroxidar los lípidos de la membrana, alterando su estructura y función (16).

Un componente crítico de las membranas celulares son las balsas lipídicas, microdominios ricos en colesterol y ceramida que desempeñan un papel fundamental en diversos procesos celulares (17). La radiación puede aumentar la producción de ceramida, promoviendo la formación de grandes plataformas de balsas lipídicas que participan en la activación de vías de señalización relacionadas con la muerte celular, la supervivencia y la inflamación (18).

-Mitocondrias: responsables de la producción de energía celular, también son susceptibles al daño por radiación, tanto directa como indirectamente. Representando hasta el 30% del volumen celular, las mitocondrias contienen ADN

circular que puede sufrir roturas de cadena, desajustes de bases o deleciones tras la exposición a la RI, convirtiéndolas en un blanco principal de la radiación (19)

Además del daño al ADN mitocondrial, la RI induce cambios morfológicos en las mitocondrias, como agrandamiento, aumento en la longitud y número de ramificaciones de las crestas, ruptura de las membranas externa e interna, vacuolización y pérdida de la matriz (20,21). Estos cambios se acompañan de una disminución en la actividad de la cadena respiratoria, particularmente en los complejos I, II y III, que muestran una alta sensibilidad a los efectos directos de la IR. La capacidad respiratoria impulsada por el succinato y la ATP sintasa también se ve afectada, comprometiendo la fosforilación oxidativa. Si bien la disminución en la tasa de fosforilación oxidativa puede recuperarse con el tiempo, la magnitud de la recuperación varía según el tipo celular (22,23).

La RI también aumenta la producción de ROS en las mitocondrias. Los electrones que se fugan de la cadena respiratoria durante el transporte pueden reducir el oxígeno molecular, generando aniones superóxido, precursores de la mayoría de las ROS.

-Retículo endoplasmático (RE): La RI induce cambios morfofuncionales en el RE, incluyendo dilatación, formación de vesículas y fragmentación de las cisternas. En el caso del RE rugoso, se observa desgranulación y la transformación de ribosomas unidos a la membrana en ribosomas libres (21,24) .

-Aparato de Golgi: La irradiación puede desorganizar la estructura del aparato de Golgi, fragmentando y reorganizando sus cisternas. Las alteraciones en el RE y el aparato de Golgi afectan la síntesis y maduración de proteínas en las células irradiadas.

-Lisosomas: En las células irradiadas, se observa un aumento en el número y volumen de los lisosomas, acompañado de una mayor actividad enzimática en estos orgánulos(21,22)

El efecto de la RI adyacente y distante al foco de irradiación

Aunque la teoría que atribuía el daño celular por radiación exclusivamente al sitio de exposición fue dominante durante mucho tiempo, numerosas observaciones han desafiado esta visión. La evidencia creciente sugiere la acción de procesos que inducen daño en las células vecinas y distantes al foco de irradiación, generando fenotipos similares a los observados en células irradiadas directamente. Además, se ha demostrado que las células cancerosas irradiadas liberan señales que modifican el microambiente tumoral, afectando a células no irradiadas. Estos hallazgos subrayan la complejidad de la respuesta celular a la RI.

Efecto de la RI adyacente al foco de radiación: efecto bystander - RIBE

A finales del siglo XX, surgió el interés por el "efecto espectador" inducido por la radiación (RIBE), que se refiere a las respuestas biológicas en células no irradiadas cercanas a células que sí lo fueron. Este fenómeno es crucial para comprender los impactos biológicos de la radiación ionizante (RI), especialmente en el contexto del cáncer. Los primeros indicios datan de 1915, cuando Murphy y Morton observaron que ratones desarrollaban inmunidad tumoral tras la irradiación, atribuyéndolo a la influencia de la radiación sobre el tejido normal circundante (25). Aunque la conexión con el daño cromosómico no estaba establecida, su hipótesis anticipó el concepto.

En la década de 1930, el "modelo del blanco", que postulaba al ADN como el principal objetivo de la radiación, se consolidó con los trabajos de Muller (26). En los años 40, se estableció la relación entre los efectos indirectos de la radiación y la formación de radicales libres, pero la atención se centró en el daño directo al ADN, sin explorar a fondo el papel de las "moléculas de señalización". A finales de los 80, el paradigma cambió hacia la investigación de la señalización celular.

El experimento de Nagasawa y Little en 1992 (27) fue un hito en el descubrimiento del RIBE. Irradiaron una pequeña fracción (~1%) de un cultivo de células de pulmón de hámster chino (CHO) con partículas alfa y observaron un aumento significativo de micronúcleos (indicadores de daño genético) en las

células expuestas a radiación, así como en las no expuestas en contacto con ellas. La magnitud del efecto fue sorprendente y desafió la visión tradicional de que el daño por radiación se limita a las células directamente afectadas. A partir de entonces, numerosos estudios confirmaron la existencia del RIBE e iniciaron la investigación de sus mecanismos.

En 1997, Folkard y cols. (28,29) utilizaron un microhaz de partículas para irradiar células individuales, revelando que el efecto espectador, medido por la formación de micronúcleos, era incluso mayor que el daño directo de la radiación (30,31). Además, observaron este efecto a distancia, en células sin contacto directo, lo que indicaba la existencia de al menos dos vías distintas involucradas en el RIBE.

Mecanismos subyacentes al efecto espectador

Los mecanismos del RIBE se pueden clasificar en tres categorías que no son excluyentes y a menudo actúan conjuntamente: la comunicación intercelular a través de **uniones gap** por contacto físico (32), la liberación de **moléculas de señalización solubles** (33) y los **exosomas** como vectores de comunicación (34).

Efecto espectador mediado por uniones gap

Las uniones gap son canales intercelulares formados por proteínas llamadas conexinas, que permiten el intercambio de iones, metabolitos y pequeñas moléculas de señalización entre células adyacentes (35,36). Su implicación en el RIBE fue propuesta por Azzam y cols. en 1998 (32) y confirmada experimentalmente en 2001 (37), demostrando que la inhibición de esta comunicación (GJIC) reducía la propagación del efecto.

La evidencia experimental se basó en la inhibición farmacológica con sustancias como el lindano y el octanol. Zhou et al. (38) observaron que el octanol disminuía significativamente la frecuencia de mutaciones inducidas por radiación, y de manera similar, el lindano redujo el efecto espectador en otras líneas celulares (39,40). La manipulación genética, creando células deficientes en uniones gap, también ha sido una herramienta poderosa para estudiar el papel de la GJIC.

A pesar de esta evidencia, algunos estudios han cuestionado su papel. Imaizum et al. (41) y Banaz-Yasar et al. (42) no observaron cambios en el efecto espectador tras el tratamiento con inhibidores de uniones gap en ciertas líneas celulares de cáncer. Estos hallazgos contradictorios sugieren que el papel de las uniones gap puede variar según el tipo celular y las condiciones experimentales, y apuntan a la existencia de otros mecanismos como la señalización soluble.

Señalización soluble

Este proceso incluye la transmisión intercelular de señales y su posterior transducción intracelular en las células espectadoras.

Moléculas de señalización intercelular:

- **Especies Reactivas de Oxígeno (ROS):** Son moléculas altamente reactivas generadas como subproductos del metabolismo. Su producción desregulada causa estrés oxidativo (43), asociado a patologías como el cáncer (44). La exposición a RI, especialmente a partículas alfa, aumenta la generación intracelular de ROS (43), principalmente por la estimulación de la NAD(P)H oxidasa. Las ROS pueden difundir a través de las membranas celulares, actuando como mensajeros intercelulares que amplifican el daño inicial. Nagasawa y Little (27) fueron los primeros en plantear esta hipótesis, observando que el superóxido dismutasa (SOD) podía inhibir el efecto. Estudios con microhaces de radiación confirmaron que la irradiación con partículas alfa induce la producción de ROS y daño al ADN en células adyacentes no irradiadas (45). Este efecto puede ser inhibido por antioxidantes como el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glutatión (46). Azzam et al. (47) también demostraron que enzimas antioxidantes como Cu-Zn SOD y catalasa inhibían la regulación positiva de la proteína p21 Waf1 y la formación de micronúcleos en células espectadoras.
- **Interleucina-8 (IL-8):** Es una citoquina que atrae y activa neutrófilos. Diversos estudios han demostrado su implicación en el RIBE. Narayanan et al. (43) la asociaron con un aumento de ROS. Un estudio posterior (48) mostró que dosis bajas de partículas alfa inducían un aumento en la

producción de IL-8. Facoetti et al. (49) observaron que la radiación gamma alteraba los niveles de expresión de IL-8 y su receptor CXCR1 de manera dependiente del tiempo. Otro estudio (50) sugirió que la IL-8 podría influir en la supervivencia de las células espectadoras. Sus mecanismos de acción incluyen la quimiotaxis, la activación celular y la modulación de vías de señalización como MAPK y NF- κ B.

- **Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1):** Es una citoquina multifuncional clave en el RIBE. Puede interactuar con la proteína clusterina (CLU) (51), que existe en dos formas: una secretora (sCLU) y una nuclear (nCLU). La activación de la nCLU por TGF- β 1 puede aumentar la apoptosis o la quiescencia celular (52,53), mientras que la sCLU puede actuar como un factor protector, bloqueando el efecto espectador (53). Recientemente, se ha investigado su interacción con microARNs (miARNs) y ARN largos no codificantes (lncRNAs). Hu et al. (54) encontraron que el miR-663, que tiene al TGF- β 1 como objetivo directo, se regulaba al alza en las células espectadoras y podía inhibir la expresión de TGF- β 1, suprimiendo el efecto. Otro estudio (55) demostró que el papel del TGF- β 1 en la tumorigénesis inducida por radiación estaba regulado epigenéticamente por varios lncRNAs.
- **Óxido nítrico (NO):** Es una molécula de señalización pequeña, estable e hidrofóbica que se difunde libremente a través de las membranas celulares. La RI, incluso a dosis bajas, puede estimular su producción y la de su enzima sintasa (NOS). El NO se produce a partir de L-arginina por tres isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). La iNOS se expresa en respuesta a estímulos inflamatorios como la RI. Matsumoto et al. (54) encontraron que la expresión de iNOS aumentaba rápidamente tras la irradiación con rayos X. Leach et al. (55) observaron que la activación de una sintasa de óxido nítrico combinatoria (cNOS) inducía eventos tempranos en el efecto espectador.

Vías de señalización intracelular:

- **Ciclooxigenasa-2 (COX-2) y vía MAPK:** La COX-2 es una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas y juega un papel importante en el daño genético en células espectadoras. Zhou et al. (56) demostraron que la inhibición de COX-2 reducía significativamente las mutaciones inducidas por el efecto espectador. La vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) regula procesos como el crecimiento y la proliferación celular. Se ha demostrado que la activación de la vía MAPK precede al aumento en la expresión de COX-2 (56), y la inhibición de esta vía resultó en una supresión casi completa del efecto espectador. Se propone que factores solubles liberados por las células irradiadas activan la vía MAPK, que a su vez aumenta la expresión de COX-2 (48,57).
- **Calcio (Ca²⁺):** Es un ion esencial en múltiples procesos celulares. En el RIBE, juega un papel fundamental en el inicio y la propagación. En las células irradiadas, se produce un aumento rápido de Ca²⁺ intracelular, tanto por entrada desde el exterior como por liberación desde los depósitos internos (retículo endoplásmico) mediada por el inositol trifosfato (IP3). Las células espectadoras también experimentan un aumento de Ca²⁺ al ser expuestas al medio condicionado de cultivos irradiados, que contiene moléculas como el ATP. La propagación de ondas intercelulares de Ca²⁺ amplifica la señalización del RIBE. Lipp et al. (58) demostraron que el medio condicionado de células irradiadas aumentaba los niveles de calcio en células no irradiadas.
- **Factor nuclear kappa B (NF-κB):** Es un factor de transcripción que regula genes implicados en la respuesta inmunitaria, la inflamación y la apoptosis. En el RIBE, media las respuestas celulares a la RI. La quinasa de ataxia telangiectasia mutada (ATM), esencial en la respuesta al daño del ADN (59), interactúa de forma compleja y bidireccional con NF-κB (63,64). NF-κB se activa en respuesta a la RI y puede aumentar la expresión de genes proinflamatorios como IL-6, IL-8 y TNF-α, que contribuyen al RIBE (60–62). Otras vías, como la de TNF/TNF-R1, también pueden activar NF-κB (65).

Exosomas como vectores de comunicación intercelular en el RIBE

Los exosomas, vesículas extracelulares de 30 a 150 nm, han emergido como importantes mediadores del RIBE (34). Transportan una carga diversa de moléculas bioactivas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) que pueden ser transferidas a otras células (67). Los primeros estudios reportaron un aumento del ligando Fas, un inductor de apoptosis, en vesículas liberadas por células irradiadas (66). Se ha demostrado que los exosomas pueden propagar el RIBE a través de múltiples generaciones celulares (68).

- **ADN mitocondrial (ADNmt):** Es un componente crucial de la señalización mediada por exosomas. Experimentos con células irradiadas sin ADNmt mostraron que sus exosomas no podían inducir daño en células no irradiadas (69,70). El ADNmt es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear (71,72). La transferencia de ADNmt dañado a través de exosomas podría contribuir a la disfunción mitocondrial y la generación de ROS en las células espectadoras. Además, el ADNmt liberado puede actuar como un patrón molecular asociado a daño (DAMP), activando el sistema inmunitario innato.
- **Biofotones:** Fotones de luz emitidos por las células, se han propuesto como comunicadores intercelulares del estrés inducido por la radiación (73,74).
- **ARN no codificantes (ARNnc):** Moléculas como los micro ARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNsi), ARN largo no codificante (ARNlnc) y ARN circular (ARNc) han sido detectados en exosomas de células irradiadas (75). Estos ARN pueden modular la expresión génica en las células espectadoras, afectando vías clave como la apoptosis, el ciclo celular y la reparación del ADN (76,77). El miR-21 es un ejemplo bien estudiado de un miARN transferido por exosomas que modula el RIBE (78).

Efectos del espectador *in vivo*

La validación de los mecanismos del RIBE en sistemas *in vivo* es crucial. Los estudios en animales han confirmado su existencia y han revelado la importancia de los mecanismos epigenéticos.

Koturbash et al. (79) irradiaron un lado del cuerpo de ratones, protegiendo el otro, y observaron que el ADN altera su patrón de metilación y cambios en la expresión de proteínas relacionadas tanto en la piel irradiada como en la no irradiada (espectadora). En otro estudio (80), se irradió la cabeza de ratas y se observó una desregulación epigenética severa en el bazo, un órgano no irradiado, con efectos que persistieron a largo plazo. Un experimento posterior (81) demostró que la irradiación intracraneal de ratones causaba cambios en la proteína p53 en los bazos, sugiriendo respuestas al daño del ADN en tejidos distantes. Además, se han revelado diferencias en la señalización del efecto espectador en función del sexo en animales (82).

RIBE y dosis de radiación

La relación entre la dosis de radiación y la magnitud del efecto es compleja. Giuseppe et al. (83) encontraron que, a dosis inferiores a 0.5 Gy, la probabilidad de inducir el efecto aumentaba con la dosis, pero la magnitud del efecto, una vez desencadenado, permanecía constante. A dosis inferiores a 0.3 Gy, la relación se invertía. Para las partículas alfa, una sola partícula es suficiente para inducir el efecto (84), mientras que para las partículas beta, se ha observado una dependencia de la dosis (85). En experimentos de transferencia de medio (86), el efecto se saturaba en el rango de 0.03-0.05 Gy.

Estos hallazgos sugieren que el efecto espectador opera mediante un mecanismo de "todo o nada" (87–89). Una vez activado, el efecto no depende de la dosis y exhibe una respuesta de magnitud similar, que puede persistir en el tiempo, transmitirse a la progenie celular (90–92) e incluso desencadenar reacciones en diferentes especies (93,94), lo que indica una alta conservación evolutiva. La saturación podría explicarse por una producción limitada de moléculas de señalización o por una capacidad de respuesta limitada de las células espectadoras.

Efecto de la RI distante al foco de radiación: efecto abscopal (EA)

Descubierto por Mole en 1953 (95), el efecto abscopal (EA) describe cómo la radioterapia (RT) puede inducir la regresión de tumores distantes que no han sido irradiados. A pesar de su gran potencial, su aplicación clínica ha sido limitada debido a su baja frecuencia de aparición. Por ello, la investigación reciente se ha centrado en desentrañar los complejos mecanismos biológicos que lo gobiernan y los factores que influyen en su manifestación.

Factores Biológicos que afectan el EA

Sistema Inmunitario

La RT no solo ejerce un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales, sino que también es capaz de activar una potente respuesta inmunitaria antitumoral, que es fundamental para el EA. La muerte de las células tumorales irradiadas provoca la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (96), como la calreticulina, el ATP, la proteína HMGB1 y el ADN bicatenario (97). Estos DAMPs actúan como señales de peligro que alertan al sistema inmunitario.

El ADN bicatenario liberado en el citoplasma es particularmente importante, ya que activa la vía cGAS-STING, un componente clave de la inmunidad innata (98). Esta activación induce la producción de interferones tipo I y otras citoquinas proinflamatorias, que a su vez promueven la maduración de las células dendríticas (CDs) y la presentación de antígenos tumorales a las células T.

Sistema Inmune Innato

Células Dendríticas (CDs)

Las CDs, como principales células presentadoras de antígenos, desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria antitumoral. Demaria et al. (99) demostraron por primera vez su importancia en el EA en un modelo de cáncer de mama en ratones. La RT combinada con Flt3-L, un factor de crecimiento para las CDs, indujo una respuesta abscopal, un efecto que no se observó en ratones inmunodeficientes que carecían de CDs funcionales. Estudios posteriores

han confirmado que la combinación de RT con inmunoterapia o la administración directa de CDs puede inducir la regresión de tumores distantes (100).

Macrófagos

El bloqueo de la molécula de superficie celular CD47 ha demostrado mejorar los efectos antitumorales de la RT y estimular un EA que es dependiente de los macrófagos, no de las células T (101). En modelos de cáncer de pulmón, la combinación de RT y bloqueo de CD47 indujo respuestas abscopales y un mayor reclutamiento de macrófagos tanto en los tumores irradiados como en los distantes. La eliminación experimental de macrófagos anuló por completo este efecto (101).

La RT influye en la diferenciación de los macrófagos, favoreciendo el fenotipo proinflamatorio y antitumoral M1 sobre el fenotipo inmunosupresor M2. Tras la RT, se observa un aumento de macrófagos M1, que contribuyen a detener el crecimiento tumoral y las metástasis mediante la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt y la promoción de la transición epitelial-mesenquimal (MET).

El proceso de activación de los macrófagos en el EA involucra la liberación de HMGB1 por parte de las células tumorales irradiadas. El HMGB1 activa los macrófagos a través de la vía TLR-4, promoviendo la secreción de TNF- α , una citoquina proinflamatoria crucial. El TNF- α liberado por los macrófagos M1 actúa sobre las células cancerosas distantes, inhibiendo su proliferación. La neutralización del TNF- α in vivo ha demostrado abolir el EA (102). La irradiación directa de macrófagos también puede inducir un cambio hacia el fenotipo M1 proinflamatorio (103).

Un mecanismo específico en el melanoma implica que la RT promueve la liberación de exosomas por parte de las células tumorales. Estos exosomas transportan un ARN circular (circPIK3R3) que, al ser captado por los macrófagos, desencadena la activación de la vía miR-872-3p/IRF7. Esto promueve la secreción de interferón tipo I (IFN-I) y la polarización M1 de los macrófagos, lo que finalmente

activa las células T CD8+ y potencia el EA (104). La combinación de RT con la activación de macrófagos se perfila como una estrategia terapéutica potente (105).

Sistema Inmunitario Adaptativo – Linfocitos T CD8+

El EA está estrechamente relacionado con la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ citotóxicos. La RT potencia la respuesta de estas células a través de varios mecanismos. Estudios en modelos animales han demostrado que se necesita una dosis menor de radiación para controlar el crecimiento tumoral en presencia de un sistema inmunitario funcional (106).

La RT puede aumentar la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en las células T CD8+ dentro de tumores no irradiados, facilitando su interacción con las células tumorales y su posterior eliminación (107). Además, la RT estimula la liberación de quimiocinas como CXCL16, que atraen a las células T CD8+ al microambiente tumoral (108, 109), un paso esencial para la respuesta abscopal. La ausencia de células T funcionales aumenta la dosis de radiación necesaria para lograr un efecto citotóxico (110).

La RT también potencia la actividad de las células T específicas del tumor al inducir la producción de interferones tipo I o la muerte celular inmunogénica (111, 112). La combinación de RT con el bloqueo de inhibidores de puntos de control como CTLA-4 puede inducir una fuerte respuesta antitumoral de células T y potenciar el EA (113, 114). Asimismo, la RT aumenta la expresión de MHC-I en las células tumorales, facilitando su reconocimiento y eliminación por parte de las células T CD8+ (115, 116). La RT también mejora la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas, lo que activa a las células T CD8+ y a las células NK (98, 117). Finalmente, la irradiación fraccionada puede inducir el EA en tumores poco inmunogénicos al inhibir la enzima TREX1, lo que activa la vía cGAS-STING (118).

Células Inmunosupresoras

La RT también puede influir en las células que suprimen la respuesta inmunitaria. Una dosis alta de irradiación (15 Gy) puede aumentar la infiltración de

células T reguladoras (Tregs) inmunosupresoras en el tumor. En cambio, una irradiación fraccionada con dosis moderadas (7.5 Gy x 2) mantiene bajos los niveles de Tregs, lo que sugiere que el esquema de dosificación es clave para modular la respuesta inmunitaria y el EA (119). La combinación de RT con anticuerpos anti-CD25, que eliminan las Tregs, puede promover la eliminación de tumores distantes en modelos animales (120).

Las citocinas

Las citocinas son proteínas que regulan la respuesta inmunitaria. Se ha demostrado que el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y el óxido nítrico (NO) están implicados en el efecto espectador (121). El bloqueo de TGF β puede estimular la respuesta de las células T CD8⁺ y la inhibición de tumores a distancia (122). El TNF α y la IL-1 α también participan, y su implicación puede variar según el tipo de radiación utilizada (123).

Los ganglios linfáticos que drenan el tumor (TDLN)

Los TDLN son estructuras cruciales para la respuesta inmunitaria antitumoral, aunque su papel en el EA ha sido poco estudiado. Actúan como filtros que capturan antígenos tumorales y son sitios clave para la activación de células T (124, 125). Además, sirven como reservorio de células T CD8⁺ de memoria que pueden responder rápidamente a una reexposición al tumor (126). La eliminación quirúrgica de los TDLN bloquea el control local del tumor por RT (127), y la presencia de células T en los TDLN es importante para el éxito de la terapia combinada con inhibidores de puntos de control (128). Irradiar los TDLN junto con el tumor puede atenuar la respuesta inmunitaria y reducir la eficacia del tratamiento (129).

Otros Factores Biológicos que Influyen en el Efecto Abscopal

El Gen p53

El gen supresor de tumores p53 también participa en la respuesta inmunitaria. Las mutaciones en p53 pueden afectar negativamente esta respuesta al inhibir la vía del interferón beta (IFN β) (130) e interferir con la vía cGAS-STING (131). Los tumores con p53 mutante también muestran una menor infiltración de

células T CD8⁺ (132). Aunque la presencia de p53 mutante no parece afectar la respuesta del tumor local a la RT, sí suprime los efectos abscopales (133, 134). Se ha demostrado que el EA depende de la presencia de un p53 funcional (135).

Mitocondrias

La irradiación puede dañar las mitocondrias, provocando la liberación de componentes como el ADN mitocondrial (ADNmt) y el ARNmt (136). Estos actúan como DAMPs, activando la respuesta inmunitaria. La liberación de ADNmt al citoplasma puede ocurrir a través de varios mecanismos (137, 138, 139) y puede activar las vías cGAS-STING (140) y RIG-I/MDA5 (145), induciendo la producción de IFN-I, que tiene un potente efecto antitumoral (141). Procesos como la mitofagia, que elimina mitocondrias dañadas, pueden inhibir este mecanismo del EA (142).

Exosomas

Los exosomas liberados por las células tumorales irradiadas juegan un papel importante en la comunicación intercelular. Pueden transportar DAMPs y antígenos tumorales, activando así a las células dendríticas y a las células T (143), o proteínas de choque térmico que activan a las células NK (144). Sin embargo, también pueden tener un efecto contrario, transportando moléculas inmunosupresoras como PD-L1 (145) o promoviendo la resistencia a la RT y la proliferación tumoral (146, 147). Además, se ha descrito que pueden afectar a células normales, aumentando el riesgo de neoplasias secundarias (148).

Efectos clastogénicos

Aproximadamente una década después del primer informe sobre los factores clastogénicos (CF), surgieron estudios que revelaron la existencia de los mismos, un fenómeno que implica la producción de factores en el plasma sanguíneo tras la exposición a la RI. Los CF de la radiación representan un fenómeno complejo que implica la generación de factores en el plasma sanguíneo capaces de inducir daño cromosómico en células no irradiadas. Si bien la existencia de estos factores ha sido ampliamente documentada, persisten

controversias y se necesitan más investigaciones para comprender completamente los mecanismos involucrados y sus implicaciones para la salud humana.

En 1962, se reportó la inducción de tumores en ratas hembra tras la inyección de plasma proveniente de ratas y ovejas que habían sido letalmente irradiadas(25). Este hallazgo sugirió la presencia de factores en el plasma irradiado capaces de inducir transformación maligna en células no irradiadas.

Posteriormente, se observó daño cromosómico en linfocitos cultivados tras la exposición al plasma de pacientes sometidos a altas dosis de radiación (26,27). De manera similar, se reportaron roturas cromosómicas en linfocitos de individuos sanos expuestos al plasma de individuos que habían recibido irradiación de cuerpo entero(28). Estos estudios confirmaron que los CF podían inducir inestabilidad genómica en células no irradiadas.

Se demostró que la producción de CF ocurría tanto *in vitro*, en sangre irradiada fuera del organismo, como *in vivo*, en la sangre de animales irradiados (29). Además, se observó que estos factores podían persistir en el plasma durante largos periodos de tiempo. Así se detectaron aberraciones cromosómicas en linfocitos expuestos al plasma de individuos que habían estado expuestos accidentalmente a la lluvia radiactiva en las Islas Marshall 15 años antes (30). De manera similar, se reportaron roturas cromosómicas en leucocitos expuestos al plasma de sobrevivientes de la bomba atómica, más de 30 años después de la exposición(31).

Faguet et al. describieron roturas cromosómicas persistentes en ratas durante al menos 10 semanas después de la irradiación de cuerpo entero (32). Emerit y colaboradores realizaron una serie de estudios en la década de 1990 que demostraron la presencia de EC en el plasma de los equipos de trabajadores de rescate de Chernobyl y de niños que vivían cerca del accidente(33–38) . También se encontraron evidencias de EC en el plasma de niños de Bielorrusia 10 años

después del accidente de Chernobyl(39) y en el plasma de trabajadores de Chernobyl y residentes de Bielorrusia 20 años después del accidente(40) .

Se determinó que los CF tienen un bajo peso molecular (1000-10 000 Da) y que su producción está relacionada con la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. El análisis bioquímico permitió identificar algunos de los componentes de estos factores, incluyendo productos de peroxidación lipídica del ácido araquidónico, citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y nucleótidos atípicos como la inosina di- y trifosfato(33) .

Se observó que los efectos deletéreos de los CF podían ser inhibidos *in vitro* (168), *in vivo* en trabajadores de Chernobyl (169) y en un modelo animal (41) mediante un extracto de hojas de *Ginkgo biloba*, conocido por sus propiedades antioxidantes.

A pesar de la abundante evidencia sobre los CF, algunos estudios no lograron detectarlos en el plasma humano tras la irradiación *in vitro* o *in vivo* (42,43). Se ha sugerido que los resultados contradictorios podrían deberse a artefactos relacionados con las condiciones de cultivo de los linfocitos o al pequeño volumen de tejido irradiado en algunos estudios .

Un estudio posterior, que empleó electroforesis en gel bidimensional para analizar proteínas de bajo peso molecular, no encontró cambios en la expresión de proteínas en el plasma de individuos sanos tras la irradiación (44). Sin embargo, el plasma de víctimas de accidentes de radiación sí mostró inducción de aberraciones cromosómicas *in vitro* (43,45) y cambios en la expresión de proteínas.

El plasma de sangre irradiada *in vitro* no indujo apoptosis en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizadas como células informadoras, pero se observó una reducción en la inducción de apoptosis en PBMC irradiadas (46), lo que podría tener implicaciones para las células que sobreviven a la exposición a la radiación.

EL MELANOMA

El melanoma representa el 1% de las neoplasias dérmicas. Es el cáncer de piel menos frecuente, pero de mayor mortalidad (47).

Datos mundiales

Según datos GLOBOCAN 2022/2024 (último registro disponible) y la base de datos de la OMS, el melanoma se perfila como una de las preocupaciones sanitarias destacadas del siglo XXI. Los registros médicos globales documentan alrededor de 324,000 diagnósticos nuevos cada año, representando el 1.7% del conjunto de patologías oncológicas. Al examinar la población general, se identifica una proporción de 3.4 personas diagnosticadas por cada 100,000 habitantes.

Los patrones de aparición según el género muestran diferencias significativas: la población masculina registra una mayor frecuencia con cerca de 167,000 casos (3.7 por cada 100,000 varones), en comparación con 158,000 diagnósticos en mujeres (3.2 por cada 100,000 mujeres).

El panorama geográfico de esta neoplasia cutánea revela disparidades llamativas. Las regiones de Oceanía, específicamente Australia y Nueva Zelanda, presentan la mayor concentración de casos, alcanzando 33.6 diagnósticos por cada 100,000 habitantes. Los países escandinavos ocupan el segundo lugar con 15.2, seguidos por Norteamérica (12.7) y la zona occidental europea (11.8). Por otro lado, las cifras más reducidas se encuentran en la región meridional asiática (0.3), el corazón de África (0.4) y el territorio oriental asiático (0.4), señalando una clara correlación con características genéticas y exposición ambiental.

La letalidad asociada alcanza aproximadamente 57,000 fallecimientos anuales, lo que establece un índice de 0.6 decesos por cada 100,000 personas. El análisis por género indica una mayor tasa de mortalidad en hombres, contabilizando 32,100 muertes en varones (0.7 por 100,000) frente a 25,000 en mujeres (0.4 por 100,000).

Las expectativas de vida varían considerablemente según el contexto socioeconómico: las sociedades industrializadas alcanzan índices de supervivencia entre 90-95% cuando la detección es temprana, mientras que las regiones en desarrollo fluctúan entre 40-60%. Esta brecha resalta cómo el acceso a tecnologías diagnósticas avanzadas y tratamientos innovadores influye decisivamente en el curso de la enfermedad.

Datos en España

En España, el melanoma de piel muestra una tendencia creciente. Según datos publicados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Red Española de Registros de Cáncer (Redecan),^(48,49) se ha registrado un aumento progresivo entre 2003 y 2024. Las estadísticas muestran que la tasa por cada 100.000 habitantes se elevó de 12,0 a 15,4 en varones y de 12,0 a 15,1 en mujeres, representando incrementos anuales del 1,2% y 1,1% respectivamente.

Las proyecciones para 2024 señalaban en esta publicación, que se detectarían 7.881 casos nuevos, distribuidos entre 4.156 mujeres y 3.725 hombres, equivalente a 15 casos por cada 100.000 habitantes al año. Esta distribución posiciona al melanoma cutáneo como el octavo tumor más común en mujeres y el undécimo en hombres. La distribución etaria muestra que el segmento de 50-69 años concentra el 36,8% de los casos, seguido por el grupo de 0-49 años (26,4%), el de 70-79 años (20,2%) y finalmente los mayores de 80 años (16,6%).

Los índices de supervivencia han mostrado una mejoría en ambos sexos, según los registros más recientes (2008-2013). En cuanto a la letalidad, los datos de 2021 registraron 1.056 fallecimientos (2 por cada 100.000 personas/año), con 586 casos en hombres y 471 en mujeres. Estas cifras ubican al melanoma cutáneo en el puesto 17 entre los cánceres más letales en hombres y en el 18 en mujeres. Es notable que mientras la tasa masculina aumentó un 0,1% anual entre 2003 y 2021, la femenina experimentó un descenso del 0,4%. El análisis por edades revela que los pacientes octogenarios presentan la mayor mortalidad (37,0%), seguidos

por el grupo de 50-69 años (28,0%), el de 70-79 años (26,4%) y finalmente el grupo de 0-49 años (8,6%).

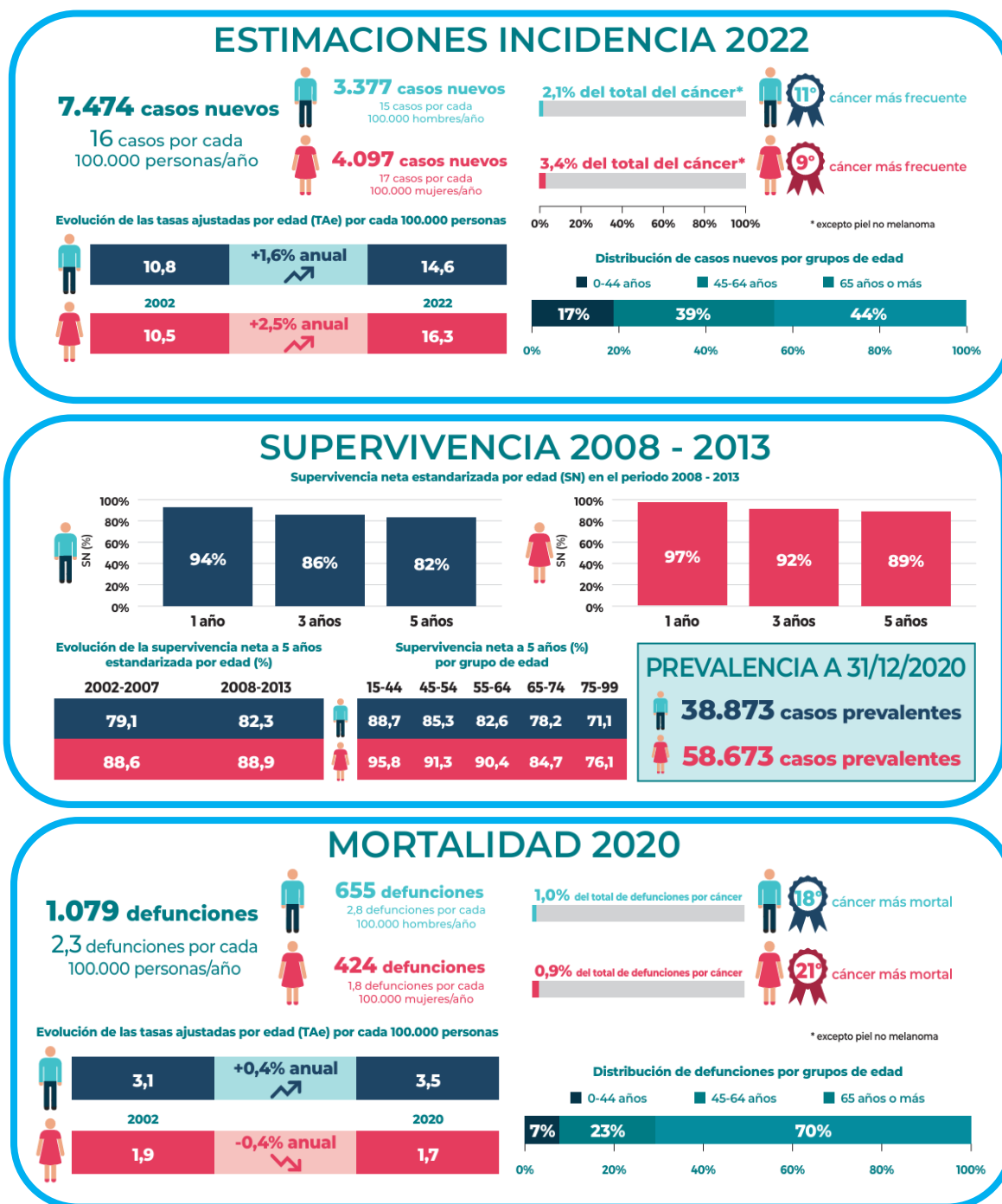


Figura 1. Estimación incidencia, supervivencia y mortalidad del melanoma. Fuente: Red Española de Registros de Cáncer. Instituto Nacional de Estadística. Código Europeo Contra el Cáncer

Subtipos de Melanoma y Características

La clasificación actual del melanoma cutáneo tiene en cuenta varios factores clave como son (47):

- El sitio de origen (asociado al epitelio versus no asociado al epitelio).
- El papel del daño solar acumulativo (relacionado con alto daño solar acumulativo, bajo o no relacionado).
- El fenotipo del lunar (recuento de nevus alto versus bajo).
- La frecuencia de BRAF, NRAS y otras mutaciones relevantes.

Esto ha dado como resultado la clasificación revisada de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2018 (ver Figura 2), que incluye los siguientes tumores de la piel (50):

- Melanoma con daño solar acumulativo bajo.
- Melanoma con daño solar acumulativo alto.
- Melanoma desmoplásico.
- Melanoma de Spitz.
- Melanoma acral.
- Melanoma de la mucosa.
- Melanoma que surge en el nevo congénito.
- Melanoma que surge en el nevo azul.
- Melanoma uveal.

Table 2. Classification of Melanomas and Precursor Lesions on the Basis of Epidemiologic, Clinical, Pathologic, and Genomic Attributes, Pathways I to III						
Pathway	Low UV Radiation Exposure/CSD				High UV Radiation Exposure/CSD	
	I				II	III
Endpoint of pathway	Low-CSD melanoma/SSM				High-CSD melanoma/LMM	Desmoplastic melanoma
Benign neoplasms (nevi)	Nevus				? IMP	? IMP
Intermediate/low-grade dysplasias and melanocytomas	Low-grade dysplasia	BIN	DPN		? IAMP/dysplasia	? IAMP/dysplasia
Intermediate/high-grade dysplasias and melanocytomas	High-grade dysplasia/MIS	<i>BAP1</i> -inactivated melanocytoma/MELTUMP	Deep penetrating melanocytoma/MELTUMP	PEM/MELTUMP	Lentigo maligna (MIS)	MIS
Malignant neoplasms	Low-CSD melanoma/SSM (VGP)	Melanoma in BIN (rare)	Melanoma in DPN (rare)	Melanoma in PEM (rare)	LMM (VGP)	Desmoplastic melanoma
Common mutations	<i>BRAF</i> p.V600E^b or <i>NRAS</i>^b <i>TERT</i> ^d ; <i>CDKN2A</i> ^a ; <i>TP53</i> ^a ; <i>PTEN</i> ^a	<i>BRAF</i>^b or <i>NRAS</i>^b + <i>BAP1</i>^a	<i>BRAF</i>^b; <i>MAP2K1</i>^b or <i>NRAS</i>^b + <i>CTNNB1</i>^b or <i>APC</i>^c	<i>BRAF</i>^b + <i>PRKARIA</i>^a or <i>PRKCA</i>^c	<i>NRAS</i>^b; <i>BRAF</i> (non-p.V600E)^b; <i>KIT</i>^b; or <i>NF1</i>^a <i>TERT</i> ^d ; <i>CDKN2A</i> ^a ; <i>TP53</i> ^a ; <i>PTEN</i> ^a ; <i>RAC1</i> ^b	<i>NF1</i>^a; <i>ERBB2</i>^a; <i>MAP2K1</i>^b; <i>MAP3K1</i>^b; <i>BRAF</i>^b; <i>EGFR</i>^b; <i>MET</i>^b <i>TERT</i> ^d ; <i>NFKBIE</i> ^b ; <i>NRAS</i> ^b ; <i>PIK3CA</i> ^b ; <i>PTPN11</i> ^b

Abbreviations: BIN, *BAP1*-inactivated nevus; CSD, cumulative solar damage; DPN, deep penetrating nevus; IAMP, intraepidermal atypical melanocytic proliferation without atypia; LMM, lentigo maligna melanoma; low/high-CSD melanoma, melanoma in skin with a low/high degree of cumulative sun/solar damage; MELTUMP, melanocytic tumor of uncertain malignant potential; MIS, melanoma in situ; PEM, pigmented epithelioid melanocytoma; SSM, superficial spreading melanoma; UV, ultraviolet; VGP, vertical growth phase (tumorigenic and/or mitogenic melanoma).

Reprinted from Bastian et al¹⁷ with permission. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, eds. 2018. *WHO Classification of Skin Tumours*. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2018. Common mutations in each pathway are listed; mutations already identified in benign or borderline lesions are shown in bold.

^a For example, *CDKN2A*, loss-of-function mutation.

^b For example, *BRAF*, gain-of-function mutation.

^c For example, *PRKCA*, rearrangement.

^d For example, *TERT*, promoter mutation.

^e For example, *ERBB2*, amplification.

Figura 2. 2018 WHO Clasificación del melanoma

Los subtipos clinicopatológicos descritos anteriormente pueden ser útiles para el reconocimiento y diagnóstico clínico (51–53).

La clasificación clinicopatológica tradicional se basa en los aspectos morfológicos de la fase de crecimiento (radial o vertical) del tumor. Esta clasificación es importante para el reconocimiento y diagnóstico histopatológico, pero no es informativa sobre el comportamiento biológico del tumor y es insuficiente para la toma de decisión terapéutica. Se distingue cuatro subtipos principales en orden descendente de frecuencia:

- Propagación superficial
- Melanoma nodular
- Lentigo maligno
- Melanoma lentiginoso acral

La mayoría de los melanomas surgen como tumores superficiales limitados a la epidermis, donde pueden permanecer durante varios años. Durante esta fase, llamada de crecimiento horizontal o "radial", el melanoma se puede curar solo con

cirugía en la mayoría de los casos. Cuando entran en una fase de crecimiento "vertical" e infiltran la dermis, ya son capaces de producir metástasis.

Los melanomas nodulares desde el principio entran en fase de crecimiento vertical. La probabilidad de metástasis se predice midiendo la profundidad en milímetros (índice de Breslow) (54).

Los patrones histológicos de los cuatro principales subtipos se comparan en la Figura 3.

- **Melanoma de propagación superficial:** Es el subtipo más común (70% de casos) (50,55). Suele ser de poco espesor ($< 1\text{ mm}$) y por tanto altamente curable. Es el subtipo que tiene más probabilidad de tener un antecedente de nevus. Puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, con mayor probabilidad en los miembros inferiores en mujeres y torácico posterior en hombres.
- **Melanoma nodular:** Representa 15-30% de casos (55). Pueden aparecer como pápulas o nódulos pigmentados oscuros, pedunculados o polipoides, pero con frecuencia con un color uniforme o un tono amelanótico/rosado, bordes simétricos y un diámetro relativamente pequeño, lo que dificulta la detección temprana (56–59). La mayoría tienen un grosor al diagnóstico mayor de 2 mm.
- **Melanoma lentigo maligno:** Surge con mayor frecuencia en áreas dañadas crónicamente por el sol en personas mayores y comienza como una mácula bronceada o marrón (60). La lesión se agranda con los años y puede desarrollar zonas pigmentadas asimétricas más oscuras que indican crecimiento vertical.
- **Melanoma lentiginoso acral:** Es el subtipo menos frecuente en población blanca, pero supone el 75% en personas de color (61). Suelen localizarse en las superficies palmar, plantar y subungueal. Aparecen como máculas de pigmentación irregular, de color marrón oscuro a negro (62). Ocasionalmente, puede presentarse como lesiones amelanóticas o hipomelanóticas que imitan enfermedades benignas como verrugas, callos,

úlceras que no cicatrizan o uñas encarnadas (63,64). El melanoma subungueal surge de la matriz ungueal y generalmente se presenta como una banda longitudinal, marrón o negra, que puede imitar afecciones como la onicomycosis o la paroniquia, llevando a un retraso en el diagnóstico (65,66).

Comparison of histologic patterns of four major subtypes of melanoma

	Superficial spreading melanoma	Lentigo maligna melanoma	Acrall lentiginous melanoma	Nodular melanoma
Pattern of RGP	Diffuse pagetoid	Lentiginous	Lentiginous	Absent
Dominant cell type in RGP	Epithelioid	Epithelioid, spindle, and uncommonly dendritic	Spindle, epithelioid, or dendritic	Not applicable
Epidermis of RGP	Normal to hyperplastic	Atrophic	Hyperplastic	Not applicable
Dominant cell type of VGP	Epithelioid	Spindle and epithelioid	Spindle and epithelioid	Epithelioid
Desmoplasia	Rare	Common	Common	Uncommon
Neurotropism	Rare	Common	Common	Uncommon
Frequency of regression	Often partial regression	Common	Variable	Uncommon

RGP: radial growth phase; VGP: vertical growth phase.

Figura 3. Comparación de patrones histológicos de los cuatro principales subtipos de melanoma

Variantes Poco Comunes

- **Melanoma amelanótico:** Representa entre el 2 y 10 % de todos los casos y supone un importante reto diagnóstico (67). Se manifiesta como máculas, pápulas o nódulos de tonalidad rosada o rojiza. Con frecuencia, estas lesiones se malinterpretan como condiciones benignas (p. ej., nevo dérmico, queratosis seborreica inflamada, hemangioma, granuloma

piógeno), lo cual suele provocar demoras significativas en el diagnóstico (68–71).

- **Melanoma tipo Spitz:** Describe un grupo de melanomas que comparten características morfológicas con los tumores de Spitz, tanto en su aspecto clínico como microscópico (72). Su diferenciación resulta compleja y frecuentemente requiere análisis moleculares complementarios.
- **Melanoma desmoplásico:** Es una variante poco común con características histológicas y clínicas diferenciadas (73). Se desarrolla como una placa o nódulo que recuerda a una cicatriz de crecimiento lento. Típicamente carece de pigmentación y puede simular otras afecciones benignas o cánceres cutáneos no melanoma (como carcinomas basocelulares o escamosos), lo que frecuentemente resulta en un diagnóstico tardío (74).
- **Melanoma productor de pigmento (variante animal):** Esta forma particular (también conocida como "melanocitoma") es una variante infrecuente constituida por células melanocíticas dérmicas, epitelioides y fusiformes con abundante pigmentación (75,76). Se caracteriza por ser una forma menos agresiva, con pocas probabilidades de diseminación, aunque paradójicamente presenta una alta incidencia de afectación de ganglios centinela.

Tratamiento del Melanoma

El tratamiento principal para el melanoma cutáneo locoregional es la **extirpación quirúrgica**. No obstante, existe un grupo de pacientes que experimentan una reaparición de la enfermedad, en ocasiones con diseminación a otros órganos. Para ellos, la inmunoterapia y la terapia dirigida se han convertido en protagonistas. La decisión de administrar terapia adyuvante o neoadyuvante se basa en una evaluación integral que incluye el riesgo de recurrencia, el estado de mutación de BRAF y las características del paciente (77,78).

- **Estadios I y IIA:** Los pacientes con melanoma de bajo riesgo (≤ 2 mm de espesor con o sin ulceración o ≤ 4 mm sin ulceración) y sin afectación ganglionar tienen un bajo riesgo de recurrencia. Para ellos, la cirugía sola suele ser curativa y no está indicada la terapia adyuvante (79).
- **Estadios IIB y IIC:** En pacientes con melanoma de alto riesgo sin afectación ganglionar, las guías actuales recomiendan tratamiento de un año de inmunoterapia adyuvante con Pembrolizumab (80–86) o Nivolumab (87), siendo una alternativa válida la vigilancia (especialmente en estadio IIB) para evitar efectos adversos.
- **Estadio IIIA:** Para pacientes con melanoma resecado y ganglios positivos de bajo riesgo, se considera la vigilancia cuando el tumor primario no ulcerado tiene un espesor de ≤ 2 mm y el ganglio centinela presenta < 1 mm de tumor, ya que su riesgo de recidiva es menor del 20% (45,88) y su Supervivencia Libre de Recaída (SLR) a 5 años es del 90% (89,90). Para todos los demás pacientes con estadio IIIA, la recomendación es un año de terapia sistémica adyuvante, según el estado de mutación BRAF.
- **Estadios IIIB, IIIC y IIID:** Los pacientes con enfermedad de alto riesgo con ganglios positivos se valoran de manera multidisciplinar.
 - **Neoadyuvancia:** El ensayo NADINA (91) analizó el tratamiento neoadyuvante con ipilimumab y nivolumab, consiguiendo una mejora en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) respecto a la cirugía y adyuvancia estándar. El pembrolizumab neoadyuvante (ensayo SWOG S1801) también mejoró la SLE con menor toxicidad (92).
 - **Adyuvancia post-neoadyuvancia:** El tratamiento se basa en la respuesta patológica. En pacientes con una respuesta parcial o nula, se propone adyuvancia con dabrafenib y trametinib (si hay mutación BRAF) o nivolumab (si no la hay) (91).
 - **Adyuvancia post-cirugía primaria:** Para pacientes con enfermedad microscópica de alto riesgo tratados con cirugía sin neoadyuvancia, las opciones incluyen un año de inmunoterapia con nivolumab o

pembrolizumab **(94–97)**, o un año de terapia dirigida con dabrafenib más trametinib en tumores con mutación BRAF (98–100).

- **Terapias en investigación:** Se está estudiando el uso de vacunas de ARNm personalizadas como mRNA-4157 (V940), que en un estudio fase II junto a pembrolizumab mejoró la SLE frente al tratamiento con pembrolizumab solo (93).

- **Evidencia de Terapias Adyuvantes:**

- El estudio **CheckMate 238** (101), que evaluó nivolumab en 906 pacientes, demostró una mejoría significativa en la SLR a 62 meses en comparación con ipilimumab.
- El estudio **KEYNOTE-054** (81,86), con 1019 pacientes, demostró que pembrolizumab mejoró significativamente la SLE y la supervivencia libre de metástasis a distancia (SLMD) en comparación con placebo.
- El estudio **S1404** (102,103) mostró que pembrolizumab mejoró la SLE en comparación con interferón alfa-2b e ipilimumab, con menor toxicidad.
- El ensayo **COMBI-AD (104,105)** demostró que la combinación de dabrafenib y trametinib mejoró la SLE, la SLMD y la Supervivencia Global (SG) en pacientes con mutación BRAF V600.

- **Estadio IV:** Para pacientes con melanoma en estadio IV resecado, se sugiere la inmunoterapia adyuvante con la combinación de nivolumab e ipilimumab, seguida de nivolumab de mantenimiento (99,100). Esta recomendación se basa en el ensayo **IMMUNED** (99), que demostró que la combinación mejoró la SLE y la SG en comparación con placebo y monoterapia. Para pacientes que no toleran la combinación, se ofrece monoterapia con nivolumab. En el ensayo CheckMate 238, el nivolumab adyuvante mostró una tendencia hacia una mejor SLE a cinco años en comparación con ipilimumab en pacientes con enfermedad en estadio IV, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos (101).

- **Radioterapia (RT) en el tratamiento del Melanoma**

La noción de que el melanoma es intrínsecamente radioresistente surgió inicialmente de estudios de cultivos celulares(50–53) que mostraron un hombro amplio en las curvas de supervivencia celular, lo que implica una mejor respuesta a una dosis más alta por fracción y una capacidad de reparación inusualmente alta (54). Algunas observaciones clínicas tempranas que utilizaron grandes fracciones de radiación por fracción respaldaron estos hallazgos de laboratorio. Sin embargo, otros estudios no observaron una diferencia entre varios esquemas de grandes fracciones, y algunas series de una sola institución informaron resultados similares con esquemas de fraccionamiento convencionales (55–57).

Estas observaciones contradictorias llevaron a un ensayo de fase III multicéntrico aleatorizado, que no logró mostrar mejores resultados con fracciones elevadas. El ensayo del Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) asignó aleatoriamente a 137 pacientes con melanoma metastásico en cualquier sitio que no fuera el abdomen o el cerebro a cuatro fracciones de 8 Gy administradas a intervalos semanales o 20 fracciones de 2,5 Gy administradas diariamente cinco días a la semana (58). No hubo diferencia en la tasa de respuesta clínica (24 y 23 % respectivamente, para la respuesta completa y 36 versus 34 % para la respuesta parcial); no se informaron las duraciones del control tumoral y la supervivencia.

Con los avances en la administración de RT, se puede administrar una dosis alta por fracción durante un período más corto utilizando radioterapia corporal estereotáctica (SBRT). Esto tiene un potencial efecto sinérgico cuando se combina con inmunoterapia inhibidora de puntos de control.

-RT en el Melanoma cutáneo

La resección amplia es el tratamiento definitivo del melanoma cutáneo localizado. En casos no elegibles para la cirugía (p. ej., inoperabilidad debido a comorbilidades médicas o proximidad a estructuras vitales), se puede considerar la RT con intención radical.

-Lentigo maligno

En el lentigo maligno, un subtipo de melanoma in situ caracterizado por melanocitos intraepidérmicos atípicos, con una tasa de crecimiento lenta y un bajo potencial para convertirse en enfermedad invasiva, cuando la escisión quirúrgica completa no es factible, la RT definitiva es una alternativa con dosis de 50 a 56 Gy en fracciones de 2 Gy o un esquema hipofraccionado dependiendo del tamaño y la ubicación de la enfermedad y la comorbilidad de los pacientes.

En una serie grande, 593 pacientes con lentigo maligna y melanoma lentigo maligna temprano fueron tratados con RT de energía superficial(59). El estudio evaluó los resultados del tratamiento primario con RT, la extirpación quirúrgica parcial seguida de RT sola y la escisión amplia seguida de RT posoperatoria, con porcentaje de pacientes con eliminación completa del tumor de 83, 90 y 97 % , respectivamente.

-Melanoma invasivo

Para la mayoría de los pacientes con melanomas primarios localizados, el tratamiento de elección es la escisión local amplia con márgenes quirúrgicos adecuados dado que en estos casos la recurrencia es menor del 5%(60). Los datos observacionales no han demostrado un beneficio para la RT sobre la cirugía en esta población(61) .

La RT adyuvante puede mejorar el control local en pacientes cuidadosamente seleccionados con alto riesgo de recurrencia local en el sitio primario después de la operación, como aquellos con melanoma cutáneo primario de la cabeza y el cuello con márgenes quirúrgicos positivos que no son susceptibles de resección sin morbilidad significativa o cirugía reconstructiva(62–64) .

La RT adyuvante también es apropiada para pacientes con melanoma localmente recurrente de cualquier subtipo. Sirva de ejemplo, la RT utilizada eficazmente en pacientes con tumores primarios de cabeza y cuello, incluidos aquellos con márgenes positivos o cercanos donde la ampliación de márgenes no se consideró factible, con tasas de control locoregional a cinco años de hasta el 82%(64).

La RT adyuvante no se sugiere de forma rutinaria para pacientes con características patológicas adversas, como tumores con grosor > 4 mm (índice de Breslow), invasión vasculolinfática y / o perineural o satelitosis, ya que los avances en otras opciones de tratamiento para el melanoma han mejorado los resultados en estos pacientes (60,62,65).

Los pacientes con tumores de alto índice de Breslow con cirugías con márgenes negativos generalmente se observan o se les ofrecen ensayos clínicos que evalúen el uso de terapia sistémica adyuvante.

-RT en el melanoma desmoplásico

Este tipo de melanoma carece de pigmentación o tiene una pigmentación muy leve y se asocia con diseminación perineural, un factor de riesgo para la recurrencia local. La RT adyuvante se ha incorporado al tratamiento, ya que la escisión local amplia sola ha dado como resultado tasas de recurrencia local de hasta el 48%(60) . Los factores de riesgo que son indicaciones para asociar la RT incluyen la localización en cabeza y cuello, infiltración neural y márgenes de resección quirúrgica afectos o cercanos donde la ampliación no es factible. Además, la RT adyuvante también puede ser apropiada para aquellos con enfermedad localmente recurrente tras la cirugía.

Los estudios observacionales sugieren que la adición de RT adyuvante local se asocia con un mejor control local y SG(66,67). En particular, la RT adyuvante tiene beneficio clínico en pacientes con un componente neurotrópico significativo en el tumor (67,68), así como en aquellos con una resección primaria incompleta (69). Sin embargo, los pacientes con melanoma desmoplásico también responden bien a la inmunoterapia(70), por lo que el papel de la RT adyuvante está evolucionando y se necesitan más ensayos aleatorizados en este entorno.

En un ensayo de fase II de un solo brazo, 20 pacientes con melanoma desmoplásico resecado quirúrgicamente fueron tratados con RT adyuvante (30 Gy en cinco fracciones en el lecho postoperatorio) (71). La tasa de recurrencia local a los dos años fue del 10% y la SG a los cinco años fue del 77%. La RT adyuvante fue bien tolerada, sin eventos adversos de grado ≥ 3 .

Un beneficio inicial de SG para la RT adyuvante se ilustró en un estudio observacional retrospectivo de la Base de Datos Nacional del Cáncer (NCDB) (72). Este estudio incluyó a 2390 pacientes con melanoma desmoplásico en etapa temprana sin afectación ganglionar tratados con escisión local amplia completa con (308 pacientes) o sin RT adyuvante (2082 pacientes) en el lecho del tumor primario. Después de ajustar por otros factores que podrían influir en la supervivencia, la radioterapia adyuvante se asoció con una mejor SG (SG a cinco años 72 versus 67 % [HR] 0,72, IC del 95% 0,53-0,98).

Por el contrario, en un análisis separado posterior del NCDB de 3527 pacientes (incluidos 186 pacientes que también recibieron inmunoterapia), la RT adyuvante no se asoció con un beneficio de SG (70). En el análisis multivariable, la edad avanzada, el estadio $T \geq 2$, el estadio $N \geq 1$ y la no recepción de inmunoterapia se asociaron con una peor SG.

Un beneficio en pacientes con invasión neural y márgenes quirúrgicos cercanos se ilustró en otra serie del Melanoma Institute Australia (67). Este estudio comparó los resultados de 671 melanomas con afinidad neural (el 72 % eran melanomas desmoplásicos) con los de una cohorte de control de 718 melanomas no neurotrópicos. Ochenta y dos pacientes recibieron RT adyuvante en el sitio primario. En una mediana de seguimiento de aproximadamente cuatro años, la RT adyuvante redujo el riesgo de recurrencia local en pacientes con melanoma neurotrópico con márgenes patológicos cercanos de menos de 8 mm (HR 0,48, IC del 95% 0,27-0,87). La RT también se asoció con una reducción en el riesgo de recurrencia (HR 0,51, IC del 95% 0,29-0,87), particularmente en el sitio primario (HR 0,30, IC del 95% 0,13-0,69) y los ganglios linfáticos regionales (HR 0,41, IC del 95% 0,17-0,98), pero no en localizaciones a distancia (HR 0,60, IC del 95% 0,29-1,24).

Un beneficio adicional para los pacientes con melanoma de cabeza y cuello se ilustró en una serie separada de 277 pacientes con melanoma desmoplásico, 113 de los cuales recibieron RT adyuvante (69). La RT fue un predictor independiente de control local (HR 0,15, IC del 95% 0,06-0,39). La RT se asoció con tasas de recurrencia más bajas para aquellos con márgenes de resección positivos

(14 versus 54 %). Para aquellos con márgenes negativos, la RT adyuvante también se asoció con un mejor control local (95 versus 76 %).

Además, los datos sugieren altas tasas de eficacia con inmunoterapia utilizando inhibidores de la PD-1 en melanoma desmoplásico (73). Por lo tanto, el tratamiento inicial con inmunoterapia se puede ofrecer a pacientes con melanoma desmoplásico primario localmente avanzado; el tratamiento local con cirugía o RT puede reservarse para aquellos con enfermedad residual. Dichos pacientes deben ser manejados en un entorno multidisciplinario y se debe fomentar la participación en ensayos clínicos.

-RT en los melanomas mucosos

Son más comunes en la cabeza y el cuello, seguidos de los anorrectales y genitourinarios. En estos pacientes si no se puede realizar la resección, se puede valorar el uso de la RT para lograr el control local además de la terapia adyuvante (74).

Para la enfermedad irresecable o localmente avanzada, la RT primaria se ha utilizado para tratar los melanomas nasosinusales. El Northern Japan Radiation Therapy Oncology Group informó una serie de 31 pacientes tratados con RT definitiva a una dosis media de 50 Gy para el melanoma mucoso primario irresecable de cabeza y cuello. Las tasas de respuesta completa y parcial fueron del 29 y el 58 %.

Otra serie de 28 pacientes mostró un control local del 49 % a los tres años utilizando un esquema de 50 a 55 Gy en 15 a 16 fracciones (75).

Con los avances en la terapia sistémica, debe valorarse esta terapéutica sola o en combinación con la RT.

En el ámbito posoperatorio, la RT adyuvante disminuye la probabilidad de recurrencia local después de la resección completa, pero no afecta la supervivencia, en parte debido a la alta tasa de recaída sistémica en estos pacientes (76–79).

Como ejemplo, los melanomas mucosos de cabeza y cuello se asocian con una alta tasa de recurrencia de la enfermedad local, incluso si la lesión primaria es pequeña y los ganglios regionales no están afectados(77,80). En una gran serie retrospectiva de pacientes con melanomas mucosos de cabeza y cuello del Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou (GETTEC), la RT adyuvante mejoró el control local(81).

El papel de la RT adyuvante en el melanoma vulvovaginal se abordó en una revisión retrospectiva de la base de datos de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) de 201 pacientes en los que el 40 % había recibido RT adyuvante. La SG no fue significativamente diferente en comparación con aquellos que recibieron cirugía sola, pero los grupos de tratamiento no fueron comparables (82).

En una revisión de la literatura de 45 años de melanomas mucosos anorrectales, se encontró que la RT adyuvante es beneficiosa en pacientes con enfermedad invasiva muscular y ganglionar regional, y la RT definitiva proporciona paliación en la enfermedad avanzada irresecable (83).

-RT en el melanoma uveal

La RT es la modalidad terapéutica principal para el melanoma uveal primario (84), pero se requiere una dosis alta que se consigue mediante braquiterapia de placa o radioterapia con partículas cargadas.

La braquiterapia (BT) de placa es la técnica de RT más utilizada para el melanoma uveal a nivel mundial. Se emplean diversos radioisótopos, incluyendo cobalto-60 (^{60}Co), yodo-125 (^{125}I), iridio-192 (^{192}Ir), paladio-103 (^{103}Pd) y rutenio-106/rodio-106 ($^{106}\text{Ru}/^{106}\text{Rh}$). El ^{125}I es el isótopo predominante debido a sus características dosimétricas favorables en un amplio rango de tamaños tumorales(85) y su mayor disponibilidad. Algunos centros prefieren el $^{106}\text{Ru}/^{106}\text{Rh}$ para tumores pequeños (86), pero se asocia con mayor tasa de fracaso en tumores grandes(87) .

Aunque algunos estudios reportaron mayores tasas de recurrencia local con BT en comparación con la RT con partículas cargadas(88) , la incorporación de la ultrasonografía intraoperatoria para la colocación de la placa(89–91) ha reducido

significativamente las recurrencias, equiparándolas a las de la RT con partículas cargadas (92,93). Esto sugiere que la mayoría de las recurrencias locales tras la BT se deben a una colocación subóptima o inclinación de la placa, detectables y corregibles mediante ultrasonografía intraoperatoria durante la inserción y extracción(94) . Esta técnica es crucial en tumores posteriores, donde el acceso quirúrgico es dificultoso y la placa tiende a inclinarse .

La recurrencia local tras la RT primaria aumenta el riesgo de metástasis(91,95) . Un estudio demostró la importancia del control local: la supervivencia por causa específica a 10 años fue del 72% en pacientes con control local tras radioterapia con haz de protones, frente al 48% en aquellos con recurrencia local(96) .

La RT con partículas cargadas (protones, iones de carbono, iones de helio) es la segunda técnica de RT usada en el melanoma uveal (97–99). Las propiedades físicas de estas partículas permiten una mayor focalización de la dosis y una caída brusca de la dosis más allá del objetivo (efecto de pico de Bragg)(100). Sin embargo, puede causar daño colateral a estructuras oculares como pestañas, glándula lagrimal, córnea, iris, cristalino, retina y nervio óptico.

Ambas técnicas logran tasas de control local similares(101). Las complicaciones oculares varían: la RT con partículas cargadas afecta más la parte anterior del ojo, mientras que la BT se asocia a mayor pérdida de agudeza visual y molestias durante el procedimiento.

La RT con partículas cargadas presenta ventajas en melanomas circumpapilares (que rodean el nervio óptico), donde la colocación de la placa es inviable, y en tumores grandes que exceden las dimensiones de la placa. Aunque estos tumores grandes suelen tratarse con enucleación, la preservación del ojo puede ser deseable en casos específicos, especialmente en pacientes con baja visión en el ojo contralateral.

La RT estereotáctica también se ha empleado para tratar melanomas uveales(102–104). Con dosis entre 50 y 70 Gy, administrada en cinco fracciones de 10- 14 Gy por fracción.

Aunque los datos de seguimiento a largo plazo son limitados, las tasas de control local y de metástasis a distancia parecen comparables a las de otras modalidades. Sin embargo, la tasa de complicaciones puede ser mayor que con la braquiterapia de placa, con aproximadamente dos tercios de los pacientes desarrollando complicaciones oculares en los cinco años posteriores al tratamiento(105,106).

-RT a nivel ganglionar

La RT adyuvante se ha utilizado a nivel ganglionar regional tras la linfadenectomía para la enfermedad macroscópica (enfermedad en estadio III). Rara vez está indicado como el tratamiento definitivo del melanoma metastásico a los ganglios linfáticos, ya que la escisión quirúrgica proporciona un control local superior, así como información pronóstica importante.

Para los pacientes con alto riesgo de recurrencia regional después de la disección ganglionar , la RT adyuvante disminuye significativamente la recaída, pero no mejora la SLE ni la SG(107,108). Dada la eficacia de las terapias sistémicas neoadyuvante y adyuvante, el uso de RT adyuvante para pacientes con alto riesgo de metástasis locales y distantes requiere una evaluación multidisciplinaria cuidadosa y una discusión con los pacientes.

La RT adyuvante es una opción para los pacientes tratados con disección de ganglios linfáticos que no son elegibles para la terapia sistémica adyuvante o aquellos con tumores de alto riesgo donde el control regional es un problema (p. Ej., respuesta patológica deficiente a la terapia sistémica neoadyuvante, recurrencia ganglionar a pesar de inmunoterapia sistémica previa o terapia dirigida; gran carga tumoral en la región cervical) (109).

En un ensayo de fase III de 250 pacientes realizado principalmente en Australia y Nueva Zelanda, los pacientes con melanoma en estadio III de alto riesgo fueron asignados aleatoriamente a RT (48 Gy en 20 fracciones) u observación después de la disección ganglionar (107,108). Los pacientes se consideraron de alto riesgo si había diseminación extraganglionar, múltiples ganglios afectados (cualquier afectación parotídea, ≥ 2 ganglios en el cuello o la axila, ≥ 3 ganglios en la

ingle) o ganglios grandes con enfermedad (≥ 3 cm en el cuello, ≥ 4 cm en la axila o la ingle). En una mediana de seguimiento de seis años, hubo significativamente menos recaídas en el grupo de RT adyuvante (21 versus 36 % [HR] 0,52, IC del 95% 0,31-0,88). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la SLE (HR 0,89, IC del 95% 0,65-1,22) ni en la SG (HR 1,27, IC del 95% 0,89-1,79).

Con base en estos resultados, los pacientes deben ser evaluados para RT adyuvante para mejorar el control regional después de la disección si tienen una respuesta patológica deficiente a la terapia neoadyuvante o no son elegibles para la terapia sistémica adyuvante y tienen uno de los siguientes:

- Múltiples ganglios positivos (cualquier enfermedad parotídea, ≥ 2 ganglios en el cuello o la axila, ≥ 3 ganglios en la ingle)
- Extensión extranodal(110)
- Ganglios afectados grandes (≥ 3 cm en el cuello, ≥ 4 cm en la axila o la ingle)
- Márgenes positivos
- Enfermedad recurrente a pesar de cirugía previa y terapia sistemática adyuvante

En melanoma de cabeza y el cuello el estándar de tratamiento incluye la escisión amplia de la lesión primaria. Los roles de la biopsia de ganglio centinela y la disección ganglionar completa están evolucionando. Cuando la biopsia del ganglio centinela no es posible por razones médicas o técnicas, las regiones ganglionares pueden vigilarse con seguimiento estrecho con ecografía seriada.

La RT ganglionar puede ser una alternativa a la disección ganglionar completa en adultos mayores o en aquellos con una contraindicación para la cirugía extensa, particularmente en pacientes con afectación ganglionar cervical en tumores de primarios de cabeza y cuello. Como ejemplo, 36 pacientes se sometieron a irradiación ganglionar cervical (30 Gy a 6 Gy por fracción dos veces por semana) después de la biopsia por escisión del (los) ganglio (s) macroscópico (s) afectado (s)(111) . El control local a cinco años fue mayor del 90%. En otro estudio observacional de 28 adultos mayores tratados por melanoma de cabeza y el cuello o primario desconocido con escisión simple del ganglio palpable y RT

adyuvante, las tasas de control regional y SG a cinco años fueron del 69 y el 50 % respectivamente(112).

-RT paliativa

La RT puede utilizarse en el melanoma avanzado con fines paliativos, para aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes, sin necesariamente curar la enfermedad.

La diseminación del melanoma a la piel y los ganglios linfáticos es frecuente en pacientes con enfermedad avanzada. Estas metástasis pueden causar dolor, sangrado o compresión de estructuras adyacentes. La resección quirúrgica es el tratamiento de elección cuando es posible. Sin embargo, la RT puede ser una alternativa en casos irresecables o para proporcionar control local y alivio sintomático (58).

La RT también es eficaz para aliviar el dolor causado por las metástasis óseas. Se ha demostrado que una sola fracción de 8 Gy puede ser tan eficaz como múltiples fracciones para el control del dolor(113) .

Las metástasis en pulmones, hígado pueden responder a la RT (114,115). Actualmente se están utilizando técnicas de RT estereotáctica fraccionada (SBRT- Stereotactic Body Radiotherapy) con dosis altas por fracción que son más eficaces (115). La elección del régimen de RT debe individualizarse en función de la localización y el tamaño de las metástasis, así como del estado general del paciente.

Las metástasis cerebrales son una complicación frecuente en el melanoma avanzado. La radiocirugía estereotáctica (SRS - Stereotactic Radiosurgery) y terapias sistémicas con actividad intracraneal (inmunoterapia, terapia dirigida). Un enfoque multidisciplinario es esencial para optimizar el tratamiento y controlar las metástasis cerebrales.

La SBRT se ha consolidado como un tratamiento eficaz para pacientes con oligometástasis extracraneales, es decir, un número limitado de metástasis fuera del cerebro. El ensayo clínico SABR-COMET demostró que la SBRT, en

combinación con la terapia estándar, mejoró la supervivencia global en pacientes con 1 a 5 metástasis de diferentes tipos de cáncer (116) .

Esta técnica se está utilizando para tratar metástasis en la columna vertebral ya que su precisión permite administrar altas dosis de radiación a las vértebras afectadas o a los tumores paraespinales, preservando la médula espinal y proporcionando un alivio sintomático significativo (117,118). También se está usando ampliamente en las metástasis pulmonares con un alto grado de control local(116) .

-RT y tratamiento sistémico

El tratamiento del melanoma avanzado a menudo involucra la combinación de RT con terapias sistémicas, como los inhibidores de BRAF y los inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI). Estas combinaciones buscan potenciar la eficacia de ambos tratamientos y mejorar el control de la enfermedad.

-RT más inhibidor de BRAF(BRAF_i)

Alrededor del 40 y el 60% de los melanomas cutáneos presentan mutaciones activadoras de BRAF , que son importantes para la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. Esto ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas contra la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que han prolongado significativamente la supervivencia en este subconjunto de pacientes.

Aunque existen pocos estudios sobre la combinación de RT e inhibidores de BRAF, un estudio in vitro demostró que vemurafenib, un inhibidor de BRAF, aumenta la radiosensibilidad de líneas celulares de melanoma con mutaciones en BRAF (119). En este estudio, el tratamiento con vemurafenib sensibilizó las células de melanoma a la radiación, probablemente al detener el ciclo celular en la fase G1. Sin embargo, este efecto no se observó en células de melanoma sin mutaciones en BRAF.

Se han reportado casos de sensibilización y recuerdo a la radiación en pacientes tratados con RT antes, durante o después del tratamiento con BRAF_i (120,121) . Estos efectos, que pueden ser graves, se manifiestan como reacciones inflamatorias en la piel y otros órganos. En una revisión de 27 publicaciones (120)se

analizó los posibles efectos secundarios de esta combinación, encontrando un aumento de la toxicidad dermatológica, pulmonar, neurológica, hepática, esofágica e intestinal. La mayoría de las reacciones cutáneas graves ocurrieron con la administración simultánea de RT y BRAFi. También se reportaron casos de toxicidad visceral grave, incluyendo perforación intestinal y hemorragia pulmonar. A pesar de algunos casos de neurotoxicidad, las tasas de complicaciones cerebrales no parecen aumentar con la administración de BRAFi. Se recomienda suspender la RT 3 días antes y después de la RT fraccionada y 1 día antes y después de la radiocirugía estereotáctica (SRS), y minimizar el tiempo sin tratamiento con BRAFi.

-RT e inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI)

Los ICI son fármacos, que se dirigen y bloquean a proteínas como PD-1 y CTLA-4, estimulan el sistema inmunitario para que reconozca y destruya las células tumorales, lo que se traduce en una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes.

La combinación de RT con ICI puede potenciar la respuesta antitumoral. La RT puede producir inflamación local lo que aumenta la infiltración de células inmunitarias en el tumor, favoreciendo la acción de los ICI

Estudios preclínicos han demostrado un efecto sinérgico de la combinación de RT con ICI, tanto en el sitio irradiado como en sitios distantes demostrando así el EA .

Sharabi et al (122) realizan un estudio preclínico que investiga los efectos inmunomoduladores de la RT tipo SBRT en combinación con inmunoterapia anti-PD-1. Se utilizaron modelos animales con tumores de melanoma (B16-OVA) y carcinoma de mama (4T1-HA), a los que se les administró SBRT en combinación con el fármaco y se observó un mejor control local del tumor. Se demuestra que la RT aumentó el porcentaje de células T, la expresión de complejos antígeno-CMH en las células tumorales, lo que facilita su reconocimiento por el sistema inmunitario, mejoró la presentación cruzada de antígenos en los ganglios linfáticos, un proceso esencial para activar la respuesta inmunitaria y aumentó la infiltración de células T

en los tumores, lo que contribuye a la destrucción de las células tumorales. Este estudio demuestra que la SBRT puede generar una respuesta inmunitaria específica contra el tumor y que la combinación con inmunoterapia anti-PD-1 puede potenciar este efecto.

Park et al (123) realizan un estudio en el que demuestran que el bloqueo de PD-1 puede potenciar los efectos antitumorales de la SBRT. Se utilizaron ratones con melanoma (B16-OVA) y carcinoma de células renales (RENCA) que expresaban PD-1 (tipo salvaje, WT) y ratones deficientes en PD-1 (knockout, KO). Se inyectaron células tumorales en las patas traseras y flancos de los ratones. Se administró SBRT a los tumores primarios en las patas traseras, mientras que los tumores secundarios en los flancos se mantuvieron fuera del campo de radiación. También se administró un anticuerpo bloqueador de PD-1 a ratones WT para evaluar su efecto en la respuesta antitumoral. Se evaluó el crecimiento tumoral, la supervivencia y la respuesta inmune en ambos grupos de ratones. La expresión de PD-1 redujo la supervivencia de los ratones con melanoma tratados con SBRT. Los ratones KO con deficiencia de PD-1 mostraron una mayor supervivencia y una reducción significativa del crecimiento tumoral, tanto en los tumores irradiados como en los no irradiados, demostrando así el EA. El bloqueo de PD-1 en ratones WT reprodujo los efectos antitumorales observados en ratones KO, aumentando la supervivencia y reduciendo el crecimiento de los tumores primarios y secundarios. La combinación de SBRT y bloqueo de PD-1 indujo una regresión casi completa del tumor primario irradiado y una reducción del 66% en el tamaño de los tumores secundarios no irradiados. El EA fue específico del tumor y no dependió del tipo de tumor ni del fondo genético del ratón. Se identificó una población de células T CD8⁺ CD11a(alto) asociada con la respuesta inmune antitumoral inducida por SBRT en ratones KO.

Estudios clínicos también han reportado resultados alentadores con la combinación de RT e ICI. Por ejemplo, un estudio retrospectivo encontró que la tasa de respuesta de lesiones no irradiadas aumentó del 11% al 25% después de la RT en pacientes tratados con el IC ipilimumab (124). Otro estudio mostró

respuestas objetivas en 6 de 22 pacientes con melanoma avanzado tratados con RT e ipilimumab(125).

La combinación de RT con inhibidores de PD-1, como nivolumab y pembrolizumab, también ha demostrado ser eficaz, con tasas de respuesta de hasta el 64% en melanomas avanzados (126–128) . Un estudio reportó una tasa de respuesta del 46% en lesiones no irradiadas en pacientes tratados con inhibidores de PD-1 y RT (127). Otro estudio encontró respuestas en el 45% de los pacientes tratados con nivolumab y SBRT(128).

A pesar de estos resultados prometedores, aún no se ha establecido con certeza la contribución de la RT a las respuestas observadas, dada la eficacia de los ICI en monoterapia. Un estudio aleatorizado que evaluó la adición de SBRT a la ICI no demostró una mejora en la supervivencia (129). Sin embargo, este estudio tuvo limitaciones que dificultan su interpretación.

En la actualidad, se están realizando ensayos clínicos para evaluar la eficacia de la combinación de RT e ICI en el melanoma. Hasta que se disponga de más datos, las decisiones de tratamiento deben individualizarse y tomarse en el contexto de una consulta multidisciplinaria.

Radiobiología del melanoma

El rasgo biológico más característico del melanoma es la capacidad de producir y almacenar melanina , que a su vez también es responsable de importantes características del tumor, haciéndolo resistente a muchos modos de terapia.

La melanogénesis

La melanogénesis, el proceso de biosíntesis de melanina en los melanocitos, es un proceso fundamental para la biología humana, con implicaciones que van desde la pigmentación de la piel y el cabello hasta la protección contra la radiación ultravioleta (UVR) y el desarrollo del melanoma.

El pigmento melanina es responsable de la variación del color de la piel humana y desempeña un papel crucial en la fotoprotección, al absorber y dispersar la UVR, previniendo así el daño al ADN y el desarrollo de cáncer de piel(130) .

La melanogénesis también está implicada en la patogénesis del melanoma. Las vías de señalización que regulan la melanogénesis también pueden influir en la proliferación, la supervivencia y la metástasis de las células de melanoma. Por lo tanto, una comprensión profunda de la melanogénesis es crucial para identificar nuevas dianas para la prevención y el tratamiento del melanoma.

Los melanocitos, las células responsables de la producción de melanina, se derivan de los melanoblastos de la cresta neural. Durante el desarrollo embrionario, los melanoblastos migran desde la cresta neural a la capa basal epidérmica junto con las estructuras foliculares pilosas a través de una vía dorsolateral después del cierre del tubo neural . Este proceso de migración y diferenciación está regulado por una serie de factores de señalización, incluyendo la proteína morfogénica ósea (BMP) y las señales Wnt(131) . Una vez que los melanoblastos alcanzan su destino final, se diferencian en melanocitos y adquieren la capacidad de producir melanosomas, donde se sintetiza y almacena la melanina (132).

Existen dos tipos principales de melanina: la eumelanina, un pigmento marrón-negro que proporciona una fuerte fotoprotección, y la feomelanina, un pigmento rojo-amarillo que puede contribuir al daño oxidativo inducido por la UVR. La proporción de eumelanina / feomelanina, así como el tamaño y la distribución de los melanosomas, determinan el color de la piel y el cabello (133,134). La epidermis humana contiene aproximadamente un 74% de eumelanina y un 26% de feomelanina, independientemente del grado de pigmentación, aunque las personas con piel más clara tienden a tener niveles más bajos de eumelanina(134).

La biosíntesis de melanina comienza con la hidroxilación del aminoácido tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosinasa (TYR)(135) . L-DOPA se oxida luego a dopaquinona, que puede seguir diferentes vías para producir eumelanina o feomelanina.

En la vía de la eumelanina, la dopaquinona se cicla espontáneamente a leucodopacromo, que luego se oxida a dopacromo. La dopacromo se descarboxila a 5,6-dihidroxiindol (DHI) o se isomeriza a ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) por la proteína 2 relacionada con la tirosina (TYRP2/DCT). DHI y DHICA se polimerizan para formar eumelanina(136–138) .

En la vía de la feomelanina, la dopaquinona reacciona con cisteína o glutatión para formar cisteinildopa o glutatiónildopa, que luego se oxidan y polimerizan para formar feomelanina(139) .

TYR, TRP1 y TRP2 son enzimas cruciales en la síntesis de melanina. Estas tres enzimas trabajan juntas para controlar la cantidad y calidad de melanina producida en los melanocitos.

- TYR (tirosinasa):es la enzima clave en la síntesis tanto de eumelanina como de feomelanina . Cataliza la oxidación de L-tirosina a dopaquinona , un paso limitante de la velocidad en la formación de melanina. La dopaquinona es el sustrato para la síntesis de ambos tipos de melanina. Las mutaciones en TYR causan el albinismo oculocutáneo tipo 1 (OCA1), la forma más común de albinismo.(140)
- TRP1 (proteína 1 relacionada con la tirosinasa):Oxida el ácido DHI-2-carboxílico (DHICA), un compuesto derivado del dopa cromo, para formar eumelanina. Las mutaciones y la falta de expresión de TRP1 se encuentran en el albinismo oculocutáneo tipo 3 (OCA3). La expresión del gen TRP1 y los niveles de proteína TRP1 se reducen significativamente en la epidermis lesionada de pacientes con vitiligo.(141)
- TRP2 (proteína 2 relacionada con la tirosinasa / DCT):Convierte el dopa cromo en DHICA, que luego es oxidado por TRP1 para formar eumelanina. Los niveles de TRP2 se correlacionan positivamente con el contenido de melanina in vivo.(142)

Los melanosomas son orgánulos especializados que se encuentran en los melanocitos y son responsables de la síntesis, almacenamiento y transporte de

melanina (143). La biogénesis de los melanosomas es un proceso complejo que se divide en cuatro etapas (144):

- Etapa I: Se forman vacuolas incoloras dentro de una matriz fibrilar compuesta de glicoproteínas.
- Etapa II: Las enzimas TYR, TYRP1 y TYRP2 se transportan al melanosoma en desarrollo.
- Etapa III: Comienza la síntesis de melanina y la deposición de pigmento en la matriz fibrilar.
- Etapa IV: El melanosoma está completamente melanizado y se transporta a las dendritas de los melanocitos.

La proteína premelanosómica (PMEL17), una glicoproteína transmembrana tipo I, es un componente estructural clave de la matriz fibrilar del melanosoma en las etapas I y II (145,146). Mutaciones en PMEL17 causan una dilución del color del pelaje en ratones (147). El antígeno MART1, un antígeno específico del melanoma detectado por células T1, interactúa con PMEL17 para regular su expresión, estabilidad y tráfico (145).

El tamaño de los melanosomas varía entre diferentes grupos étnicos, siendo más grande en personas de ascendencia africana y más pequeño en personas de ascendencia europea (148). Esta diferencia en el tamaño de los melanosomas contribuye a las variaciones en el color de la piel.

Una vez que los melanosomas maduran, se transportan desde la región perinuclear del melanocito a las dendritas. A través de las dendritas, los melanosomas se transfieren a los queratinocitos, donde la melanina se distribuye para proporcionar fotoprotección. Estudios recientes han demostrado que la autofagia, juega un papel importante en la regulación de la degradación de los melanosomas en los queratinocitos (149,150). Los queratinocitos de piel caucásica exhiben una mayor actividad autofágica que los de piel afroamericana, lo que resulta en una degradación más rápida de los melanosomas y una menor pigmentación de la piel.

La melanogénesis está regulada por una variedad de factores extrínsecos, siendo la UVR el más importante. La UVR, que comprende aproximadamente el 5% de la radiación solar que llega a la superficie de la tierra, se divide en UVA (95%) y UVB (5%) (151). Ambos tipos de UVR pueden inducir daño en el ADN y estimular la melanogénesis, aunque a través de mecanismos diferentes.

La exposición a la UVR induce dos tipos de respuestas de bronceado: el oscurecimiento pigmentario inmediato (IPD) y el bronceado retardado (DT) (152). El IPD, que ocurre minutos después de la exposición a la UVA, se debe a la oxidación de la melanina preexistente y a la redistribución de los melanosomas dentro de los queratinocitos. El DT, que ocurre días después de la exposición a la UVB, se debe a un aumento en la síntesis de melanina, especialmente eumelanina (153).

La UVR, en particular la UVB, genera daño directo en el ADN a través de la inducción de roturas de timidina y la formación de fotoproductos genotóxicos, como los dímeros de pirimidina de ciclobutano y los fotoproductos 6-4 . Estos dímeros distorsionan la estructura del ADN e interfieren con la replicación y transcripción del ADN, lo que puede conducir a mutaciones y, potencialmente, al desarrollo de cáncer de piel. Además del daño directo, la UVR promueve la generación de ROS (154). El daño oxidativo al ADN inducido por ROS puede contribuir a la inestabilidad genómica y a la carcinogénesis.

Además, la UVR puede inducir la melanogénesis a través de dos mecanismos principales:

- Activación directa de la proteína quinasa C (PKC): La UVR induce la formación de diacilglicerol (DAG), un segundo mensajero lipídico que activa la PKC (155,156). La PKC, a su vez, fosforila la tirosinasa, la enzima clave en la síntesis de melanina, aumentando su actividad y promoviendo la melanogénesis.
- Activación indirecta a través de la vía p53-POMC-MC1R-MITF: El daño en el ADN inducido por UVR aumenta los niveles de p53 en queratinocitos, melanocitos y células de melanoma (157,158). La p53 transactiva la expresión del gen pro-opiomelanocortina (POMC), principalmente en los queratinocitos epidérmicos (159). POMC es precursora de la hormona estimulante de melanocitos α (α -

MSH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). α -MSH y ACTH actúan como agonistas de los receptores de melanocortina 1 (MC1R) en los melanocitos. La activación de MC1R desencadena una cascada de señalización intracelular que involucra la proteína quinasa A (PKA) y el elemento de respuesta de monofosfato de adenosina cíclico (CREB), culminando en la activación del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) (160). MITF es un regulador clave de la melanogénesis, controlando la expresión de genes que codifican enzimas clave en la síntesis de melanina, como la tirosinasa, TYRP1 y TYRP2.

La exposición a la UVR aumenta el número de dendritas en los melanocitos y la tasa de transferencia de melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos (161). Esto permite una distribución más eficiente de la melanina en la epidermis, proporcionando una mayor protección contra la UVR. La eumelanina, en particular, actúa como un filtro solar natural, absorbiendo la UVR y previniendo el daño adicional al ADN(162).

Existe una correlación inversa entre el contenido de melanina en la piel y los niveles de dímeros de pirimidina de ciclobutano, lo que evidencia el papel fotoprotector de la pigmentación(163). Las personas con piel clara, que tienen menor contenido de melanina, son más susceptibles al daño en el ADN inducido por UVR y, por lo tanto, tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de piel(164) .

El receptor de melanocortina 1 (MC1R) es un miembro de la familia de receptores de melanocortina (MC), acoplados a proteína G (GPCR) y se expresa principalmente en las membranas celulares de los melanocitos (165,166). La señalización de MC1R promueve la síntesis de melanina y la tasa de transferencia de melanosomas en los melanocitos, lo que lo convierte en uno de los reguladores más importantes de la pigmentación en mamíferos (167). Al unirse a las melanocortinas, como la α -MSH y la ACTH inducidas por la exposición a la UVR, MC1R estimula la adenil ciclase, aumentando los niveles de AMPc intracelular y activando la vía de señalización de PKA-CREB-MITF, lo que lleva a un aumento en la activación de los genes de la melanogénesis y en la producción de eumelanina.(168).

MC1R es un gen altamente polimórfico, con más de 420 variantes identificadas en humanos (169). Las variantes de MC1R pueden afectar la función del receptor, alterando la producción de melanina y la respuesta a la UVR. Las variantes de pérdida de función de MC1R se asocian con una disminución en la producción de eumelanina, un aumento en la producción de feomelanina, un fenotipo de "pelo rojo" (RHC) y un mayor riesgo de cáncer de piel (170,171). Pero este gen también se ha identificado como un gen de susceptibilidad al melanoma (172,173). Las variantes de pérdida de función de MC1R se han encontrado en el 26-40% de los pacientes con melanoma . Estas variantes pueden aumentar el riesgo de melanoma al disminuir la producción de eumelanina, lo que reduce la fotoprotección, y al afectar la reparación del ADN en los melanocitos (174). En melanocitos humanos primarios, la eliminación de MC1R afecta la supervivencia y la reparación del ADN en respuesta a la UVR, aumentando el riesgo de melanoma . Por lo tanto, controlar la formación de pigmento mediante la regulación de MC1R podría ser un objetivo eficaz para la prevención y el tratamiento del melanoma.

El principal antagonista de MC1R que compite con α -MSH es la proteína de señalización agouti (ASIP). La expresión de ASIP humana en ratones transgénicos produce colores de pelaje amarillos, y la expresión de ASIP en melanocitos humanos inhibe la actividad de la tirosinasa y la proliferación celular al bloquear los efectos estimuladores de α -MSH en la acumulación de AMPc y la actividad de la tirosinasa, respectivamente (175,176).

A pesar de la identificación de más de 100 loci involucrados en la pigmentación de vertebrados, el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) es un regulador transcripcional crucial de la melanogénesis y un factor clave en el desarrollo, la supervivencia y la función de los melanocitos (177). MITF pertenece a la familia de factores de transcripción MiT, que también incluye E3 (TFE3), EB (TFEB) y EC (TFEC), que son oncogenes humanos y han sido implicados en el melanoma (178,179).

El fenotipo de microftalmia se observó por primera vez en ratones con ojos pequeños, pelaje blanco y sordera debido a una mutación homocigota en *Mitf* (180) , seguido de otras anomalías como la disminución del número de mastocitos,

osteoclastos defectuosos y un inicio temprano de sordera debido a múltiples mutaciones en el locus *Mitf* (181). El locus *Mitf* en humanos se encuentra en el cromosoma 3. Existen varias isoformas principales de MITF, que se originan a partir de promotores distintos, y la isoforma M de MITF (MITF-M) es una isoforma específica de los melanocitos que participa en la regulación de la pigmentación, el desarrollo y la diferenciación de los melanocitos(160) .

MITF-M se activa transcripcionalmente por CREB y otros factores de transcripción, como paired box gene 3 (PAX3), SRY (sex-determining region Y)-box 10 (SOX10) y el factor de unión al potenciador linfocitario 1 (LEF1) (160,179). La expresión forzada de MITF por sí sola no es suficiente para reprogramar fibroblastos de ratón y humanos en melanocitos funcionales, pero la combinación de MITF, SOX10 y PAX3 sí lo es(178).

MITF transactiva directamente los promotores de las enzimas de pigmentación primarias TYR, TYRP1 y TYRP2, y también induce la transcripción de PMEL17 y MART-1(182). Otras proteínas involucradas en la biogénesis y el tráfico de melanosomas, como el receptor acoplado a proteína G 143 (GPR143), que regula la maduración y el tamaño de los melanosomas, y Rab27A, que participa en el transporte de melanosomas, también son dianas directas de MITF (183,184). Además, MITF promueve la expresión de genes relacionados con la síntesis de melanina, como *Tbx2* y *BCL2* (185,186), y participa en la regulación del ciclo celular de los melanocitos al promover la expresión del gen *p21* y cooperar con la proteína del retinoblastoma (RB1) para potenciar la activación de la transcripción de *p21* (187).

La desregulación de MITF está implicada en la melanomagénesis. MITF puede actuar como un oncogén o un supresor de tumores dependiendo del contexto celular. En algunos casos, la sobreexpresión de MITF puede promover la proliferación de células de melanoma, mientras que, en otros casos, la pérdida de MITF puede contribuir a la progresión del melanoma.

La melanogénesis, a pesar de su papel protector en la piel sana, puede convertirse en un arma de doble filo en el contexto del melanoma. Esto se debe a

que la producción de melanina no es un proceso inocuo, sino que genera una serie de intermediarios reactivos que pueden tener consecuencias deletéreas para las células. Durante la melanogénesis, se producen diversas moléculas intermediarias, como quinonas, semiquinonas y radicales libres. Estas moléculas son altamente reactivas y pueden interactuar con el ADN, causando daño oxidativo y promoviendo la aparición de mutaciones (188).

La acumulación de mutaciones a lo largo del tiempo puede explicar por qué un fenotipo melánico (melanoma con alta producción de melanina) en etapa tardía se asocia a un mal pronóstico (189). En estos melanomas, la producción continua de melanina y sus intermediarios reactivos podría generar un ambiente propicio para la acumulación de mutaciones adicionales, lo que podría favorecer la progresión del tumor y la resistencia a los tratamientos.

Otro aspecto crucial es que las vías de señalización que regulan la melanogénesis están interconectadas con las vías que controlan la transformación neoplásica (190–192). Esto significa que las alteraciones en estas vías pueden afectar tanto la producción de melanina como la adquisición de características neoplásicas por parte de las células.

En una célula melanógenamente activa, las mutaciones en genes que codifican factores reguladores de la melanogénesis, como CREB (193), PI3K/p70 (194), c-KIT (195), NRAS (196,197) o BRAF (198,199), pueden expresarse de forma más evidente.

Estas mutaciones, al afectar las vías de señalización compartidas, pueden manifestarse simultáneamente en el fenotipo pigmentario y en la adquisición de características neoplásicas, como un aumento de la proliferación, la invasión y la metástasis (200).

La melanina

La melanina, es una macromolécula que presenta una estructura amorfa lo que le confiere propiedades fisicoquímicas únicas (201). Su espectro de absorción, similar al de materiales inorgánicos, carece de máximos característicos y disminuye desde la radiación UV hacia longitudes de onda mayores, volviéndose

transparente en el infrarrojo (202,203). Esta capacidad de absorción, responsable de su coloración, la convierte en un fotoprotector eficaz al convertir la radiación en calor .

A nivel molecular, la melanina exhibe una rica diversidad de grupos funcionales: grupos carboxilo con diferentes grados de protonación, grupos quinona/hidroquinona con diferentes grados de oxidación y semiquinonas que le confieren propiedades paramagnéticas(204,205). Esta versatilidad funcional la convierte en un tampón de pH, capaz de protonarse reversiblemente, y en un tampón redox, capaz de oxidarse y reaccionar con radicales libres como los generados por la radiólisis o fotólisis del agua (206,207). Además, su compleja estructura interna le confiere propiedades de resina de intercambio iónico, permitiendo la absorción reversible de cationes metálicos (zinc, calcio, hierro, cobre, manganeso, etc.), compuestos orgánicos, gases y agua (208,209).

Si bien la melanina es resistente a la hidrólisis ácida, puede sufrir degradación enzimática mediada por oxidorreductasas dependientes de NADPH (NOX) y/o por la acción de la luz visible y UV (210,211). Esta degradación libera sustancias previamente absorbidas, algunas con actividad fotoquímica o redox, como el hierro y el cobre, contribuyendo a la potencial toxicidad de la melanina, especialmente la feomelanina, más susceptible a la fototoxicidad que la eumelanina (212–214).

La alta concentración de centros paramagnéticos en la melanina le permite actuar como un eliminador de radicales libres inducidos por la RI, protegiendo a las células del daño oxidativo. Estudios comparativos sobre la radiosensibilidad celular respaldan la influencia del contenido de melanina en la respuesta a la radiación . In vitro, la adición de melanina a polímeros como el polimetilmetacrilato o el colágeno reduce la señal de radicales libres generada por la irradiación con rayos X, sugiriendo un efecto radioprotector.

Más allá de su interacción con los productos radiolíticos, la melanina posee la capacidad de unir oxígeno molecular de forma no enzimática, una interacción que va más allá de la simple adhesión superficial y que se ve influenciada por la

temperatura (215). En las células de melanoma, la melanina, encapsulada en los melanosomas, secuestra oxígeno molecular, disminuyendo su concentración en las proximidades de orgánulos sensibles al daño por radiación, como las mitocondrias y el núcleo, contribuyendo a la radiorresistencia celular.

En resumen, la melanina ejerce su acción radioprotectora a través de tres mecanismos principales:

- Absorción de la radiación: Su amplio espectro de absorción le permite absorber diferentes tipos de radiación, incluyendo la UV (216,217) y la RI (218,219), convirtiendo la energía en calor y previniendo el daño a componentes celulares.
- Neutralización de radicales libres: Actúa como antioxidante, recombinándose con productos de radiólisis y fotólisis, como radicales libres y ROS, neutralizando su capacidad de daño celular (220).
- Consumo y secuestro de oxígeno: Disminuye la concentración de oxígeno en su entorno mediante su consumo como cosustrato enzimático (tirosinasa (221), fenilalanina hidroxilasa (222)) y su absorción superficial, limitando la formación de ROS y el daño celular inducido por la radiación.

Si bien la melanina confiere una serie de mecanismos protectores frente a la radiación, su presencia puede, paradójicamente, aumentar la radiosensibilidad celular en determinadas circunstancias (223). Un ejemplo de ello es la sinergia observada entre la melanina y los iones de manganeso (II) en la generación de daño al ADN en neuronas (224).

Estudios recientes han demostrado que la resistencia a la radiación en diversos organismos está asociada a la presencia de complejos de manganeso de alta simetría, mientras que los complejos de baja simetría pueden inducir radiosensibilización (225). Curiosamente, estos complejos de baja simetría se forman en los centros activos de enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas. Por lo tanto, la resistencia a la radiación no solo depende de la capacidad genética de la célula para minimizar el estrés oxidativo, sino también de su estado nutricional, que influye en la disponibilidad de manganeso y la formación de complejos .

En este contexto, la capacidad de la melanina para secuestrar cationes de manganeso (Mn^{2+}) mediante la formación de complejos de baja simetría (209) cobra especial relevancia. Esta interacción podría explicar el efecto sinérgico observado entre la melanina y el manganeso (II) en la radiosensibilización celular. Al secuestrar manganeso y promover la formación de complejos de baja simetría, la melanina podría aumentar la susceptibilidad al daño por radiación.

En consecuencia, la melanina ejerce un efecto complejo y multifactorial en la radiosensibilidad celular. Si bien su capacidad para absorber radiación y consumir oxígeno puede contribuir a la radiorresistencia, su interacción con el manganeso y la formación de complejos de baja simetría pueden inclinar la balanza hacia la radiosensibilización.

Estudios con modelos animales

-El hámster dorado sirio (*Mesocricetus auratus*) se ha consolidado como un modelo animal fundamental en la investigación biomédica, incluyendo el estudio del melanoma. Factores como su fácil domesticación la resistencia a la endogamia y la baja variabilidad genética permiten el mantenimiento de trasplantes alogénicos y la susceptibilidad a infecciones virales humanas, lo que lo convierte en un modelo versátil para diversas investigaciones. (226–228)

La variabilidad en los fenotipos de coloración del pelaje en esta especie brinda la oportunidad de investigar la influencia de este factor en el desarrollo del melanoma (229). Además, los hámsteres sirios desarrollan con facilidad melanomas espontáneos e inducidos químicamente, con un alto potencial metastásico (230).

Entre los modelos de melanoma en hámster dorado, destacan el melanoma de Greene (231), el melanoma de Fortner (232,233) y el melanoma de Bomirski (234), cada uno con características únicas que los hacen adecuados para diferentes estudios. Cabe destacar que, a pesar de su susceptibilidad al desarrollo de melanoma, los hámsteres son resistentes a la melanomagénesis inducida por radiación UV (230,235).

El modelo de melanoma de hámster Bomirski (BHM) es un sistema experimental de gran valor para la investigación del melanoma, compuesto por dos líneas celulares: Ma (melánica) y Ab (amelanótica) (236,237). La línea Ma se originó a partir de un melanoma espontáneo en un hámster sirio en 1959, mientras que la línea Ab derivó de Ma en 1963 tras una alteración espontánea que resultó en la pérdida de la capacidad de producir melanina. Esta pérdida de pigmentación en Ab se asocia a un aumento en la tasa de crecimiento, pérdida de la capacidad metastásica y disminución del tiempo de supervivencia (238).

Ambas líneas han mantenido una notable estabilidad fenotípica durante décadas de pases alogénicos en hámsteres. Sin embargo, se ha observado una disminución progresiva en el intervalo de trasplante necesario para ambas líneas, lo que sugiere un aumento en la agresividad tumoral con el tiempo (239,240).

A pesar de ser amelanótica, la línea Ab conserva cierta actividad de tirosinasa, aunque a niveles significativamente menores que la línea Ma. Esta característica la hace similar a algunos melanomas amelanóticos humanos que también expresan tirosinasa. La pérdida de la síntesis de melanina en Ab se debe a un bloqueo en la biogénesis de los melanosomas (238) (238,241).

Es importante destacar que la inducción de la melanogénesis en la línea Ab es posible mediante la incubación con medios ricos en tirosina u otros precursores de melanina. Este proceso induce cambios fenotípicos complejos que dependen del tipo y la concentración del precursor utilizado.

Las líneas Ma y Ab presentan diferencias significativas en diversas características:

- Ultraestructura: Ab presenta un aparato de Golgi extenso, abundantes ribosomas, y modificaciones en la estructura de la membrana plasmática y el contenido de ADN en comparación con Ma.
- Respuesta inmune: Ma y Ab ejercen diferentes efectos sobre el sistema inmunitario, con variaciones en la antigenicidad, inmunogenicidad y secreción de citocinas.

- Proliferación y apoptosis: Ab muestra una mayor proporción de células en fase S/G2/M del ciclo celular y una menor capacidad de apoptosis espontánea en comparación con Ma . Sin embargo, Ab es más sensible a la muerte celular inducida por camptotecina (242,243) y a la radiación (244).
- Metabolismo: Ab presenta una mayor tasa de glucólisis aeróbica y anaeróbica, mientras que Ma tiene un mayor consumo de oxígeno (245). Ab también muestra un mayor potencial transmembrana mitocondrial basal en comparación con Ma (246). Estas diferencias metabólicas se correlacionan con la presencia o ausencia de melanina y se han confirmado mediante estudios de inducción de la melanogénesis (247).

El modelo BHM, con sus dos líneas celulares con características contrastantes, ofrece una herramienta invaluable para la investigación del melanoma. Permite estudiar la influencia de la melanina en la progresión tumoral, la respuesta a la terapia y las diferencias metabólicas entre células melanóticas y amelanóticas.

Las primeras observaciones sobre la radiosensibilidad en el modelo BHM datan de la década de 1970, cuando se evidenció una notable diferencia en la respuesta a la radiación de baja LET (Transferencia Lineal de Energía) entre las líneas celulares Ma (pigmentada) y Ab (no pigmentada). Tras la irradiación con rayos X fraccionados (48 Gy), los tumores Ab mostraron una regresión más rápida que los tumores Ma.

Para determinar si esta diferencia en radiosensibilidad se originaba a nivel celular o tisular, se diseñó un experimento in vitro e in vivo. Las células de ambas líneas se irradiaron in vitro y posteriormente se implantaron en hámsteres. La fracción de supervivencia se calculó a partir de las curvas de crecimiento tumoral. Los resultados confirmaron la mayor radiorresistencia de las células Ma, con una dosis letal media (DL50) de 4.8 Gy para Ma y 2.0 Gy para Ab. Esto indica que la melanina presente en las células Ma confiere un grado de protección contra la radiación de baja LET.

La terapia de radioquelación busca potenciar la eficacia de la radioterapia mediante la combinación con agentes quelantes, que actúan como radiosensibilizadores. En un estudio con datos no publicados referenciados por Śniegocka et al. (248), se empleó Edathamilo cálcico-disódico (ECD) como

quelante, aplicado tópicamente sobre melanomas implantados en hámsteres. La combinación de ECD con radiación (20 Gy de rayos X fraccionados) resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral, con un volumen tumoral tres veces menor en el día 33 en comparación con el grupo control que recibió solo radiación. Este hallazgo sugiere que la radioquelación con ECD podría ser una estrategia prometedora para aumentar la radiosensibilidad del melanoma.

Para evaluar la influencia del oxígeno en la radiosensibilidad del BHM, se utilizó radiación de alta LET en forma de neutrones de 5.5 MeV. La radiación de alta LET es menos dependiente del oxígeno para su efecto citotóxico. Los resultados mostraron que la diferencia en radiosensibilidad entre las líneas Ma y Ab, observada con la radiación de baja LET, desapareció al utilizar neutrones. Esto confirma que el oxígeno juega un papel clave en la radiosensibilidad diferencial entre ambas líneas celulares.

El modelo de melanoma ocular en hámster proporciona una plataforma valiosa para investigar la radiosensibilidad del melanoma y evaluar diferentes estrategias de radioterapia, incluyendo la radiación de baja LET, la terapia con haz de protones y la radio-fototerapia.

Este modelo se estableció mediante la implantación de fragmentos de BHM en la cámara anterior (CA) del ojo de hámsteres sirio (249). Tras la implantación, los tumores crecen en el iris, infiltrando los tejidos circundantes, y producen metástasis en los pulmones, riñones y ganglios linfáticos regionales (250). La vasculatura de estos tumores es altamente irregular y heterogénea, con vasos tortuosos, embolizaciones, fenestraciones y brotes (251). Estas características vasculares contribuyen a la expansión tumoral. Este modelo ofrece ventajas sobre otros modelos de melanoma ocular, como la ausencia de rechazo del injerto y la capacidad de desarrollar metástasis espontáneas.

Los efectos de la radiación de baja LET se investigaron en las líneas BHM Ma y Ab en el modelo ocular utilizando radiación β de rutenio-106 (^{106}Ru) (252). Romanowska-Dixon et al. observaron un retraso en el crecimiento tumoral dependiente de la dosis en ambas líneas. La línea Ab (amelanótica) mostró mayor

radiosensibilidad que la línea Ma (melánica) La radiación no afectó significativamente el número ni el tamaño de las metástasis, excepto a dosis altas (10 Gy), donde se observó una disminución en el número de metástasis en la línea Ma . El análisis histológico reveló daño vascular y necrosis tumoral en los tumores irradiados. La modificación del fraccionamiento de la radiación resultó en una inhibición completa de las metástasis durante 70 días.

La irradiación con haz de protones (10 Gy) retrasó el crecimiento del melanoma BHM Ma en el ojo de hámster . Además, se observó una reducción significativa en la masa de las metástasis pulmonares. Estos resultados son consistentes con estudios previos que demuestran la capacidad de la terapia con protones para inhibir la migración, la invasión y la actividad de la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) en células tumorales de fibrosarcoma humano HT 1080 altamente agresivas in vitro (253).

Se investigó la combinación de terapia fotodinámica (TFD) con radiación gamma en el modelo de melanoma ocular BHM (254). La TFD utiliza un fotosensibilizador que se activa con luz para generar especies reactivas de oxígeno que dañan las células tumorales. La combinación de TFD con radiación gamma resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral, especialmente cuando se administraron en dosis fraccionadas (255). La línea Ab mostró mayor sensibilidad a la radio-fototerapia que la línea Ma. Se cree que la eficacia de este tratamiento combinado se debe a la disminución de células madre tumorales viables .

-El jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) se ha consolidado como un modelo animal valioso en la investigación biomédica, particularmente en el estudio del melanoma. Su uso en la investigación oncológica se debe a diversas características, incluyendo su susceptibilidad a desarrollar melanomas inducidos químicamente y su baja reactividad inmunológica, que facilita el crecimiento de tumores trasplantados.

Un ejemplo paradigmático de la utilidad del jerbo de Mongolia en la investigación del melanoma es el melanoma Zeman UJ90. Este tumor surgió de forma espontánea en un jerbo tratado con N-etil-N-nitrosourea (ENU), un potente

carcinógeno con afinidad por las células de origen neuronal y una predilección por inducir tumores en áreas pigmentadas y expuestas al sol (256,257). Inicialmente identificado en la oreja del animal, el tumor fue trasplantado y se estableció como una línea tumoral estable.

Las características del modelo que lo hacen valioso en la investigación son:

- **Baja inmunogenicidad:** presentan una respuesta inmunitaria deficiente, caracterizada por una baja actividad de macrófagos (258), una débil respuesta de injerto contra huésped (259) y una baja respuesta en ensayos de linfocitos mixtos (260). Esta característica se traduce en una baja actividad del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en los tumores Zeman UJ90, lo cual se asemeja a lo observado en tumores humanos (261,262). La inducción de la síntesis de óxido nítrico (NO) en estos tumores requiere un estímulo inmunológico potente, como el lipopolisacárido (LPS) (263–265).
- **Heterogeneidad tumoral:** La línea Zeman UJ90 presenta dos sublíneas: una melánica (M-FGM) y otra amelanótica (A-FGM) (7). La sublínea amelanótica exhibe una mayor capacidad metastásica en comparación con la melánica, lo que contrasta con el comportamiento del melanoma de hámster Bomirski, donde la línea pigmentada es más metastásica.
- **Cinética de crecimiento:** La sublínea amelanótica (A-FGM) crece más lentamente que la melánica (M-FGM), un fenómeno que difiere del comportamiento de otros melanomas amelanóticos experimentales, que suelen crecer más rápido (266,267). Sin embargo, esta observación es consistente con el comportamiento del melanoma BHM MI hipomelanótico (268,269).

Las variantes melánica y amelanótica se utilizaron para evaluar la radiosensibilidad tumoral a la radiación X. Se observó una respuesta débil a dosis bajas de radiación (5 y 10 Gy), lo cual era esperable. La radiación inhibió el crecimiento tumoral tanto en la variante pigmentada como en la no pigmentada, y la efectividad de la radiación aumentó linealmente con la dosis. Sorprendentemente, la melanina ejerció un efecto radioprotector en este modelo,

a diferencia de lo observado en melanomas de hámster. Sin embargo, este fenómeno no es único y había sido reportado previamente (223).

La radioresistencia observada en el melanoma Zeman UJ90 es consistente con la radorresistencia general de los jerbos de Mongolia descrita en la literatura (270–273). Estos hallazgos hacen del jerbo de Mongolia un modelo animal singular para el estudio de la radioterapia del melanoma.

Es importante destacar que el papel radioprotector de la melanina puede variar según el modelo experimental y, en la práctica clínica, según el caso individual y la etapa de desarrollo del tumor.

Estudios en líneas celulares

La relación entre la pigmentación del melanoma y su radiosensibilidad ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones. Los primeros estudios con líneas celulares de melanoma humano arrojaron resultados contradictorios, Kinnaert et al mostraron mayor radioresistencia en células pigmentadas [470] y Barranco et al. ven alta radioresistencia en células del melanoma sin encontrar diferencias significativas en la radiosensibilidad según la pigmentación (50).

Brozyna, et als (274) utilizando una línea celular de melanoma humano establecida in vitro en la que se puede controlar el nivel de pigmentación de melanina, demostraron que la sensibilidad a la radiación gamma es inversamente proporcional a la actividad de la vía melanogénica. Además, utilizando inhibidores clásicos de la actividad de la tirosinasa en concentraciones no tóxicas, descubrieron que la disminución de la producción de melanina aumenta concomitantemente la sensibilidad del melanoma a la radiación gamma.

En este estudio para eliminar la influencia del genotipo en la radiosensibilidad, se usó la línea celular de melanoma humano SKMel-188, que presenta una melanogénesis inducible Esta línea celular tiene una característica especial: su capacidad de producir melanina es inducible según la cantidad de precursores de melanina que se le administren El experimento consistió en exponer

las células SKMel-188 a radiación gamma y se comparan las células melanóticas con las amelanóticas. El resultado fue que las células pigmentadas sobreviven más a la radiación que las no pigmentadas (275). Cuanta más melanina producen las células, más resistentes son a la radiación. Si se bloquea la producción de melanina con sustancias químicas (N-feniltiourea o D-penicilamina), las células se vuelven más sensibles a la radiación. Curiosamente, el mismo enfoque podría potencialmente sensibilizar a las células de melanoma a la quimioterapia o inmunoterapia. En resumen, este estudio sugiere que la melanina puede actuar como un escudo protector contra la radiación en las células de melanoma. Esto tiene implicaciones importantes para el tratamiento del melanoma, ya que podría ser necesario inhibir la producción de melanina para que la radioterapia sea más efectiva.

Estudios clínicos

Históricamente, la radioterapia ha tenido un papel limitado en el tratamiento del melanoma debido a la creencia de que estos tumores eran radorresistentes. Sin embargo, la evidencia actual indica que los melanomas presentan un amplio espectro de radiosensibilidad. En la actualidad, la radioterapia se utiliza en casos seleccionados de melanoma lentigo maligno y como terapia adyuvante o paliativa en pacientes con enfermedad metastásica regional o sistémica.

La decisión de utilizar RT como terapia adyuvante debe individualizarse y considerar el contexto clínico específico. Además, la presencia o ausencia de melanina en el tumor es un factor relevante, ya que la melanogénesis puede influir en el comportamiento y el metabolismo de las células tumorales. Estudios recientes han demostrado que la presencia de melanina en melanomas metastásicos puede atenuar el beneficio de la radioterapia (276).

Se ha reportado un beneficio de la RT adyuvante en subtipos específicos de melanoma, como el desmoplásico, el lentigo maligno y el mucoso.

En el caso del lentigo maligno, la RT puede ser una alternativa a considerar en casos seleccionados. Los melanomas desmoplásicos, que carecen de pigmentación, parecen ser particularmente sensibles a la RT adyuvante.

Ya hace más de una década Brożyna et al. realizan un estudio clínico en el que demostró que la melanogénesis en melanomas cutáneos primarios con metástasis (estadios III y IV) se asocia a una menor supervivencia general y libre de enfermedad (189). Este estudio retrospectivo analizó la relación entre la melanogénesis y la supervivencia en 73 pacientes con melanoma cutáneo. Los resultados mostraron que la presencia de melanina en melanomas metastásicos y metástasis ganglionares se asoció con una menor SG y SLE. Los autores concluyen que la melanogénesis podría ser un factor pronóstico adverso en el melanoma metastásico y sugieren que la inhibición de la melanogénesis podría ser una estrategia terapéutica adyuvante.

Estos mismos autores publicaron después otro estudio en el que encuentran que los pacientes con melanomas amelanóticos metastásicos mostraron una mayor supervivencia tras la radioterapia en comparación con aquellos con tumores pigmentados (276). Este estudio retrospectivo investigó la influencia del contenido de melanina en la respuesta a la RT en pacientes con melanoma metastásico analizando dos cohortes de pacientes: pacientes con melanomas metastásicos que recibieron RT, con o sin quimioterapia (n=57) y Pacientes con melanoma primario, con o sin metástasis (n=84); para analizar la relación entre la pigmentación y el estadio tumoral (pT) y la afectación ganglionar (pN). Se observó que los pacientes con metástasis amelanóticas mostraron una supervivencia significativamente mayor después de la RT en comparación con aquellos con metástasis pigmentadas. Esta diferencia fue más pronunciada en los pacientes que recibieron solo RT, lo que sugiere que la melanina podría atenuar la eficacia de la radioterapia. Además también encuentran que la melanina se relaciona con la progresión tumoral: en los melanomas primarios, la pigmentación disminuyó en tumores avanzados (pT3-pT4) en comparación con tumores tempranos (pT1-pT2). Sin embargo, en los tumores avanzados, la pigmentación fue mayor en aquellos con metástasis ganglionares (pN1-3) o a distancia (pM1) en comparación con aquellos

sin metástasis . Esto sugiere que la melanina podría estar involucrada en la progresión del melanoma.

Estos resultados clínicos son consistentes con estudios previos que reportan un peor pronóstico en pacientes con melanomas pigmentados del cuerpo ciliar y coroideos (277,278).

Los datos experimentales y clínicos sugieren que la inhibición de la melanogénesis podría ser una estrategia para radiosensibilizar las células de melanoma y mejorar la eficacia de la radioterapia. Además, la inhibición de la melanogénesis podría tener un efecto sinérgico con la quimioterapia o la inmunoterapia.

Aunque la RT tiene un papel de actor secundario en el melanoma dérmico, sin embargo, sigue siendo una herramienta terapéutica importante, para el melanoma uveal (MU), donde se observa una regresión satisfactoria en la mayoría de los casos.

En el tratamiento del MU, la RT se emplea como adyuvante a la cirugía, utilizando tanto RT externa como braquiterapia con placas. La braquiterapia, es el tratamiento conservador más común para los melanomas coroideos, seguido de la RT con haz de protones.

En un estudio piloto con pacientes que padecían melanoma coroideo, se exploró el potencial de la terapia de radioquelación para mejorar la respuesta a la braquiterapia. Se utilizaron dos agentes quelantes, Cuprenil y Chelaton, administrados en un régimen que abarcaba los períodos pre y durante la braquiterapia (7-10 días antes y 9-14 días durante). La evaluación del tamaño tumoral se realizó a las 8 y 16 semanas posteriores al tratamiento. Los resultados mostraron una reducción significativa del volumen tumoral, alcanzando aproximadamente un 45% a las 16 semanas en el grupo tratado con Cuprenil. Se ha postulado que el efecto radiosensibilizador de estos quelantes podría deberse a su capacidad para inhibir el consumo de oxígeno en las células de melanoma (279). Esta inhibición del consumo de oxígeno podría aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la radiación. La inhibición de la producción de melanina podría

contribuir a la radiosensibilización, ya que la melanina puede actuar como un radioprotector en algunas circunstancias. En resumen, este estudio piloto sugiere que la terapia de radioquelación con Cuprenil o Chelaton podría ser una estrategia prometedora para mejorar la respuesta del melanoma coroideo a la braquiterapia. Se necesitan estudios adicionales para confirmar estos hallazgos y determinar la eficacia y seguridad de esta terapia en una población más amplia de pacientes.

La melanogénesis puede influir en la radiosensibilidad del melanoma. La inhibición de la pigmentación podría ser una estrategia prometedora para aumentar la eficacia de la radioterapia en este tipo de cáncer. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para comprender completamente los mecanismos involucrados y optimizar las estrategias de tratamiento.

Otros mecanismos de Radiorresistencia (Más allá de la Melanina)

La resistencia del melanoma a la radiación no solo es debida al efecto protector de la melanina, también existen una serie de mecanismos de defensa conectados:

- Una reparación del ADN muy competente, que es capaz de solventar las roturas de doble hebra (DSB) mediante las vías de NHEJ y HRR.
- La supresión de la muerte celular programada, a través de la desregulación de la vía de p53 y de niveles elevados de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2.
- La activación de rutas de señalización que promueven la supervivencia, como las vías MAPK y PI3K/AKT, impulsada por mutaciones oncogénicas en genes como BRAF o NRAS.
- La influencia del microambiente tumoral, en el que la hipoxia reduce la eficacia de la radiación al disminuir la cantidad de oxígeno disponible para produce daño al ADN .

Estrategias Modernas para Superar la Radiorresistencia

La supervivencia celular frente a la radiación sigue el modelo matemático lineal-cuadrático (LQ), cuyo parámetro clave es el ratio α/β . Históricamente el α/β del melanoma se ha considerado alrededor de 3 Gy . Este ratio bajo supone que este tumor tiene gran capacidad para poder reparar el daño subletal. Esta característica explica su resistencia a los regímenes convencionales de radioterapia (con dosis bajas por fracción) y justifica el uso de estrategias de hipofraccionamiento con dosis más elevadas para superar dicha capacidad de reparación.

La comprensión de los factores de resistencia descritos ha provocado una transformación en el abordaje terapéutico del melanoma, superando su resistencia histórica mediante dos enfoques principales. Por un lado el uso de la Radioterapia Ablativa Estereotáctica (SBRT/SRS), que se basa en la administración de dosis muy elevadas en pocas fracciones (hipofraccionamiento extremo). Con dosis altas por fracción se logra que los mecanismos de reparación del ADN no sean suficientes y se produce la muerte celular por medio de la destrucción de la microvascularización tumoral y la activación del sistema inmunitario. Por otro lado la sinergia con terapias sistémicas. La radioterapia mejora la respuesta a los inhibidores de BRAF/MEK en tumores con esta mutación. De forma más significativa, actúa como un inmunomodulador que potencia el efecto de la inmunoterapia (ICIs), transformando el tumor irradiado en un antígeno que pasa al torrente circulatorio y es capaz de inducir respuestas sistémicas (efecto abscopal).

LOS POLIFENOLES VEGETALES

Antes de profundizar en los compuestos específicos, es útil contextualizar su lugar dentro de la familia de los polifenoles. Estructuralmente, estos metabolitos secundarios de las plantas se clasifican de forma general en dos grandes grupos, basados en la estructura de su esqueleto de carbono: Flavonoides y No Flavonoides. Esta distinción es fundamental para comprender sus diferentes orígenes biosintéticos y sus propiedades biológicas.

LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides constituyen una familia extensa y diversa de metabolitos secundarios polifenólicos ubicuos en el reino vegetal. Su presencia es notable en la dieta humana, siendo ingeridos regularmente a través del consumo de frutas, verduras, frutos secos, semillas, té, vino tinto y cítricos.(335)

Estructuralmente, se caracterizan por un esqueleto base de difenilpropano (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos aromáticos (denominados A y B) interconectados por una cadena de tres carbonos que conforman un anillo heterocíclico oxigenado (C), conocido como benzo-γ-pirona que se ha asociado con capacidad antioxidante en diferentes sistemas biológicos.(336–339)

Su clasificación se establece en función de las variaciones en su estructura química y el grado de oxidación del esqueleto carbonado.

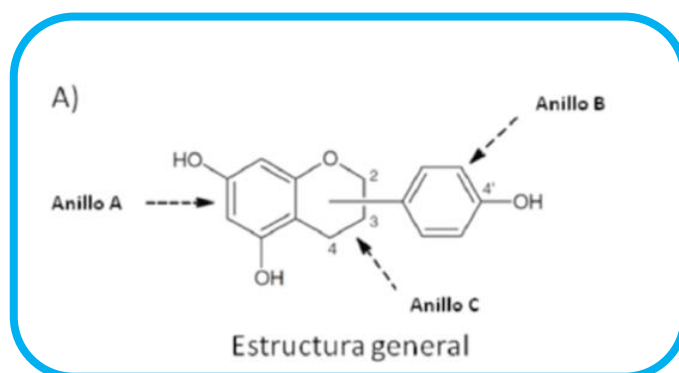


Figura 4. Estructura general de los flavonoides

Se han identificado más de 9000 compuestos con estructura flavonoide, ya que existen numerosas combinaciones con múltiples sustituyentes de grupos hidroxilo, metoxilo, O- y C-glucósido sobre la estructura básica benzo-γ-pirona (C6-C3-C6).(340–342)

Estos compuestos poseen un importante valor debido a sus múltiples aplicaciones en las industrias agroalimentarias y farmacéuticas. Además, numerosos estudios han demostrado que los flavonoides poseen una amplia gama de aplicaciones médicas, actuando como agentes antibacterianos(343), antiinflamatorios (344), antioxidantes (345), antineoplásicos (346) y antigénicos (347).

Debido a las diferencias en la estructura, distribución, metabolismo y biodisponibilidad de los flavonoides, diferentes flavonoides pueden tener diferentes efectos en la salud humana. Los flavonoides se han estudiado en el contexto de diversas enfermedades. Muestran potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la depresión, la inflamación y el daño hepático. Además, se han investigado sus propiedades antihipertensivas, cardioprotectoras y antiulcerosas. Su efecto en la diabetes, las infecciones (fúngicas, víricas y bacterianas) y el cáncer también ha sido objeto de estudio.

LOS POLIFENOLES NO FLAVONOIDES

El grupo de los polifenoles no flavonoides es estructuralmente muy heterogéneo y agrupa a varias subclases de gran relevancia biológica y farmacológica. A diferencia de la estructura C6-C3-C6 común a los flavonoides, estos compuestos presentan esqueletos de carbono más sencillos o de orígenes biosintéticos distintos. Las principales subclases incluyen los ácidos fenólicos, los estilbenos y, de especial relevancia para este estudio, los diterpenos fenólicos.

Ácidos Fenólicos

Son compuestos con una estructura relativamente simple, derivados del ácido benzoico (esqueleto C6-C1) o del ácido cinámico (esqueleto C6-C3). Son

abundantes en alimentos como el café, los arándanos, las ciruelas y los cereales integrales. Un ejemplo destacado es el ácido rosmarínico, un éster del ácido cafeico que, al igual que el ácido carnósico, se encuentra en altas concentraciones en el romero.

Estilbenos

Se caracterizan por una estructura de difeniletileno (C6-C2-C6). Aunque son menos comunes en la dieta, han atraído un enorme interés científico. El representante más conocido es el resveratrol, presente en las uvas (y por tanto en el vino tinto), los cacahuetes y algunos frutos del bosque.

Diterpenos Fenólicos

Finalmente, encontramos los diterpenos fenólicos, una clase de compuestos singular que combina un esqueleto de diterpeno (C20, derivado de unidades de isopreno) con la presencia de un grupo fenólico, responsable de su actividad biológica.

Es precisamente en esta categoría donde se clasifica el ácido carnósico, el compuesto central de esta tesis doctoral. Se encuentra de forma abundante en plantas como el romero (*Rosmarinus officinalis*) y la salvia. Su potente capacidad antioxidante y su efecto dual como radioprotector y radiosensibilizador paradójico han sido objeto de numerosos estudios, como se describirá a continuación. Junto a su derivado, el carnosol, representa uno de los ejemplos más claros de cómo un polifenol no flavonoide puede modular de forma selectiva la respuesta celular a la radiación ionizante.

Todos estos compuesto tienen una serie de propiedades que le hacen interesantes desde el punto de vista oncológico.

Actividad antitumoral

Se ha prestado especial atención a la mejora de los medicamentos contra el cáncer utilizando fitocompuestos vegetales. Su potencial, disponibilidad y bajo

costo en comparación con los medicamentos terapéuticos modernos para el tratamiento de enfermedades los hacen muy atractivos

Los polifenoles tienen un amplio espectro de actividades antineoplásicas. Actúan a través de múltiples mecanismos para ejercer sus efectos antitumorales. (280) Algunos de los mecanismos más destacados son: la interferencia con la actividad de las proteínas quinasas, la inhibición del crecimiento de células tumorales, la inducción de apoptosis y la inhibición de metástasis/migración/angiogénesis

Su capacidad para interferir con la actividad de las proteínas quinasas que regulan la proliferación celular, inhibiendo la proteína quinasa C (PKC), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la quinasa de adhesión focal (FAK).

Inhibición de la PKC, enzima multifuncional involucrada en una amplia gama de actividades celulares, incluyendo la promoción de tumores. (281)

Diversos estudios in vitro han demostrado que ciertos flavonoides dietéticos, en particular la quercetina, la fisetina y la luteolina, son potentes inhibidores de la PKC (282–284). La quercetina se ha identificado como el inhibidor más eficiente de la PKC entre los flavonoides examinados. La fisetina y la luteolina actúan bloqueando competitivamente el sitio de unión del ATP en la unidad catalítica de la PKC.

Se ha observado que tanto la luteolina como la quercetina poseen características estructurales similares, como un doble enlace entre C2 y C3 en el anillo C y grupos -OH en C3' y C4' en el anillo B, lo que sugiere una capacidad similar para unirse a los sitios de unión de ATP en proteínas tirosina quinasas (PTK) (285,286)

Inhibición del receptor del EGFR, proteína tirosina quinasa que juega un papel fundamental en el crecimiento y la propagación de las células cancerosas. La inhibición de la actividad de la tirosina quinasa EGFR podría conducir a una disminución en el crecimiento de las células tumorales. La genisteína, la luteolina y la quercetina han demostrado ser supresores efectivos de la tirosina quinasa EGFR. De estos flavonoides, la luteolina y la quercetina parecen ser más potentes

que la genisteína en la inhibición del EGFR en células cancerosas. La quercetina y la luteolina provocan la transinactivación de la tirosina quinasa EGFR y una reducción notable en el nivel de fosforilación de tirosina de las proteínas celulares. (282,285,286)

Inhibición de la FAK, proteína tirosina quinasa no receptora involucrada en la supervivencia, el ciclo celular y la motilidad celular. La sobreexpresión de FAK es común en una variedad de tumores humanos y se ha relacionado con la tumorigénesis, la invasividad celular y la metástasis. La inhibición de la FAK se asocia con la supresión de la proliferación y migración celular in vitro. Se ha demostrado que la disminución de la actividad o la desactivación de la función de la FAK afecta el crecimiento y la metástasis en diversos tumores. El tratamiento con luteolina o quercetina impide la fosforilación de la FAK en células tumorales. La quercetina y la luteolina también inducen una reducción en los niveles de FAK fosforilada y de metaloproteinasas de matriz secretadas (MMP), lo que podría contribuir a la supresión del potencial invasivo y la migración celular.(287–290)

Se carece de conocimiento sobre cómo estas sustancias entran en la célula y ejercen su acción en el compartimento donde se localizan las quinasas. Una posibilidad es que no tengan ningún efecto sobre las quinasas en las células quiescentes y solo interfieran con el sitio de unión a ATP cuando la enzima se transloca tras la activación (281).

Durante las últimas tres décadas, se ha dedicado un esfuerzo considerable a investigar el efecto de estas sustancias en la inhibición del crecimiento de células tumorales. La quercetina ha sido objeto de numerosos estudios. Investigaciones iniciales en la década de los 70, demostraron la capacidad de la quercetina para inhibir el crecimiento de diversas líneas celulares tumorales in vitro, incluyendo células de leucemia (291). Estudios posteriores confirmaron la actividad antitumoral de la quercetina y otros flavonoides en modelos animales, demostrando su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores(292).

La quercetina ha mostrado potentes efectos antiproliferativos en una variedad de líneas celulares tumorales in vitro, incluyendo células de cáncer

gástrico, colon, mama, ovario, hígado (293–299). Además, se ha observado sinergia entre la quercetina y el cisplatino en la inhibición del crecimiento tumoral (300). Otros estudios han revelado que su actividad antiproliferativa se ve potenciada por el ácido ascórbico (301). Flavonas polimetoxiladas como la tangeretina y la nobiletina también han demostrado actividad antiproliferativa, en cultivos celulares (302,303).

La quercetina ejerce sus efectos antiproliferativos a través de diversos mecanismos, incluyendo la inhibición de la glucólisis aeróbica, la inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, el aumento de los niveles de AMP cíclico, la interferencia con el ciclo celular y la interacción con sitios de unión a estrógenos de tipo II nuclear. Además, la capacidad de la quercetina para inhibir varias tirosinaquinasas puede contribuir a su actividad antiproliferativa.

Los flavonoides han demostrado la capacidad de inducir la apoptosis en células tumorales a través de diversos mecanismos, incluyendo la modulación del ciclo celular, la inhibición de proteínas quinasas y la generación de ROS.

Se han realizado múltiples estudios con diferentes sustancias. La genisteína, por ejemplo, induce la apoptosis en células de leucemia mielógena humana (304) y bloquea la supresión de la apoptosis en células de la granulosa ovárica de rata (305). Junto con la tirfostina, induce la apoptosis en líneas celulares de leucemia humana. (306) También se ha visto con la quercetina (307,308), la tangeretina en células HL-60 (309) y la luteolina, bloqueando la vía de señalización del EGFR en varias células tumorales, incluyendo A431, MiaPaCa-2, Hep G2 y MCF 7 (285). Existen numerosos artículos estudiando la apigenina como inductora de apoptosis en cáncer de próstata (310–313) a través del bloqueo y la modulación del ciclo celular, la disrupción de la función mitocondrial y la inhibición de NF-kappa B.

La inhibición de metástasis/migración/angiogénesis, representa un desafío significativo en el tratamiento del cáncer.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son un grupo de enzimas que descomponen las proteínas que se encuentran en la matriz extracelular, el entramado de proteínas y otras moléculas que rodea y sostiene las células en los

tejidos. En muchos tipos de neoplasias, la producción de MMP se correlaciona con la invasión y la metástasis (314–316). Existen diferentes tipos de MMP, como las colagenasas, gelatinasas, estromelisin y MMP de tipo membrana, cada una con funciones específicas en la degradación de los componentes de la matriz extracelular. La actividad de las MMP está regulada a múltiples niveles, incluyendo la expresión génica, la secreción y la activación de las enzimas. Los inhibidores endógenos, como la α 2-macroglobulina y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP), regulan la actividad de las MMP(317,318). La inhibición de las MMP se ha explorado como una estrategia para limitar la metástasis del cáncer(319–322).

Los polifenoles pueden influir en la actividad de las MMP de diversas maneras. La quercetina, por ejemplo, disminuye la invasión de células de melanoma al reducir la pro-MMP-9(323,324) [154]. Tanto la luteolina como la quercetina pueden disminuir la secreción de MMP-2 y MMP-9 en varias líneas celulares de cáncer (324). La genisteína, por otro lado, inhibe la invasión de células de cáncer de mama al regular negativamente la actividad de MMP-9(325) .

Se ha observado que los compuestos con un mayor número de grupos hidroxilo o sustituciones glucosídicas tienen un efecto inhibitor más potente sobre las MMP-2 y -9 (326). El galato de epigallocatequina , un flavanol del té verde, es un potente inhibidor de MMP-2 y -9 así como de la MT1-MMP(327–330).

La inhibición de la angiogénesis es otra estrategia para limitar la metástasis. Esta inhibición se ha observado en gran cantidad de flavonoides, como la fisetina, la apigenina , la luteolina , la hispidulina(331–333)(334,335).

Relación estructura-actividad para la actividad anticancerígena

Es importante destacar que los efectos anticancerígenos de los flavonoides están estrechamente relacionados con su estructura química, con pequeñas variaciones que pueden resultar en cambios significativos en su actividad biológica.

El importante papel del doble enlace $C2 = C3$ es esencial para una fuerte inhibición tumoral(336,337) . Además, se producirá una mayor inhibición si los dos grupos hidroxilo del anillo B existen uno al lado del otro y $C2 = C3$ está insaturado (336) . Cabe señalar que muchos informes proporcionan evidencia del efecto de la hidroxilación en la modulación tumoral. Los flavonoides hidroxilados específicos tienen un efecto inhibitor más fuerte sobre las células cancerosas que los análogos de permetoxilación. Se propone reemplazar el anillo B como una parte catecol con influencia vital. Mientras tanto, la sustitución adicional de grupos hidroxilo en el anillo B no cambia la actividad (337). En el caso del anillo C, la 3-hidroxilación se considera un componente muy importante para mejorar el efecto biológico (338). Los derivados flavonoides de la O-metilación contribuyen a aumentar la actividad biológica, que a menudo se asocia con la polimetoxilación del anillo A.

Polifenoles en el melanoma

Tienen un potencial prometedor en la prevención y el tratamiento del melanoma, modulando la melanogénesis y ejerciendo efectos anticancerígenos a través de diversos mecanismos.

La melanogénesis es un proceso complejo regulado por varios genes. La vía principal se inicia con la hormona α -MSH, que estimula el receptor MC1R. Esto activa la vía cAMP-PKA y aumenta la expresión de MITF, un factor de transcripción que activa enzimas clave para la producción de melanina, como la tirosinasa, TYRP-1 y TYRP-2. La proteína ASIP inhibe este proceso al antagonizar la α -MSH.

Pueden afectar la melanogénesis al modular diferentes puntos de esta vía. Por ejemplo, el galato de epigallocatequina y la hesperidina inhiben la acumulación de MITF (339,340), mientras que la hesperetina la aumenta (341). La baicaleína inhibe MITF a través de la degradación mediada por ERK1/2 (342). La luteolina, la genisteína, el kaempferol y la quercetina afectan la tirosinasa directa o indirectamente (343–346). La apigenina, por otro lado, se dirige a TYRP-2/DCT y TYRP-1(347) .

Es interesante notar que sustancias con estructuras similares pueden tener efectos opuestos en la melanogénesis. Por ejemplo, la apigenina estimula la síntesis de melanina, mientras que la luteolina la inhibe, a pesar de que solo difieren en un grupo hidroxilo(348) .La luteolina también puede regular positivamente la expresión de ASIP, lo que podría contribuir a su efecto inhibidor sobre la melanogénesis(349) .

En general, los flavonoides muestran una interacción compleja con la vía de la melanogénesis, modulando diferentes puntos de esta y exhibiendo efectos variables dependiendo de su estructura y el contexto celular.

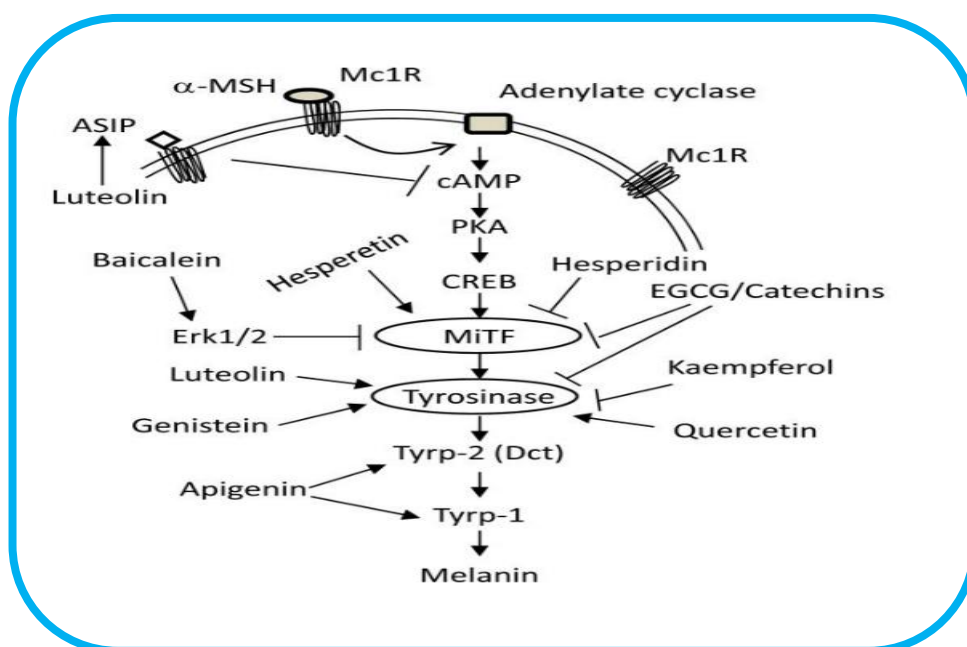


Figura 5. Interacción de los flavonoides en la vía de la melanogénesis. (350)

Estos compuestos exhiben un efecto antimelanoma al inhibir la proliferación e invasión celular e inducir la apoptosis(351). Los mecanismos también son múltiples: eliminación de ROS, modulación inmunitaria, regulación del ciclo celular y modificación epigenética, incluida la metilación del ADN y la desacetilación de histonas.

Numerosos estudios han demostrado la potente actividad antioxidante de los polifenoles, convirtiéndolos en eficaces eliminadores de ROS. El exceso de ROS genera daños en el ADN, los lípidos y las proteínas, y altera la señalización celular,

contribuyendo al desarrollo del melanoma. Los flavonoides actúan como agentes protectores en estas condiciones.

Para evaluar la capacidad antioxidante de estas sustancias, se utilizan diversos métodos *in vitro*. (352–354)

El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) mide la capacidad de un antioxidante para reducir un radical libre estable, lo que provoca un cambio de color de violeta a amarillo. Este cambio se mide con un espectrofotómetro para cuantificar la actividad antioxidante.

Otro método es el ensayo FRAP (poder antioxidante reductor férrico), que mide la capacidad de un antioxidante para reducir el hierro férrico (Fe^{3+}) a hierro ferroso (Fe^{2+}). Esta reacción genera un cambio de color que se mide para determinar la capacidad reductora del antioxidante.

El ensayo TEAC (catión radical ABTS) es similar al DPPH, pero utiliza un radical libre diferente (ABTS) que también cambia de color al ser reducido por un antioxidante. Este ensayo es más versátil que el DPPH, ya que puede utilizarse en un rango más amplio de pH.

El ensayo ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) es una variante del ensayo TEAC que utiliza un radical ABTS generado mediante una reacción química. Es más sensible que el TEAC para medir la capacidad antioxidante.

El ensayo FC (capacidad reductora de Folin-Ciocalteu) mide la capacidad de un antioxidante para reducir un reactivo específico, lo que produce un cambio de color que se puede medir. Este ensayo es sencillo y ampliamente utilizado, pero no es específico para antioxidantes.

La capacidad reductora total electroquímica mide la capacidad de un antioxidante para donar electrones mediante técnicas electroquímicas. Este método proporciona información sobre la capacidad reductora de los antioxidantes, pero requiere un equipo especializado.

Finalmente, el sistema NBT/XO (hipoxantina/xantina oxidasa acoplado con la reducción con nitroazul de tetrazolio) mide la capacidad de un antioxidante para inhibir la producción de radicales superóxidos. Este ensayo es relevante porque los radicales superóxidos son un tipo de ROS que puede dañar las células.

Cada uno de estos ensayos proporciona información complementaria sobre la actividad antioxidante de los flavonoides, lo que permite una evaluación más completa de su potencial para proteger contra el daño oxidativo.

Se ha observado que los polifenoles presentan algún grado de actividad antioxidante, pero la luteolina y la quercetina destacan por su potencia(355,356). Por ejemplo, la luteolina muestra una actividad antioxidante dependiente de la dosis en ensayos DPPH y NBT/XO, tanto en sistemas libres de células como en células B16 de melanoma, donde reduce los niveles de ROS intracelulares(348).

Los mecanismos moleculares de la actividad antioxidante son complejos, pero se pueden agrupar en tres categorías principales:

- Quelación de iones metálicos de transición: pueden quelar iones metálicos como Cd^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} y Zn^{2+} (357,358). Estos iones promueven la formación de ROS y algunos son carcinógenos. Los sitios de unión de metales en los compuestos suelen ser grupos hidroxilo y/o cetonas adyacentes.
- Reacción directa con radicales libres: pueden neutralizar radicales libres a través de sus grupos hidroxilo libres (354). Por ejemplo, la quercetina elimina los radicales superóxidos principalmente a través de los grupos 3'4'-dihidroxilo en el anillo B (359).
- Modulación de sistemas antioxidantes celulares: pueden modular sistemas antioxidantes celulares para restablecer el equilibrio redox después del estrés oxidativo.

Estas funciones no son mutuamente excluyentes. En el melanoma, las principales fuentes de ROS incluyen las mitocondrias, las NADPH oxidasas, las oxidasas nítricas, la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y los melanosomas (360). Estas fuentes están reguladas por factores transcripcionales como NRF2 y

los miembros de la familia AP-1 (361–364). NRF2 es un objetivo importante para estas sustancias , ya que es un regulador maestro del equilibrio redox (365).

Hay diversos estudios en la literatura con diversas sustancias que apoyan estos datos. Así la luteolina puede inhibir o activar NRF2, dependiendo del tipo de célula y la concentración (366–370). La apigenina estimula la actividad de NRF2 en diferentes líneas celulares (371–374). La quercetina también activa NRF2 y promueve la expresión de genes antioxidantes (375–378). La genisteína y el EGCG también inducen NRF2 (379–381) .

Otros flavonoides, como la baicaleína, pueden modular la expresión de COX-2 (382), mientras que la luteolina, la apigenina y la genisteína la suprimen (383–386). La luteolina, la quercetina y la apigenina también inhiben AP-1 (387–389).

Las mitocondrias y las enzimas generadoras de ROS también son moduladas por los flavonoides. Algunos, como la apigenina y la baicaleína, inducen la producción de ROS en células de melanoma (361,390), mientras que otros, como la luteolina, la inhiben [28]. Estos efectos varían según el tipo de flavonoide, la dosis y el contexto celular.

Existe evidencia sólida de que la inflamación y la supresión inmunitaria desempeñan un papel crucial en la etiología, progresión e incluso el pronóstico del melanoma. Estos compuestos han demostrado tener propiedades antiinflamatorias con un impacto potencial en la prevención y el tratamiento del melanoma. Modulan la inflamación a través de mediadores clave en el melanoma y la piel, como los factores de transcripción AP-1 , NFκB , STAT3 y las oxidasas nítricas (iNOS y nNOS). La AP-1 y NFκB pueden regular positivamente la expresión de citocinas como IL-8 .

Estos datos se pueden evidenciar en datos concretos de la literatura. Así la luteolina, la quercetina y la apigenina inhiben AP-1 (387–389). La luteolina promueve la degradación de STAT3, bloqueando las señales inflamatorias de citocinas como IL-6 e IL-10 (391). La quercetina, por otro lado, altera la fosforilación de STAT3, afectando su localización nuclear(392) . El EGCG previene la inmunosupresión inducida por UV a través de la producción de IL-12 (393).

También es sabido que el NO juega un papel importante en el microambiente inflamatorio del melanoma, promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis. La expresión de iNOS en el melanoma se correlaciona negativamente con la supervivencia del paciente, mientras que nNOS está sobreexpresada y es un objetivo potencial para la terapia. Los polifenoles tienen interacciones complejas con el NO. Pueden actuar como eliminadores de NO, pero también generar superóxido(394). Bajo estrés oxidativo, pueden inhibir iNOS o la vía NFκB, ejerciendo un efecto antiinflamatorio (394). El impacto de estos compuestos en los niveles de NO depende del tipo de sustancia, la concentración y las condiciones celulares, como los niveles de expresión de iNOS.

Los polifenoles exhiben actividad antiproliferativa y proapoptótica a través de diversas vías de señalización, como la HGF/SF-Met, la vía MAPK, la regulación del ciclo celular, la inducción de la diferenciación y la vía PI3K-AKT. Al igual que en la melanogénesis, diferentes polifenoles tienen efectos distintos sobre sus dianas celulares, que son bastante diversas.

En estudios con melanoma de ratón B16-BL6 xenoinjertado, se observó que el EGCG, la apigenina y la quercetina inhiben el crecimiento tumoral, con una eficacia similar al tamoxifeno en el caso de la apigenina y la quercetina(395). El EGCG inhibe la formación de colonias en agar blando (396), posiblemente al inhibir la ciclina D1, CDK2 y PCNA, mientras que induce p21waf1/cip1 y p27kip1, y promueve la apoptosis (397). También reduce la acumulación de la proteína MITF (398), lo que puede contribuir a su efecto antiproliferativo. La apigenina induce el bloqueo del ciclo celular en G2/M al inhibir la actividad de CDK1 (399), lo que puede explicar su actividad antimelanoma in vivo (395). El glucopiranosido de cianidina induce la diferenciación de las células B16 al aumentar los niveles de AMPc, la expresión de tirosinasa y la expresión del marcador de diferenciación MART-1 (400)

Tanto el EGCG como la quercetina inhiben la señalización de HGF/SF-Met, un regulador clave de la migración e invasión del melanoma(401,402) . La fisetina inhibe la proliferación de células 451Lu al interrumpir la vía de señalización de β-catenina/MITF (403). También inhibe la invasión y metástasis de células de melanoma al inhibir la transición epitelial a mesenquimal (404,405) . El tratamiento

combinado con fisetina y el inhibidor de RAF, Sorafenib, muestra una mayor reducción del crecimiento tumoral en modelos xenoinjertados que los compuestos individuales, debido a múltiples mecanismos, como la inducción de la apoptosis, la inhibición de la proliferación y la angiogénesis, y la inhibición de las vías MAPK y PI3K (406).

En general, todas estas sustancias muestran efectos antiproliferativos y/o antimetastásicos contra el melanoma, aunque no está claro si actúan directamente sobre los genes afectados.

Cada vez hay más evidencia que sugiere que muchos de estos compuestos pueden regular la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos, incluyendo la modificación de histonas, la metilación del ADN y la modulación de miRNA/lncRNA (microARN y ARN largo no codificante) (407). Estas modificaciones epigenéticas pueden afectar a una amplia variedad de genes.

Las histonas, proteínas que empaquetan el ADN, pueden modificarse mediante acetilación y metilación a través de enzimas como la histona acetiltransferasa (HAT), la histona desacetilasa (HDAC), la histona metiltransferasa (HMT) y la histona desmetilasa (HDM). El ADN también puede modificarse por metilación a través de las ADN metiltransferasas. La mayoría de los flavonoides presentan funciones de modificación epigenética, aunque la mayoría de los datos se han obtenido en tipos de células diferentes al melanoma. En las células de melanoma, las ADN metiltransferasas (DNMT), las HDAC y las HAT son dianas comunes de los flavonoides, y estas enzimas afectan la expresión de genes supresores de tumores como p21CIP1 y p16INK4A (408,409). En varias líneas celulares de melanoma humano, los polifenoles del té verde (mezcla de monómeros de epicatequina) inhiben las HDAC, promueven la actividad de las HAT (320,410) e inducen la expresión de p16INK4A, p27KIP1 y p21CIP1(397). Estos genes supresores de tumores suelen estar silenciados epigenéticamente en las células de melanoma(411–413).

Es importante destacar que los efectos anticancerígenos que se han descrito en los polifenoles están estrechamente relacionados con su estructura química, con

pequeñas variaciones que pueden resultar en cambios significativos en su actividad biológica.

Así, Rodríguez et al. (414) publican un estudio, en *Melanoma Research* (2002), investigando cómo seis flavonoides diferentes afectan el crecimiento de dos líneas celulares de melanoma de ratón B16F10 y humana SK-MEL-1. El objetivo principal fue determinar la citotoxicidad y el efecto antiproliferativo de estas sustancias para las células de melanoma, comparándolos con el melfalán, un quimioterápico de probada efectividad. Para ello, se realizaron ensayos *in vitro* utilizando hesperetina, 7,3'-dimetilhesperetina, eriodictiol, luteolina, quercetina y tangeretina. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: ensayos de citotoxicidad (24 h) para evaluar si los flavonoides causaban la muerte celular directa, y ensayos antiproliferativos (72 h) para evaluar si inhibían el crecimiento celular a largo plazo. Los resultados mostraron que, en cuanto a la citotoxicidad, solo la tangeretina y, en menor medida la luteolina en altas concentraciones, mostraron una ligera inhibición del crecimiento de las células de melanoma. El melfalán, como era de esperar, inhibió el crecimiento de ambas líneas celulares de forma dependiente de la dosis. La línea celular de ratón B16F10 fue más sensible que la línea celular humana SK-MEL-1 a los tratamientos de 24 horas. En los ensayos antiproliferativos, la tangeretina fue el flavonoide más efectivo para inhibir el crecimiento de ambas líneas celulares. La 7,3'-dimetilhesperetina solo inhibió el crecimiento a la concentración más alta probada. La luteolina y la quercetina tuvieron un efecto moderado en la línea celular B16F10, mientras que la hesperetina y el eriodictiol no mostraron ningún efecto. El melfalán, nuevamente, mostró una potente inhibición del crecimiento, siendo mucho más potente que la tangeretina. Al igual que en los ensayos de citotoxicidad, la línea celular B16F10 fue más sensible a los tratamientos.

Los autores del estudio sugieren que la estructura química de los flavonoides influye en su actividad antiproliferativa. La ausencia del doble enlace C2-C3 en los flavonoides hidroxilados parece hacerlos menos efectivos, mientras que la presencia de al menos tres grupos metoxi adyacentes en el esqueleto de la flavona y la flavanona parece aumentar su capacidad para inhibir el crecimiento celular.

En esta misma línea Martínez et al. (415) investigan en un estudio in vitro cómo diferentes flavonoides polihidroxilados afectan el crecimiento de células de melanoma (B16F10) y melanocitos (Melan-a). Los investigadores querían entender si la estructura química de los flavonoides influye en su capacidad para detener la proliferación de células cancerosas y encontraron que la miricetina, la baicaleína y el ácido gálico fueron los más efectivos para inhibir el crecimiento de ambas líneas celulares. Esto se debe a que poseen un doble enlace C2-C3 y tres grupos hidroxilo adyacentes en sus anillos A o B, lo que les da una estructura plana que favorece la actividad antiproliferativa. Este estudio sugiere que la estructura química de los flavonoides, específicamente la planaridad y la presencia de tres grupos hidroxilo adyacentes, es crucial para su actividad antiproliferativa.

El estudio de Yañez et al. (416) investigó la actividad citotóxica y antiproliferativa de 13 compuestos fenólicos en dos líneas celulares de melanoma (B16F10 de ratón y SK-MEL-1 humana) y una línea de melanocitos no neoplásicos de ratón (Melan-a), observando que la mayoría de los compuestos mostraron citotoxicidad moderada o nula después de 24 horas de tratamiento. Encontraron una relación entre la estructura química de los compuestos fenólicos y su actividad antiproliferativa contra las células de melanoma. Los hallazgos sugieren que la presencia de un doble enlace C2-C3, un grupo catecol y un alto grado de hidroxilación en el anillo B son características estructurales que potencian la capacidad de los flavonoides para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

La presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (C2-C3) en el esqueleto base del flavonoide se asocia a una mayor actividad antiproliferativa. Esta característica distingue a las flavonas y flavonoles de las flavanonas, que carecen de este doble enlace. Los resultados del estudio mostraron que la luteolina (flavona) y la quercetina (flavonol), ambas con un doble enlace C2-C3, exhibieron mayor actividad antiproliferativa que la eriodictiol (flavanona), que no lo posee.

Se cree que el doble enlace C2-C3 contribuye a la planaridad molecular del flavonoide, lo que podría favorecer una mejor interacción con las dianas moleculares responsables de la proliferación celular.

El grupo catecol, formado por dos grupos hidroxilo adyacentes en el anillo B del flavonoide, se correlaciona con una mayor actividad antiproliferativa. La luteolina y la quercetina, ambas con un grupo catecol en el anillo B, mostraron una mayor capacidad antiproliferativa en comparación con la eriodictiol, que carece de este grupo. Se postula que la presencia del grupo catecol incrementa la capacidad antioxidante del flavonoide. Además, el grupo catecol podría facilitar la formación de enlaces de hidrógeno con las dianas moleculares, lo que favorecería una interacción más fuerte y una mayor inhibición de la proliferación celular.

Por último, apreciaron que el número de grupos hidroxilo en el anillo B del flavonoide también parece influir en la actividad antiproliferativa. A mayor número de grupos hidroxilo, mayor actividad antiproliferativa. El estudio muestra que la miricetina, con tres grupos hidroxilo en el anillo B, presentó una actividad significativamente mayor que la quercetina, que solo tiene dos. Esta observación sugiere que los grupos hidroxilo adicionales en el anillo B podrían aumentar la capacidad del flavonoide para formar enlaces de hidrógeno con sus dianas moleculares, lo que resultaría en una mayor inhibición de la proliferación.

En este mismo sentido el estudio de Conesa et al (417) evalúa el potencial de tres flavonoides - tangeretina, rutina y diosmina - en el tratamiento de la metástasis pulmonar en un modelo experimental. Se utilizó la sublínea de células B16F10, conocida por su alta capacidad de metástasis en el pulmón.

El estudio se dividió en varios grupos: un grupo de control (solo inoculación de células tumorales), un grupo que recibió una solución de etanol (considerado el grupo de control real ya que el etanol se utilizó como vehículo para los flavonoides), y tres grupos que recibieron los flavonoides tangeretina, rutina y diosmina, respectivamente. Los flavonoides se administraron a los ratones a través de la comida y bebida durante 11 días antes de la inoculación de las células tumorales y durante los 21 días siguientes.

Los resultados del estudio demostraron que la diosmina fue el flavonoide más eficaz en la reducción de la metástasis pulmonar. Se observó una disminución del 52% en el número de nódulos metastásicos en comparación con el grupo tratado

con etanol. La diosmina también redujo significativamente el porcentaje de implantación (79.40%), el índice de crecimiento (67.44%) y el índice de invasión (45.23%).

La rutina también mostró una reducción significativa en estos índices, aunque menos pronunciada que la diosmina. La tangeretina, por otro lado, tuvo un efecto menor y no estadísticamente significativo en la reducción de la metástasis.

Un hallazgo importante del estudio fue que el etanol, utilizado como vehículo para la administración de los flavonoides, incrementó significativamente la metástasis pulmonar. Esto resalta la importancia de considerar cuidadosamente los efectos del vehículo en estudios de este tipo. Se especula que el etanol podría estimular la migración celular y afectar la fibrinólisis endotelial y la agregación plaquetaria, lo que podría explicar su efecto pro-metastásico.

Los autores del estudio sugieren que la actividad antimetastásica observada con la diosmina podría estar relacionada con su capacidad para disminuir la distensibilidad venosa, reforzar la resistencia capilar e inhibir la liberación de mediadores de la inflamación. También se plantea la posibilidad de que la estructura química de los flavonoides y sus metabolitos influyan en su capacidad para inhibir ciertas actividades enzimáticas o bloquear receptores implicados en la metástasis.

Es importante destacar que los niveles plasmáticos de los tres flavonoides estudiados fueron similares, lo que sugiere que la estructura química, más que la concentración, podría ser un factor determinante en la actividad antimetastásica.

Benavente- García et al (418) analizan la relación entre la estructura química de diversos compuestos fenólicos y sus efectos antiproliferativos en células de melanoma. Los compuestos fenólicos estudiados corresponden a ocho flavonoides con diferentes sustituyentes hidroxilo y metoxi, y cuatro ácidos fenólicos. Las líneas celulares utilizadas fueron: B16F10, SK-MEL-1 y Melan-a. Las células de melanoma fueron más sensibles a los compuestos metoxilados y, en general, la línea celular Melan-a fue la más sensible al tratamiento con los

compuestos fenólicos, especialmente en el caso de los compuestos trihidroxilados.

Los autores encontraron que los compuestos luteolina, tangeretina, baicaleína, quercetina y miricetina, así como el ácido gálico, mostraron efectos antiproliferativos en las líneas celulares estudiadas. La tangeretina fue el más eficaz en las células B16F10. El ácido gálico, por otro lado, tuvo el efecto antiproliferativo más potente en las líneas celulares B16F10 y Melan-a.

El estudio concluye que la presencia de un doble enlace C2-C3 en los compuestos polihidroxilados aumenta la actividad antiproliferativa en las tres líneas celulares utilizadas. Además, la presencia de al menos tres grupos hidroxilo adyacentes en un núcleo aromático confiere un fuerte efecto antiproliferativo, ya sea en el anillo A (como en la baicaleína) o en el anillo B (miricetina) del esqueleto flavonoide. La metilación de los hidroxilos no reduce la capacidad antiproliferativa e incluso parece aumentarla.

Los polifenoles como radioprotectores y antimutagénicos

El concepto de radioprotectores surgió después de la Segunda Guerra Mundial, como parte de los esfuerzos para proteger a los humanos de las posibles consecuencias de la guerra nuclear. Las primeras investigaciones de Patt (419) demostraron que ciertos compuestos, como la cisteína, podrían proteger a los animales experimentales de los efectos letales de la radiación. Desde entonces, una amplia investigación se ha centrado en el desarrollo de agentes radioprotectores más eficaces y menos tóxicos. Estos agentes han cobrado especial importancia en el tratamiento del cáncer, donde se utilizan para proteger los tejidos sanos durante la radioterapia, al tiempo que permiten que la radiación se dirija a las células tumorales.

Los polifenoles destacan por su capacidad de radioprotección ya que pueden neutralizar radicales libres y también genoprotectora al proteger el ADN ante el daño causado por las radiaciones ionizantes, lo cual se relaciona con la actividad antioxidante y su estructura química. (420)

Diversos estudios constatan estos datos. El estudio de Castillo et al (421) investigó el efecto radioprotector de tres extractos de semilla de uva (GSE) con diferente grado de polimerización de procianidinas (GSE1, GSE2 y GSE3) frente al daño cromosómico inducido por radiación gamma en linfocitos humanos. Se empleó el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis para evaluar la frecuencia de micronúcleos en células expuestas a radiación. Los resultados mostraron una correlación positiva entre el grado de polimerización de las procianidinas y la actividad radioprotectora: GSE3 (mayor grado de polimerización) > GSE2 > GSE1 > dimetilsulfóxido (DMSO, control positivo). El GSE3 redujo significativamente la frecuencia de micronúcleos inducidos por radiación. Se propone que la mayor actividad antioxidante y anticlastogénica de los GSE con mayor grado de polimerización se debe a un mayor número de sitios de quelación de radicales libres y a la estabilidad del radical aroílico flavonoide generado durante la neutralización de radicales libres. Estos hallazgos sugieren que los GSE, especialmente aquellos con alto grado de polimerización de procianidinas, podrían ser agentes radioprotectores prometedores.

En más estudios se han investigado los efectos radioprotectores de estas sustancias para contrarrestar las lesiones cromosómicas resultantes de la exposición a rayos X. Así Benavente – García (422) empleó un ensayo de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea para evaluar la frecuencia de micronúcleos en ratones tratados con un extracto polifenólico de hojas de *Olea europaea* L (OL) antes y después de la irradiación. Se comparó su eficacia con la de varios flavonoides (diosmina y rutina) y compuestos que contienen azufre (dimetilsulfóxido [DMSO] y 6-n-propil-2-tiouracilo-6c [PTU]). Los resultados mostraron que, en el tratamiento previo a la irradiación, la rutina fue el compuesto más eficaz, seguido de DMSO, OL, PTU y diosmina. Se observó una correlación lineal entre la actividad anticlastogénica y la capacidad antioxidante de los polifenoles. En el tratamiento posterior a la irradiación, el OL fue el único compuesto que mostró una actividad anticlastogénica significativa, siendo más eficaz que la diosmina y la rutina. Se propone que la actividad radioprotectora del

OL se debe a su capacidad para eliminar radicales libres, incluyendo el anión superóxido, el radical hidroxilo y los lipoperoxiradicales.

Utilizando el test de micronúcleos en linfocitos humanos, otro estudio (423) evaluó la capacidad radioprotectora de tres compuestos fenólicos del romero (ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico) frente al daño cromosómico inducido por rayos gamma. El ácido carnósico demostró ser el más efectivo, tanto antes como después de la irradiación, seguido del carnosol. El ácido rosmarínico y el ácido ascórbico mostraron una actividad radioprotectora menor, mientras que el dimetil sulfóxido no presentó efecto protector. Los autores sugieren que la capacidad de estos compuestos para eliminar radicales libres, como los radicales hidroxilos y lipoperoxi, es fundamental en su actividad radioprotectora. Se destaca la importancia del grupo catecol y el grupo carboxílico libre en la estructura de los compuestos fenólicos del romero para su actividad antioxidante y radioprotectora.

En este sentido siguiendo el estudio del ácido rosmarínico para evaluar su capacidad para proteger contra el daño inducido por radiación UV y otras radiaciones ionizantes a través de experimentos in vitro e in vivo, demostró una fuerte actividad antioxidante, retrasando la peroxidación lipídica y neutralizando radicales libres de manera más efectiva que el ácido ascórbico(424). Además, el AR protegió contra el daño cromosómico inducido por radiación gamma en linfocitos humanos, tanto en tratamientos previos como posteriores a la irradiación.

Así Alcaraz et als (425) publican un estudio se dedicó a investigar el potencial protector de sustancias antioxidantes comunes en la dieta humana. La hipótesis era que estos compuestos, gracias a su capacidad para neutralizar los radicales libres, podrían contrarrestar el daño genético inducido por la radiación. El estudio se centró en diez compuestos antioxidantes que se encuentran habitualmente en la alimentación, incluyendo el ácido rosmarínico, el ácido carnósico, el D-tocoferol (vitamina E), el ácido L-ascórbico (vitamina C) y la apigenina (un flavonoide presente en frutas y verduras). Para evaluar su capacidad protectora, los investigadores utilizaron el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis en linfocitos humanos. En el experimento, se añadieron los compuestos antioxidantes

a muestras de sangre humana cinco minutos antes de exponerlas a 2 Gy de RI. Posteriormente, se analizaron las células para determinar la frecuencia de micronúcleos. Los resultados mostraron que varios de los antioxidantes evaluados redujeron significativamente la cantidad de micronúcleos, lo que indica una protección contra el daño cromosómico inducido por la radiación. El ácido rosmarínico, el ácido carnósico y el D-tocoferol demostraron ser los más efectivos, logrando una reducción del daño genotóxico de hasta un 58%. Es importante destacar que este nivel de protección fue incluso mayor que el obtenido con la amifostina, radioprotector utilizado en radioterapia que se caracteriza por su alta toxicidad.

Diferentes estudios han establecido una relación entre las capacidades radioprotectoras y antimutagénicas de algunos polifenoles con sus estructuras químicas y capacidades antioxidantes. Aunque los flavonoides tienen una estructura química básica común, deben existir factores estructurales importantes que puedan condicionar la actividad radioprotectora, como el grado de oxidación de la estructura (flavanona, flavona), los sustituyentes (posición, número y naturaleza de los grupos en los anillos A y B del esqueleto flavonoide y la presencia de glicosilación). En este sentido el estudio de Alcaraz (426) analizó cómo varios flavonoides protegen contra el daño genético causado por los rayos X en ratones. Para ello, se expuso a los ratones a diferentes dosis de radiación y se les administraron distintos flavonoides antes y después de la exposición. El daño cromosómico se midió en las células de la médula ósea utilizando el ensayo de micronúcleos. Se encontró una relación directa entre la dosis de rayos X y la cantidad de daño cromosómico. Los extractos de semilla de uva y las procianidinas de cadena media fueron los flavonoides más efectivos en la protección contra el daño, superando incluso a la amifostina, el único radioprotector aprobado para uso clínico. Curiosamente, la capacidad protectora de los flavonoides fue mayor cuando se administraron antes de la exposición a la radiación. El estudio también reveló que la estructura química de los flavonoides influye en su capacidad protectora. Los flavonoides más efectivos compartían características como la presencia de un grupo catecol, la ausencia de un grupo carbonilo en la posición C4

del anillo C y un cierto grado de polimerización. Un hallazgo interesante fue que la quercetina, un flavonoide con alta capacidad antioxidante in vitro, no solo no protegió contra el daño, sino que lo aumentó. Sin embargo, la rutina, una forma modificada de la quercetina, sí mostró capacidad protectora

Otro estudio (427) realiza una revisión sistemática de estudios sobre el resveratrol, un polifenol natural presente en uvas, vino tinto y cacahuetes, y su capacidad para proteger tejidos del daño causado por la radiación ionizante, como los rayos X y los rayos gamma. Se analizaron 33 estudios publicados entre 2005 y 2020, incluyendo un ensayo clínico, estudios en células (in vitro) y estudios en animales (in vivo), que utilizaron diferentes dosis de radiación y de resveratrol. El resveratrol demostró ser eficaz en la protección de diversos tejidos. Por ejemplo, en el intestino, redujo la inflamación y el daño a la mucosa; en los pulmones, disminuyó la fibrosis y mejoró la función respiratoria. También protegió a los linfocitos del sistema inmunitario del daño genético, previno la disminución en la producción de espermatozoides en los testículos y protegió los folículos ováricos. En la médula ósea, estimuló la producción de células sanguíneas, mientras que en las glándulas salivales previno la sequedad bucal y la disfunción. Además, redujo la inflamación y el daño a la piel. Los mecanismos de radioprotección del resveratrol son diversos. Reduce la apoptosis, inhibe la inflamación y estimula las defensas antioxidantes del cuerpo, aumentando la actividad de enzimas que neutralizan los radicales libres. Es importante destacar que la mayoría de los estudios no reportaron efectos tóxicos, lo que lo convierte en un agente con potencial para la radioprotección sin el riesgo de proteger también las células tumorales. Sin embargo, existen desafíos para su aplicación clínica, principalmente su baja biodisponibilidad, que dificulta su absorción por el cuerpo. Para superar este obstáculo, se están desarrollando nanoformulaciones que permitan una mejor absorción y distribución del resveratrol en el organismo.

En 2020 Xie et als (428) investigan el potencial del EGCG, un componente del té verde con propiedades antioxidantes, para proteger el intestino del daño causado por la radiación. Los investigadores observaron que el EGCG prolongó la supervivencia de ratones expuestos a radiación letal y redujo el daño a la mucosa

intestinal. El EGCG protegió el intestino a través de varios mecanismos: Aumentó el número de células madre intestinales, redujo el daño al ADN, disminuyó la muerte celular (inhibió tanto la apoptosis como la ferroptosis, redujo los niveles de ROS y activó la vía de señalización Nrf2 que protege las células del estrés oxidativo. Los investigadores confirmaron la importancia de la vía Nrf2 al bloquearla con un inhibidor, lo que anuló los efectos protectores del EGCG.

En este sentido aparecen otros artículos en la misma línea, sobre la radioprotección de estas sustancias contra la lesión intestinal inducida por radiación(429,430)

Algunos autores investigan las propiedades neuroprotectoras y radioprotectoras de estas sustancias , debido a sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias y su uso como complemento prometedor a la radioterapia para prevenir los efectos secundarios en el cerebro y el deterioro cognitivo. (431,432)

Los polifenoles como radiosensibilizadores

Curiosamente en la literatura también podemos encontrar artículo que relacionan estas sustancias con la radiosensibilización. Así el artículo de Tiwari y Mishra (433) explora un enfoque diferente al de los estudios que hemos discutido previamente: en lugar de la radioprotección, se centra en la radiosensibilización mediante flavonoides. Es decir, investiga cómo los flavonoides pueden hacer que las células tumorales sean más sensibles a la radiación. Los autores revisan la literatura científica sobre el tema y analizan los mecanismos moleculares por los cuales los flavonoides pueden sensibilizar las células tumorales a la radiación. Algunos de estos mecanismos incluyen el aumento del daño al ADN, la inhibición de la reparación del ADN, la inducción de la apoptosis, la modulación del ciclo celular y la inhibición de la angiogénesis.

Con esta intención hay más artículos que exploran el uso de radiosensibilizadores naturales en la radioterapia. Tradicionalmente, se han utilizado radiosensibilizadores sintéticos, pero recientemente ha aumentado el

interés en los productos naturales, como los fitocompuestos, por su potencial para potenciar los efectos de la radioterapia.

El artículo de Komorowska (434) se centra en radiosensibilizadores naturales que se encuentran actualmente en ensayos clínicos, como el paclitaxel, la curcumina, la genisteína y la papaverina, y en aquellos con evidencia científica sólida sobre sus efectos radiosensibilizadores, como el resveratrol.

Efecto paradójico de los polifenoles: radioprotector y radiosensibilizador

Se ha visto que hay polifenoles que tienen un efecto dual : tienen la capacidad de proteger las células sanas del daño de la radiación, al mismo tiempo que hace que las células tumorales sean más sensibles a ella.

Esto ocurre con la genisteína(435) que protege las células sanas reduciendo la apoptosis y el daño oxidativo causado por la radiación. La genisteína ejerce su efecto protector al mitigar el daño a varios niveles. En primer lugar, reduce la apoptosis en las células sanas, manteniendo la estabilidad de las mitocondrias, regulando el calcio intracelular y modulando las proteínas que controlan la apoptosis. Además, actúa como un potente antioxidante, neutralizando las ROS y estimulando las defensas antioxidantes naturales del cuerpo. Finalmente, la genisteína reduce la inflamación y la fibrosis, procesos que pueden dañar los tejidos sanos tras la radiación.

Al mismo tiempo, la genisteína potencia el efecto de la radiación sobre las células tumorales a través de diversos mecanismos. Dificulta la reparación del ADN dañado, induce la detención del ciclo celular para evitar la proliferación de células dañadas y promueve su muerte. Además, aumenta selectivamente el estrés oxidativo en las células tumorales, potenciando el efecto destructivo de la radiación. La genisteína también modifica el microambiente tumoral, haciéndolo más susceptible al tratamiento, e interfiere en vías de señalización que promueven la supervivencia de las células cancerosas

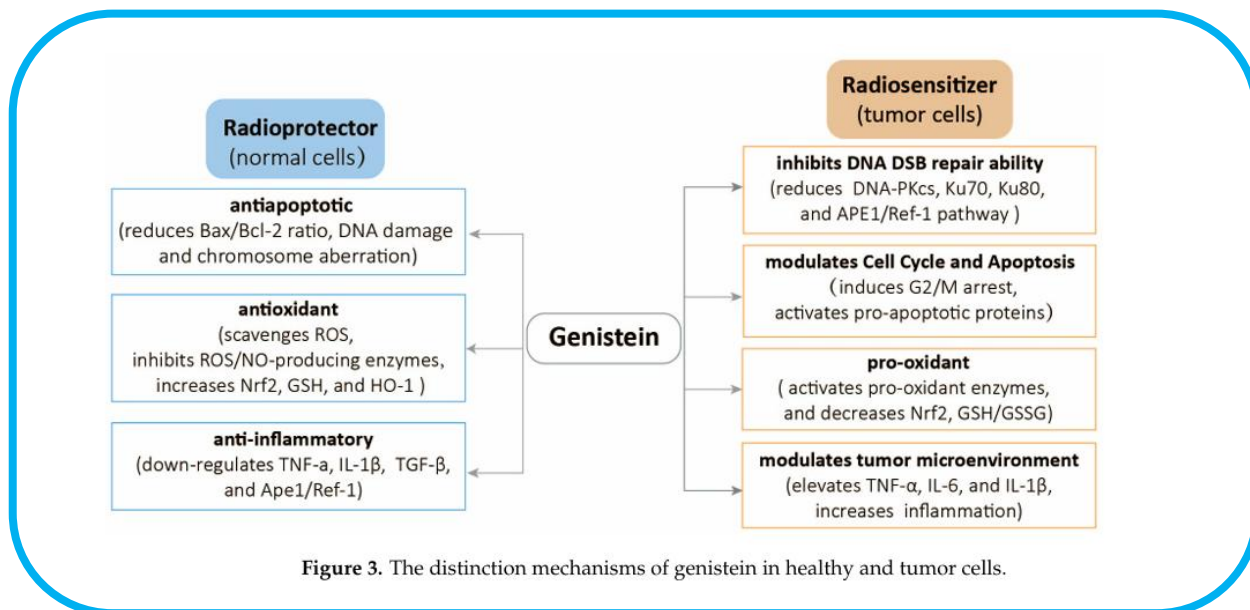


Figure 3. The distinction mechanisms of genistein in healthy and tumor cells.

Figura 6. Mecanismos de los polifenoles como radioprotectores y radiosensibilizadores (436)

Otras sustancias, como la daidzeína y la gliciteína, también presentan estas propiedades únicas que les permiten actuar de manera selectiva sobre las células tumorales, aumentando su sensibilidad a la radioterapia, al mismo tiempo que protegen las células sanas de los efectos nocivos de la radiación (437,438) .

Otro ejemplo interesante es la combinación de Astragalus mongholicus Bunge, una isoflavona utilizada en la medicina tradicional china, con su molécula pequeña ononina. Esta combinación ha demostrado aumentar la radiosensibilidad del cáncer de pulmón y proteger la función hepática del daño por radiación en modelos de ratón C57BL/6 (439).

Es importante destacar que este efecto dual no es exclusivo de las isoflavonas de soja. Existen otras sustancias naturales que también han demostrado actuar como radiosensibilizadores en células cancerosas y radioprotectores en células normales. Entre ellas, destacan la curcumina y el resveratrol, (440–443) dos polifenoles ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en células normales, así como por

su capacidad para inducir estrés oxidativo y detener el ciclo celular en la fase G2/M en células cancerosas.

En otros polifenoles como el carnosol también se ha podido observar este efecto paradójico. Alcaraz et al (444) investigan el potencial del carnosol (COL), un diterpeno fenólico presente en el romero, como agente dual en el contexto de la radioterapia: radioprotector para células normales y radiosensibilizador para células de melanoma. El estudio se centra en la capacidad del COL para modular la respuesta celular a la radiación ionizante, explorando sus efectos en diferentes tipos de células y los mecanismos moleculares involucrados. Para evaluar la capacidad genoprotectora del COL, se utilizó la prueba de micronúcleos en linfocitos humanos expuestos a rayos X. y mostraron que el COL redujo significativamente la frecuencia de micronúcleos inducidos por la radiación, lo que indica una fuerte actividad antimutagénica. Específicamente, mostró un factor de protección del 50% y un factor de reducción de dosis de 4.3, lo que significa que redujo el daño cromosómico a la mitad y permitió que las células soportaran una dosis de radiación 4.3 veces mayor. Posteriormente, se evaluó la capacidad radioprotectora del COL en células epiteliales prostáticas normales (PNT2) y en células de melanoma metastásico (B16F10). Para ello, se utilizó el ensayo MTT, que mide la viabilidad celular mediante la reducción de una sal de tetrazolio. En las células PNT2, el COL aumentó la supervivencia celular después de la exposición a la radiación, actuando como un radioprotector eficaz. Este efecto se observó incluso con dosis altas de radiación (10 Gy) y en las dos concentraciones de COL utilizadas (20 μ M y 40 μ M). El COL eliminó el 39% del daño celular letal que resulta de la irradiación en estas células, lo que indica una protección significativa. Sin embargo, en las células B16F10, el COL no protegió las células de la radiación, sino que aumentó la muerte celular, mostrando un efecto radiosensibilizador. Este efecto se cuantificó con un factor de sensibilización del 34% y una relación de aumento de 2.12, lo que significa que el COL aumentó la muerte celular inducida por la radiación en un 34% y duplicó la eficacia de la radiación. Los autores sugieren que este efecto paradójico del COL en las células de melanoma podría estar relacionado con la activación de la melanogénesis, el proceso de producción de

melanina. Esta activación lleva a una redistribución de las enzimas antioxidantes, interfiriendo con los mecanismos de defensa antioxidante celulares y haciendo que las células de melanoma sean más susceptibles a las lesiones resultantes de la exposición a la radiación. En células normales, el COL actúa como un antioxidante, eliminando los radicales libres generados por la radiación ionizante y protegiendo las células del daño. Sin embargo, en las células de melanoma, la activación de la melanogénesis por el COL altera el equilibrio de enzimas antioxidantes, como el glutatión y la cisteína liasa, que son cruciales para la defensa redox celular. Esto disminuye la capacidad de las células de melanoma para eliminar las ROS y las hace más susceptibles al daño por radiación.

Además, las células B16F10 tienen una menor actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, enzimas que también contribuyen a la eliminación de ROS. Esta deficiencia en la capacidad de eliminación de ROS, combinada con el efecto del COL sobre la melanogénesis, amplifica el daño causado por la radiación.

Por tanto, concluyen que el carnosol tiene un efecto dual en la respuesta celular a la radiación: protector en células normales, ya que neutraliza los radicales libres y protege las células del daño, previniendo los efectos secundarios de la radiación y como sensibilizador en células de melanoma al activar la melanogénesis, alterar el equilibrio redox y aumentar la susceptibilidad al daño por radiación, potenciando la eficacia del tratamiento.

El mismo autor (445) repitió la experiencia con otro polifenol, el ácido rosmarínico y los resultados mostraron también un efecto paradójico. En las células PNT2, el ácido rosmarínico ejerció un efecto protector, reduciendo el daño al ADN y aumentando la supervivencia celular tras la irradiación. Sin embargo, en las células de melanoma B16F10, el ácido rosmarínico tuvo el efecto contrario: aumentó la muerte celular inducida por la radiación.

Para explicar esta diferencia, los autores indican que el ácido rosmarínico estimula la melanogénesis en las células de melanoma. Este proceso altera el sistema de defensa antioxidante de las células, haciéndolas más vulnerables al daño causado por la radiación. En concreto, la melanogénesis consume glutatión

y afecta la actividad de enzimas antioxidantes, comprometiendo la capacidad de las células tumorales para contrarrestar los efectos de la radiación.

Este equipo de investigación (446) profundiza en las causas en otro estudio. Se centran en analizar la producción de glutatión (GSH) en células de melanoma B16F10 y células epiteliales prostáticas humanas (PNT2). El GSH es un antioxidante crucial que protege a las células del estrés oxidativo, y se ha demostrado que su aumento está relacionado con la resistencia a la radioterapia en células tumorales. Los resultados mostraron que, en las células PNT2, el AR incrementaba los niveles de GSH, potenciando así su capacidad radioprotectora. En cambio, en las células de melanoma B16F10, el AR no solo no aumentaba el GSH, sino que disminuía la proporción de GSH/GSSG, un indicador del estado redox celular. Esto sugiere que el AR podría estar promoviendo el daño en las células de melanoma inducido por la radiación. Los autores proponen una hipótesis para explicar este fenómeno: el AR podría estar activando la vía metabólica de la síntesis de eumelanina en las células B16F10. Este proceso consume GSH, reduciendo su disponibilidad para proteger a las células del estrés oxidativo generado por la radiación. En consecuencia, las células de melanoma se vuelven más susceptibles al daño.

Por último, el equipo de Alcaraz ,que ha investigado estos efectos en el carnosol y el ácido rosmarínico realiza la investigación con el ácido carnósico (CA)(Alcaraz et al., 2022). El carnosol y el ácido carnósico son dos compuestos naturales que, aunque comparten similitudes en su origen y algunas propiedades, presentan diferencias clave que vale la pena destacar. Ambos se encuentran en plantas como el romero y la salvia, y pertenecen a la familia de los diterpenos fenólicos, lo que les confiere su potente capacidad antioxidante. Sin embargo, a nivel molecular, el ácido carnósico posee un grupo carboxilo que lo distingue del carnosol. Esta sutil diferencia estructural tiene implicaciones en sus características y actividades biológicas. En cuanto a su poder antioxidante, ambos compuestos son eficaces en la neutralización de radicales libres, pero el ácido carnósico se considera generalmente más potente y previamente ya se ha descrito, que el CA tiene mayor capacidad radioprotectora .(448). Además, la presencia del grupo carboxilo en el ácido carnósico aumenta su solubilidad en agua en

comparación con el carnosol. Esta diferencia en solubilidad puede influir en su biodisponibilidad y en cómo interactúan con las células y tejidos del organismo.

El estudio evalúa tanto los efectos directos en las células irradiadas como los efectos indirectos en las células que reciben señales de las células irradiadas (RIBE).

Mediante ensayos de micronúcleos, realizados tanto in vivo como in vitro, se ha demostrado que el compuesto CA posee una notable capacidad para proteger el material genético. Este efecto genoprotector se observó no solo en las células que fueron directamente irradiadas ($p < 0.001$), sino también en aquellas afectadas por el efecto espectador inducido por la radiación (RIBE, $p < 0.01$).

De forma contradictoria, el impacto del CA sobre la viabilidad celular varía drásticamente según la línea celular estudiada. En las células PNT2, el compuesto actuó como un potente radioprotector, consiguiendo que el 97% de las células sobrevivieran a una dosis de 20 Gy de rayos X. Esto supuso revertir el 67% de la letalidad celular causada por la radiación ($p < 0.001$), lo cual se asoció a una reducción de la apoptosis ($p < 0.001$) y a una mejora del equilibrio redox, reflejada en un incremento del ratio GSH/GSSG ($p < 0.01$).

En contraste, el tratamiento con CA en las células B16F10, que son conocidas por su alta resistencia a la radiación, manifestó un inesperado efecto radiosensibilizador. La supervivencia celular disminuyó un 32%, mientras que la mortalidad se disparó un 200% ($p < 0.001$) en comparación con las células que solo fueron irradiadas. Este aumento de la muerte celular también se registró en un 100% ($p < 0.001$) en las células espectadoras (RIBE, $p < 0.01$). Adicionalmente, se detectó un aumento de la apoptosis ($p < 0.001$) y un descenso en la proporción GSH/GSSG ($p < 0.01$), confirmando así su acción radiosensibilizante paradójica en este tipo de células.

El CA protege a las células PNT2 del daño por radiación lo que se atribuye a su capacidad antioxidante, mientras que el efecto radiosensibilizador en las células B16F10 se relaciona con una posible activación de la vía de la feomelanina, que

consume GSH intracelular y lo hace menos disponible para combatir el estrés oxidativo.

Los autores señalan la importancia de entender los procesos subyacentes de sustancias como el CA podría conducir a nuevas estrategias de tratamiento que protejan las células sanas y dañen selectivamente las células neoplásicas durante la radioterapia.

Este estudio aporta información valiosa sobre los efectos complejos del CA en la respuesta celular a la radiación y abre nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias oncológicas más eficaces.

La lucha contra el cáncer se enfrenta a un desafío fundamental: eliminar selectivamente las células cancerosas sin dañar las células sanas. Si bien la radioterapia es una de las modalidades de tratamiento más eficaz, no está exenta de inconvenientes. A pesar de su precisión, la radiación puede afectar a los tejidos sanos circundantes, causando efectos secundarios que impactan negativamente en la calidad de vida de los pacientes. Además, la resistencia de algunas células tumorales a la radiación compromete la eficacia del tratamiento.

En este contexto, los compuestos que presentan un efecto dual — protegiendo los tejidos sanos (radioprotección) y, simultáneamente, aumentando la vulnerabilidad de las células tumorales (radiosensibilización)— surgen como la clave para una terapia más selectiva y eficaz. Como se ha detallado en esta revisión, ciertos polifenoles naturales, y en particular los diterpenos fenólicos como el ácido carnósico, representan candidatos excepcionalmente prometedores para alcanzar este objetivo

II. OBJETIVOS

1. Estudiar los efectos moduladores del ácido carnósico sobre la respuesta celular a la radiación ionizante, tanto in vitro como in vivo, con el fin de determinar su potencial como agente radioprotector selectivo en células no tumorales y como radiosensibilizador en algunas células tumorales de melanoma, así como explorar los mecanismos de este comportamiento dual.
2. Evaluar la capacidad genoprotectora del ácido carnósico sobre el daño cromosómico inducido por radiación ionizante, utilizando el ensayo de micronúcleos con bloqueo citogenético (CBMN) en linfocitos humanos in vitro y de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNPCEs) de médula ósea y en reticulocitos (MN-RET) de sangre periférica mediante citometría de flujo en modelos murinos in vivo .
3. Determinar el impacto del ácido carnósico sobre la supervivencia de las líneas celulares PNT2, Melan-A6, B16F10 y SK-MEL-1 sometidas a radiación ionizante mediante el ensayo MTT y el ensayo XTT, con el fin de establecer su potencial para modificar la respuesta citotóxica a la radiación de forma diferencial en estos cultivos.
4. Investigar cómo el ácido carnósico modula los niveles de glutatión total (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y el ratio GSH/GSSG , en las líneas celulares PNT2, Melan-A6, B16F10 y SK-MEL-1 sometidas a radiación ionizante y/o ácido carnósico, para evaluar su impacto sobre el estado redox intracelular en el contexto del daño radioinducido y su relación con la radiosensibilidad.
5. Valorar el potencial traslacional del ácido carnósico como estrategia coadyuvante en radioterapia para mejorar el índice terapéutico en el tratamiento del melanoma, basándose en su capacidad para proteger células no tumorales y sensibilizar células tumorales a la radiación.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL.

-Muestras de sangre.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de personas que no padecían ninguna enfermedad conocida, por lo que se les consideró individuos sin aparentes problemas de salud. Para llevar a cabo la extracción sanguínea, se utilizaron tubos estériles al vacío VENOSAFE™ (Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica) con heparina (Heparin sodium 5%; Laboratorios Rovi, Madrid) como anticoagulante. Los voluntarios fueron dos mujeres de 18 y 20 años, no fumadoras, sin enfermedades ni exposición a agentes clastogénicos que firmaron un consentimiento informado para el estudio. La extracción se realizó por la mañana, y las muestras se utilizaron de inmediato de acuerdo al método establecido. El Comité de Bioseguridad de la Universidad de Murcia (UM) (ID: 472/2021) (Anexo I) autorizó previamente los procedimientos relacionados con las muestras y tejidos humanos empleados en este estudio.



Figura 7. Proceso de extracción de sangre

-Modelos animales

En esta investigación, se utilizaron ratones Swiss machos entre 9 y 11 semanas de edad y un peso inicial de 20-25 gramos. A lo largo del estudio, los animales se

alojaron en un ambiente controlado con idénticos parámetros de temperatura, iluminación y humedad. Se les permitió comer y beber libremente. El Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la UM se encargó de la adquisición y mantenimiento de todos los animales. (Licencia REGAES300305440012).

Este estudio se realizó siguiendo las recomendaciones éticas internacionales (Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations) y fue aprobado por el Comité Ético de la UM (CECA: 510/2018) y el Gobierno de la Región de Murcia (nº A13211208) (Anexo I)

-Líneas celulares

Se usaron 4 líneas celulares :

- **La línea celular PNT2 :**

Esta línea celular, derivada de tejido prostático no tumoral de un varón de 33 años, posee la particularidad de haber sido convertida en una línea celular inmortal al introducirle, mediante transfección, un plásmido con el material genético del virus SV40 que presentaba un origen de replicación defectivo. Fueron adquiridas de HPACC (Salisbury, Reino Unido) y cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Sigma-Aldrich), 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, bajo condiciones de alta humedad (90-95%) y en una atmósfera enriquecida con un 5% de dióxido de carbono.

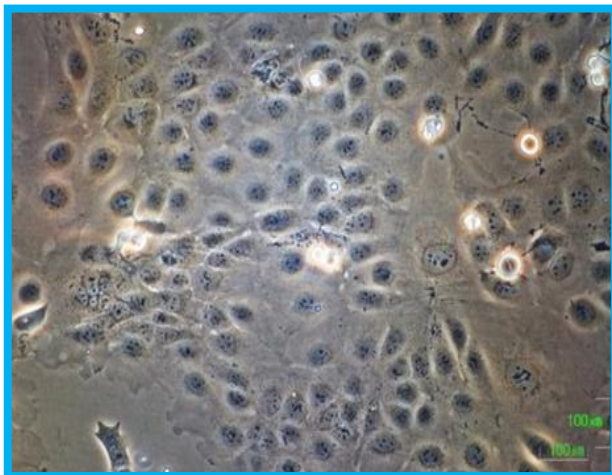


Figura 8. Células epiteliales normales de próstata humana PNT2

- **Línea celular de melanoma metastásico murino B16F10:**

Esta sublínea celular metastásica deriva de la cepa parental B16 y proviene de un melanoma de aparición espontánea en la piel de la oreja de un ratón C57BL/6 (NIH). La línea, cedida originalmente por el Dr. V. Hearnig (NIH, Bethesda, MD), es mantenida y distribuida por el Laboratorio de Biociencias Navales de la Facultad de Salud Pública de la Universidad de California (Berkeley, CA).

Para su crecimiento, se empleó un medio DMEM (Sigma-Aldrich) con L-glutamina y 4,5 g/l de glucosa, sin bicarbonato sódico y con un pH estabilizado entre 7,2-7,4. Esta solución base fue enriquecida con un 10% de SBF (Sigma-Aldrich), 4 mM de L-glutamina, penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 μg/ml).

La incubación de las células se realizó a 37 °C, bajo una atmósfera con un 90-95% de humedad y una concentración de CO₂ del 7,5%. Morfológicamente, este cultivo muestra células de forma fusiforme con extensiones dendríticas, que adopta una apariencia poligonal cuando aumenta la confluencia celular. El medio de cultivo, que utilizaba rojo de fenol como monitor de pH, se conservó en recipientes de 75 cm² dentro de incubadoras que proporcionaban las condiciones de temperatura, humedad y CO₂ adecuadas.

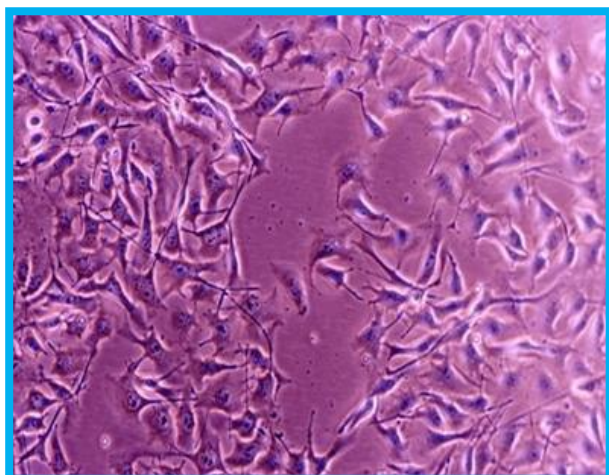


Figura 9. Células de la línea B16F10, de melanoma metastásico murino, observadas a un aumento de 200X

- **Línea celular de melanocitos murinos Melan-A6:**

Es una línea celular de melanocitos no tumorigénicos por lo que su principal valor es que sirve como un modelo de melanocitos normales, permitiendo comparaciones directas con líneas celulares tumorales como B16F10 y SKMEL1. Una de sus características más valiosas es que se inmortalizó de forma espontánea durante el cultivo, lo que permitió obtener una línea celular estable que conserva la mayoría de las características de los melanocitos normales

Las células melan-A6 se cultivaron en medio RPMI con Glutamina, suplementado con un 10% de SBF, 200 nM de TPA, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de sulfato de estreptomicin. Las células se incubaron a una temperatura constante de 37°C y en una atmósfera saturada de humedad con un 7.5% de CO₂. El cultivo celular se mantuvo sembrando una densidad inicial de aproximadamente $5 \cdot 10^5$ células en frascos de 75 cm², conteniendo 10 ml de medio de cultivo. El cultivo se mantuvo hasta llegar a un 80% de confluencia (2 o 3 días).

Fue obtenida del laboratorio de la Dra. D. Bennett (St George's University of London, Reino Unido) en la década de 1980 a partir de melanoblastos obtenidos de la piel del tronco de embriones de ratón de la cepa C57BL/6 y cedidas por el Profesor Don José Carlos García-Borrón Martínez, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Murcia, España.

- **Línea celular SK-MEL-1 de melanoma humano:**

Fue aislada en 1966 por el Dr. Herbert F. Oettgen y sus colegas en el Instituto Sloan Kettering (de ahí las siglas "SK"). Se obtuvo de una metástasis en el conducto linfático torácico de un paciente varón caucásico de 29 años con melanoma maligno. Es la primera de una serie de líneas celulares de melanoma (SK-MEL-1, SK-MEL-2, SK-MEL-3, etc.) establecidas a partir de muestras tumorales derivadas de pacientes, lo que las hace valiosas para estudiar la heterogeneidad del melanoma.

SK-MEL-1 es portadora de una de las mutaciones más comunes e importantes en el melanoma, la **mutación BRAF V600E**. Esta mutación activa de forma constitutiva la vía de señalización MAPK, promoviendo el crecimiento celular descontrolado. Esto la convierte en un modelo celular fundamental para probar inhibidores de BRAF (como vemurafenib o dabrafenib), terapias dirigidas clave en el tratamiento del melanoma.

Es pigmentada, es decir, produce melanina. Esto permite estudiar los procesos de melanogénesis y la respuesta a fármacos que puedan afectar esta vía.

Expresa antígenos de melanoma que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario. De hecho, estudios tempranos demostraron que el suero de otros pacientes con melanoma contenía anticuerpos que reaccionaban contra las células SK-MEL-1, lo que fue un hallazgo pionero en la inmunología del cáncer.

El protocolo de cultivo celular fue en medio Eagle's Minimum Essential (EMEM) de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.). Este medio estaba enriquecido con 4,5 g/l de glucosa, 10% de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina y los antibióticos penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) para prevenir la contaminación.

Las condiciones de incubación se mantuvieron a 37 °C con un 90-95% de humedad y una atmósfera de 7,5% de CO₂. Para un crecimiento celular óptimo, se inició el cultivo con una densidad de 2×10⁵ células/ml, y se aseguró que la concentración celular se mantuviera entre 1×10⁵ y 1×10⁶ células/ml. El

mantenimiento del cultivo se realizó mediante la adición o sustitución periódica del medio de cultivo.

La línea celular SK-MEL-1 (melanoma humano) utilizada se obtuvo directamente del catálogo avanzado de LGC (ATCC, número de catálogo HTB-67).

-Equipamiento

- **Irradiador de Rayos X**

En este estudio, se empleó un irradiador de rayos X Smart Laboratory-ray, modelo 583 E, con un tubo 200 E (200 kV y 4,5 mA) (YXLON International A/S Copenhagen, Dinamarca). El equipo está localizado en el Servicio de Protección Radiológica y de Gestión de Residuos del SAI de la UM.



Figura 10 . Fuente de rayos X Smart Laboratory-ray, Model 583 E.

- **Electrómetro.**

La dosis de radiación a la que fueron expuestos los cultivos dentro del irradiador de rayos X se midió utilizando un electrómetro UNIDOS E equipado con una cámara de ionización/sonda TW 30010-1 (PTW Freiburg, Alemania). La sonda de alta sensibilidad permitió calcular y controlar la dosis en directo y las mediciones fueron posteriormente confirmadas mediante dosimetría de termoluminiscencia, asegurando la precisión de la dosis aplicada



Figura 11. Electrómetro UNIDOS E

- **Dosímetros de Termoluminiscencia (TLDs)**

En el estudio de micronúcleos, la dosis de RI aplicada a las preparaciones sanguíneas debe determinarse con precisión. Esta medición es esencial porque está directamente relacionada con el daño al ADN celular que se manifiesta con la formación de MN. Además la relación entre la dosis de RI y la respuesta biológica (la formación de MN) no es lineal. Para caracterizar esta relación, es necesario construir una curva dosis-respuesta. Esta curva se obtiene graficando la cantidad de micronúcleos formados en función de diferentes dosis de radiación.

Los TLDs, ampliamente utilizados durante décadas, son la técnica más adecuada para medir dosis de RI.

Se prepararon dosímetros de termoluminiscencia para este estudio utilizando cristales de fluoruro de litio (GR-200r, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China) tratados con Mg, Cu y P para aumentar su sensibilidad a la radiación. Los TLDs, con forma cilindro (4-5 mm de diámetro y 1 mm de grosor), se colocaron de dos en dos en bolsas plásticas incoloras de 8x16 mm, cerradas herméticamente y aseguradas. Cada bolsa fue codificada y etiquetada con tinta indeleble para su correcta identificación. El diseño compacto de los TLDs permitió su colocación cerca de las muestras durante la irradiación. Se utilizaron un total de 50 dosímetros distribuidos en 24 bolsas, incluyendo una bolsa de control sin exposición a la radiación.

Tras la exposición, para analizar los dosímetros, se utilizó un lector automático Harshaw 5500 TLD, el cual fue configurado con un ciclo de calentamiento tiempo-temperatura diseñado para este tipo de material termoluminiscente. Siguiendo las indicaciones del CIEMAT, se definió una lectura cíclica para los cristales (LiF: Mg, Cu, P) a 15 °C/s desde 50 °C hasta 275 °C, manteniendo la temperatura 12,7 segundos para una lectura total de 26,7 segundos. El presente ciclo de lectura permite la determinación precisa de dosis hasta 1 Gy, posibilitando la reutilización de los dosímetros.

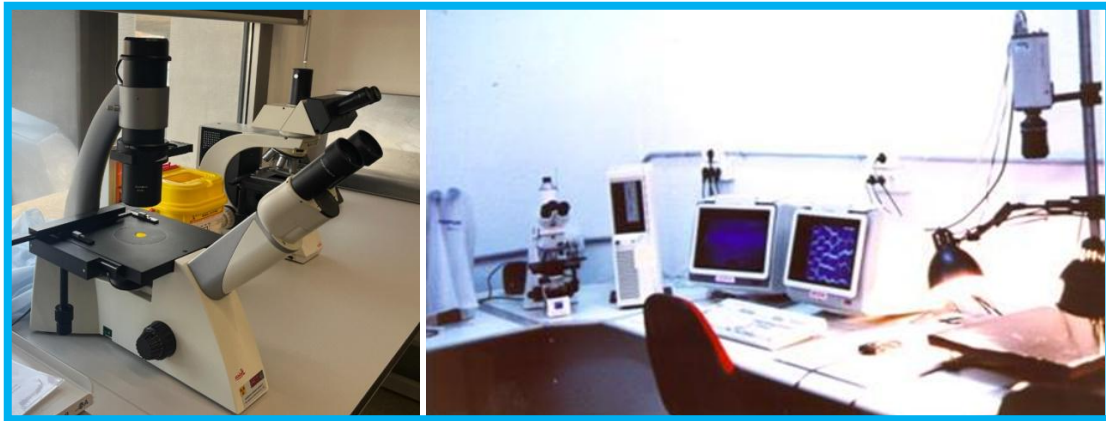
El CIEMAT, proporcionó los TLDs y monitorizó las lecturas con el objetivo de conocer la dosis de radiación recibida. La determinación se basó en análisis de curvas emitidas por programas del CIEMAT. Se establecieron dosis de 50 Gy y 2 Gy para los experimentos.



Figura 12.TLD: técnica más adecuada para medir dosis de RI.

- **Microscopía**

Para asegurar una cuantificación precisa de células con micronúcleos, se utilizaron tres microscopios ópticos distintos: el Leitz Laborlux 12 (Leitz, Alemania), el Hund V200 (Wetzlar, Alemania) y el Olympus BX40 (Barcelona, España). Este enfoque permitió la verificación cruzada de los conteos y minimizó el posible sesgo de cualquier instrumento individual. Además, un escáner Leica SCN400 F capturó imágenes de alta resolución de cada muestra, proporcionando un registro visual detallado y permitiendo análisis adicionales si fuera necesario. Esta técnica combinada de microscopía y escaneo facilitó un diseño de estudio digital doble ciego, donde los observadores no tenían conocimiento de las identidades de las muestras durante el análisis. Este enfoque riguroso permitió la evaluación precisa del efecto biológico, específicamente la frecuencia de micronúcleos, utilizando el sistema Digital Hub Management Web Service de la Universidad de Murcia



- **Figuras 13 y 14.** Microscopio OLYMPUS BX40 y puesto de medición biométrica

Image	Image	Image	Image
	ImageCollection_000000901_2012-05-30 13_35_34.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000902_2012-05-30 13_36_45.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000903_2012-05-30 13_36_56.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000904_2012-05-30 13_38_25.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000905_2012-05-30 14_36_04.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000906_2012-05-30 14_36_49.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000907_2012-05-30 13_34_40.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000908_2012-05-30 13_34_47.acn	LaticSON	1
	ImageCollection_000000910_2012-05-30 14_31_24.acn	LaticSON	1

Figura 15 . Preparaciones de microscopio virtual digital



Figura 16 . Detalle ampliado de un campo visualizado en un microscopio virtual digital

- **Equipo de Cromatografía.**

Con el propósito de efectuar el estudio cromatográfico de los componentes analizados, se recurrió a un equipo Hewlett-Packard (HP), específicamente el modelo HPLC 1100 System (Agilent technologies, Sta. Clara, USA). Este sistema se encontraba equipado con un detector de diodos. La separación se llevó a cabo empleando una columna A C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm id) como fase estacionaria, la cual contenía partículas con un tamaño promedio de 5 micras. Se fijó la temperatura de la columna en 30 °C, mientras que el flujo de la fase móvil se mantuvo en 1ml/min. La detección de los compuestos se realizó mediante una longitud de onda de 280 nm.



Figura 17. Equipo HPLC: modelo HPLC 1100 System

- **Espectrofotómetro multimodo.**

Para determinar la cantidad de luz absorbida, se utilizó un lector FLUOstar Galaxy, proporcionado por el Servicio de Cultivo de Tejidos del SAI de la Universidad de Murcia. Dispone de la capacidad de operar en cuatro modos de detección distintos:

1. Absorbancia UV/Vis: Se emplean filtros específicos para medir la cantidad de luz ultravioleta o visible que atraviesa la muestra.

2. Fluorescencia: Se determina la intensidad de la fluorescencia emitida por la muestra, incluyendo la técnica de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET).
3. Fluorescencia en el tiempo: Se mide la fluorescencia en función del tiempo, lo que incluye la técnica TR-FRET.
4. Luminiscencia: Se cuantifica la cantidad de luz emitida por la muestra mediante reacciones químicas o biológicas.



Figura 18. Espectrofotómetro FLUOstar Galaxy

- **Espectrómetro**

La cuantificación de la absorbancia se efectuó utilizando un espectrómetro FLUOstar® Omega, fabricado por BMG Labtech (Ortenberg, Alemania). Se trata de un lector de placas multimodo capaz de medir la absorbancia. Funciona con una variedad de filtros para cubrir el rango UV/visible

El equipo permite realizar mediciones de absorbancia en un espectro que abarca desde los 220 hasta los 1000 nm, con resoluciones que varían entre 1 y 10 nm (figura 19).

Los hallazgos derivados del procesamiento de las preparaciones se almacenan de manera digital mediante el software Reader Control y MARS Data Analysis. Este software posibilita la creación de tablas de absorbancia y el análisis de los datos recopilados.



Figura 19 . Espectrómetro FLUOstar Omega

- **Citómetros de flujo**

Para llevar a cabo la medición de reticulocitos mediante citometría de flujo, se empleó un equipo Becton Dickinson LSR Fortessa™ (mostrado en la figura 20). Este citómetro de flujo cuenta con opción de muestreo de alto rendimiento, lo que le permite trabajar con placas de pocillos múltiples, como las de 96 pocillos. Además, está equipado con 5 líneas de láser que posibilitan la detección simultánea de hasta 20 parámetros. El sistema utiliza láseres con longitudes de onda que van de 355 nm a 640 nm, y potencias de 20 mW a 50 mW.

Este equipo fue fabricado por BD Bio-sciencies, ubicado en San José, California, Estados Unidos.



Figura 20. Citómetro BD LSRFortessa™ X-20.

Para determinar la apoptosis y el ciclo celular, se utilizó un citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (figura 21). Este **citómetro de flujo** cuenta con un sistema de dos láseres, uno de **Argón azul (488 nm)** y otro de **Helio-Neón rojo (633 nm)**. Este equipo permite analizar hasta seis características de las células, incluyendo su tamaño (FSC), complejidad interna (SSC) y cuatro marcadores fluorescentes, y adquiere los datos en tubo. El equipo fue fabricado por Becton Dickinson en Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos.



Figura 21 . Citómetro BD FACSCalibur™.

- **Cabina de flujo laminar**

Para asegurar un entorno de trabajo libre de contaminación y mantener la uniformidad del flujo de aire, se ha empleado una campana de flujo laminar Telstar Bio-II-A. Este equipo especializado, a través de su sistema de flujo laminar, realiza una filtración exhaustiva del aire, eliminando partículas y garantizando un ambiente estéril para los procedimientos.



Figura 22. Cabina de seguridad biológica y química Clase II, tipo A2. TELSTAR Mod. Bio II Advance.

- **Sustancias químicas y biológicas empleadas en el estudio**

En este estudio se utilizaron diversos compuestos químicos y biológicos adquiridos a diferentes proveedores. Los medios de cultivo celular RPMI 1640, EMEM, DMEM y Ham's F10, así como la fitohemaglutinina A (PHA), la citocalasina B, la estreptomicina, la penicilina y la solución salina fosfato-buffer (PBS) fueron suministrados por Sigma-Aldrich® chemicals SA (Madrid, España).

El suero bovino fetal (FBS) se obtuvo de Gibco™ (EE. UU.), mientras que el ácido acético glacial y el etanol fueron proporcionados por Scharlab® SL (Madrid, España). Panreac® química SL (Madrid, España) suministró el metanol y el cloruro

potásico. La heparina sódica al 5% fue obtenida de Rovi® Pharmaceutical Laboratories (Madrid, España).

El dimetilsulfóxido (DMSO) fue proporcionado por Laboratorios Merck (Merck, Darmstadt, Alemania). El ácido carnósico (AC) fue suministrado por Furfural Español S.A. (Nutrafur®, Alcantarilla, Murcia).

La ribonucleasa A (RNasa A) de páncreas bovino y la solución de yoduro de propidio (PI) a 1,0 mg/mL fueron adquiridas a Sigma-Aldrich Chemicals S.A. (Madrid, España). El anticuerpo anti-CD71 de rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue proporcionado por Southern Biotech (Birmingham, EE. UU.).

La apoptosis se cuantificó utilizando el kit Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (número de catálogo V13241), adquirido de Invitrogen, una marca de Thermo Fisher Scientific (Madrid, España).

Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Promega Biotech Ibérica S.L. (Madrid, España): N-etilmaleimida (NEM), tampón de lisis pasiva, ditiotreitól (DTT) con 99% de pureza, luciferina-NT, reactivo de detección de luciferina, glutatión y glutatión S-transferasa.

-Conservación y acondicionamiento de los reactivos para su empleo en los análisis

- **MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio)**

El MTT es un compuesto tetrazólico ampliamente utilizado en ensayos de viabilidad celular. Su mecanismo de acción se basa en la reducción por las células metabólicamente activas a un producto de formazán de color púrpura, cuya cantidad puede medirse espectrofotométricamente.

El MTT se almacenó a una temperatura de entre 0 y 5 °C en una solución de 8 mg/ml preparada en PBS (solución salina tamponada con fosfato). Esta solución se guardó a 4 °C en un ambiente sin luz, ya que el MTT es sensible a la luz y puede degradarse. No se conservó más de 1 mes para asegurar la integridad y eficacia del reactivo.

- **XTT(2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida)**

Es un ensayo colorimétrico para la cuantificación de la proliferación, la viabilidad y la citotoxicidad celulares. El material de la muestra consiste en células adherentes o células en suspensión cultivadas en microplacas de 96 pocillos. Al contrario que con la MTT, el producto de hidrólisis de la XTT es soluble en agua; por consiguiente, no se precisa una etapa de solubilización. La sal de tetrazolio XTT es hidrolizada a formazán por medio de un complejo mecanismo celular. Esta biorreducción se produce sólo en células viables, por consiguiente, la cantidad del colorante formazán formado muestra una correlación directa con el número de células metabólicamente activas en el cultivo.

Se utilizó, una solución de XTT 1mg/mL disuelto en buffer fosfato salino de PMS 5mM en PBS (Sigma-Aldrich), filtrado y conservado a 37°C.

- **Dimetilsulfóxido (DMSO)**

El DMSO es un compuesto orgánico con múltiples aplicaciones en biología y medicina. Se utiliza como disolvente de diversas sustancias, crioprotector para células y tejidos, y posee propiedades antioxidantes.

El DMSO (con un peso molecular de 78 y una pureza del 99,5%) se mantuvo a temperatura ambiente. Se utilizó al 5% y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

El DMSO se incluyó en los grupos estudiados por dos razones principales:

- **Solubilización de flavonoides:** El DMSO es esencial para solubilizar algunos flavonoides utilizados en el estudio.
- **Efectos antioxidantes:** La estructura química del DMSO, que presenta puentes disulfuro, y sus propiedades antioxidantes podrían influir en los resultados, por lo que se consideró un grupo de tratamiento independiente para evaluar sus posibles efectos.

- **Albúmina Bovina**

La albúmina bovina es una proteína sérica utilizada en diversas aplicaciones biológicas y bioquímicas, como cultivos celulares, ensayos de unión a proteínas y como estabilizador de enzimas.

La albúmina de suero bovino liofilizada (fracción V), con una pureza mínima del 96%, se almacenó a una concentración de 20 mg/ml en PBS esterilizada con filtros, a una temperatura de 0 a 5 °C

- **Solución de CD-71/RNasa**

Para el experimento de MN en reticulocitos de ratón, se siguió el siguiente protocolo para la preparación de la solución de CD71/RNasa. Trabajando con luz tenue para minimizar la desnaturalización, la solución se preparó justo antes de su uso.

Para preparar la solución de tinción, se elaboró una mezcla maestra de tampón de bicarbonato, RNasa y anti-CD71-FITC. Esta mezcla se preparó en cantidad suficiente para el número total de muestras, incluyendo un 10% adicional para compensar el volumen muerto y asegurar la disponibilidad para todas las muestras.

El procedimiento consistió en añadir 0,2 µl de anti-CD71-FITC (a una concentración de 0,5 mg/ml) y 7 µl de RNasa A al tampón de bicarbonato (72,8 µl), alcanzando una cantidad final de 80 µl por muestra.

- **Ácido carnósico**

Se compró **ácido carnósico (CA)** (C₂₀H₂₈O₄) con una pureza de ≥91% a Sigma-Aldrich (Madrid, España). Este compuesto (ácido (4aR,10aS)-5,6-dihidroxi-1,1-dimetil-7-propan-2-il-2,3,4,9,10,10a-hexahidrofenantreno-4a-carboxílico) fue obtenido de *Rosmarinus officinalis*.

Es un compuesto fenólico con propiedades antioxidantes. Presenta insolubilidad en agua, una solubilidad parcial en alcoholes y una alta miscibilidad con disolventes orgánicos y aceites

Para su preparación se disolvió en DMSO a una concentración de 1 mg/ml debido a su baja solubilidad en agua.

- **Anexina V**

La anexina V es una proteína que se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido que se expone en la superficie de las células en las primeras etapas de la apoptosis.

El kit Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen™) se empleó para evaluar la apoptosis celular mediante citometría de flujo. Este kit detecta la apoptosis temprana a través de la fosfatidilserina (PS) y la permeabilidad de la membrana celular, utilizando anexina V Alexa Fluor® 488, que se une a la PS, y yoduro de propidio (PI), que solo penetra en células con membranas dañadas. El protocolo se siguió estrictamente, lavando y cosechando las células tratadas, para luego centrifugarlas y resuspenderlas. Se añadieron los componentes del kit (anexina V y PI) a las células resuspendidas, se incubaron en hielo y se añadió un tampón. La lectura de la fluorescencia se realizó inmediatamente en un citómetro de flujo.

MÉTODO

1. ACTIVIDAD GENOPROTECTORA

a. Efecto de la RI en la formación de micronúcleos en linfocitos humanos: estudio in vitro con citochalasina B

- **Muestras de sangre periférica y linfocitos**

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de los voluntarios y se recogieron en tubos estériles al vacío VENOSAFE™ (Terumo Europe NV, Lovaina, Bélgica) con heparina (heparina sódica al 5%, Rovi Lab, Madrid) como anticoagulante. La sangre se procesó dividiéndola en fracciones de 2 ml, que se almacenaron en tubos criogénicos. Estas fracciones se usaron para la realización de curvas dosis-respuesta y para evaluar la actividad protectora de ciertas sustancias.

- **Preparación de curvas dosis-repuesta**

La sangre de los donantes se organizó en dos conjuntos distintos:

Conjunto 1: Se emplearon catorce envases criogénicos, cada uno conteniendo 2 ml de sangre, para la creación de una curva de respuesta a la irradiación. Dos de estos envases no recibieron RI y se utilizaron como controles (muestras no irradiadas para determinar la cantidad basal de micronúcleos). Los otros doce envases recibieron dosis de Rx de 2 Gy.

Conjunto 2: Se estudió la capacidad protectora in vitro de ciertas sustancias. Este conjunto consistía en viales con fracciones de 2 ml de sangre en recipientes criogénicos. Se utilizaron para evaluar el efecto antigenotóxico del AC (administrado antes y después de la exposición a la radiación).

Dos muestras de sangre sirvieron como controles: una sin irradiar (cantidad basal de micronúcleos) y otra irradiada. Una muestra adicional se trató únicamente con la sustancia de prueba y sirvió como control de dicha sustancia. Algunas

muestras se trataron con la sustancia de prueba antes de la irradiación (grupo de preirradiación), mientras que otras se trataron después (grupo de postradiación).

- **Técnica para determinación de micronúcleos**

El estudio se centra en la aplicación del ensayo de MN en linfocitos humanos de sangre periférica como metodología principal. Este ensayo es una técnica de citogenética ampliamente utilizada para evaluar el daño genético de las células.

La técnica se basa en la observación de MN en el citoplasma de las células. Los MN son pequeños cuerpos que contienen cromosomas o fragmentos de cromosomas que quedan excluidos del núcleo principal en la división celular. Su presencia es un indicador de inestabilidad genómica y daño en el ADN.

El protocolo empleado sigue la metodología descrita por Fenech (1986, 1990, 2000) (449–451), la cual es considerada un estándar en este campo. Esta metodología implica el cultivo in vitro de linfocitos extraídos de sangre periférica humana. Estos linfocitos son estimulados para dividirse y se detiene la división celular (citocinesis) en la primera división mitótica mediante el uso de un bloqueador de la citocinesis, como la citocalasina B. Esto permite la acumulación de células en metafase, facilitando la observación de los cromosomas y la identificación de MN.

La metodología de MN en linfocitos de sangre periférica humana es particularmente útil para evaluar el daño genotóxico causado por la exposición a agentes como la RI. Esta técnica es ampliamente utilizada y ha sido adaptada por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) para optimizar el uso de los recursos, como la reducción del volumen del medio de cultivo requerido (452).

El protocolo se inició con la obtención de extracciones de sangre venosa de tres individuos sin patología conocida. Las muestras de sangre fueron procesadas inmediatamente para prevenir la coagulación mediante la adición de heparina.

Los linfocitos fueron cultivados in vitro en un medio de cultivo celular específico. Se utilizaron 4,5 ml de medio de cultivo celular para cada muestra. Una vez establecidos los cultivos celulares, los linfocitos fueron expuestos a rayos X.

Además de la exposición a la radiación, se incluyeron grupos de tratamiento con AC. En estos grupos, se añadió una solución de AC a las muestras de sangre a una concentración de 25 μ M. El volumen añadido fue de 20 μ L por cada 2 mL de sangre.

Es importante destacar que todos los procedimientos que implicaron la manipulación de muestras humanas contaron con el visto bueno del Comité de Bioseguridad Experimental de la Universidad de Murcia (UM), con el número de referencia 472/2021. Este aval garantiza que la investigación se realizó conociendo las normas éticas y de seguridad establecidas para la investigación con sujetos humanos.

Para asegurar la validez y confiabilidad de los resultados, cada experimento se llevó a cabo por sextuplicado. Esta práctica de replicación permite evaluar la variabilidad de los resultados y fortalece la significancia estadística de los hallazgos.

- **Elaboración de los componentes que integran el medio de cultivo**

Se llevó a cabo la elaboración de los reactivos incorporados a la solución de cultivo, según se especifica seguidamente:

- a) Fitohemaglutinina (PHA)

La fitohemaglutinina (PHA), un mitógeno empleado para estimular la división celular de los linfocitos fue adquirida comercialmente a Sigma-Aldrich (Madrid). El reactivo se suministró en viales de 1 mg y 5 mg, y se conservó en un ambiente a temperatura entre 2 y 8 °C hasta su uso.

Para la preparación de la solución de PHA, se utilizó el medio de cultivo Ham F10. La disolución de la PHA se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad para prevenir la contaminación microbiana, que podría afectar los resultados del estudio.

La proporción utilizada para la disolución de la PHA fue de 1 mg de PHA por cada ml de medio Ham F10. Esta concentración se seleccionó basándose en estudios previos y se optimizó para las condiciones experimentales. La solución resultante se almacenó a una temperatura de -20 °C.

La preparación estándar consiste en 100 ml de medio de cultivo. Dado que se necesitan 16 µg de PHA por cada ml, se emplearon 1.600 µg de PHA para 100 ml de medio de cultivo, lo que equivale a 1,6 mg de PHA.

Como la concentración obtenida fue de 1 mg/ml de Ham F10, para administrar 1,6 mg de PHA, se incorporaron 1,6 ml de la disolución de PHA preparada con antelación.

b) Citochalasina B (Cyt B)

La citocalasina B (Cyt B), un agente empleado para inhibir la citocinesis y así acumular células en metafase, fue adquirida comercialmente a Sigma-Aldrich (Madrid). Este compuesto, suministrado en presentaciones de 1 mg y 5 mg, fue almacenado a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

La preparación de la solución de Cyt B requirió su disolución en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% en un entorno estéril. La proporción utilizada para esta disolución inicial fue de 1 mg de Cyt B por cada 0,5 ml de DMSO. La manipulación se realizó bajo condiciones de esterilidad para prevenir la contaminación microbiana.

La solución de Cyt B en DMSO se procesó posteriormente en una cabina de flujo laminar. Se dividió la solución en alícuotas de 1 ml, cada una conteniendo 0,1 ml de la solución de Cyt B en DMSO y 0,9 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). La adición de PBS tenía como objetivo diluir la concentración de DMSO a un 10%, una concentración que ha demostrado ser biocompatible con los linfocitos y que no afecta su viabilidad ni la eficacia de la Cyt B. La concentración final de Cyt B en cada alícuota fue de 200 µg.

Estas alícuotas se almacenaron a una temperatura de -80 °C. Las alícuotas se descongelaron únicamente en el momento de su uso, para agregarlo al medio de cultivo de linfocitos.

La cantidad de Cyt B añadida al cultivo fue de 3 µg/ml. Dado que cada cultivo tenía un volumen de 10 ml, la cantidad total de Cyt B añadida a cada cultivo fue de 30 µg. Para lograr esta concentración, se utilizaron 150 µl del contenido de una de las alícuotas preparadas previamente.

b) Solución Hipotónica de Cloruro Potásico

Se preparó una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) a una concentración de 0,075 M. Para ello, se pesaron 5,59 gramos de KCl (suministrado por Probos, Madrid) y se disolvieron en 1 litro de agua destilada a temperatura ambiente.

La solución hipotónica de KCl tiene como objetivo inducir un incremento en el tamaño de las células binucleadas, lo que facilita su visualización al microscopio óptico.

c) Tampón Fosfato

La preparación del tampón fosfato 10 mM a pH de 6,2 se realizó mediante la dilución de sales de fosfato en agua bidestilada. Específicamente, se utilizaron las siguientes cantidades de sales de fosfato: 1,560 gramos de dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 2,340 gramos de fosfato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Estas cantidades de sales se disolvieron en un litro de agua bidestilada lo que permite alcanzar el pH deseado de 6,2.

d) Solución fijadora

La solución fijadora, fue preparada en el momento de su uso. Esta solución se compone de una mezcla de alcohol metílico y ácido acético glacial en una proporción de 3:1. Esta práctica garantiza la óptima preservación de las células y sus estructuras.

- **Descripción de la técnica de micronúcleos (MN)**

Se detalla la metodología seguida para la obtención de las preparaciones a analizar.

1.- Elaboración del medio de cultivo

Se llevó a cabo combinando los siguientes componentes en proporciones específicas:

- Medio HAM F10: Este medio basal, adquirido comercialmente, constituye el 85% del volumen final del medio de cultivo.
- Suero bovino fetal (SBF): se añadió al medio de cultivo a una concentración del 15%.
- Fitohemaglutinina (PHA): se incorporó al medio a una concentración de 16 µg/ml.
- Glutamina: se agregó al medio de cultivo a una concentración de 1 µg/ml.
- Antibióticos: Se utilizaron penicilina sódica y estreptomicina, a una concentración de 100 UI/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

2.- Cultivo celular:

Se llevó a cabo incubando 1 ml de cada muestra de sangre con heparina en frascos de cultivo de 25 ml. Este proceso se realizó en una estufa de incubación a una temperatura de 37 °C, en un ambiente enriquecido con CO₂ al 5%. Cada muestra de sangre se incubó junto con 9 ml de medio de cultivo. El tiempo de incubación se estableció entre 72 y 76 horas.

3.- Adición de citocalasina B (Cyt B) para el bloqueo de la citocinesis

Transcurridas 44 horas desde el inicio del cultivo celular, se procedió a la adición de Cyt B a cada uno de los cultivos. La Cyt B actúa inhibiendo la polimerización de la actina, una proteína esencial para la formación del citoesqueleto y, por lo tanto, bloquea la citocinesis que sigue a la cariocinesis. Este bloqueo resulta en la acumulación de células binucleadas.

La adición de la Cyt B se realizó de manera estéril. Se incorporaron 150 µl de la disolución de Cyt B a cada cultivo que contienen 30 µg de Cyt B, lo que resulta en una concentración final de 3 µg/ml en el medio de cultivo.

La adición de la Cyt B en un momento específico del cultivo, 44 horas después de su inicio, es un aspecto importante ya que es el momento calculado para que las células se encuentren antes del inicio de la citocinesis.

4.- Incubación del cultivo:

El período de incubación se extendió por otras 28-32 horas, para la acumulación de células binucleadas.

La duración total del cultivo celular, que abarca tanto los períodos de incubación pre- como post-Cyt B, alcanzó las 72-76 horas.

5.- Trasvase y centrifugación inicial de los cultivos celulares

Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido, el contenido de cada uno de los recipientes de cultivo se transfirió a tubos de centrifuga de 15 ml y sometidos a centrifugación a una velocidad de 1000 rpm durante un período de 5 minutos. Se utilizó una centrífuga Heraeus Minifuge T (Madrid) para este propósito.

6.- Solución hipotónica y segunda incubación:

Después de la centrifugación inicial y la eliminación del sobrenadante, se procedió a añadir 8 ml de una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) al sedimento celular que contenía los linfocitos para provocar un fenómeno de osmosis desplazando el agua al interior de la célula y aumentando su volumen.

Tras la adición de la solución hipotónica de KCl, los tubos con las células en suspensión se incubaron nuevamente en la estufa a 37 °C y en un ambiente enriquecido con CO₂ al 5% durante 3 minutos.

7.- Centrifugación, fijación y resuspensión:

- Centrifugación y eliminación del sobrenadante: el cultivo se centrifugó a 800 rpm. 8 minutos para eliminar la fase líquida.
- Fijación: El sedimento celular se resuspendió en 8 ml de fijador, una mezcla 3:1 de alcohol metílico y ácido acético glacial. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 1000 rpm durante 5 minutos.

- Lavados: El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en fijador fresco.
- Resuspensión final: los linfocitos, se resuspendieron en 0,5 ml de fijador, concentrándolas para la preparación de portaobjetos.

8.- Preparación de portaobjetos:

Una vez limpios, los portaobjetos fueron enfriados para mejorar la dispersión y la adhesión celular. Se coloca gota a gota la suspensión celular sobre el portaobjetos y se seca con una corriente suave de aire.

9.- Tinción de las preparaciones microscópicas

Veinticuatro horas después de la preparación de los portaobjetos, las muestras se tiñeron sumergiéndolas en una serie de soluciones de tinción :

- Tinción con May-Grünwald puro: Los portaobjetos se sumergieron en una solución de May-Grünwald puro (Merck, Darmstadt, Alemania) por 3 minutos.
- Tinción con May-Grünwald al 50%: los portaobjetos se sumergieron en una solución de May-Grünwald al 50% durante 2 minutos.
- Tinción con Giemsa: Finalmente, los portaobjetos se sumergieron en una solución de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 2 minutos.

10.- Lavado y secado final:

Tras el proceso de tinción, las preparaciones microscópicas fueron sometidas a un lavado final sumergiéndolos en un tampón fosfato 100 mM con un pH de 6,2 y se dejaron secar.

11.- Montaje final de las preparaciones

Se realizó la colocación de un cubreobjetos sobre la suspensión celular teñida y seca que se encuentra en el portaobjetos.

- **Conteo de micronúcleos: criterios**

El análisis de las preparaciones microscópicas se llevó a cabo siguiendo un protocolo estandarizado.

Los portaobjetos se escanearon digitalmente utilizando un escáner Leica SCN400F, un sistema de imagen de alta resolución con un Digital Image Hub (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, EE. UU.).

La evaluación y conteo de micronúcleos fue realizado por un equipo de tres especialistas : dos radiobiólogos, cada uno con más de diez años de experiencia en el campo de los estudios citogenéticos, y un especialista en anatomía patológica con más de quince años de experiencia profesional.

Quinientas células binucleadas (CB) por preparación fueron objeto de conteo para determinar la frecuencia de MN. Cada muestra de sangre generó dos cultivos celulares, de los cuales se obtuvieron seis preparaciones microscópicas. En consecuencia, cada valor mostrado representa el análisis de tres mil CB, efectuado por tres observadores de manera independiente, a pesar de que las cifras de micronúcleos se hayan expresado por cada quinientas células bloqueadas (MN/500 CB). Las muestras se codificaron y se mezclaron, garantizando que los especialistas desconocieran los resultados de los demás mientras se realizó el análisis.

El conteo se realizó a triple ciego, obteniéndose un valor único por muestra, resultado del promedio de las 6 lecturas independientes. Los criterios de Almassy (1987) (453) fueron seguidos para el recuento de micronúcleos:

- Los MN deben compartir idéntica estructura que el núcleo principal.
- Su tamaño debe ser inferior a la mitad del núcleo principal, o bien no exceder el doble de la longitud normal de un cromosoma.
- Serán redondos o esféricos, y estar claramente sin contacto con núcleo principal.
- A diferencia de partículas no nucleares, no deben mostrar refracción lumínica.

- El conteo se realiza solo en células con citoplasma intacto.
- Debe haber una relación directa entre el número de micronúcleos (MN) y la velocidad de división de las células.



Figura 23. Observación al MO (400x, tinción May-Grünwald-Giemsa) de dos linfocitos binucleados (CB) con citoplasma conservado, donde uno de ellos presenta un micronúcleo (MNCB) en el citoplasma.

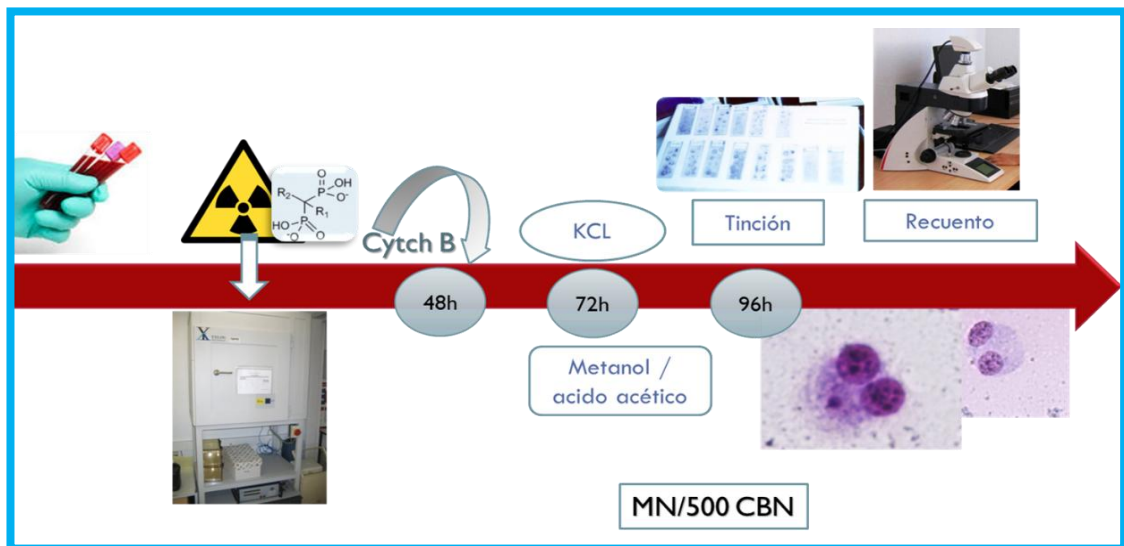


Figura 24. Esquema del protocolo experimental del ensayo de CBMN: recolección de de sangre de voluntarios sin enfermedades previas, exposición de dichas muestras a irradiación, fijación celular para detener la división, y lectura microscópica para cuantificar el número de micronúcleos (MN) en 500 células con bloqueo de citocinesis. El ensayo incluye condiciones control (C, sin irradiación ni tratamiento), control irradiado (Ci, solo irradiación), células irradiadas tratadas con AC (CA). Fenech & Morley, 1985; IAEA, 2011

b. Ensayo de micronúcleos in vivo en reticulocitos de ratón para la evaluación de daño genotóxico

El ensayo de micronúcleos in vivo en reticulocitos de ratón, con cuantificación mediante citometría de flujo (MNRET), se erige como una técnica ampliamente utilizada y validada en el campo de la toxicología y la genética.

Este método, cuya descripción original se atribuye a Schmid (454) en 1975, permite analizar el daño que se produce en el ADN de las células de la médula ósea de ratón.

Para la extracción de la médula ósea de ambos fémures, los animales de experimentación son sacrificados mediante descerebración traumática. La metodología para la extracción de la médula ósea se basa en protocolos estandarizados descritos por Von Ledebur y Schmid (455) en 1973, y posteriormente por Schmid(454) en 1975.

El protocolo para el análisis de micronúcleos de médula ósea de ratón se llevó a cabo siguiendo una serie de pasos .

El proceso se inició con la radiación de los ratones con rayos X a una dosis de 50 cGy (Figura 25 y 26).

Veinticuatro horas después de la irradiación, los animales fueron sacrificados. Inmediatamente después, se procedió a la separación de los fémures, retirando cuidadosamente el tejido muscular y tendones adheridos a los huesos (Figura 27).

Una vez limpios, se cortaron las epífisis femorales. El suero bovino fetal fue inyectado con una jeringa de insulina de 24G a través de la diáfisis del fémur para la recolección de la médula ósea, que fue depositada en tubos de 15 ml (Figura 28).

El contenido de los tubos se pipeteó hasta lograr una suspensión celular homogénea, se dejó reposar durante 5 minutos y luego se centrifugó a 1000 rpm 5 minutos en una centrífuga Centromix 549 (Selecta, Madrid). Se aspiró el sobrenadante hasta dejar un volumen aproximado de 0,2 ml.

Se realizó un frotis, y las extensiones celulares se dejaron secar a temperatura ambiente durante un día completo.

Transcurridas 24 horas se procedió a la tinción: Inicialmente, se aplicó May-Grünwald puro (Analema, Vorquímica S.L, Vigo) 3 minutos. A continuación, se eliminó la mitad del colorante May-Grünwald y se sustituyó por agua destilada, manteniendo esta solución 2 minutos. Sin enjuagar, se añadió una solución de Giemsa (Probus, Madrid), diluida 1:6 en un tampón fosfato 100M, pH 6,2, y se dejó actuar durante otros 2 minutos. Posteriormente los preparados se lavaron sumergiéndolos, uno a uno, en agua destilada para eliminar el exceso de colorante. La parte posterior de los portaobjetos se limpió con Xilol (Probus, Madrid) y se permitió que las muestras se secaran. Finalmente, se colocó el cubreobjetos sobre las extensiones celulares teñidas.(Figura 29)



Figura 25 . Animales de experimentación expuestos a RI.



- **Figura 26.** Equipo de rayos X que ilustra la irradiación simultánea de ratones de experimentación y muestras sanguíneas.



Figura 27. Disección de los fémures para conseguir medula ósea

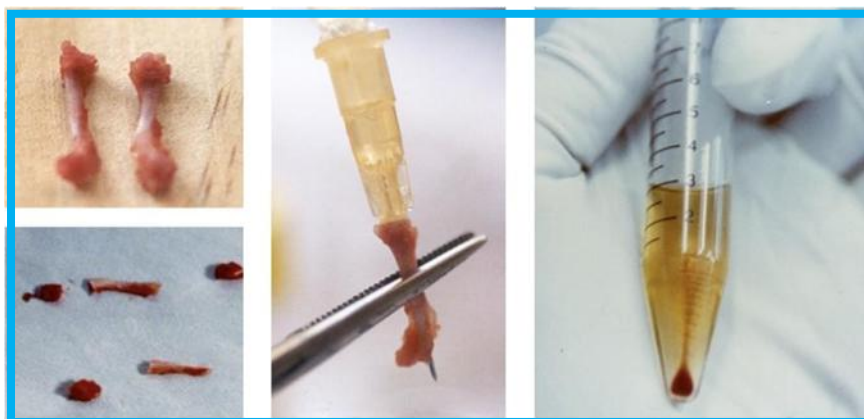


Figura 28. Extracción de medula ósea tras la disección de fémures.

- **Análisis microscópico para la cuantificación de micronúcleos**

El análisis de las muestras de médula ósea se llevó a cabo por dos investigadores distintos, quienes trabajaron de forma independiente. Se utilizó microscopía óptica para este análisis. Para el conteo y el estudio de los micronúcleos (MN), se empleó de manera regular un aumento de 400x. Cuando fue necesario confirmar o diferenciar estructuras, se incrementó el aumento a 1000x, utilizando aceite de inmersión.

Se analizaron dos muestras separadas de cada animal experimental. En cada muestra, se contabilizaron 500 eritroblastos policromatófilos (PCEs). El objetivo era establecer la frecuencia de MN en cada animal. Esta frecuencia se reportó como el número de MN encontrados por cada 1000 PCEs, para cada individuo.

Los investigadores realizaron el conteo sin conocer el origen ni las características específicas de las muestras analizadas. Se calculó un valor único para cada punto experimental, el cual representa el promedio de las lecturas obtenidas para cada una de las muestras.

Adicionalmente, se calcularon las siguientes proporciones:

- PCEs en relación con los eritrocitos normocromáticos (NCEs) (proporción P/N)
- PCEs en relación con el total de eritrocitos (PCEs + NCEs) (proporción P/E).

c. Determinación de Micronúcleos en Reticulocitos de Ratón con Citometría de Flujo

- **Protocolo Detallado:**

La técnica empleada para el análisis de MN en reticulocitos se basa en el protocolo descrito por Balmus et al. [178], utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson LSR Fortessa con capacidad de alto rendimiento y láseres de excitación azul (488 nm) y verde (561 nm) (BD Bio-sciences, San José, CA, USA). La detección de la fluorescencia emitida por el anti-CD71 conjugado con FITC y el yoduro de propidio (PI) se realizó mediante filtros de paso de banda de 530/30 nm y 610/20

nm, respectivamente. Este ensayo permite identificar niveles bajos de inestabilidad genómica en muestras de sangre de 25 µl, los cuales no son detectables mediante fenotipado clásico.

El procedimiento de preparación de muestras para el análisis fue el siguiente (Figura 30):

1. Dilución de la muestra: en un tubo de 1,5 ml, se diluyeron 50 µl de sangre de la cola del ratón con 300 µl de una solución de heparina
2. Fijación de la muestra: Se extrajeron 150 µl de la mezcla de sangre y heparina, y se vertieron en 2 ml de metanol frío (previamente congelado a -80°C) utilizando una pipeta. Este paso se repitió para un tubo duplicado.
3. Almacenamiento de la muestra: Se invirtieron los tubos 4-5 veces para evitar la agregación celular y se almacenaron a -80°C durante al menos 12 horas.
4. Lavado de la muestra: Se añadieron 12 ml de tampón de bicarbonato frío (4°C) a los tubos.
5. Centrifugación de la muestra: Se centrifugaron los tubos a 500 G durante 5 minutos a 4°C.
6. Resuspensión de la muestra: Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de tampón de bicarbonato frío.
7. Preparación de la placa de 96 pocillos: Se transfirieron alícuotas de 20 µl de la muestra a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (ABgene, #AB-0859). Además, se destinaron tres tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para la preparación de los controles. Para ello, se añadieron 20 µl de muestra a cada tubo, que se usarían para los controles: sin tinción, con PI y con CD71-FITC.
8. Tinción de la muestra: Se añadieron 80 µl de solución de CD71-FITC/RNasa a las muestras en la placa y al tubo de control de tinción única de CD71-FITC. A los tubos de control sin tinción y control solo con PI se les añadió 7 µl de RNasa y 73 µl de tampón.

9. Incubación de la muestra: La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó durante 45-60 minutos a 4°C con agitación a baja velocidad (60 rpm).
10. Lavado de la muestra: Se añadieron 600 µl de tampón de bicarbonato frío (4°C) a las muestras (en pocillos y tubos Eppendorf) y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos a 4°C.
11. Eliminación del sobrenadante de los tubos de control con una pipeta.
12. Resuspensión de las células: Los sedimentos celulares se resuspendieron en 500 µl de tampón de bicarbonato mediante pipeteo suave.
13. Transferencia a la placa de lectura: Se transfirieron 200 µl de muestra a una placa de 96 pocillos transparentes con base plana para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

- **Análisis**

A continuación se detallan los pasos del procedimiento:

1. Preparación de los tubos de control: Se transfirieron 500 µl de cada muestra de control (sin teñir, solo con PI y solo con CD71-FITC) a tubos de poliestireno de 5 ml.
2. Ajuste de parámetros y selección inicial: Para comenzar, se ajustó el citómetro utilizando una muestra no teñida. Se adquirieron los eventos celulares en un gráfico de dispersión (scatter plot) donde el eje X mostraba la dispersión frontal lineal (FSC-A-Lin) y el eje Y, la dispersión lateral logarítmica (SSC-A-log). En este gráfico, se pudieron distinguir entre dos y tres poblaciones de glóbulos rojos. Para el análisis, se seleccionó la población principal de eritrocitos y se estableció una puerta de selección inicial (R1) alrededor de ella
3. Aislamiento de dobletes: Se trazó FSC-W-Lin (dispersión frontal lineal - ancho) frente a FSC-A-Lin (dispersión frontal lineal - área) para aislar los

- dobletes y se estableció la puerta R2 para incluir solo a las células individuales.
4. Ajuste de compensación para PI y CD71-FITC: Se añadieron 2,5 μ l de PI al tubo de control , se dejó incubar unos minutos y se adquirieron los eventos. Se ajustaron el voltaje y la ganancia para asegurar que todos los sucesos quedaran dentro de los ejes del diagrama, y para separar las células positivas de las negativas, se estableció una región de análisis dividida en cuadrantes.
 5. Ajuste de compensación para CD71-FITC: Se repitió este paso para el control de CD71-FITC, utilizando el mismo procedimiento para ajustar el voltaje, la ganancia y la puerta de cuadrante.
 6. Eliminación de la autofluorescencia: Se utilizó el control de tinción única con PI para identificar y excluir la población autofluorescente, estableciendo para este fin el "gate" R3
 7. Identificación de poblaciones celulares: En un diagrama biexponencial de CD71-FITC frente a PI, se establecieron puertas para identificar cuatro poblaciones distintas: reticulocitos (RET, Q1), reticulocitos con micronúcleos (MN-RET, Q2), eritrocitos normocrómicos con micronúcleos (MN-NCE, Q3) y eritrocitos normocrómicos (NCE, Q4).
 8. Configuración del citómetro de flujo para lectura de placas: Se ajustó el citómetro de flujo para trabajar con múltiples pocillos , lo que permite el análisis automatizado de un gran número de muestras.
 9. Ajuste de parámetros de lectura: Se configuró el volumen a 70 μ l, las mezclas a 4 y la velocidad de flujo volumétrico a 0,5 μ l/s o 1 μ l/s (para lograr ~1000-2000 eventos por segundo).
 10. Tinción de la placa: Se agregó 1 μ l de PI a cada pocillo de la placa con un multipipeteador, rellenando 24 pocillos.
 11. Lectura y exportación de datos: Se cargó el protocolo guardado en el citómetro de flujo y se exportaron y guardaron los datos.

12. Reanálisis de datos: Se repitió el análisis, aplicando las puertas R1 (eritrocitos), R2 (dobletes) y R3 (autofluorescencia), y se identificaron las poblaciones celulares (RET, MN-RET, MN-NCE y NCE).

13. Cálculo del porcentaje de micronúcleos: Se utilizaron los recuentos absolutos de eventos para cada cuadrante para calcular el porcentaje de formación de MN.

- **Procesamiento de muestras y análisis de datos para la determinación de micronúcleos en reticulocitos**

El procesamiento de las muestras y el análisis de los datos se llevaron a cabo siguiendo un protocolo.

La cuantificación de la frecuencia de reticulocitos micronucleados en sangre (MN-RET) se basó en el análisis de aproximadamente 196.000 eventos por cada animal. La adquisición de estos datos se realizó en un citómetro de flujo equipado con un sistema de muestreo automatizado de alto rendimiento. Para asegurar la homogeneidad, dicho sistema resuspendió cada muestra entre 2 y 4 veces, manteniendo un flujo de lectura constante que osciló entre 1.000 y 2.000 eventos por segundo.

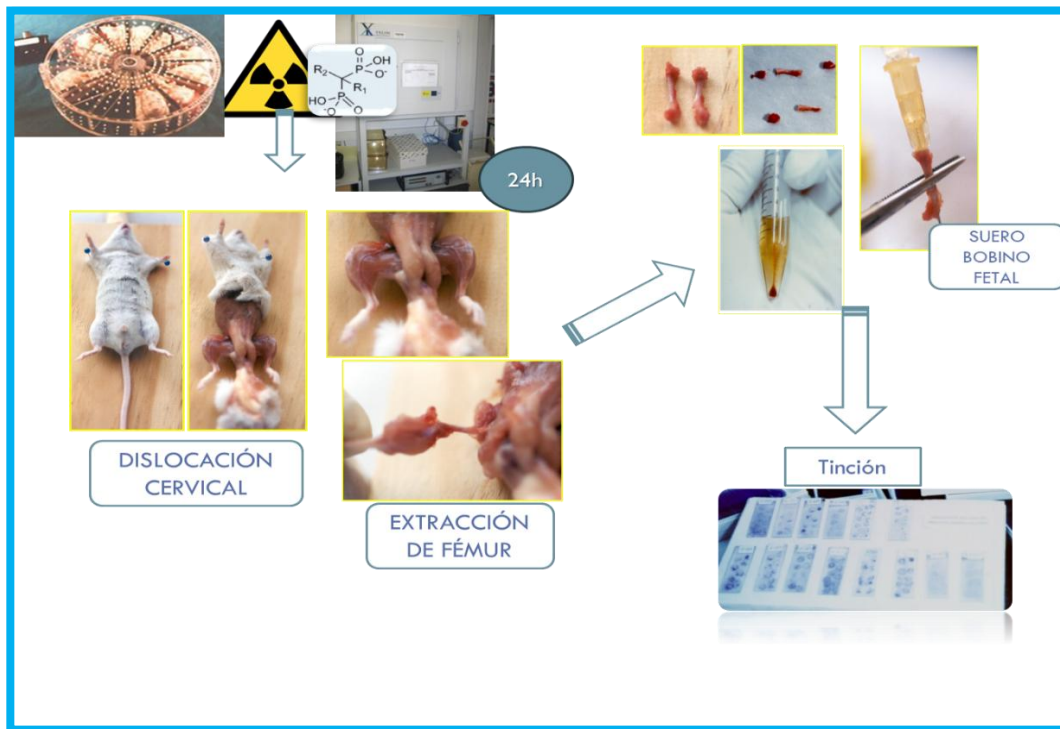
Para el correcto análisis de la población de células eritrocitarias, fue crucial establecer una estrategia de puertas de análisis (*gating*). La definición precisa de estas regiones se logró gracias al uso de controles sin tinción y controles marcados con un único fluorocromo.

El cálculo del porcentaje final de MN-RET se derivó del recuento absoluto de eventos registrados en los diferentes cuadrantes, datos que fueron extraídos directamente mediante el software del equipo. Para obtener este valor, se empleó la siguiente expresión matemática:

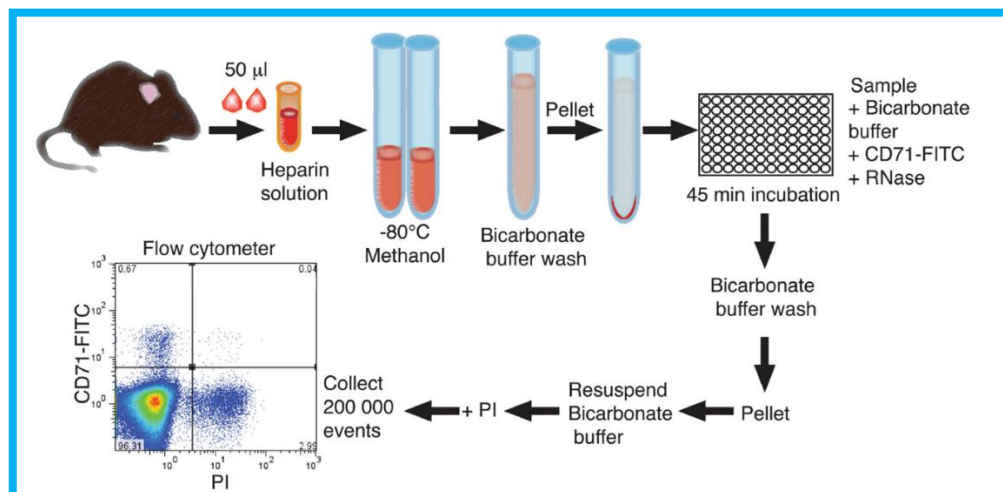
$$\% \text{ MN-RET} = [\text{MN-RET} / (\text{RET} + \text{MN-RET})] \times 100$$

Donde:

- MN-RET representa el número de reticulocitos con micronúcleos.
- RET representa el número de reticulocitos sin micronúcleos.



- **Figura 29.** Guía del proceso de análisis de micronúcleos en ratones.



- **Figura 30.** Guía del proceso de análisis de micronúcleos en ratones con citometría de flujo.

2.ACTIVIDAD CITOTOXICIDAD

a. Estudios de citotoxicidad: Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y XTT.

- **Cultivo y preservación de líneas celulares.**

Cuatro líneas celulares distintas fueron seleccionadas para este estudio. Estas líneas celulares fueron propagadas y mantenidas mediante cultivos masivos y, además, se criopreservaron para su uso futuro.

El cultivo masivo se estableció en condiciones óptimas dentro de frascos de cultivo de 75 cm², utilizando un medio de cultivo específico para cada línea celular.

El crecimiento de las células se monitorizó rutinariamente mediante observaciones microscópicas directas de los frascos de cultivo, utilizando un microscopio invertido de contraste de fases. Se realizaba un recambio del medio de cultivo cada dos días, o con mayor frecuencia si el cambio de color del indicador de pH alertaba de su acidificación.

En las células adheridas, las células se cultivaron hasta alcanzar la confluencia, momento en el cual forman una monocapa celular uniforme que cubre la superficie del frasco de cultivo. En este punto, los cultivos fueron tratados con una solución de tripsina (0,1 mg/ml) y EDTA (0,2 mg/ml) durante un período de 5 minutos en una estufa a 37°C.

Tras la separación celular, se añadieron 4 ml de medio de cultivo precalentado, suplementado con SBF, para neutralizar la acción de la tripsina. La mezcla se centrifugó a 214 g durante 10 minutos a una temperatura de 22°C. El sedimento celular resultante se resuspendió en 2 ml de medio fresco.

En las células en suspensión, se cultivaron añadiendo medio fresco hasta que fueran superior a 2×10^6 , momento en el que se procedía a su subcultivo. Retirábamos todo el medio del fresco y lo colocábamos en tubos de 50ml y se centrifugaba a 125g durante 6 minutos, para recuento.

Se procedió entonces al recuento de las células viables utilizando una cámara hemocitométrica y el colorante azul de tripán, que tiñe las células muertas pero no las vivas, permitiendo distinguirlas. Este recuento celular sirvió de base para calcular la cantidad de células necesarias (inóculo) para sembrar nuevos frascos de cultivo.

Paralelamente, se implementó un riguroso control de calidad para descartar la presencia de contaminación por *Mycoplasma* spp. Se tomaron muestras periódicas de los cultivos de ambas líneas celulares y se analizaron con fluorescencia directa, empleando el colorante para el ADN (H33233, Hoechst, Alemania) que revela la presencia de estos microorganismos.

El proceso de criocongelación, destinado a preservar las células a largo plazo, se realizó en cultivos que se encontraban en una fase cercana a la confluencia. Las células fueron tripsinizadas y centrifugadas, y el sedimento celular se resuspendió en medio fresco suplementado con SBF hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 células/ml.

La suspensión celular se distribuyó en tubos criogénicos, añadiendo un 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) crioprotector.

El protocolo de criocongelación, se llevó a cabo sumergiendo las ampollas que contenían las células en una solución de alcohol isopropílico que induce una disminución gradual y controlada de la temperatura a una velocidad de aproximadamente 1°C por minuto, hasta alcanzar los -80°C .

Una vez que las ampollas alcanzaron la temperatura de -80°C , se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido, donde la temperatura desciende hasta -196°C .

Para recuperar las células, se sumergieron en agua a 37°C .

Una vez descongeladas, las células se transfirieron a un tubo de centrifuga dentro de una cabina de flujo laminar. Se añadieron 10 ml de medio de cultivo precalentado al tubo para diluir el dimetilsulfóxido DMSO. Tras lo cual, la mezcla se centrifugó a 214 g durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 1-2 ml de medio de cultivo fresco.

Se realizó un nuevo recuento celular utilizando el colorante azul de tripán, que solo penetra en células con membranas celulares dañadas, lo que permite diferenciar entre células viables y no viables (que se tiñen de azul).

Finalmente, se procedió a la siembra de las células. El medio de cultivo se renovó a las 24 horas y se enriqueció con SBF.

- **Optimización del Número Celular para Ensayos de Viabilidad y Proliferación**

Los ensayos de viabilidad celular y proliferación, en este caso implementados 24 y 48 horas después de la exposición de las células a la sustancia en estudio (con y sin radiación X), requirieron la optimización inicial del número de células sembradas. Se utilizaron placas de 96 pocillos Nunc® MicroWell con fondo óptico, cada pocillo con una capacidad de 300 µl. Para cada tratamiento y tipo de célula se incorporó un control positivo, que fue mantenido en condiciones idénticas a las de los grupos experimentales.

Las células empleadas en los ensayos se encontraban en fase de crecimiento exponencial. Los parámetros de cultivo en los pocillos replicaban los de los frascos de cultivo. Una vez sembradas las células, se procedió a una incubación de 24 horas con los tratamientos correspondientes para los dos tipos de ensayo.

Para determinar la concentración óptima, se analizó la curva de crecimiento característica de cada línea celular y se determinó que el número más apropiado de células a sembrar por pocillo era de 3.200 para las células PNT2 y de 2.500 para las células de melanoma BF16F10, SK-MEL-1 y Melan-A6.

- **Evaluación de la Viabilidad Celular Mediante el Ensayo MTT y XTT: Un Método Espectrofotométrico para Cuantificar la Actividad Metabólica**

El ensayo MTT, o ensayo de reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, es una técnica colorimétrica ampliamente utilizada para evaluar la viabilidad y proliferación celular. Este ensayo se fundamenta en la capacidad de la

enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, presente en las células eucariotas metabólicamente activas, para reducir el MTT, una sal de tetrazolio soluble de color amarillo, a MTT formazán. El MTT formazán es un producto insoluble de color azul intenso que se acumula en el interior de las células vivas.

La reducción del MTT a formazán es un indicador directo de la actividad metabólica de las células, y específicamente de la función mitocondrial. La actividad del succinato deshidrogenasa, es un reflejo del estado metabólico y la viabilidad de la célula.

El ensayo XTT, que tiene base en la reducción de la sal de sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) por las deshidrogenasas mitocondriales hasta cristales de formazán, reacción acelerada por la adición de un acoplador de electrones como es el Fenasin Metosulfato (PMS).

La cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células vivas presentes en la muestra. Esta relación lineal permite cuantificar la viabilidad celular mediante la medición espectrofotométrica de la absorbancia del formazán disuelto.

En este estudio el método usado por Carmichael et al. (1987) y Alley et al. (1988)(456) para MTT y la técnica descrita por Scudiero, D et al (1988) para XTT, ambas fueron adaptadas a las condiciones de cultivo específicas para medir la viabilidad celular en las líneas celulares estudiadas.

- **Protocolo Experimental del Ensayo MTT y XTT: Cuantificación de la Viabilidad Celular**

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Reemplazo del medio de cultivo: Inicialmente, el medio de cultivo presente en cada pocillo de la placa de 96 pocillos fue removido en las células adheridas. A continuación, se añadió un volumen de 200 µl de medio de cultivo fresco, carente de rojo de fenol y suplementado con SBF.

2. Adición del MTT en las células adheridas y XTT en las células en suspensión: Seguidamente, se adicionó un volumen de 50 µl de la solución de MTT/XTT, a una concentración de 8 mg/ml y 1mg/ml respectivamente, a cada uno de los pocillos.
3. **Incubación:** Las placas de 96 pocillos, tras la adición del MTT/XTT, se incubaron durante un período de 4 horas en una estufa de cultivo celular a una temperatura controlada de 37°C y una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.
4. **Solubilización del formazán:** Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo. El DMSO es un solvente orgánico que tiene la capacidad de solubilizar el MTT formazán.
5. **Agitación:** Las placas se agitaron a temperatura ambiente durante un período de 30 minutos.
6. **Lectura de absorbancia:** Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia de cada pocillo utilizando un espectrofotómetro FLUOstar Galaxy®. Se empleó un sistema de doble longitud de onda, específicamente 560 nm (longitud de onda de referencia), 450nm y 690 nm (longitud de onda de lectura). La lectura a 560 nm mide la absorbancia del MTT formazán reducido, 450nm XTT forman reducido, mientras que la lectura a 690 nm se utiliza para corregir cualquier interferencia óptica no específica.

- **Evaluación del efecto del AC sobre la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y XTT**

Este estudio se enfocó en determinar el efecto del compuesto AC sobre la viabilidad celular, utilizando cuatro líneas celulares diferentes: células PNT2, Melan A6, SKMEL1 y células B16F10.

Preparación y siembra celular: Las células PNT2, Melan A6, SKMEL1 y B16F10 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.200 y 2.500 células/ml,

respectivamente. Después de la siembra, las células se incubaron durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5%/7,5% CO₂).

Preparación y administración del AC: El compuesto AC se preparó inicialmente disolviéndolo en DMSO a una concentración de 1 mg/ml. A continuación, la solución de AC en DMSO se diluyó en solución salina tamponada con fosfato para obtener las concentraciones de trabajo deseadas: 25 µM. La administración del AC a las células se realizó mediante la adición directa de la solución de AC en PBS al medio de cultivo, 15 minutos antes de la irradiación con rayos X.

Irradiación y evaluación de la viabilidad: Después de incubarlo durante 15 minutos con el AC, las placas de 96 pocillos que contenían las células se irradiaron (20 Gy). La irradiación se llevó a cabo utilizando una fuente de rayos X calibrada. Después se incubaron 24 o 48 horas.

Análisis de datos: La viabilidad celular relativa se midió a través de la conversión de MTT/XTT en formazán. Para determinarla, se comparó la reducción en la absorbancia de las muestras tratadas con ácido carnósico con la del grupo de control, que no recibió tratamiento. La viabilidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular} = (\text{Absorbancia del cultivo de células tratadas} / \text{Absorbancia del control no tratado}) \times 100$$

Esta fórmula expresa la viabilidad de las células tratadas como un porcentaje de la viabilidad de las células control no tratadas. Para asegurar la reproducibilidad y la precisión de los resultados, todos los experimentos se realizaron con al menos seis repeticiones para cada condición de tratamiento. Los datos obtenidos se expresaron como la media $\pm$ la desviación estándar (SD) de las repeticiones, permitiendo evaluar la variabilidad experimental.

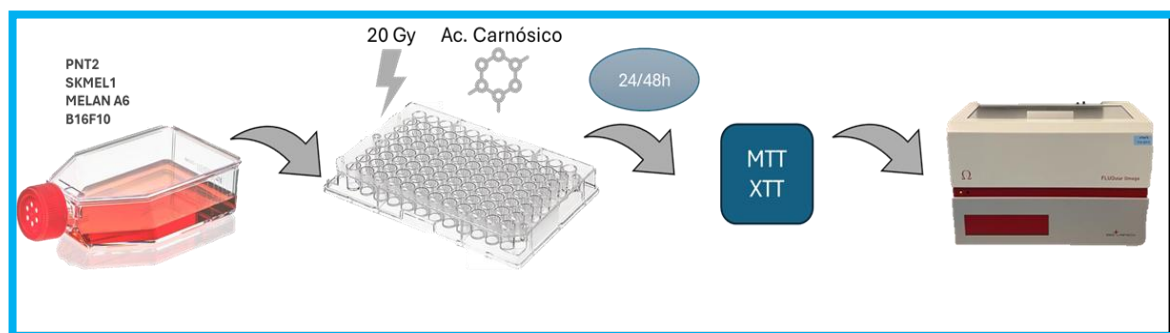


Figura 31. Esquema del protocolo del test MTT y XTT

3.NIVELES DE GLUTATIÓN INTRACELULAR (GSH Y GSSG)

El glutatión (GSH) es un tripéptido tiólico (γ -glutamilcisteinilglicina) de crucial importancia como antioxidante en el entorno celular. Esta molécula existe en dos formas interconvertibles: reducida (GSH) y oxidada (GSSG) (457). En condiciones fisiológicas normales, la concentración de GSH supera con creces la de GSSG, reflejando un equilibrio celular adecuado y un estado redox favorable. No obstante, se ha observado que situaciones patológicas que desencadenan estrés oxidativo, como la exposición a agentes tóxicos, la inflamación crónica o la radiación, provocan una disminución significativa en la proporción GSH/GSSG (458). Esta disminución indica un aumento en la producción de ROS y un agotamiento de la capacidad antioxidante de la célula. Por consiguiente, la determinación de los niveles de GSSG en condiciones de estrés inducido puede aportar información del grado de estrés oxidativo que experimenta un organismo (459,460), así como sobre la eficacia de los mecanismos de defensa antioxidante.

La cuantificación de los niveles totales de glutatión (GSH + GSSG) y de las proporciones de GSSG y GSH/GSSG en células PNT2 y Melan A6, SKMEL1, B16F10 se llevó a cabo empleando el kit GSH/GSSG-Glo Assay (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España). Este sistema se basa en la luminiscencia para la detección y cuantificación. Las células fueron sometidas a las diferentes condiciones experimentales (control, irradiación, tratamiento con Ácido Carnósico) y tres horas tras la exposición a 20 Gy, se procedió a la medición de los niveles de glutatión.

La determinación tanto del glutatión total como de GSSG se fundamenta en la reacción de conversión de una sonda de GSH (luciferina-NT a luciferina) catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GST), que a su vez se acopla a una reacción de luciferasa. La luciferina es un sustrato de la enzima luciferasa, cuya reacción produce una emisión de luz (luminiscencia) directamente proporcional a la cantidad de luciferina presente. La cantidad de luciferina generada depende de la cantidad de GSH presente, ya que el GSH es un cofactor esencial para la actividad de la GST. Por lo tanto, la señal luminiscente emitida por la luciferasa refleja la cantidad de GSH en la muestra.

Es importante señalar que para garantizar la especificidad de la medición, la determinación del glutatión total y de GSSG se efectúa a través de reacciones simultáneas. La primera etapa del ensayo consiste en medir el glutatión total (GSH + GSSG). Para lograrlo, se emplea un agente reductor cuya función es convertir la totalidad del glutatión presente en el lisado celular a su estado reducido, GSH. De esta manera, se asegura que la medición de la luminiscencia refleje la cantidad total de glutatión, independientemente de su estado de oxidación inicial. El segundo ensayo está diseñado para medir específicamente los niveles de GSSG. Para lograrlo, se incorpora un reactivo que secuestra selectivamente todo el GSH, manteniendo el GSSG inalterado. Tras este paso de bloqueo, se procede a reducir el GSSG a GSH, lo que permite su cuantificación final mediante luminiscencia. Este procedimiento permite determinar con precisión la proporción de GSSG en el total de glutatión, lo que es un parámetro más sensible de estrés oxidativo que la medición del GSH total por sí solo.

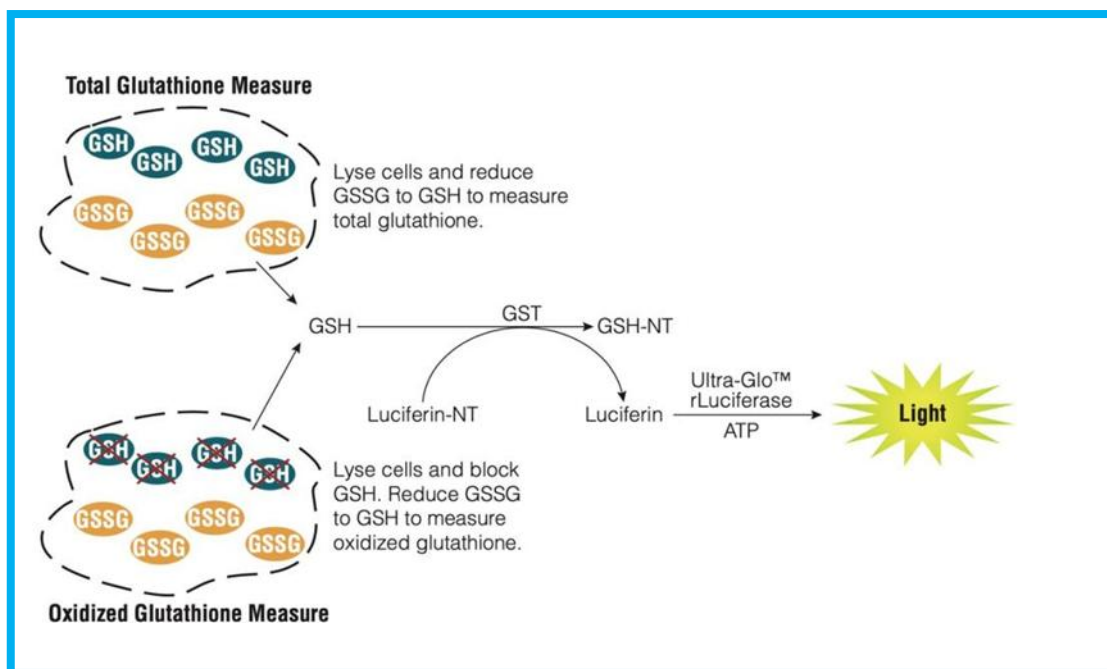


Figura 32. Reacciones para medir glutatión total y oxidado (kit GSH/GSSG-Glo Assay).

- **Metodología para la determinación de glutatión intracelular (GSH y GSSG)**

A. El procedimiento experimental para la cuantificación de glutatión intracelular (GSH y GSSG) en células adheridas se llevó a cabo siguiendo una serie de pasos:

1. Preparación de las células: Las células, previamente sembradas y adheridas durante 24 horas en una placa de 96 pocillos, fueron sometidas a tratamiento con los compuestos en estudio o con el vehículo correspondiente (control).
2. Lisis celular: Las células fueron lavadas con PBS para eliminar cualquier resto de tratamiento que pudiera interferir con la lisis celular y la posterior reacción enzimática. Posteriormente, se añadió el reactivo de lisis específico para cada determinación. Se empleó un reactivo de lisis de glutatión total para el conjunto de células destinadas a la medición de glutatión total, y el reactivo de lisis de glutatión oxidado para el conjunto de células reservadas para la medición de GSSG.

3. Adición del reactivo de generación de luciferina: El reactivo de generación de luciferina, que contiene la enzima glutatión S-transferasa (GST) y el sustrato luciferina-NT, se añadió a los pocillos, mediante agitación suave. A continuación, se procedió a una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, la GST cataliza la conversión de luciferina-NT a luciferina en presencia de glutatión reducido (GSH). La cantidad de GSH en la muestra determina la cantidad de luciferina que se genera.
4. Adición del reactivo de detección de luciferina: El reactivo de detección de luciferina, que contiene la enzima luciferasa, se incorporó a todos los pocillos, seguido de una mezcla cuidadosa para asegurar una distribución uniforme del reactivo en el pocillo. Después de un reposo de 15 minutos para permitir la reacción a temperatura ambiente, se realizó la medición de la luminiscencia utilizando un lector de microplacas. La luciferasa cataliza la oxidación de la luciferina, produciendo luminiscencia cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de luciferina presente y, por lo tanto, a la cantidad de GSH en la muestra.

B. El procedimiento experimental para la cuantificación de glutatión intracelular (GSH y GSSG) en células en suspensión se llevó a cabo siguiendo una serie de pasos:

1. Preparación de Células: Las células, previamente sembradas durante 24 horas en una placa de 96 pocillos, fueron sometidas a tratamiento con los compuestos en estudio o con el vehículo correspondiente (control). Tras este tiempo, añadimos 20 μ l de suspensión celular por pocillo a una nueva placa de 96 pocillos compatible con la lectura en luminiscencia.
2. Añadir 5 μ l del compuesto de prueba o vehículo a 5X concentración por pocillo.
3. Añadir 25 μ l de Lisis Total de Glutatión o Lisis de Glutatión Oxidado (dependiendo de lo que se quiera medir). Usar el reactivo de lisis en un plazo de 30 minutos tras su preparación.
4. Agitar la placa durante 5 minutos.

5. Añadir 50 µl de Reactivo Generador de Luciferina recién preparado. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 100 µl de Reactivo Detector de Luciferina, agitar brevemente, esperar 15 minutos y medir la luminiscencia.

- **Cálculo de ratios GSH/GSSG:**

La señal luminiscente, medida en Unidades Relativas de Luz (RLU), fue la base para todos los cálculos. Esta señal permitió, por un lado, obtener directamente la proporción GSH/GSSG y, por otro, cuantificar las concentraciones de glutatión mediante interpolación a partir de una recta patrón previamente establecida utilizando soluciones de glutatión de concentración conocida. La curva estándar permite convertir las unidades de luminiscencia en concentraciones de glutatión

Es importante destacar que este procedimiento permite la medición independiente de glutatión total y GSSG, lo que posibilita el cálculo preciso de la proporción GSH/GSSG. Esta proporción es un indicador clave del estado redox celular y del estrés oxidativo. Un ratio GSH/GSSG elevado indica un ambiente celular reductor y una buena capacidad antioxidante, mientras que un ratio bajo sugiere estrés oxidativo y un compromiso de la capacidad antioxidante de la célula.



Figura 33. Kit de glutatión de Promega.

- **Cálculo de fracciones de glutatión a partir de la curva estándar de GSH**

El cálculo de las fracciones de glutatión (GSH y GSSG) se realiza mediante los siguientes pasos:

1. Elaboración de curvas estándar:

- Se preparan soluciones de GSH y GSSG de concentraciones conocidas, que abarquen un rango adecuado para la construcción de la curva estándar.
- Se mide la luminiscencia (RLU) correspondiente a cada concentración de GSH y se grafica RLU neto (RLU de la muestra menos RLU del blanco) frente a la concentración de GSH en μM . Este gráfico representa la curva estándar de GSH.
- Se elabora un segundo gráfico. Para ello, se dividen por dos los valores del eje x (concentraciones de GSH) del primer gráfico. Esto se debe a que por cada mol de GSSG se generan 2 moles de GSH. Se obtiene la concentración equivalente al dividir las concentraciones de GSH a la mitad de GSSG. Este segundo gráfico representa la curva estándar de GSSG.

2. Conversión de RLU a concentraciones:

Utilizando la pendiente (m) obtenida de la porción lineal de cada curva estándar (tanto la de GSH como la de GSSG) y la fórmula de la recta ($y = mx + b$), se convierten los valores promedio de RLU neto de las células tratadas y no tratadas a concentraciones micromolares de GSSG y GSH. La ecuación de la recta permite calcular la concentración de glutatión en las muestras a partir de la luminiscencia medida.

3. Determinación de la concentración de GSH:

Para obtener la concentración de glutatión, se resta la contribución de GSSG del valor total. Para ello, se multiplican los valores micromolares de GSSG por dos (ya que cada molécula de GSSG se reduce a dos de GSH) y se restan del valor total de glutatión. De esta manera, se obtiene la concentración de GSH.

4. Cálculo de ratios:

Se calculan los ratios de GSH/GSSG utilizando las fórmulas correspondientes

$$\text{Ratio GSH / GSSG control} = \frac{\mu\text{M glutatión total vehículo} - (\mu\text{M GSSG vehículo} \times 2)}{[\mu\text{M GSSG vehículo}]}$$

$$\text{Ratio GSH / GSSG tratado} = \frac{\mu\text{M glutatión total tratado} - (\mu\text{M GSSG tratado} \times 2)}{[\mu\text{M GSSG tratado}]}$$

Es importante destacar que la precisión en la determinación de las fracciones de glutatión depende en gran medida de la calidad de las curvas estándar y de la correcta aplicación de los cálculos.

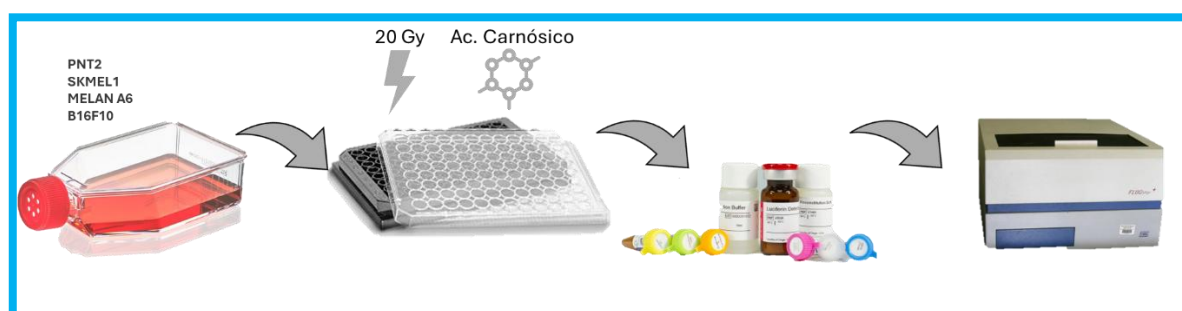


Figura 34. Protocolo de determinación de glutatión: Irradiación (20 Gy) y medición de glutatión en células PNT2, SKMEL1, MELAN A6 y B16F10.

4. DETECCIÓN DE APOPTOSIS

a. Detección de Apoptosis mediante el Ensayo de Anexina V.

La apoptosis, fue investigada utilizando el kit Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, España, Madrid). Este kit se basa en la capacidad de la anexina V para unirse a la fosfatidilserina (PS), un

fosfolípido que, en células sanas, se encuentra principalmente en el interior de la membrana plasmática.

En las primeras etapas de la apoptosis, la PS se transloca hacia la superficie externa de la membrana celular, donde se vuelve accesible a la anexina V. La anexina V, marcada con un fluorocromo Alexa Fluor® 488, se une a la PS, lo que permite la detección de células apoptóticas tempranas. En etapas más avanzadas de la apoptosis, la membrana celular pierde su integridad, permitiendo el ingreso del ioduro de propidio (PI), un colorante que se une al ADN. Las células en este estado final de apoptosis se marcan tanto con anexina V como con PI.

El protocolo experimental se realizó siguiendo estrictamente el manual del producto para garantizar la precisión y confiabilidad de los resultados:

1. **Lavado y cosecha celular:** Las células, previamente tratadas, se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría para eliminar cualquier resto de medio de cultivo o compuestos de tratamiento. Posteriormente, fueron cosechadas mediante desprendimiento de la superficie de cultivo.
2. **Marcaje celular:** Tras la centrifugación y resuspensión de las células en PBS, se añadieron 5 µL de anexina V Alexa Fluor® 488 (Componente A del kit) a la suspensión celular. A continuación, se agregó 1 µL de ioduro de propidio (PI) a una concentración de 100 µg/mL por cada 100 µL de cultivo celular en suspensión.
3. **Incubación y adición de tampón:** La mezcla celular se incubó durante 15 minutos en condiciones de oscuridad para permitir la unión de la anexina V y el PI a las células. Transcurrido este tiempo, se añadieron 400 µL de tampón de unión a cada muestra, manteniendo las muestras en un baño de hielo para detener cualquier proceso celular adicional.
4. **Análisis por citometría de flujo:** Inmediatamente después de la adición del tampón, las células teñidas fueron analizadas mediante citometría de flujo. Se midió la fluorescencia a longitudes de onda de 530 nm y 575 nm,

utilizando una excitación de 488 nm en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

5. **Tinción para microscopía:** Adicionalmente, se tiñeron células con anexina V para su visualización mediante MO, lo que proporcionó información complementaria sobre la distribución de la PS y la morfología celular durante el proceso de apoptosis

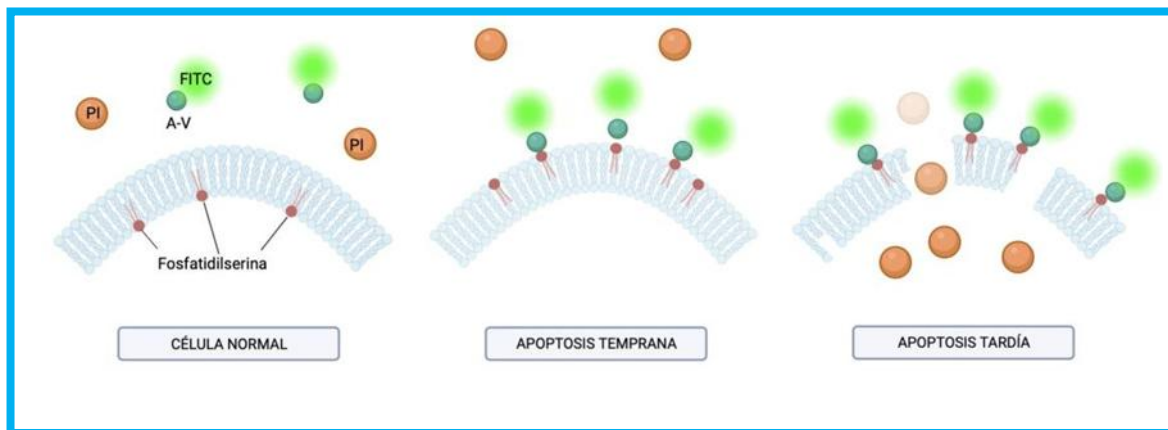


Figura 35. Etapas de la Apoptosis: Una Representación Visual. Describe la progresión de la apoptosis, destacando los cambios clave en la estructura celular. En una célula normal y sana, la fosfatidilserina (PS) se localiza en la capa interna de la membrana celular, protegida de la detección externa. Las moléculas de anexina V (A-V), marcadas con un fluoróforo (F), no pueden unirse a la PS en estas condiciones. Durante la apoptosis temprana, la PS se va translocando hacia la capa externa de la membrana, volviéndose accesible a la anexina V, que ahora puede unirse y ser detectada. A medida que progresa la apoptosis, la integridad estructural de la membrana celular se deteriora, lo que conduce a la permeabilización y, en última instancia, a la destrucción celular.

5. ANALISIS DEL CICLO CELULAR

Las líneas celulares PNT2, SKMEL1, MELAN A6 y B16F10 se cultivaron en placas de cultivo de 25 cm² con 5 mL de medio de cultivo apropiado y se incubaron en

condiciones estándar (37°C, 5% CO₂, y humedad controlada). Una vez alcanzada la confluencia adecuada, los medios de cultivo fueron reemplazados con medios frescos y las células fueron tratadas con las diferentes condiciones experimentales durante 24 horas.

Para los grupos experimentales sometidos a irradiación, se administró ácido carnosíco (CA) a una concentración final de 25 µM. Transcurridos 30 minutos desde la administración del compuesto, las muestras fueron irradiadas con una dosis determinada de rayos X.

A las 48 horas de finalizada la exposición, las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio de cultivo y centrifugadas a 200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recontaron las células y se ajustó la concentración celular a 1x10⁶ células en 200 µL de PBS frío. Para la fijación, las suspensiones celulares se colocaron en hielo y se les añadieron, con agitación suave y en goteo, 2 mL de una solución de etanol al 70% en PBS. Las muestras se mantuvieron en esta solución durante 30 minutos a 4°C para lograr una adecuada permeabilización celular.

Tras la fijación, las células fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue descartado. El sedimento celular se resuspendió en 800 µL de PBS frío. Para la tinción del ADN, se añadieron a cada muestra 100 µL de una solución de yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 400 µg/mL y 100 µL de RNasa A (1 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en PBS. Las muestras fueron incubadas en oscuridad y a 4°C durante 30 minutos para garantizar una correcta intercalación del PI con el ADN celular.

La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), utilizando un láser de excitación a 488 nm y un filtro de emisión de 585/42 nm. Los histogramas de contenido de ADN fueron generados y analizados con el software ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME, EE. UU.), utilizando el modelo de ajuste adecuado para la determinación de la distribución celular en las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M). Todos los

experimentos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.

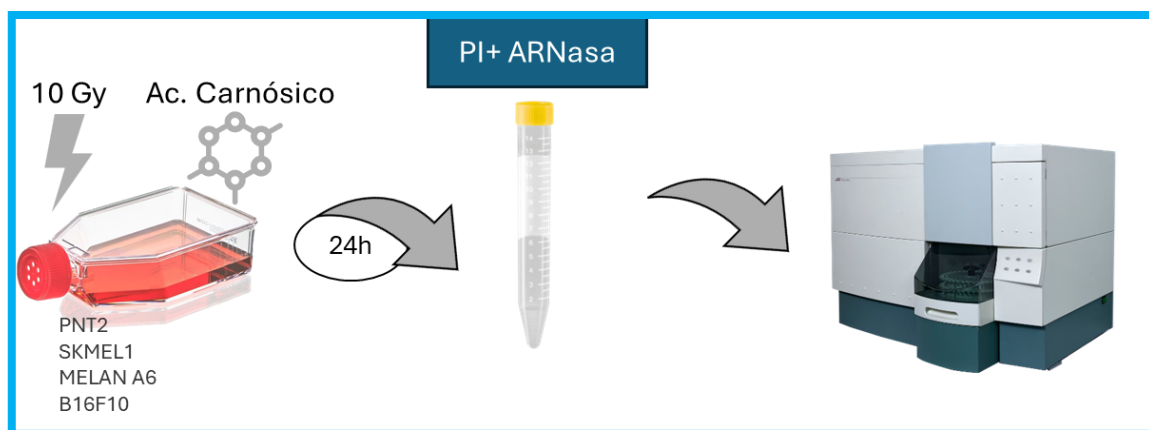


Figura 36. Protocolo de análisis del ciclo celular: Irradiación (10 Gy) en células PNT2, SKMEL1, MELAN A6 y B16F10.

6. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, utilizando el paquete de software estadístico BMDP (Versión 1988; IBM PC/DOS). Este software permitía realizar una amplia variedad de análisis estadísticos, incluyendo análisis de varianza, regresión y correlación.

• Experimentos de genoprotección

En los experimentos de genoprotección, se realizaron comparaciones entre los diferentes grupos experimentales (control, tratado con el compuesto en estudio, tratado con el vehículo) mediante contrastes de igualdad de medias, empleando análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Este análisis permitió determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los grupos en cuanto a la frecuencia de micronúcleos. Adicionalmente, se llevaron a cabo análisis de regresión lineal y polinómica para evaluar la relación entre la dosis del compuesto

en estudio y la frecuencia de micronúcleos. También se realizaron análisis de correlación para evaluar la relación entre otras variables, como la concentración de glutatión y la frecuencia de micronúcleos. Se estableció un nivel de significación estadística de $p < 0,05$ para todos los análisis, lo que significa que se consideró que una diferencia entre grupos era estadísticamente significativa si la probabilidad de que esta diferencia se debiera al azar era inferior al 5%.

- **Ensayos de determinación in vivo e in vitro de micronúcleos, apoptosis y glutatión intracelular**

El análisis estadístico de los ensayos de micronúcleos, apoptosis y glutatión intracelular (*in vivo* e *in vitro*) se realizó aplicando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía complementado con contrastes de medias post hoc (como el test de Tukey o el test de Dunnett) para analizar la asociación estadística existente entre las variables medidas (frecuencia de micronúcleos, porcentaje de apoptosis, niveles de glutatión) y los diferentes tratamientos experimentales. Los contrastes post hoc permitieron determinar qué grupos diferían significativamente entre sí en caso de que el ANOVA resultara significativo. Las medias cuantitativas de los grupos se compararon mediante análisis de regresión lineal y correlación para evaluar la relación entre las variables y los tratamientos.

- **Cálculo del factor de protección (FP)**

Con el fin de evaluar el nivel de protección, también llamado factor de protección (FP), se analizó la reducción en la incidencia de micronúcleos, un valor que se expresa como porcentaje de protección, utilizando la siguiente fórmula, basada en la descripción de Sarma y Kesavan (1993) [189]:

$$FP (\%) = (F \text{ control} - F \text{ tratado} / F \text{ control}) \times 100$$

Donde:

- FP representa la magnitud de la protección, expresada en porcentaje.

- F control es la frecuencia de micronúcleos observada en las muestras de control irradiadas.
- F tratado es la frecuencia de micronúcleos detectada en las muestras irradiadas y tratadas.

Esta fórmula permite cuantificar el porcentaje de reducción en la frecuencia de micronúcleos debido al tratamiento, en comparación con el grupo control irradiado.

- **Ensayo de supervivencia celular**

Con el objetivo de comparar el efecto de las diferentes concentraciones sobre la supervivencia celular, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Como análisis post-hoc, se utilizó la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (M.D.S.) para establecer qué pares de concentraciones diferían de forma estadísticamente significativa en su impacto sobre la viabilidad celular.

En este contexto específico, se adaptó la fórmula previamente mencionada [189] para calcular el FP en términos de supervivencia celular, de la siguiente manera:

$$FP (\%) = (\text{Control M irradiado} - \text{Tratado M irradiado} / \text{Control M irradiado}) \times 100$$

Donde M representa el porcentaje de mortalidad celular en relación con las células de control no irradiadas.

- **Transformación logarítmica de los datos**

Previo a los análisis estadísticos, los datos fueron transformados logarítmicamente para asegurar el cumplimiento de las condiciones requeridas para la aplicación del análisis de varianza (ANOVA), como la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas. La transformación logarítmica es una técnica común utilizada en estadística para corregir problemas de distribución no normal y varianzas no homogéneas en los datos.

IV. RESULTADOS

1. ENSAYO DE GENOTOXICIDAD. ENSAYOS IN VIVO E IN VITRO.

a. Test de Micronúcleos en Linfocitos Humanos bloqueados con citochalasina B (CBMN).

Los resultados de nuestro estudio genotóxico en linfocitos humanos fueron de 10 ± 2 MN/500 CB en las muestras de sangre del grupo control no irradiado.

La irradiación con 2 Gy provocó un aumento significativo en la aparición de MN, alcanzando 27 ± 4 MN/500 CB ($p < 0.001$), lo que indica un daño genotóxico inducido por los rayos X.

El tratamiento con ácido carnósico no mostro un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos lo que muestra una ausencia de genotoxicidad a las dosis administradas.

El tratamiento con 25 μ l de ácido carnósico a las células irradiadas disminuye la frecuencia de micronúcleos hasta 13 ± 3 MN/500 CB ($p < 0.001$) lo que sugiere una capacidad genoprotectora contra el daño cromosómico inducido por la radiación como muestra la figura 37.

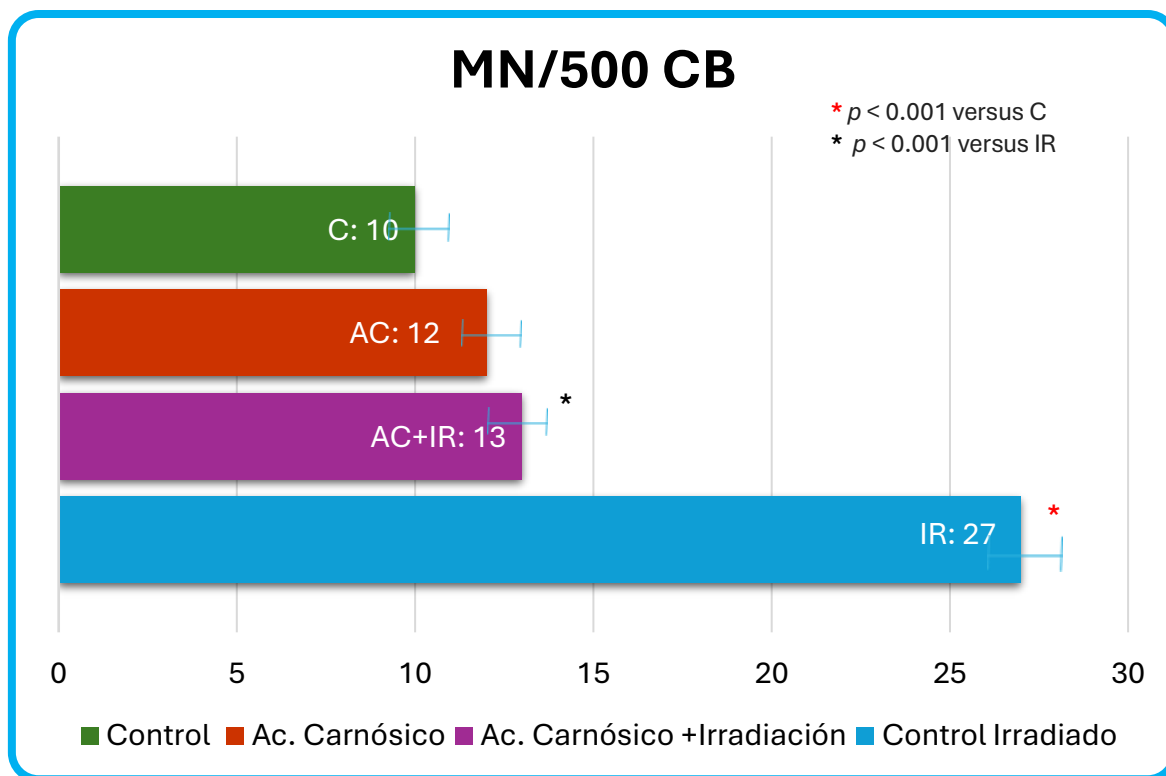


Figura 37. Frecuencia de micronúcleos en células binucleadas

b. Test de Micronúcleos de Eritrocitos policromáticos (MNPCEs) en Médula Ósea de ratón.

Se estableció la frecuencia basal de micronúcleos (MN/1000 PCEs) en el grupo de roedores control, obteniendo un valor de $3,1 \pm 1,1$. Como se observa en la figura 38, el tratamiento con Ácido Carnósico (AC) no alteró significativamente esta frecuencia ($4 \pm 0,7$), ya que no se encontraron diferencias estadísticas respecto al grupo control (C). Este hallazgo demuestra la nula actividad genotóxica del AC en este modelo animal.

La exposición de los roedores a 50 cGy de los rayos X (IR) produjo en nuestro estudio un aumento significativo en los MNPCEs/1000 PCEs ($18,7 \pm 1,1$ MNPCEs/1000 PCEs) con respecto a la frecuencia basal presentada por los animales de control ($3,1 \pm 1,1$ MNPCEs/1000 PCEs) ($p < 0.001$).

Se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en la incidencia de micronúcleos (MN) cuando se administró AC antes de la irradiación (grupo AC+IR). Frente a los $18,7$ MN/1000 PCEs del grupo que únicamente recibió

radiación (IR), el grupo pretratado con AC mostró un nivel de solo 7,3 MN/1000 PCEs, lo que evidencia la actividad genoprotectora del compuesto.

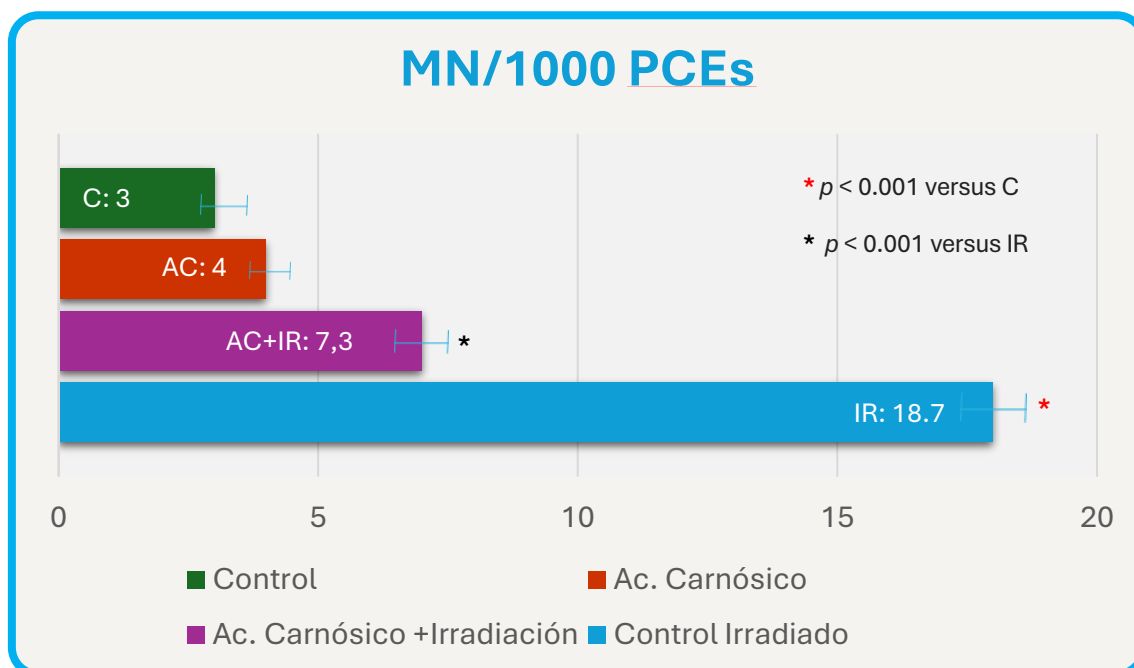


Figura 38. Frecuencia de micronúcleos en eritroblastos policromatófilos de medula ósea.

c. Test de Micronúcleos Reticulocitos (MN-RET) en Sangre periférica de ratón.

En nuestro estudio de citometría de flujo para la detección de Micronúcleos (MN) en Reticulocitos (RET), la exposición de los animales a 2 Gy de rayos X (IR) produjo un aumento en la frecuencia de aparición de micronúcleos en comparación con los animales de control (C), mostrando una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre ambos grupos, lo que indica una inducción de daño genotóxico inducido por rayos X.

Se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la incidencia de micronúcleos en el grupo pretratado con AC antes de la irradiación (AC+IR), en comparación con el grupo que únicamente recibió rayos X. (IR), lo que demuestra su capacidad para proteger contra el daño genotóxico inducido por radiación ionizante (Figura 39).

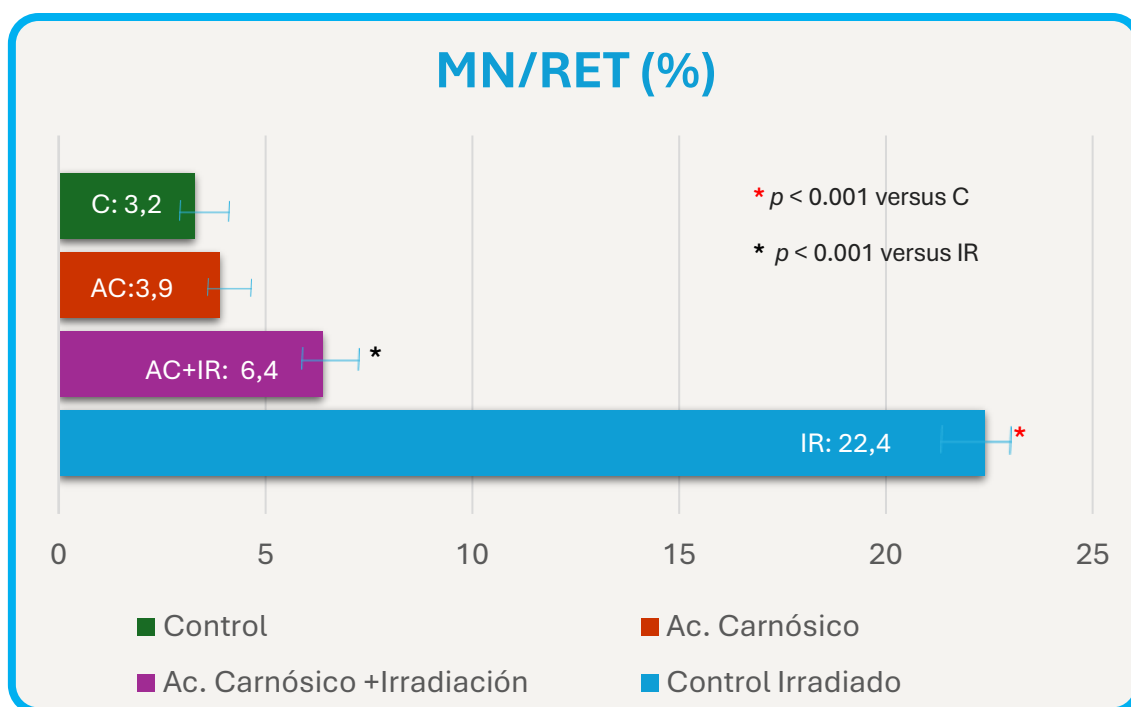


Figura 39. Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos en sangre periférica

2. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD. ENSAYOS DE MTT Y XTT.

a. Resultados ensayo MTT en cultivos de células de próstata humanas PNT2.

Se determinó la tasa de supervivencia de las células PNT2 sometidas a una dosis de 20 Gy de Radiación Ionizante. Los valores porcentuales de supervivencia celular, con mediciones tomadas a las 24 y 48 horas, se detallan en la tabla 1 y se ilustran gráficamente en la figura 40.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia (%) en cultivos de PNT2 sometidos a 25 μ M de AC y una irradiación de 20 Gy. Datos fueron registrados tras 24 y 48 horas de incubación.

	C	CI	CCA	CICA
0h	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00
24h	100 $\pm$ 4.00	69 $\pm$ 2.75	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00
48h	100 $\pm$ 4.00	61 $\pm$ 2.42	81 $\pm$ 3.25	100 $\pm$ 4.00

La exposición a una dosis de 20 Gy provocó una reducción en el porcentaje de células PNT2 viables, tanto a las 24 como a las 48 horas post-irradiación. Mientras que los cultivos control no expuestos a radiación mantuvieron una supervivencia del 100% en ambos puntos temporales, las células irradiadas mostraron una viabilidad de solo el 31,3 % a las 24 h y del 39,2 % a las 48 h. Esta disminución confirma la capacidad citotóxica de la radiación ionizante en esta línea celular y fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Para valorar el impacto del AC sobre la supervivencia de las células PNT2 se administraron 25 microlitros de AC a 25 μ M y se evaluó el porcentaje de supervivencia a las 24 y a las 48 horas de incubación. Como se observa en la figura 40 la adición de AC 25 μ M a las células PNT2 provocó una disminución del 0,21% y del 18,63% en la viabilidad celular a las 24 y 48 horas de incubación, respectivamente.

Se evaluó la supervivencia de las células PNT2 después de ser tratadas con 25 μ M de ácido carnósico y, posteriormente, expuestas a radiación. Las células se incubaron durante 24 horas y luego se midió el porcentaje de células que sobrevivieron al tratamiento, mostrando un aumento de la supervivencia celular a las 48h de hasta el 98,3% mostrando así la capacidad radioprotectora del ácido carnósico a las dosis administradas sobre las células PNT2.

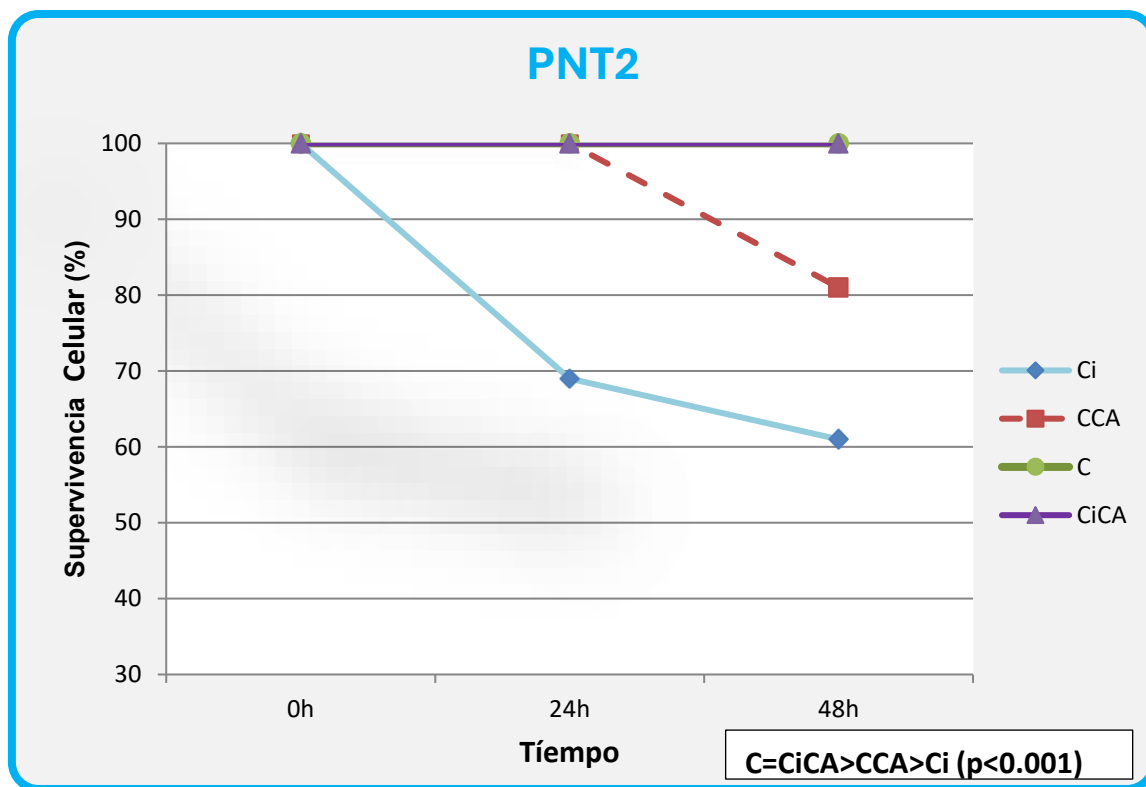


Figura 40. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de PNT2.

b. Resultados ensayo MTT en cultivos de células de melanoma murino B16F10.

Se evaluó la supervivencia celular de las células B16F10 al ser expuestas a una dosis de Radiación Ionizante (20 Gy) y/o Ácido Carnósico (25 μ M), mediante ensayo MTT con lecturas a las 24 y 48 horas post-tratamiento (Tabla 2 y Figura 41).

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia celular (%) en cultivos de B16F10, tras ser sometidos al tratamiento con 25 μ M de Ácido Carnósico y a 20 Gy de radiación. Las mediciones fueron realizadas a las 24 y 48 horas.

	C	CI	CCA	CICA
0h	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00
24h	100 $\pm$ 4.00	66 $\pm$ 2.63	100 $\pm$ 4.00	82 $\pm$ 3.28
48h	100 $\pm$ 4.00	59 $\pm$ 2.36	85 $\pm$ 3.40	39 $\pm$ 1.56

Las células de control, que no recibieron ningún tratamiento, mostraron una supervivencia del 100% a las 24 y 48 horas. Sin embargo, al exponer las células B16F10 a la dosis de radiación, se observó una reducción significativa en su viabilidad.

Específicamente, a las 24 horas, la supervivencia celular disminuyó al 66% (una reducción del 34%). Esta tendencia continuó a las 48 horas, con la supervivencia cayendo al 59% (una reducción del 41%). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$), lo que demuestra el efecto citotóxico de la radiación ionizante en las células de melanoma B16F10.

Para valorar el impacto del AC por sí solo sobre la supervivencia de las células B16F10, se administró AC 25 μ M (CCA) y se evaluó el porcentaje de supervivencia a las 24 y a las 48 horas. La adición de AC 25 μ M a las células B16F10 (CCA) no provocó disminución de la viabilidad celular a las 24 horas (100% supervivencia), pero sí una disminución del 15% a las 48 horas de incubación (85% supervivencia).

En los cultivos de células B16F10 tratados con 25 μ M de ácido carnósico (AC) y expuestos a la radiación (grupo CiCA), se observó una supervivencia del 82% a las

24 horas y del 39% a las 48 horas. A diferencia de los resultados obtenidos en las células PNT2, en las células B16F10 el pretratamiento con AC no confirió protección frente a la radiación. De hecho, a las 48 horas la situación se invirtió drásticamente, cayendo la supervivencia en el grupo CiCA al 39%, un valor notablemente inferior al 59% observado en el grupo Ci (solo irradiación). Estos hallazgos demuestran que el ácido carnósico (AC) no solo carece de capacidad radioprotectora, sino que actúa como un potente agente radiosensibilizador en las células B16F10.

La combinación de AC y radiación resultó en una disminución de la supervivencia celular del $32.1 \pm 3.5\%$, lo que representa una reducción de la viabilidad celular de casi el doble en comparación con la radiación aplicada de manera individual. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

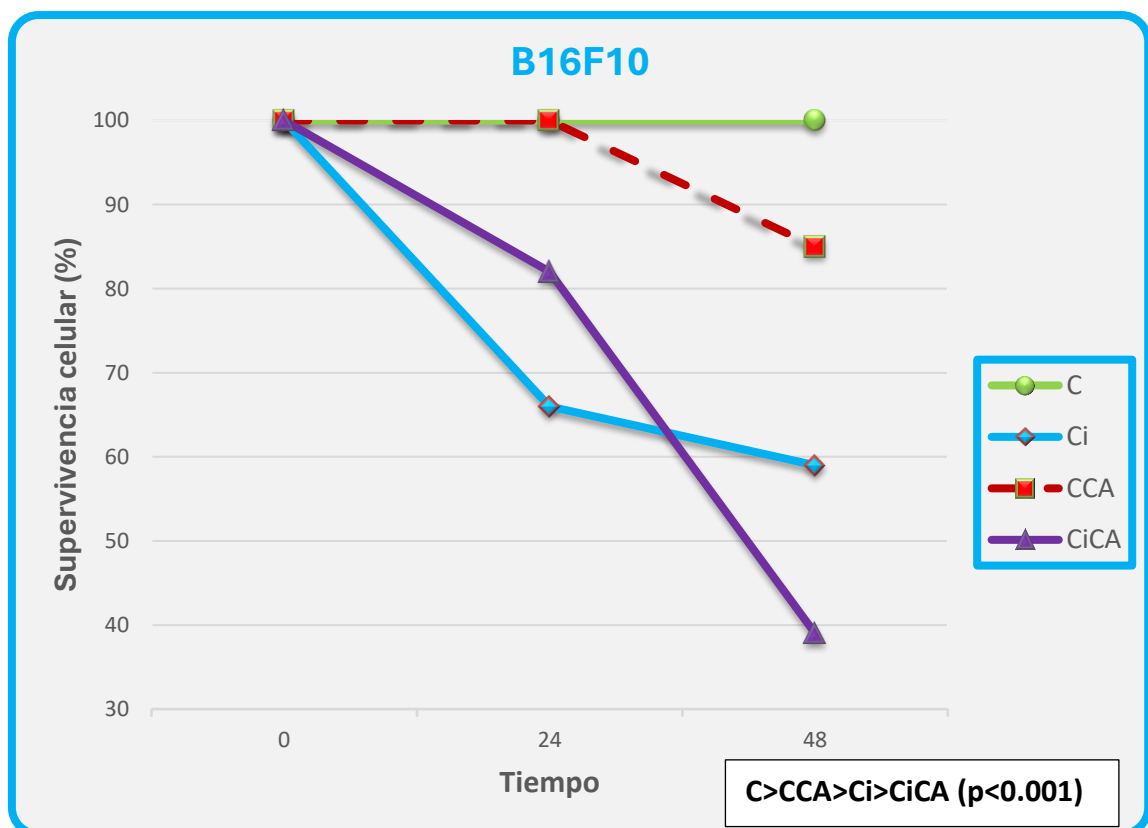


Figura 41. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de B16F10.

c. Resultados ensayo MTT en cultivos de células de Melanocitos murinos MELAN-A6.

Se analizó la supervivencia celular de la línea celular de melanocitos murinos MELAN A6 tras la exposición a Radiación Ionizante (20 Gy) y/o Ácido Carnósico (AC, 25 μ M). La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT, realizando mediciones a las 24 y 48 horas después de los tratamientos (Tabla 3 y Figura 42).

- **Tabla 3.** Porcentaje de células Melan-A6 (%) que sobrevivieron después de ser tratadas con ácido carnósico (AC) a una concentración de 25 μ M y a 20 Gy de rayos X. Los resultados se registraron 24 y 48 horas después del tratamiento para evaluar la viabilidad celular.

	C	CI	CCA	CICA
0h	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00
24h	100 $\pm$ 4.00	70 $\pm$ 2.82	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00
48h	100 $\pm$ 4.00	57 $\pm$ 2.27	86 $\pm$ 3.42	55 $\pm$ 2.21

Se constata una reducción en el porcentaje de células MELAN A viables que recibieron la dosis de radiación (grupo Ci), observándose este efecto tanto a las 24 como a las 48 horas post-irradiación. Los cultivos control (C), sin tratamiento, mantuvieron una supervivencia del 100% durante todo el experimento. En contraste, las células MELAN A expuestas únicamente a la radiación (Ci) mostraron una disminución en la supervivencia del 30% a las 24 h (supervivencia del 70%) y del 43% a las 48 h (supervivencia del 57%). Esto confirma el efecto citotóxico de la radiación ionizante sobre las células MELAN A con significancia estadística ($p < 0,001$).

Al evaluar el efecto del AC por sí solo (grupo CCA), se observó que la administración de AC 25 μ M no afectó la viabilidad a las 24 horas (100%

supervivencia), pero indujo una disminución del 14% a las 48 horas (86% supervivencia), indicando una leve toxicidad tardía del compuesto en estas células.

Los resultados de los cultivos de MELAN A tratados con AC 25 μ M antes de ser irradiados (grupo CiCA) presentaron un comportamiento particular. A las 24 horas, estas células mostraron una supervivencia del 100%, marcadamente superior al 70% observado en las células que solo recibieron radiación (Ci), sugiriendo un potente efecto protector inicial del AC. Sin embargo, este efecto protector fue transitorio. A las 48 horas, la supervivencia del grupo CiCA disminuyó drásticamente hasta el 55%, un valor muy similar e incluso ligeramente inferior al 57% registrado en el grupo Ci (solo radiación). La información confirma que, a las 48 horas, no existe una diferencia significativa en la supervivencia entre las células tratadas con AC + radiación y las células tratadas solo con radiación.

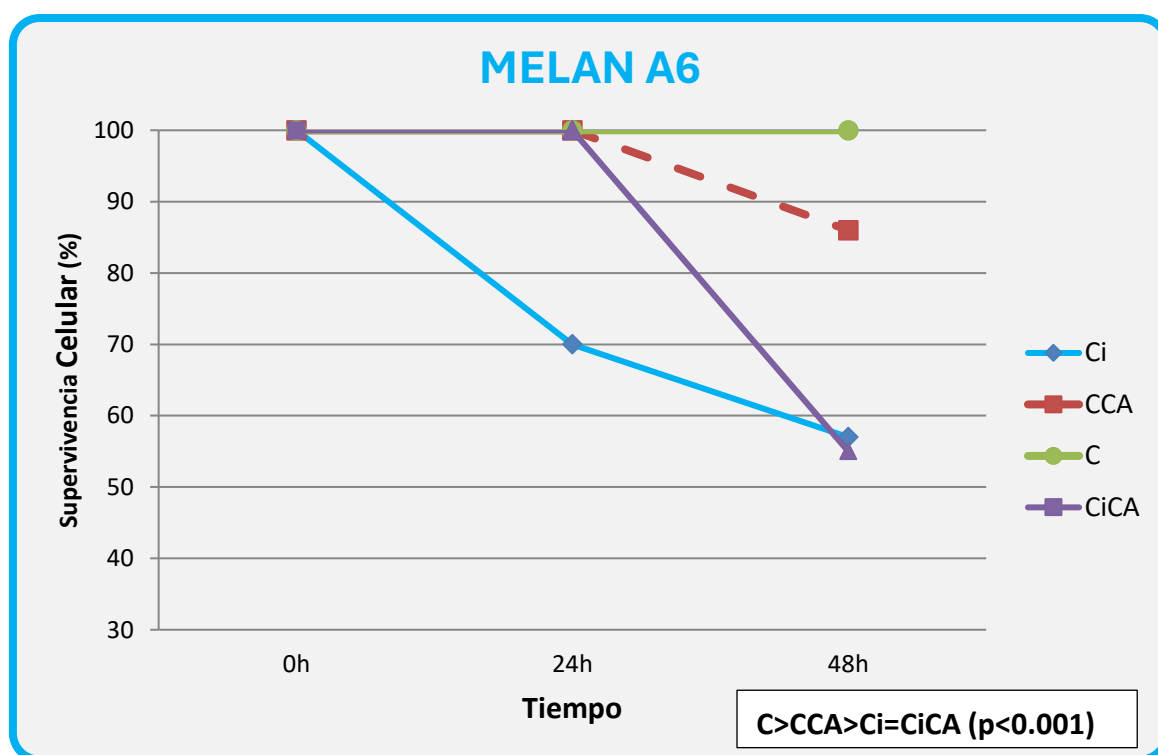


Figura 42. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de MELAN-A6.

En conclusión, para las células MELAN A bajo las condiciones experimentales estudiadas, el Ácido Carnósico parece ofrecer una fuerte protección contra el daño inducido por radiación a corto plazo (24 horas), pero este efecto radioprotector no

se mantiene a largo plazo (48 horas). A las 48 horas, la viabilidad celular del grupo tratado con AC antes de la irradiación es comparable a la del grupo que solo recibió radiación, indicando una ausencia de radioprotección sostenida en esta línea celular. Este patrón difiere tanto de la protección duradera vista en PNT2 como de la posible radiosensibilización observada en B16F10.

d. Resultados ensayo XTT en cultivos de células de melanoma humano SKMEL-1

Se estudió la respuesta de las células de SKMEL 1 a la Radiación Ionizante (20 Gy) y/o al tratamiento con Ácido Carnósico (AC, 25 μ M). La supervivencia celular se cuantificó mediante el ensayo XTT a las 24 y 48 horas tras la aplicación de los tratamientos (Tabla 4 y Figura 43).

- **Tabla 4.** Porcentaje de supervivencia celular (%) en la línea de melanoma humano SKMEL-1 después del tratamiento combinado con AC (25 μ M) y 20 Gy de radiación. La evaluación se realizó a las 24 y 48 horas.

	C	CI	CCA	CICA
0h	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00
24h	100 $\pm$ 4.00	71 $\pm$ 2.83	100 $\pm$ 4.00	100 $\pm$ 4.00
48h	100 $\pm$ 4.00	58 $\pm$ 2.31	78 $\pm$ 3.13	55 $\pm$ 2.23

La exposición a la radiación (grupo Ci) indujo una disminución de la viabilidad en las células SKMEL 1. Mientras los cultivos control (C) mostraron un 100% de supervivencia en todo momento, las células irradiadas (Ci) presentaron una reducción en la supervivencia del 29% a las 24 horas (supervivencia del 71%) y del

42% a las 48 horas (supervivencia del 58%). Estos datos confirman el efecto citotóxico de la radiación sobre esta línea celular con significancia estadística ($p < 0,001$).

El tratamiento exclusivo con AC 25 μM (grupo CCA) no afectó la supervivencia celular a las 24 horas (100%), pero sí produjo una disminución de la viabilidad del 22% a las 48 horas (supervivencia del 78%), sugiriendo una toxicidad moderada del compuesto a largo plazo en las células SKMEL 1.

En cuanto al efecto combinado (grupo CiCA), las células SKMEL 1 tratadas con AC antes de la irradiación mostraron una supervivencia del 100% a las 24 horas. Este valor es notablemente superior al 71% observado en el grupo que solo recibió radiación (Ci), indicando un efecto radioprotector muy marcado por parte del AC a corto plazo. Sin embargo, de forma similar a lo observado en las células MELAN A, esta protección fue transitoria. A las 48 horas, la supervivencia de las células en el grupo CiCA descendió significativamente hasta el 55%. Este nivel de supervivencia es muy parecido, e incluso ligeramente inferior, al 58% registrado en el grupo Ci (solo radiación) en el mismo punto temporal.

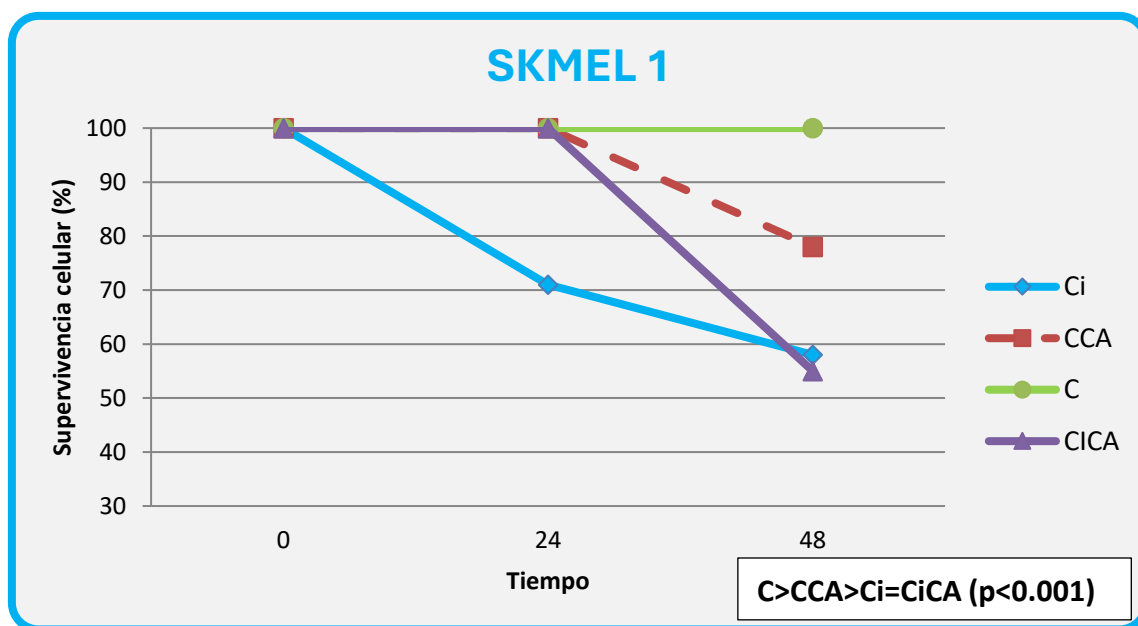


Figura 43. Curvas de supervivencia celular de los cultivos de SKMEL 1.

Por lo tanto, los resultados en las células SKMEL 1 indican que el Ácido Carnósico ejerce un efecto radioprotector inicial muy potente a las 24 horas, pero este efecto se pierde completamente a las 48 horas. A largo plazo, la supervivencia de las células que recibieron el tratamiento combinado es comparable a la de aquellas que solo fueron irradiadas, demostrando la ausencia de un beneficio radioprotector sostenido del AC en esta línea de melanoma humano bajo las condiciones estudiadas.

Resultados del Ensayo de Citotoxicidad (MTT y XTT). Conclusión.

En todas las líneas celulares probadas, la administración de AC (CCA) modificó la supervivencia celular comparándolo con el control (C) ($p < 0,01$), mostrando una ligera citotoxicidad a la concentración probada tras 48 horas de incubación. Asimismo, la radiación de 20 Gy de rayos X (Ci) produjo en todas las líneas celulares una disminución significativa de aproximadamente el 40% en la supervivencia celular con respecto a las células de control (C) ($p < 0,001$), lo que demostró la capacidad citotóxica de la radiación ionizante.

La administración de AC a los cultivos celulares antes de la irradiación (CiCA) produjo cambios significativos y diferentes en cada línea celular estudiada.

En la línea celular PNT2, el tratamiento combinado (CiCA) resultó en un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) de la supervivencia, en comparación con el grupo que únicamente recibió radiación (Ci). Este hallazgo demuestra la clara actividad citoprotectora del AC contra el daño por rayos X. Concretamente, se determinó un Factor de Protección (FP) del $97 \pm 1,1\%$, consiguiendo revertir el 67% de la letalidad por irradiación ($p < 0,001$) y logrando una viabilidad celular comparable a la de las muestras de control sin tratar.

Por el contrario, la administración de AC a los cultivos de B16F10 antes de la irradiación (CiCA) produjo una disminución estadísticamente significativa de la supervivencia celular ($p < 0,001$), potenciando el daño citotóxico inducido por los rayos X en comparación con el grupo irradiado (Ci). En estas células no se

determinó ningún factor de protección, confirmando la ausencia de capacidad radioprotectora del AC. En lugar de proteger, el ácido carnósico (AC) actuó como un potente radiosensibilizador en las células B16F10. Su combinación con la radiación redujo la supervivencia celular en un $32.1 \pm 3.5\%$, casi el doble de la muerte celular observada con la radiación sola. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Finalmente, en las líneas celulares Melan-A y SK-MEL-1, la administración de AC antes de la irradiación (CiCA) no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos que solo fueron irradiados (Ci). Esto demuestra que el AC no ejerce un efecto radiosensibilizador en estas células, pero también que se pierde el efecto radioprotector observado en las células sanas.

3. ENSAYO DE APOPTOSIS. ANEXINA V

Para la evaluación de la apoptosis en las distintas líneas celulares, se empleó citometría de flujo utilizando tinción con anexina V conjugada a un fluorocromo (FITC) e ioduro de propidio (PI). Los resultados obtenidos en este ensayo muestran el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V+/PI-) en PNT2, MELAN A6, B16F10, SKMEL-1.

De cada una se discriminó cuatro poblaciones celulares:

- Anexina V negativa / PI negativa: células vivas.
- Anexina V positiva / PI negativa: células en apoptosis.
- Anexina V positiva / PI positiva: células en apoptosis tardía o necróticas.

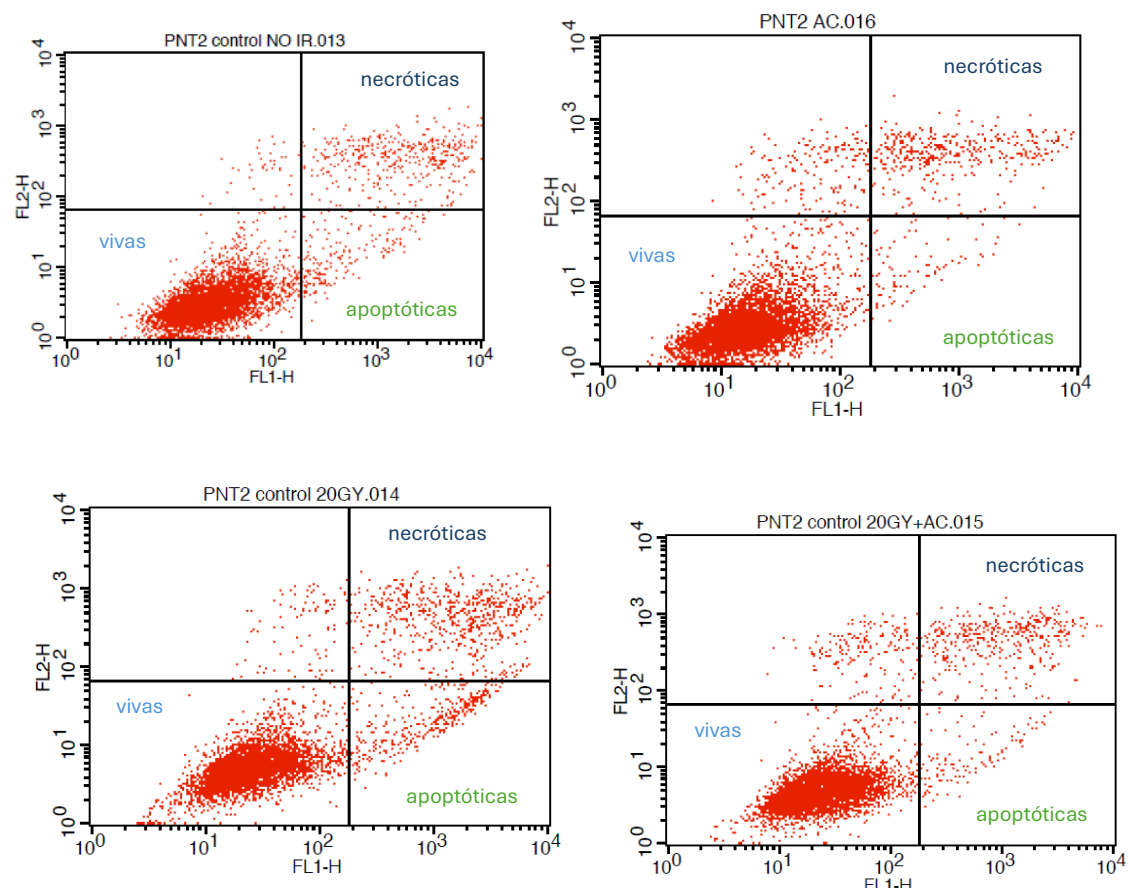


Fig. 44. Evaluación mediante citometría de flujo de la apoptosis celular utilizando tinción con anexina V conjugada a un fluorocromo (FITC) e ioduro de propidio (PI).

a. Resultados ensayo de Apoptosis en cultivos de células de próstata humanas PNT2.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V+/PI-) en las células PNT2 no tratadas fue de 2,95%. Tras el tratamiento con Ácido carnósico, se observó una disminución significativa en la población apoptótica, llegando a 1,23% en comparación con el control ($p < 0.05$). Además, el porcentaje de células en necrosis (Anexina V+/PI+) fue de 7,14% en las condiciones control y de 6,47% tras el tratamiento. En el que se irradia con 20 Gy, el porcentaje de apoptosis temprana alcanzó un valor máximo de 5,74%, mientras que la necrosis aumentó hasta 10,58%, sugiriendo una relación

dosis-dependiente en la inducción de muerte celular. Cuando a estas células irradiadas les administrábamos el ácido Carnósico en las concentraciones estudiadas, las células apoptóticas se disminuían hasta alcanzar un 1,85% y las necróticas hasta un 6,8% ($p < 0.05$) mostrando un claro efecto radioprotector sobre esta línea celular (Tabla 5 y Figura 45).

Tabla 5. Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en cultivos de células PNT2 tratadas con AC, 20 Gy de radiación o combinación.

	CELULAS VIVAS	CELULAS APOPTOTICAS	CELULAS NECROTICAS	CELULAS NECROTICAS TARDIAS
Control NO Irradiado- C	89.21 %± 3.58%	2.95 %± 0.12%	7.14 %± 0.29%	0.71 %± 0.03%
Ácido Carnósico- CCA	89.31 %± 3.56%	1.23%± 0.05%	6.47 %± 0.26%	2.99 %± 0.14%
20 Gy – Ci	82.22%± 3.27%	5.74%± 0.21%	10.58 %± 0.41%	1.46 %± 0.07%
20 Gy +AC- CiCA	88.40%± 3.52%	1.85%± 0.07%	6.80%± 0.28%	2.94%± 0.17%

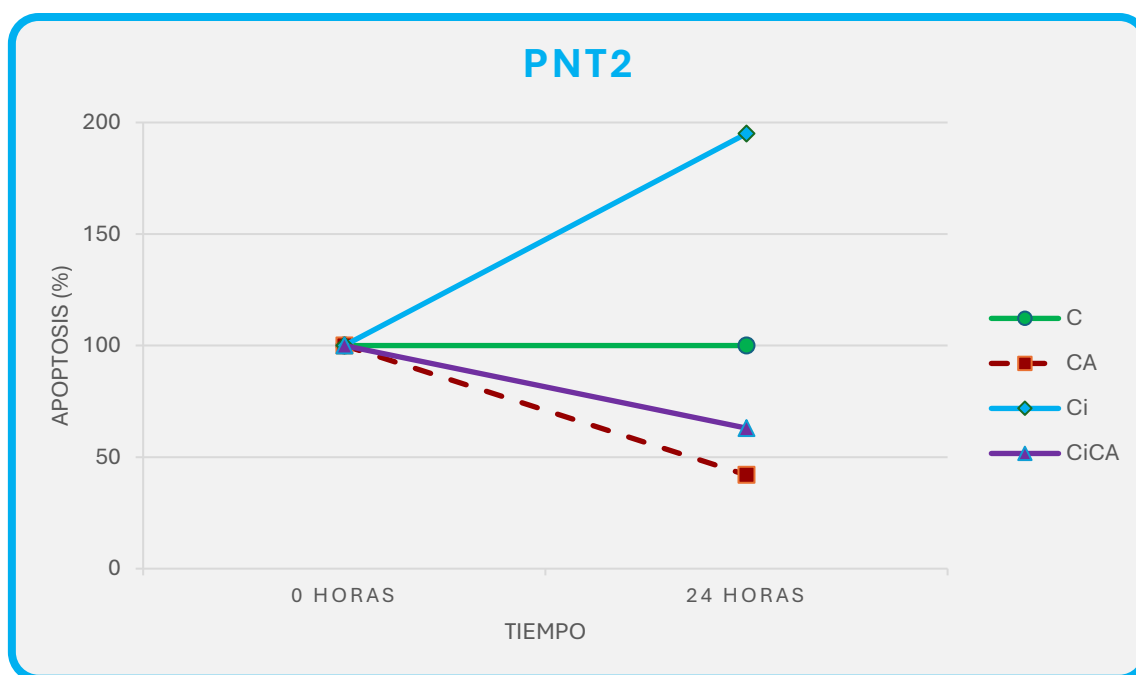


Figura 45. Ensayo de Apoptosis en cultivos de células PNT2.

b. Resultados ensayo de Apoptosis en cultivos B16F10.

Los resultados obtenidos en este ensayo (Tabla 6 y Figura 46) muestran que el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V+/PI-) en las células B16F10 no tratadas fue muy bajo, situándose en 0,71%.

Tras el tratamiento con Ácido Carnósico, la población en apoptosis temprana apenas varió, alcanzando el 0,79%. El porcentaje de células en necrosis (Anexina V+/PI+) mostró una ligera disminución, pasando de 3,53% en el control a 2,87% tras el tratamiento con AC.

En las células que se irradiaron con 20 Gy, el porcentaje de apoptosis temprana aumentó significativamente hasta 4,11% (comparado con el 0,71% del control). De manera similar, la necrosis se incrementó notablemente hasta 15,81% (comparado con el 3,53% del control), lo que indica que la irradiación induce ambas formas de muerte celular en esta línea.

Cuando a estas células irradiadas con 20 Gy se les administró el Ácido Carnósico, el porcentaje de células apoptóticas tempranas mostró una ligera reducción del 17% (disminuyendo a 3,42% frente al 4,11% con irradiación sola). De forma similar, el porcentaje de células necróticas también disminuyó. Sin embargo, es crucial señalar que, como indica el análisis del artículo, esta leve reducción en la muerte celular no alcanzó significación estadística. Por lo tanto, los resultados indican que el Ácido Carnósico no ejerce un efecto radioprotector o anti-apoptótico relevante en las células B16F10. Esta ausencia de protección en el ensayo de apoptosis es coherente con el potente efecto radiosensibilizador observado en los ensayos de viabilidad celular, donde la combinación de AC y radiación aumentó significativamente la muerte celular.

Tabla 6. Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en cultivos B16F10 tratadas con Ácido Carnósico, 20 Gy de radiación o combinación.

	CELULAS VIVAS	CELULAS APOPTOTICAS	CELULAS NECROTICAS	CELULAS NECROTICAS TARDIAS
Control NO Irradiado-C	90.25%± 3.61%	0.71 %± 0.03%	3.53 %± 0.14%	5.50 %± 0.22%
Ácido Carnósico-CA	92.21 %± 3.69%	0.79%± 0.03%	2.87 %± 0.11%	4.14 %± 0.17%
20 Gy- Ci	74.69 %± 2.99%	4.11 %± 0.16%	15.81 %± 0.63%	5.39 %± 0.22%
20 Gy + AC- CiCA	82.02 %± 3.28%	3.42 %± 0.14%	9.21 %± 0.37%	5.34 %± 0.21%

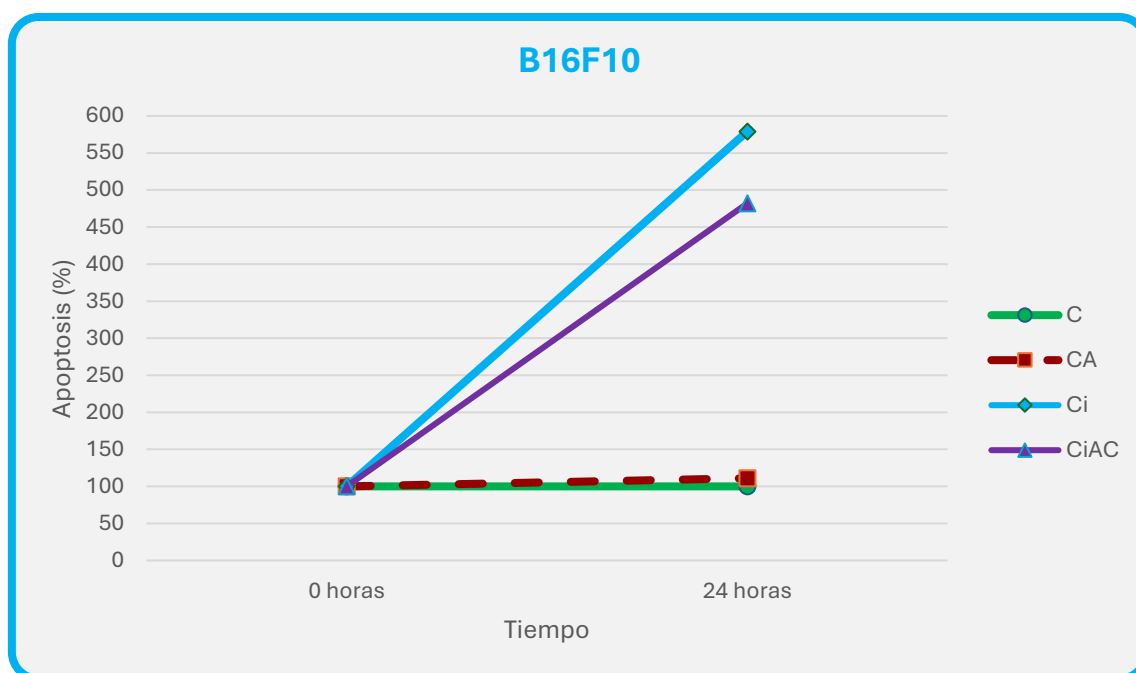


Figura 46. Ensayo de Apoptosis en cultivos de B16F10 tratados con Ácido Carnósico (AC), 20 Gy de radiación (Ci) y combinación de AC y radiación (I+AC).

c. Resultados ensayo de Apoptosis en cultivos de células Melan-A6.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V+/PI-) en las células Melan-A6 no tratadas fue de 4,67%.

Tras el tratamiento con Ácido Carnósico, se observó una disminución en la población apoptótica temprana, llegando a 1,55% en comparación con el control (4,67%). Sin embargo, el porcentaje de células en necrosis (Anexina V+/PI+) aumentó considerablemente, pasando de 6,85% en las condiciones control a 16,68% tras el tratamiento solo con AC.

En las células que se irradiaron, el porcentaje de apoptosis temprana aumentó hasta el 5,4%, mientras que la necrosis aumentó de forma muy marcada hasta 28,97%, sugiriendo que la irradiación induce ambas vías de muerte en esta línea celular.

Cuando a estas células irradiadas se les administró el Ácido Carnósico, las células apoptóticas tempranas mostraron un valor de 5,22%, ligeramente inferior al 5,4% observado en las células irradiadas solas, mientras que las necróticas disminuyeron hasta un 20,59% (comparado con el 28,97% de las irradiadas solas) (Tabla 7 y Figura 47) . Estos resultados sugieren que el Ácido Carnósico no ejerce un efecto radiosensibilizador en las células Melan-A6 y, de hecho, muestra una leve tendencia protectora frente a la apoptosis, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa.

Tabla 7. Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en cultivos de células Melan-A6 tratadas con Ácido Carnósico, 20 Gy de radiación o combinación.

	CELULAS VIVAS	CELULAS APOPTOTICAS	CELULAS NECROTICAS	CELULAS NECROTICAS TARDIAS
Control NO Irradiado- C	88.37%± 3.53%	4.67%± 0.19%	6.85%± 0.27%	0.12%± 0.00%
Ácido Carnósico- CA	81.51%± 3.26%	1.55%± 0.06%	16.68%± 0.67%	0.26%± 0.01%
Irradiadas - Ci	67.37%± 2.69%	5.40%± 0.21%	28.97%± 1.16%	1.30%± 0.05%
Irradiadas +AC - CiAC	72.76%± 2.91%	5.22%± 0.21%	20.59%± 0.82%	1.44 %± 0.06%

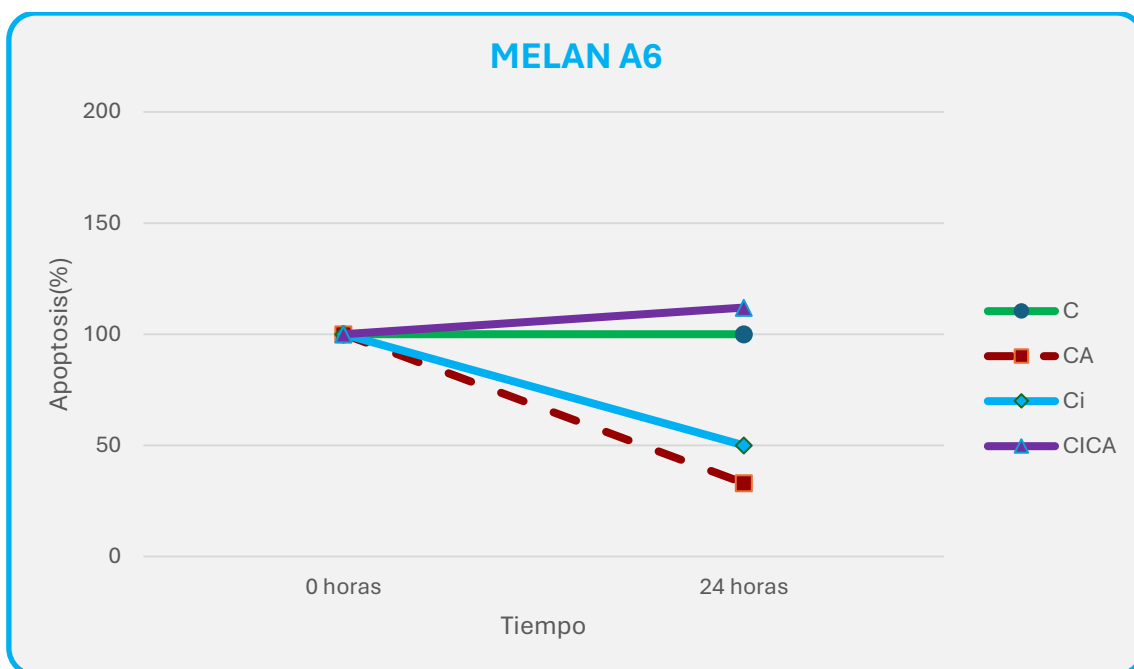


Figura 47. Ensayo de Apoptosis en cultivos de células Melan-A6 tratados con Ácido Carnósico (AC), 20 Gy de radiación (Ci) y combinación de AC y radiación(I+AC).

d. Resultados ensayo de Apoptosis en cultivos de células SKMEL-1.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V+/PI-) en las células SKMEL-1 no tratadas fue de 2,36%.

Tras el tratamiento con Ácido Carnósico, se observó un ligero incremento en la población apoptótica temprana, alcanzando el 3,33% en comparación con el control (2,36%). De forma similar, el porcentaje de células en necrosis (Anexina V+/PI+) aumentó levemente, pasando de 5,97% en condiciones control a 6,63% tras el tratamiento con AC.

En las células que fueron irradiadas, el porcentaje de apoptosis temprana aumentó de forma notable hasta 5,42%. Por el contrario, la necrosis disminuyó significativamente hasta 1,86% (comparado con el 5,97% del control), lo que

sugiere que la irradiación en esta línea celular induce preferentemente la vía apoptótica sobre la necrótica.

Cuando a estas células irradiadas se les administró el Ácido Carnósico, el porcentaje de células apoptóticas tempranas descendió ligeramente hasta 4,90% (comparado con el 5,42% de las irradiadas solas). El porcentaje de células necróticas aumentó ligeramente hasta 3,11% (comparado con el 1,86% de las irradiadas solas, aunque permaneciendo por debajo del nivel del control no irradiado) (Tabla 8 y Figura 48). Estos datos muestran una leve reducción en la apoptosis que, sin embargo, no fue estadísticamente significativa, indicando la ausencia de un efecto radioprotector relevante en las células SKMEL-1.

Tabla 8. Datos en porcentajes de células vivas, apoptóticas, necróticas y necróticas tardías en cultivos de células SKMEL-1 tratadas con Ácido Carnósico, 20 Gy de radiación o combinación

	CELULAS VIVAS	CELULAS APOPTOTICAS	CELULAS NECROTICAS	CELULAS NECROTICAS TARDIAS
Control NO Irradiado – C	91.01%± 3.64%	2.36%± 0.09%	5.97%± 0.24%	0.46%± 0.02%
Ácido Carnósico – CA	89.32%± 3.57%	3.33%± 0.13%	6.63%± 0.27%	0.72%± 0.03%
Irradiadas – CI	90.78%± 3.63%	5.42%± 0.22%	1.86%± 0.07%	0.26%± 0.01%
Irradiadas +AC – CiCA	90.60%± 3.62%	4.90%± 0.20%	3.11%± 0.12%	0.81%± 0.03%

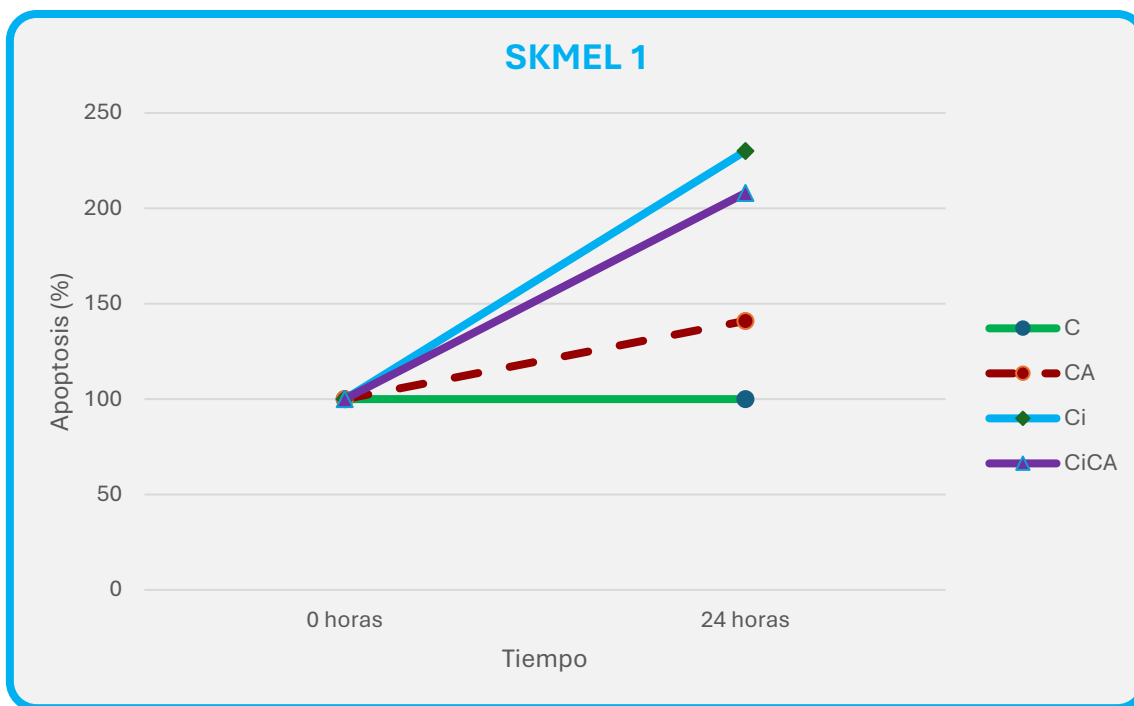


Figura 48. Ensayo de Apoptosis en cultivos de células SKMEL-1 tratadas con Ácido Carnósico (AC), 20 Gy de radiación (Ci) y combinación de AC y radiación (I+AC).

Resultados del Ensayo de Apoptosis. Conclusión.

Cuando comparamos la apoptosis por línea celular y tratamiento (tabla 9 y Figura 49) apreciamos que en las líneas celulares no tumorales (PNT2 y Melan-A), la administración de Ácido Carnósico (AC) por sí solo disminuyó la apoptosis de forma estadísticamente significativa. En las líneas tumorales, el tratamiento produjo un aumento de la apoptosis en las células SK-MEL-1, mientras que en las B16F10 el efecto fue insignificante.

La exposición a 20 Gy de rayos X (Ci) aumentó la apoptosis en todas las líneas celulares probadas. El incremento fue de casi seis veces en B16F10, 2.3 veces en SK-MEL-1, el doble en PNT2 y de aproximadamente un 14% en las células Melan-A, lo que corresponde a un aumento porcentual relativo.

El pretratamiento con AC antes de la irradiación (CiCA) reveló el efecto más diferencial: en las células PNT2, produjo una disminución estadísticamente significativa con una reducción de la apoptosis tan drástica que el valor final fue incluso inferior al del control basal, lo que representa una disminución porcentual superior al 300% en comparación con el grupo irradiado demostrando un potente efecto radioprotector. En cambio, en las otras tres líneas celulares, la reducción de la apoptosis fue mucho menor (3% en Melan-A, 10% en SK-MEL-1 y 17% en B16F10), sin alcanzar significación estadística.

El ácido carnósico ejerce una fuerte protección anti-apoptótica en las células epiteliales sanas, pero esta capacidad se anula en las células productoras de melanina, donde el efecto protector es solo marginal.

Tabla 9. Resultados del ensayo de Apoptosis por línea celular y tratamiento

Línea Celular	Control (C)	Ácido Carnósico (CCA)	Irradiado (Ci)	Irradiado + AC (CiCA)
PNT2	2.95 ± 0.12	1.23 ± 0.05	5.74 ± 0.23	1.85 ± 0.07
MELAN A	4.67 ± 0.19	1.55 ± 0.06	5.40 ± 0.21	5.22 ± 0.21
SKMEL 1	2.36%± 0.09%	3.33%± 0.13%	5.42%± 0.22%	4.90%± 0.20%
B16F10	0.71 ± 0.03	0.79 ± 0.03	4.11 ± 0.16	3.42 ± 0.14

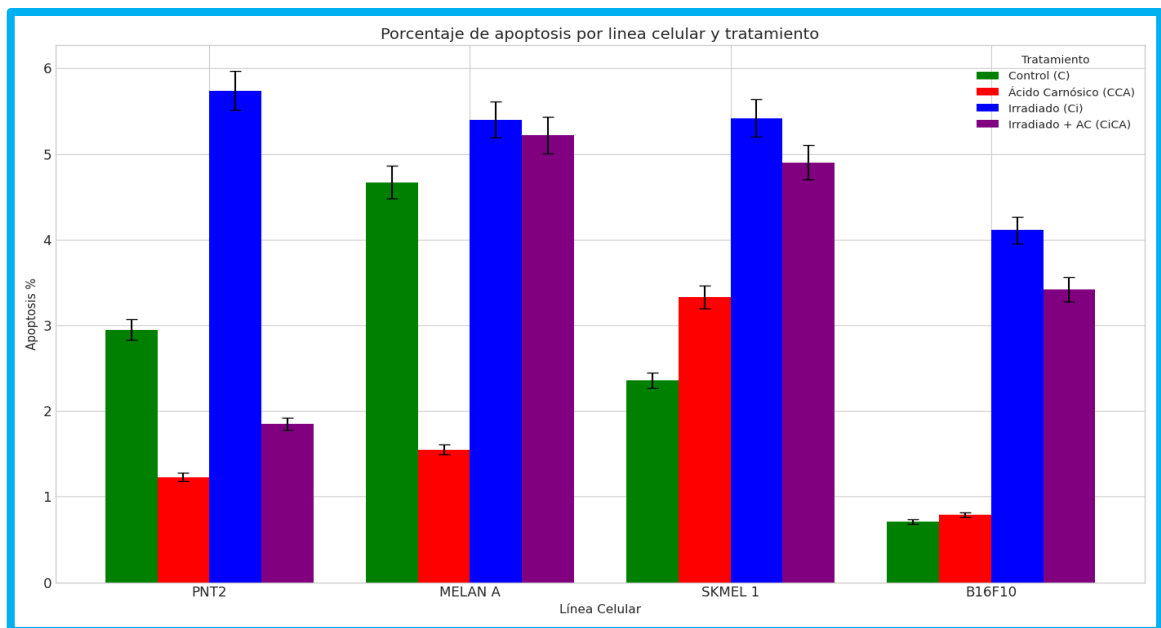


Figura 49: Resultados del ensayo de Apoptosis por línea celular y tratamiento

4. ANÁLISIS CICLO CELULAR

a. Análisis del ciclo celular en células de próstata humanas PNT2.

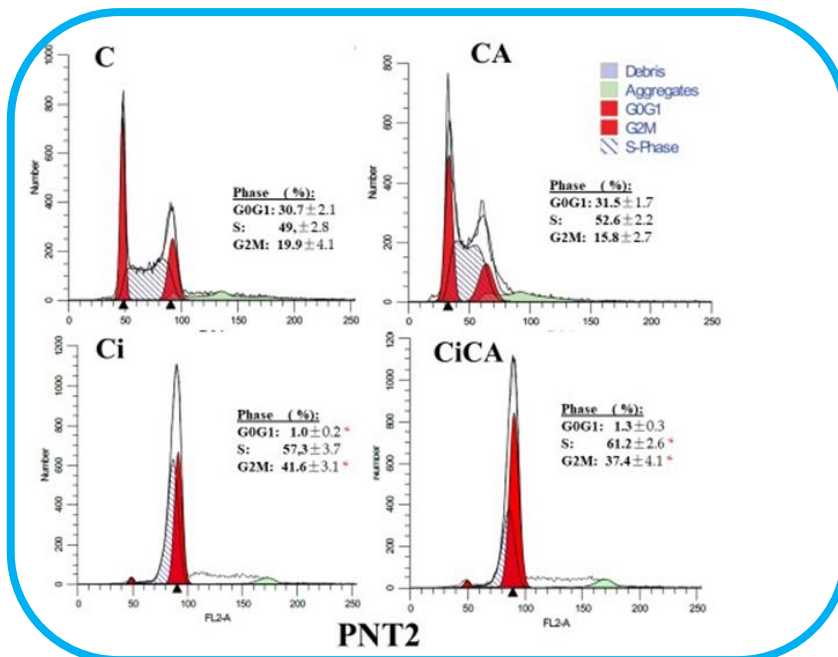


Figura 50. Análisis del ciclo celular en la línea celular PNT2 mediante citometría de flujo.

El análisis del ciclo celular de la línea celular PNT2 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico se muestra en la figura 50.

. Cuando las células fueron tratadas con ácido carnósico no se observan diferencias significativas respecto al control, solo aumentan un poco la fase G0/G1 y la S y ha disminuido un poco la fase G2/M. Se registró un ligero aumento en las poblaciones de las fases G0/G1 (31.55% vs 30.72% en control) y S (52.63% vs 49.29% en control), acompañado de una leve disminución en la fase G2/M (15.82% vs 19.99% en control), indicando que el compuesto por sí solo no altera sustancialmente la progresión del ciclo celular. (Tabla 10 y Figura 51)

Los resultados mostraron que las células sometidas a 10 Gy de rayos X mostraban una drástica disminución de la fase G0/G1(1.07%) y aumento significativo de fase G2/M(41.59%), sugiriendo una activación de los mecanismos de control del daño en el ADN. La fase S en este caso también aumenta, pero de forma más moderada. En este caso la irradiación lo que produce es una acumulación de las células en la fase de mitosis. Además, se observó un aumento en la población de células en sub-G1, indicativo de apoptosis inducida por el daño genotóxico.

En contraste, el tratamiento con ácido carnósico en estas células irradiadas, disminuyo estos efectos ligeramente, reduciendo la acumulación en G2/M y la población apoptótica.

Estos hallazgos sugieren que ácido carnósico puede ejercer un efecto protector sobre la línea celular PNT2 tras la exposición a irradiación, favoreciendo la recuperación del ciclo celular y reduciendo el impacto del estrés oxidativo inducido

Tabla 10. Datos en porcentaje de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea PNT2 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico

	G0/G1	S	G2/M
Control -C	30,72%± 1.23%	49,29%± 1.97%	19,99%± 0.80%
AC	31,55% ± 1.26%	52,63% ± 2.11%	15,82%± 0.63%
CI	1,07% ± 0.04%	57,34% ± 2.29%	41,59%± 1.66%
I + AC	1,30% ± 0.05%	61,22% ± 2.45%	37,48%± 1.50%

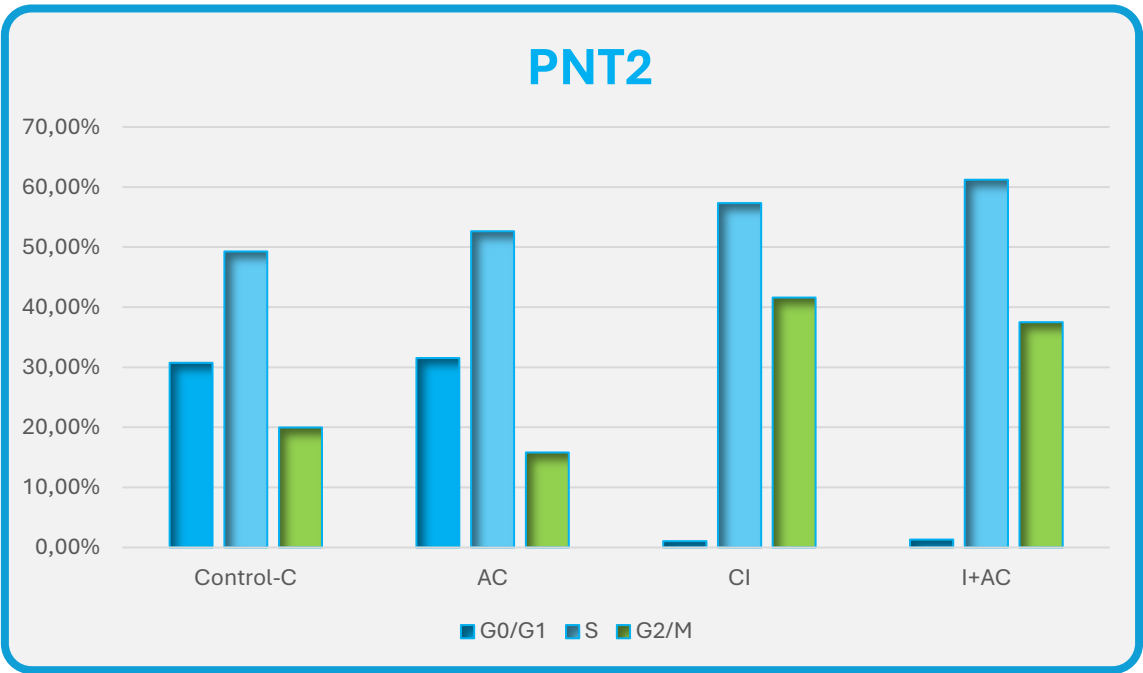


Figura 51: Grafico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea PNT2 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico

b. Análisis del ciclo celular en células de próstata humanas B16F10.

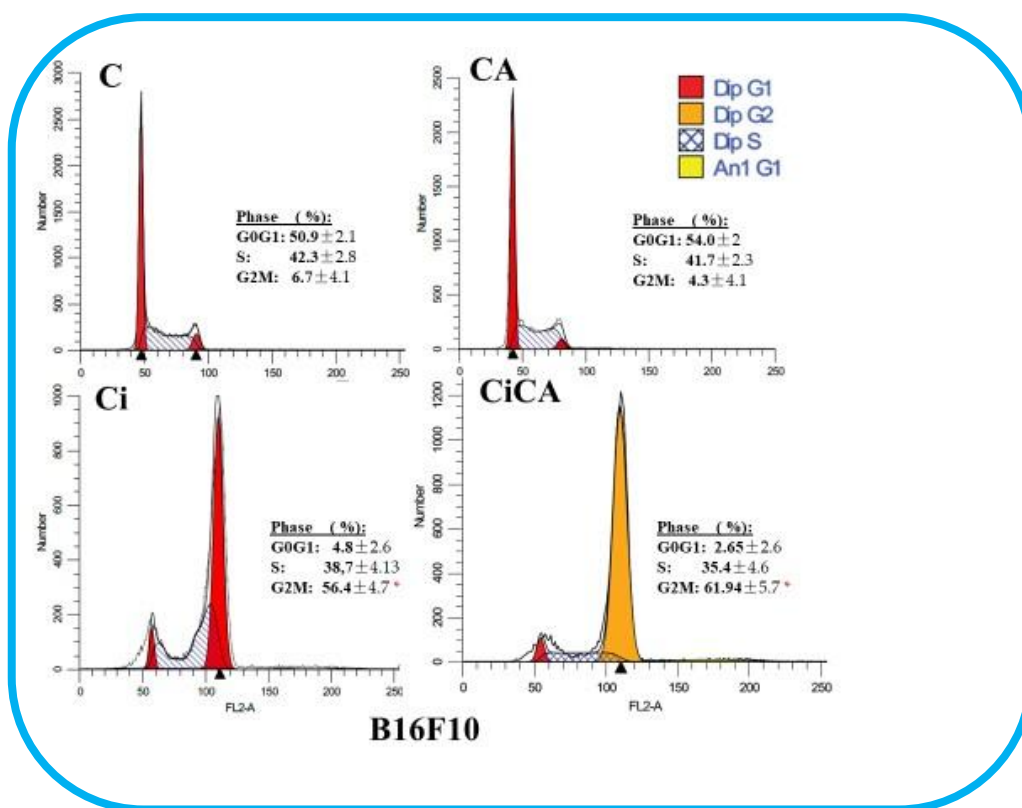


Figura 52. Análisis del ciclo celular en la línea celular B16F10 mediante citometría de flujo.

El análisis del ciclo celular de la línea celular B16F10 mediante citometría de flujo se realizó para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico (Figura 52).

Cuando las células B16F10 fueron tratadas solamente con ácido carnósico, prácticamente no se encontraron diferencias significativas con respecto al control. Los porcentajes en las fases fueron G0/G1, S y G2/M son muy similares a los del control.

Los resultados (tabla 11 y Figura 53) mostraron que las células sometidas a irradiación presentaron, al igual que la línea PNT2, una drástica disminución de la fase G0/G1 (4,85%) y un gran aumento significativo de la fase G2/M (56,38%) en comparación con el control. La fase S mostró una ligera disminución (38,76%). Este

perfil sugiere una fuerte activación de los puntos de control del ciclo celular, resultando en una acumulación de células en la fase G2/M debido al daño inducido por la radiación.

En contraste con la línea PNT2, al combinar la irradiación con el ácido carnósico, en las células B16F10, se observó un *incremento todavía mayor* de la acumulación en la fase G2/M (61,94%) en comparación con las células solamente irradiadas (56,38%). Esto fue acompañado por una ligera disminución adicional en las fases G0/G1 (2,65%) y S (35,41%).

Estos hallazgos sugieren que, a diferencia del efecto observado en PNT2, el ácido carnósico en células B16F10 irradiadas no facilita la recuperación del ciclo celular, sino que parece potenciar el bloqueo en G2/M inducido por la radiación. Esto podría indicar un efecto radiosensibilizador del ácido carnósico en esta línea celular, al menos en términos de bloqueo del ciclo celular.

Tabla 11. Datos en porcentajes de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea B16F10 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico.

	G0/G1	S	G2/M
Control -C	50,95%± 2.04%	42,29%± 1.69%	6,76%± 0.27%
AC	54,02%± 2.16%	41,72%± 1.67%	4,26%± 0.17%
CI	4,85%± 0.19%	38,76%± 1.55%	56,38%± 2.26%
I + AC	2,65%± 0.11%	35,41%± 1.42%	61,94%± 2.48%

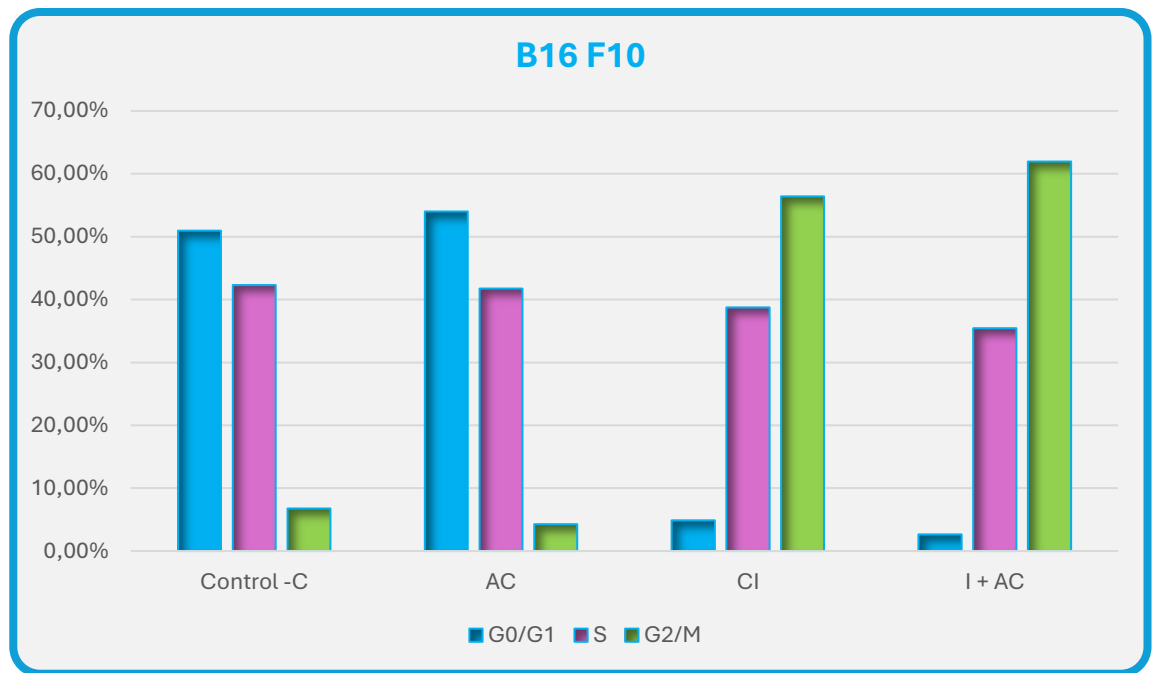


Figura 53. Gráfico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea B16F10 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico.

c. Análisis del ciclo celular en células de próstata humanas Melan-A6.

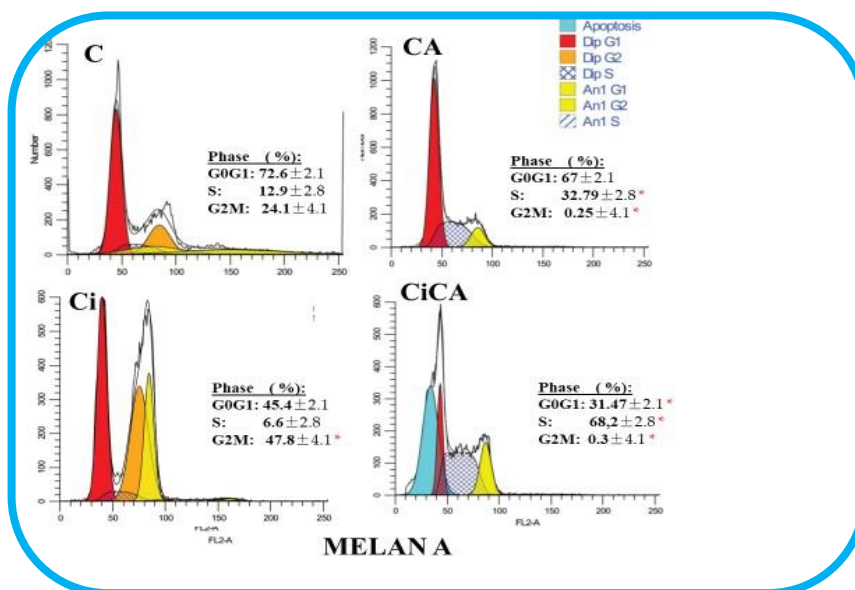


Figura 54. Análisis del ciclo celular en la línea celular Melan-A6 mediante citometría de flujo.

El análisis del ciclo celular de la línea celular Melan-A6 mediante citometría de flujo se realizó para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico (Figura 54).

El análisis se modeló manualmente considerando las poblaciones aneuploides presentes (no se modelaron debris ni agregados). Aunque se tienen en cuenta los porcentajes globales de aneuploides y diploides, la interpretación del ciclo celular se centra en la población diploide, por ser la más representativa

Al tratar esta línea celular únicamente con ácido carnósico, se observó una notable disminución del porcentaje de células aneuploides (del 27,42% en control al 11,69%), lo que se sugiere como un posible efecto antigenotóxico. En la población diploide, el tratamiento con AC provocó cambios drásticos: la fase G2/M se redujo a un mínimo (0,25%), mientras que la fase S aumentó considerablemente (32,75% frente al 12,98% del control), con un aumento moderado en G0/G1 (67,00%). Esto podría indicar una inhibición de la división celular inducida por AC, con acumulación de células en la fase de síntesis.

Con la irradiación, el porcentaje de células aneuploides (23,65%) retornó a valores similares a los del control. Sin embargo, en la población diploide, se produjo un fuerte aumento de células en la fase G2/M (47,88% frente al 24,08% del control), con una marcada disminución de las fases G0/G1 (45,45%) y S (6,66%). La interpretación sugiere que esta acumulación masiva en G2/M refleja la incapacidad de las células para completar la citocinesis y la división celular tras el daño por irradiación.

En las células tratadas con la combinación de irradiación y ácido carnósico, se modeló específicamente la población apoptótica debido a su relevancia. El hallazgo más significativo fue la inducción masiva de apoptosis, alcanzando casi el 40% (39,94%) de la muestra total. El porcentaje de aneuploides (24,25%) fue similar al del grupo irradiado solo. En cuanto a mínimo (0,31%), mientras que la fase S aumentó de forma muy considerable (68,2% las células diploides no apoptóticas

restantes, la fase de división (G2/M) cayó a un 26%), y la fase G0/G1 disminuyó (31,43%). (Tabla 12 y figura 55)

Estos resultados indican un comportamiento complejo y marcadamente diferente al de PNT2. El ácido carnósico solo ya altera profundamente el ciclo en Melan-A6. En combinación con la irradiación, el ácido carnósico no muestra un efecto protector, sino que induce una fuerte apoptosis y altera severamente el ciclo celular de las células supervivientes (acumulación masiva en S, bloqueo en G2/M). Esto sugiere un potente efecto citotóxico y radiosensibilizador del ácido carnósico en la línea celular Melan-A6.

Tabla 12. Análisis de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de aneuploides y diploides de la línea Melan A6 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico.

	Aneuploides	Diploides	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis
Control -C	27,42%± 1.10%	72,58%± 2.90%	62,94%± 2.52%	12,98%± 0.52%	24,08%± 0.96%	
AC	11,69%± 0.47%	88,31%± 3.53%	67,00%± 2.68%	32,75%± 1.31%	0,25%± 0.01%	
CI	23,65%± 0.95%	76,35%± 3.05%	45,45%± 1.82%	6,66%± 0.27%	47,88%± 1.92%	
I + AC	24,25%± 0.97%	75,75%± 3.03%	31,43%± 1.26%	68,26%± 2.73%	0,31%± 0.01%	39,94%± 1.60%

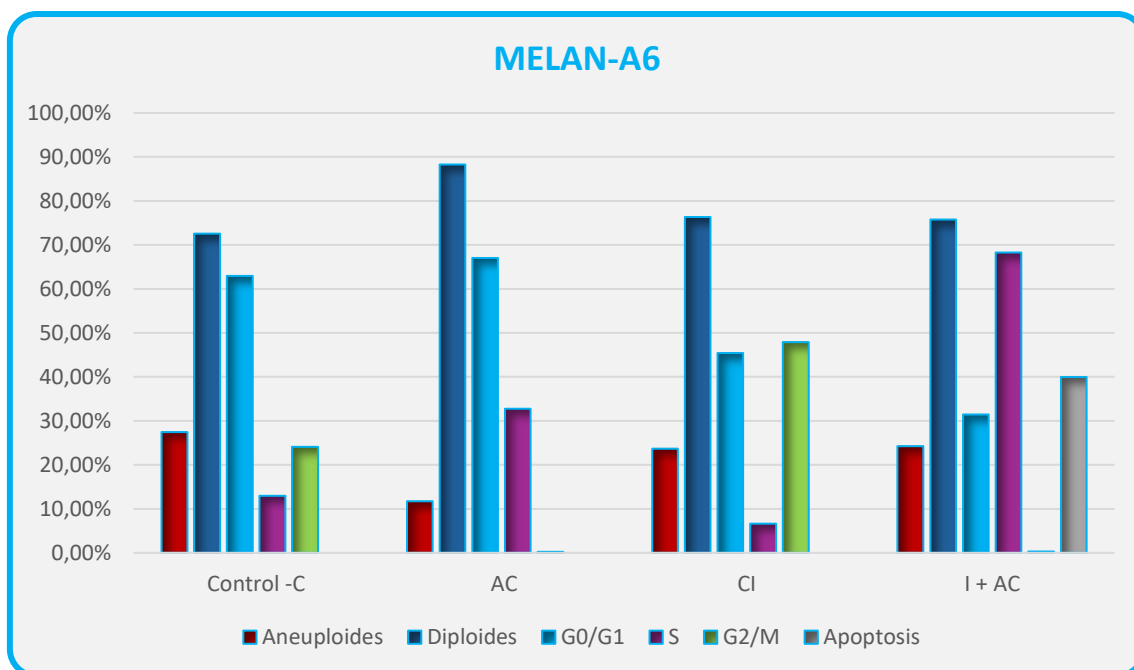


Figura 55. Gráfico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea Melan-A6 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico en células aneuploides y diploides.

d. Análisis del ciclo celular en células SKMEL 1.

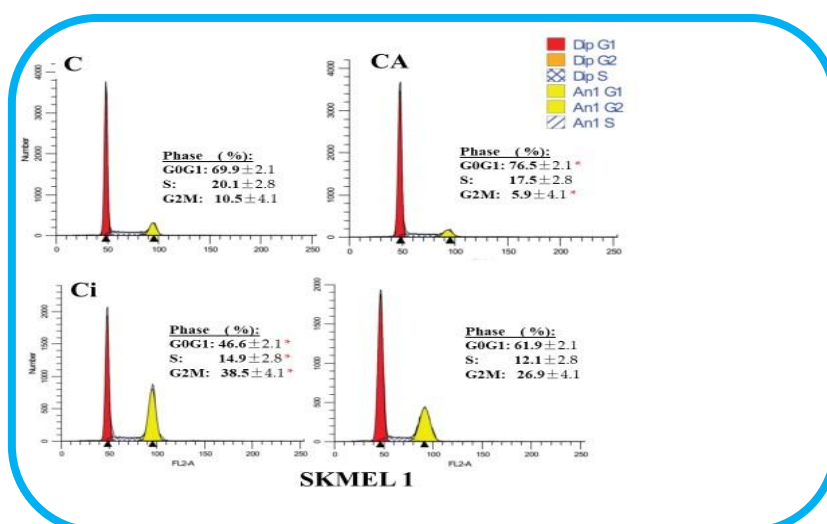


Figura 56. Análisis del ciclo celular en células SKMEL 1 mediante citometría de flujo.

El análisis del ciclo celular de la línea celular SKMEL-1 mediante citometría de flujo se realizó para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el ácido carnósico (Figura 56).

Al tratar las células SKMEL-1 únicamente con ácido carnósico , se observó un aumento en la fase G0/G1 (76,55% frente al 69,94% del control). Sin embargo, la fase G2/M disminuyó hasta casi la mitad (5,93% frente al 10,05% del control). En cuanto a la fase S, se produjo una disminución poco acusada (17,52% frente al 20,01%).

Al irradiar las células , se observó una disminución de la fase G0/G1 (a 46,65%) a la par que un gran aumento en la fase G2/M (a 38,46%). La fase S disminuyó de forma más moderada (a 14,89%). Se concluye que, en este caso, la irradiación produce una acumulación de las células en la fase de mitosis (G2/M).

Al combinar el ácido carnósico con la irradiación , se observó que el porcentaje de células en G0/G1 (61,09%) mostró una recuperación parcial, siendo un valor más cercano al del control (69,94%) en comparación con las células solo irradiadas (46,65%). La acumulación en G2/M (26,91%) fue menor que en el caso de las células irradiadas solamente (38,46%), aunque se mantuvo elevada (más del doble) respecto al control (10,05%). La fase S continuó disminuyendo (12,00%).

Estos hallazgos sugieren que, de manera similar a lo observado en la línea PNT2, el ácido carnósico parece ejercer un efecto protector en las células SKMEL-1 tras la exposición a irradiación. Este efecto se refleja en una reducción del bloqueo en G2/M inducido por la radiación y una tendencia a recuperar la proporción de células en G0/G1, favoreciendo la recuperación del ciclo celular en comparación con las células únicamente irradiadas. (Tabla 13 y figura 57)

Tabla 13. Análisis de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea SK-MEL1 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico

	G0/G1	S	G2/M
Control – C	69,94%± 2.80%	20,01%± 0.80%	10,05%± 0.40%
AC	76,55% ± 3.06%	17,52% ± 0.70%	5,93%± 0.24%
CI	46,65% ± 1.87%	14,89% ± 0.60%	38,46%± 1.54%
I+ AC	61,09% ± 2.44%	12,00% ± 0.48%	26,91%± 1.08%

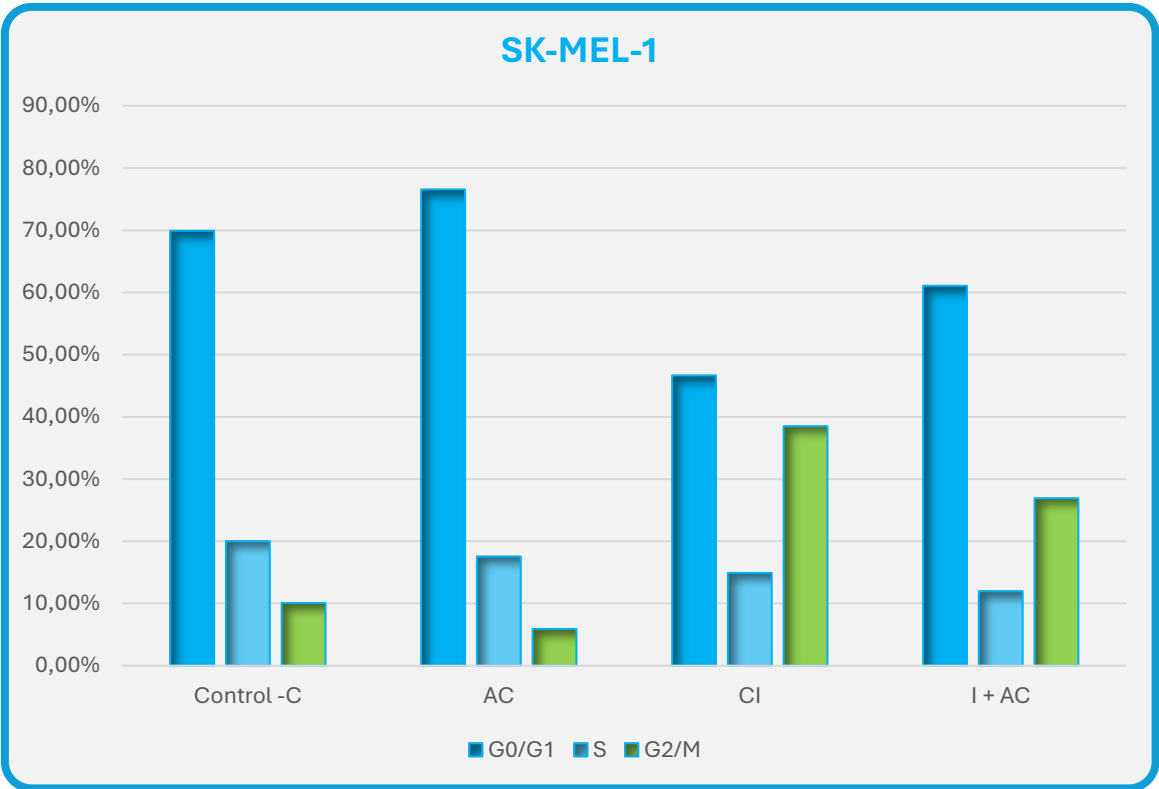


Figura 57. Gráfico de barras de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular de la línea SKMEL-1 mediante citometría de flujo para evaluar el efecto de la radiación ionizante y el tratamiento con ácido carnósico

5.- DETERMINACIÓN GLUTATIÓN. GSH-GSSH

La curva standard de concentración de GSH total muestra una buena linealidad hasta la concentración de 8 μM , con cierto grado de saturación a concentraciones más elevadas. Dado que los resultados obtenidos no superan las 500.000 RLU, éstos se encuentran dentro de la zona lineal de la curva dosis-respuesta presentando una pendiente y reproducibilidad adecuadas para el estudio (Figura 58).

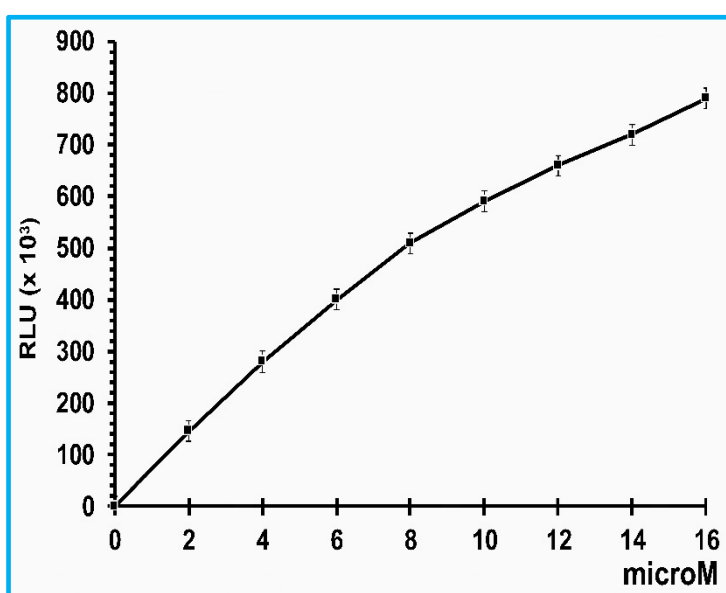


Figura 58. Curva dosis-respuesta de Glutatión.

Determinación de glutatión total (GSH)

Primero, se evaluó la cantidad total de glutatión (GSH) en los cuatro cultivos celulares (PNT2, B16F10, SKMEL1 y MELAN A6). En condiciones normales, los cultivos control (C) mostraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de GSH total entre las cuatro líneas celulares ($p < 0.001$), con una mayor cantidad en las células productoras de melanina; notablemente, la concentración en B16F10 fue más del doble que en PNT2. De forma general, los tratamientos con Ácido Carnósico (AC), la irradiación (Ci) y la combinación de

ambos (I+AC) revelaron respuestas marcadamente diferentes y, en algunos casos, opuestas entre las líneas celulares tumorales y no tumorales, las cuales se analizarán en detalle a continuación (Tabla 14 y Figura 59)

- Tabla 14 .** Resultados de luminiscencia de los cultivos de PNT2, B16F10, SKMEL1 y MELAN A6 en las distintas condiciones ensayadas.

GSH	PNT2	B16F10	SKMEL1	MELANA6
C	210± 8.40	462± 18.48	269± 10.76	324± 12.96
AC	97± 3.88	453± 18.12	373± 14.92	254± 10.16
Ci	24± 0.96	552± 22.08	506± 20.24	232± 9.28
I+AC	40± 1.60	512± 20.48	443± 17.72	327± 13.08

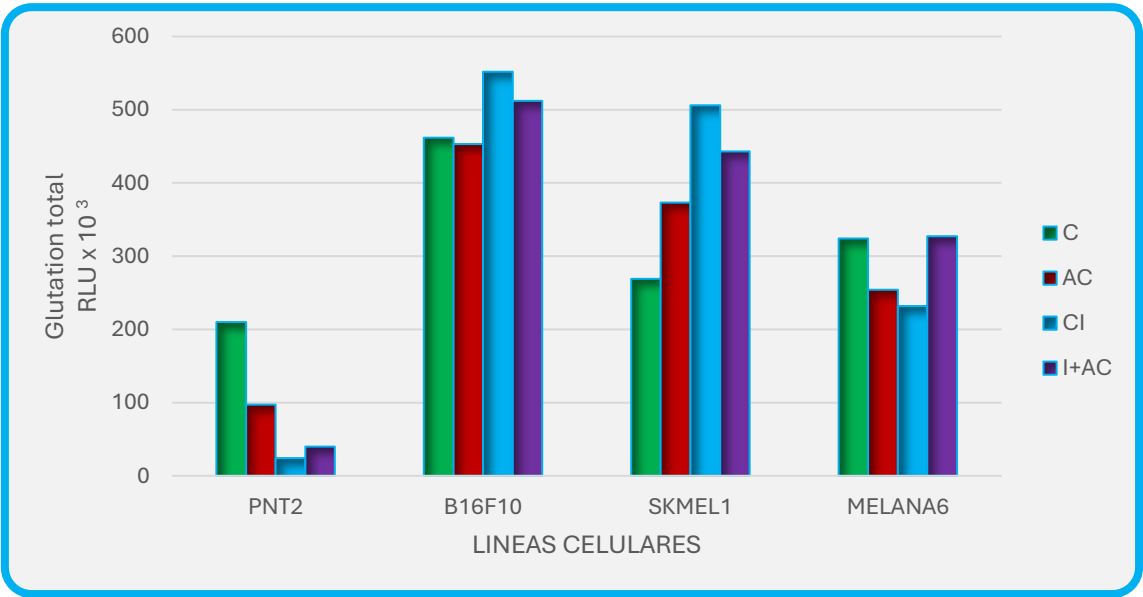


Figura 59. Resultados de Glutation total de los cultivos de PNT2, B16F10, SKMEL1 y MELAN A6.

Al analizar de forma individual la línea celular no tumoral PNT2, se observa que la administración de Ácido Carnósico por sí sola (AC) disminuyó notablemente el GSH total, pasando de 210 ± 8.40 RLU en el grupo control a 97 ± 3.88 RLU. La exposición a la radiación (Ci) provocó un agotamiento aún más drástico de las reservas de GSH, desplomando los niveles hasta 24 ± 0.96 RLU. En las células tratadas con Ácido Carnósico antes de ser irradiadas (I+AC), los niveles de GSH (40 ± 1.60 RLU) fueron ligeramente superiores a los del grupo que solo fue irradiado. Esto indica que, aunque los niveles de GSH se mantuvieron muy bajos, el Ácido Carnósico podría ofrecer una protección mínima o contribuir a una leve recuperación frente al daño severo de la irradiación

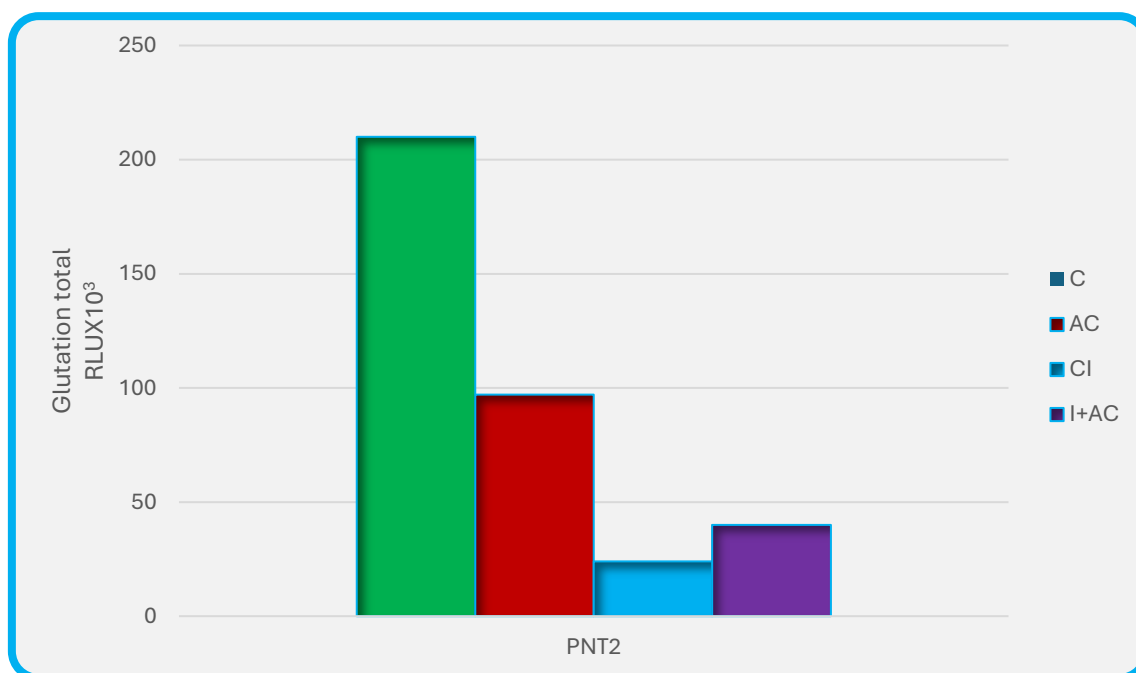


Figura 60. Resultados de Glutathione total del cultivo celular PNT2 en las distintas condiciones ensayadas

En el caso de la línea celular de melanoma murino B16F10, el comportamiento fue marcadamente distinto al de las células no tumorales. El Ácido Carnósico por sí solo (AC) apenas alteró los niveles basales de GSH (462 ± 18.48 RLU en el control frente a 453 ± 18.12 RLU). En contraste con las células

PNT2, la irradiación (Ci) no disminuyó, sino que indujo un aumento en la concentración de GSH hasta 552 ± 22.08 RLU, lo que se interpreta como una respuesta de defensa activa de la célula tumoral. Sin embargo, al administrar Ácido Carnósico antes de la irradiación (I+AC), este aumento fue atenuado, registrándose un nivel inferior (512 ± 20.48 RLU). Este hallazgo sugiere que el Ácido Carnósico interfiere con la capacidad de las células tumorales para sobreproducir GSH como mecanismo de protección frente a la radiación (Figura 61).

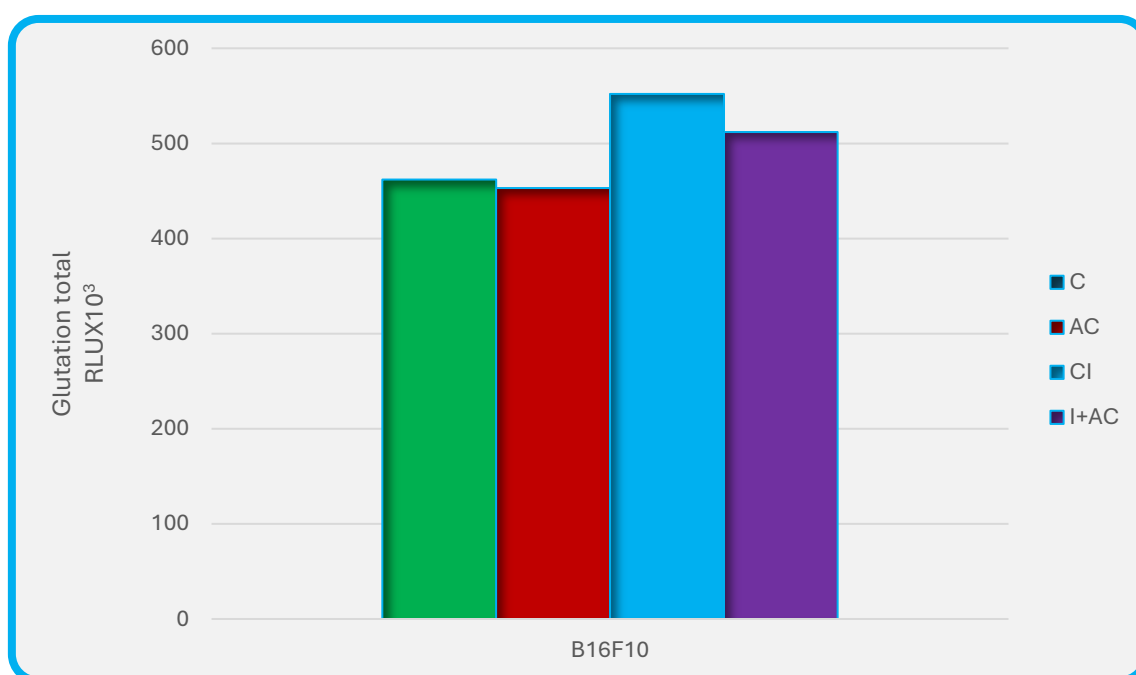


Figura 61. Resultados de Glutathion total del cultivo celular B16F10 en las distintas condiciones ensayadas

La línea de melanoma humano SKMEL1 mostró algunas particularidades. A diferencia de las otras líneas, la administración de Ácido Carnósico por sí sola (AC) provocó un aumento notable en los niveles de GSH total, que pasaron de 269 ± 10.76 RLU en el control a 373 ± 14.92 RLU. Al igual que las células B16F10, la irradiación (Ci) también indujo un incremento significativo de GSH como respuesta defensiva, alcanzando 506 ± 20.24 RLU. De manera similar a lo observado en B16F10, el tratamiento previo con Ácido Carnósico (I+AC) atenuó este aumento inducido por la radiación, registrando un nivel de 443 ± 17.72 RLU.

Este comportamiento refuerza la idea de que el AC interfiere con la respuesta antioxidante de las células de melanoma frente a la radiación (Figura 62).

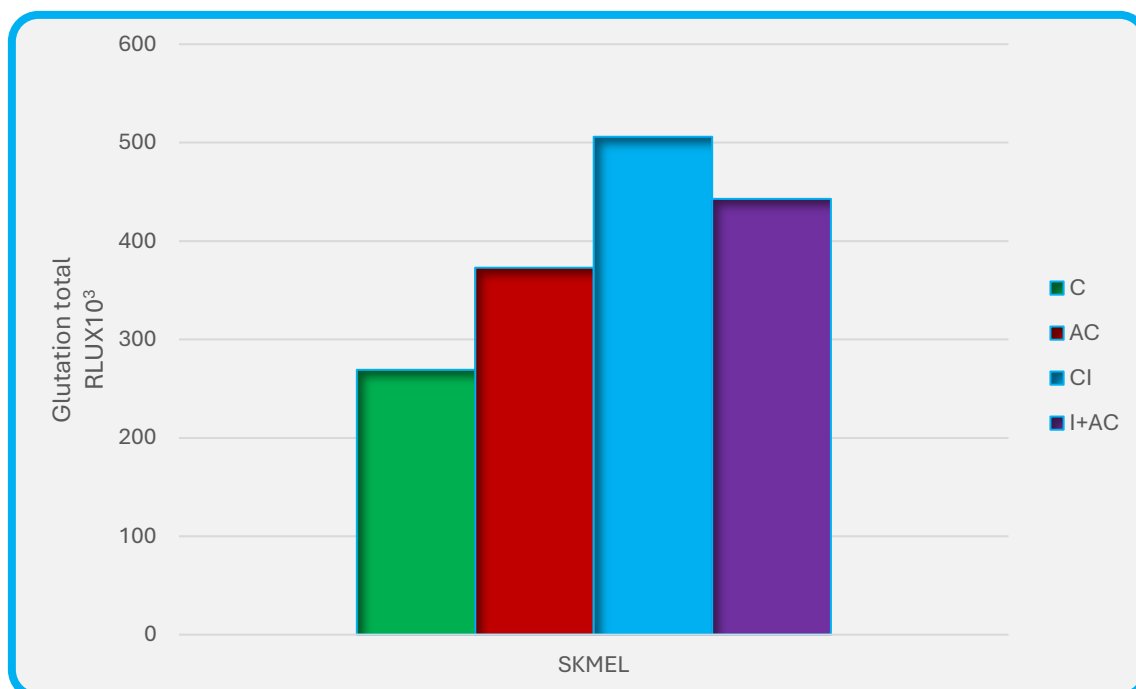


Figura 62. Resultados de Glutathion total del cultivo celular SKMEL en las distintas condiciones ensayadas

MELAN A6 mostró un comportamiento que evidencia el efecto protector del Ácido Carnósico. De forma similar a las células PNT2, tanto el Ácido Carnósico por sí solo (AC) como la irradiación (Ci) provocaron una disminución en los niveles de GSH total con respecto al control (324 ± 12.96 RLU). Sin embargo, el hallazgo más relevante se observó en el tratamiento combinado: cuando el AC se administró antes de la irradiación (I+AC), los niveles de GSH (327 ± 13.08 RLU) no solo fueron considerablemente más altos que en las células solo irradiadas (232 ± 9.28 RLU), sino que se recuperaron hasta alcanzar los valores del grupo control. Este resultado sugiere de manera importante que el Ácido Carnósico ejerce un potente efecto radioprotector en estas células no tumorales, ayudándolas a mantener sus defensas antioxidantes tras el daño por radiación (Figura 63)

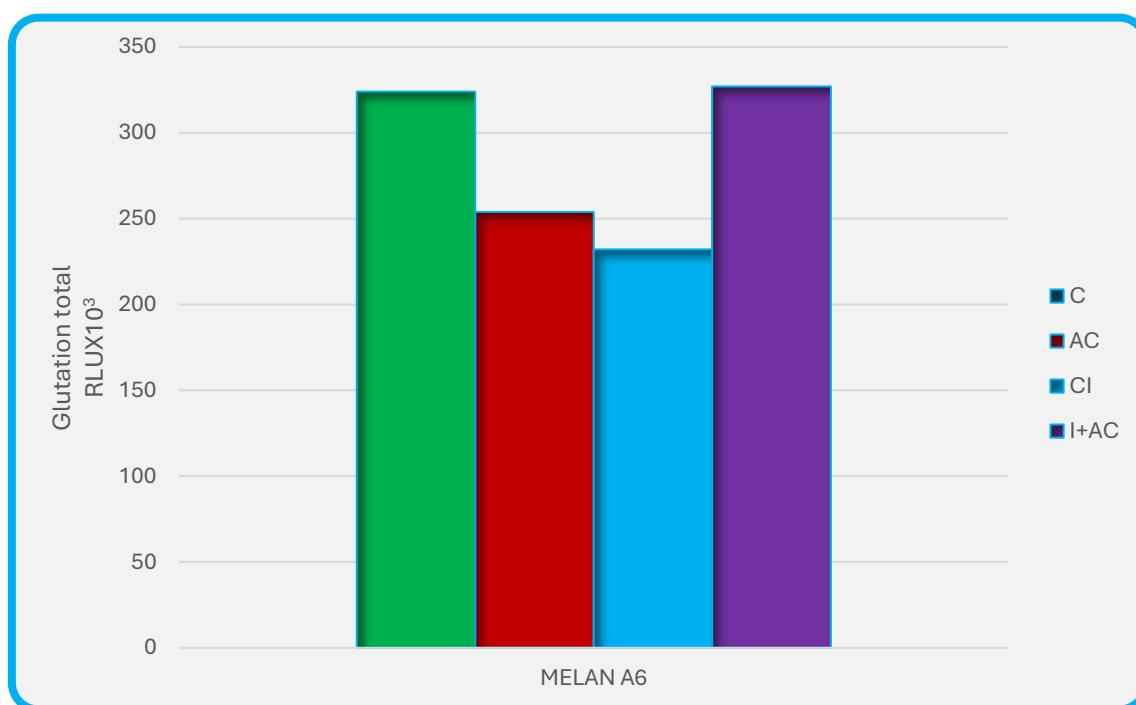


Figura 63. Resultados de Glutathion total del cultivo celular MELAN A6 en las distintas condiciones ensayadas

Resultados del ensayo del Glutathion total. Conclusión

En conjunto, los resultados de la determinación de GSH total demuestran un comportamiento diferencial y dependiente del tipo celular. Se confirma que tras la irradiación, las células no tumorales (PNT2 y MELAN A6) sufren un agotamiento de sus reservas de GSH, mientras que las células de melanoma (B16F10 y SKMEL1) responden con un aumento significativo de este antioxidante como mecanismo de defensa. El hallazgo más relevante es que el Ácido Carnósico, un compuesto con conocida capacidad radioprotectora, muestra un efecto dual: en la línea no tumoral MELAN A6, ejerce un claro efecto protector al restaurar los niveles de GSH. Sin embargo, en las células productoras de melanina, se observa una pérdida de esta capacidad radioprotectora que, en el caso de las líneas tumorales, sugiere un efecto paradójico radiosensibilizador.

Resultados ensayo de determinación Ratio GSH/GSSG en cultivos de células PNT2

La evaluación de la ratio GSH/GSSG en la línea celular PNT2 reveló una respuesta compleja y mayoritariamente adaptativa, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control. De forma sorprendente, tanto el tratamiento con Ácido Carnósico (AC) solo (+26%) como la irradiación (CI) sola (+18%) provocaron un ligero aumento no significativo en la ratio, sugiriendo una posible mejora del estado redox. En contraste, la combinación de ambos tratamientos (I+AC) fue la única condición que indujo una disminución en la ratio (-9%), indicando un leve estrés oxidativo (Tabla 15 y Figura 64).

Este comportamiento de la ratio funcional contrasta con lo observado en la reserva total de glutatión. En este caso, el tratamiento con Ácido Carnósico sí produjo una disminución significativa del glutatión total ($p < 0.001$), y la exposición a 20 Gy de radiación provocó una depleción aún más severa y drástica ($p < 0.001$), manteniéndose los niveles muy bajos en el grupo combinado.

La interpretación conjunta de ambos resultados sugiere que, en las células PNT2, los tratamientos provocan un agotamiento de la reserva total de glutatión, pero la célula es muy eficiente en mantener su equilibrio redox funcional. Esta ausencia de un colapso en la ratio GSH/GSSG, a pesar de la drástica caída en la cantidad total de glutatión, es coherente con el efecto radioprotector que el Ácido Carnósico ejerce en esta línea celular, ayudándola a gestionar el estrés oxidativo sin entrar en un estado pro-oxidante severo.

Tabla 15. Resultados de la ratio GSH/GSSG (%) del cultivo celular PNT2 en condiciones basales (C), con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC)

Ratio GSH/GSSG	%
C	0% ± 0.00%
AC	26% ± 1.04%
CI	18% ± 0.72%
I+AC	-9% ± 0.36%

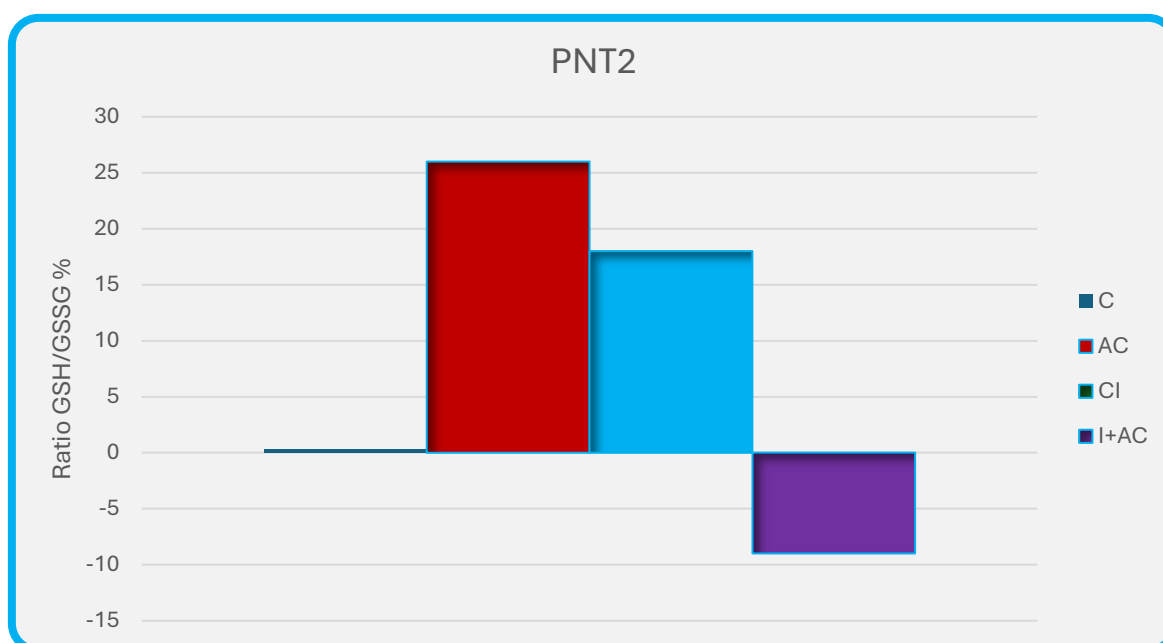


Figura 64. Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular PNT2 en las distintas condiciones ensayadas

a. Resultados ensayo de determinación glutatión en células B16F10.

La línea celular de melanoma B16F10 presenta un perfil antioxidante que la distingue de las células no tumorales. En su estado basal (C), estas células se

caracterizan por poseer niveles de glutatión total considerablemente elevados, de 462 RLU , y una ratio GSH/GSSG también descrito como muy alto. Esta configuración inicial, que combina una gran reserva de glutatión con un estado redox altamente funcional, significa que estas células poseen un potente sistema de defensa endógeno que les confiere una marcada resistencia natural para neutralizar el estrés oxidativo.

Al analizar el efecto de los tratamientos individuales, se observa que el Ácido Carnósico (AC) por sí solo tiene un impacto modesto sobre estas células. Provoca una leve disminución en los niveles de glutatión total a 453 RLU y una reducción mínima de solo un -2% en la ratio GSH/GSSG. En contraste, la irradiación (CI) induce un severo estrés oxidativo, como evidencia la significativa caída del -40% en la ratio GSH/GSSG. Este colapso del estado redox ocurre a pesar de que la célula activa una potente respuesta adaptativa, incrementando sus niveles de glutatión total por encima de su ya elevado nivel basal, hasta alcanzar 552 RLU. Este comportamiento revela que, aunque las células tumorales intentan defenderse produciendo más glutatión, la intensidad del daño por radiación es tan grande que el sistema se ve sobrepasado, llevando a un intenso consumo de GSH y a un estado celular claramente oxidado.

La irradiación combinada con Ácido Carnósico (I+AC) tiene una interacción compleja y de interés terapéutico (Tabla 16 y Figura 65). Se observa un doble efecto del Ácido Carnósico: por un lado, atenúa el desequilibrio redox, ya que la caída de la ratio GSH/GSSG es menos pronunciada (-34%) en comparación con la irradiación sola (-40%). Esto indica que el compuesto ayuda a preservar una mayor proporción del glutatión en su estado funcionalmente activo. Por otro lado, el Ácido Carnósico parece interferir con la principal estrategia de defensa de la célula tumoral: la sobreproducción de glutatión total. En el grupo I + AC , los niveles de glutatión total (512 RLU) son inferiores a los que la célula logra alcanzar bajo la irradiación sola (552 RLU).

Este comportamiento dual es la clave de su potencial terapéutico. Al limitar la capacidad de las células de melanoma para aumentar su escudo antioxidante

principal (el glutatión total) y, simultáneamente, modular el estado funcional de dicho sistema, el Ácido Carnósico podría actuar como un agente radiosensibilizador.

Tabla 16. Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular B16F10 en condiciones basales (C) , con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC).

Ratio GSH/GSSG	%
C	0 %± 0.00%
AC	-2%± 0.08%
CI	-40%± 1.60%
I+AC	-34%± 1.36%

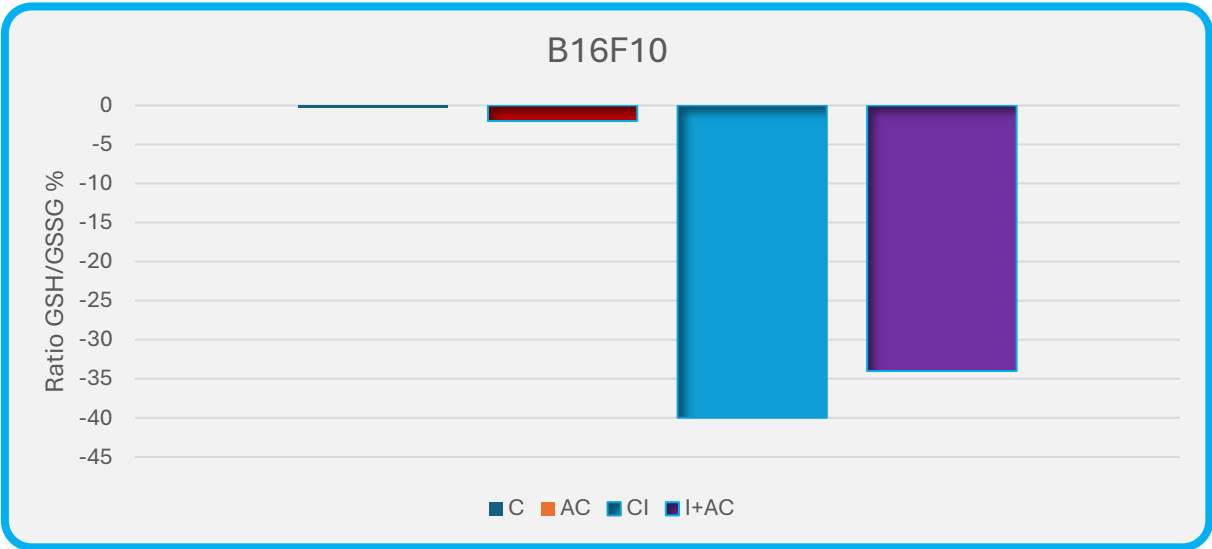


Figura 65. Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular B16F10 en las distintas condiciones ensayadas

b. Resultados ensayo de determinación glutatión en células Melan-A6.

Tabla 17. Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular MELAN A6 en condiciones basales (C) , con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC).

Ratio GSH/GSSG	%
C	0%± 0.00%
AC	-26%± 1.04%
CI	-40%± 1.60%
I+AC	-30%± 1.20%

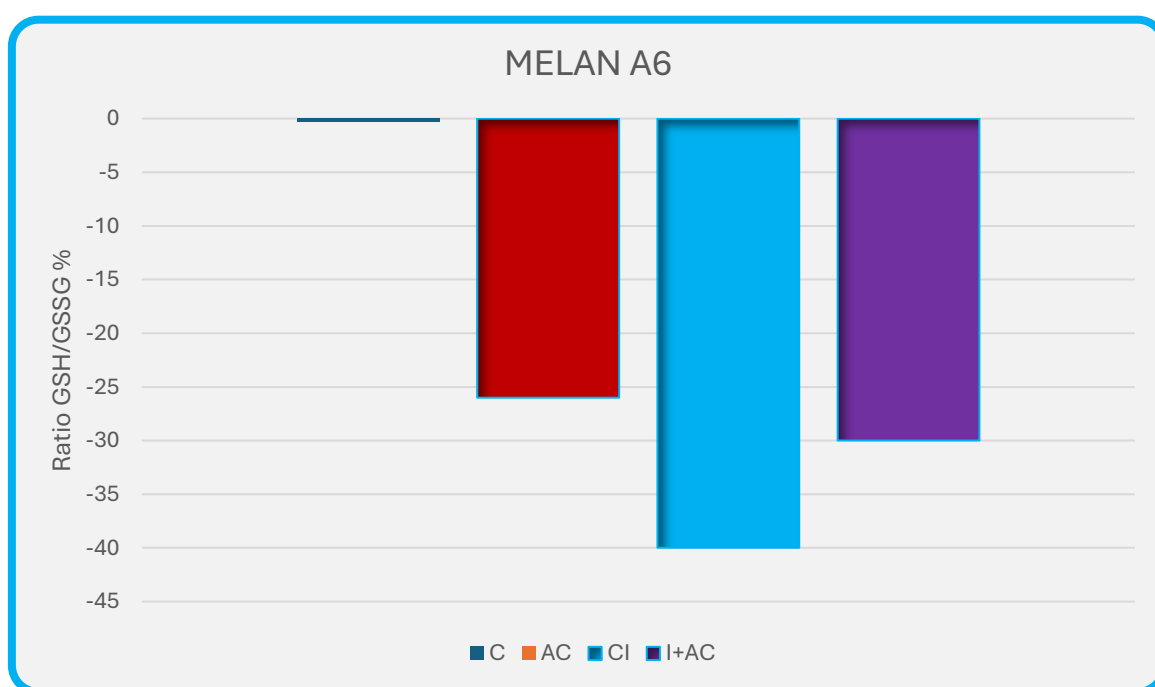


Figura 66. Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular MELAN A6 en las distintas condiciones ensayadas

La línea celular de melanocitos MELAN A6, considerada como un modelo de célula no tumoral fue evaluada para determinar su respuesta redox frente al Ácido Carnósico y la irradiación, en comparación con las líneas de melanoma. En su estado basal (C), estas células presentan un sistema antioxidante saludable, con niveles de glutatión total de 324 RLU y una ratio GSH/GSSG equilibrado. (Tabla 17 y Figura 66)

La exposición a los agentes de forma individual reveló que ambos actúan como estresores oxidativos para estas células. El tratamiento con Ácido Carnósico (AC) por sí solo indujo un detrimento en el estado redox, reflejado en una disminución de la ratio GSH/GSSG en un -26% y una reducción del glutatión total a 254 RLU. De forma similar, la irradiación (CI) con 20 Gy comprometió aún más el sistema, reduciendo el glutatión total a 232 RLU y provocando una caída de la ratio en un -40%.

Estos resultados sugieren que, tanto el Ácido Carnósico como la irradiación comprometen la capacidad antioxidante de las células MELAN A6.

En contraste cuando se administra Ácido Carnósico en combinación con la irradiación (I+AC), se observa un potente efecto radioprotector. Este beneficio se manifiesta de dos maneras clave. Primero, la reserva de glutatión total no solo se protege de la depleción, sino que se recupera a niveles cercanos al basal, alcanzando 327 RLU. Segundo, aunque la ratio GSH/GSSG sigue disminuyendo en un -30% respecto al control, esta caída es menor que la provocada por la irradiación sola (-40%), lo que demuestra que el Ácido Carnósico ayuda a la célula a mantener un mejor equilibrio redox funcional bajo el estrés de la radiación.

Para las células MELAN A6 el Ácido Carnósico demuestra un efecto radioprotector. Su beneficio radica en una acción dual que consiste en restaurar la reserva total de glutatión y, mitigar la severidad del desequilibrio redox inducido por la irradiación. Este comportamiento protector, que ayuda a las células de tipo no tumoral a preservar su homeostasis y sus defensas antioxidantes, contrasta fuertemente con los efectos observados en las células de melanoma.

c. Resultados ensayo de determinación glutatión en células SKMEL1.

Tabla 18. Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular SKMEL-1 en condiciones basales (C) , con Ácido Carnósico (AC), irradiadas(CI) e irradiadas con Ácido Carnósico (I+AC).

Ratio GSH/GSSG	%
C	0%± 0.00%
AC	23%± 0.92%
CI	-19%± 0.76%
I+AC	-23%± 0.92%

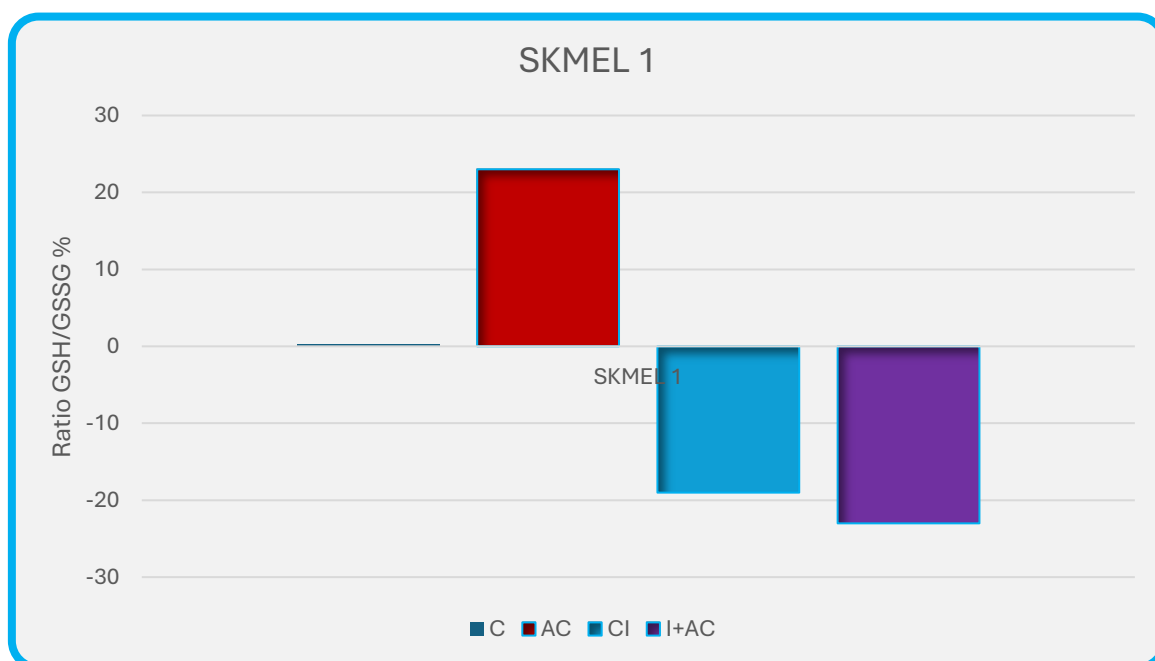


Figura 67. Resultados de la ratio GSH/GSSG en % del cultivo celular SKMEL-1 en las distintas condiciones ensayadas

La línea celular de melanoma humano SKMEL1 exhibió una respuesta compleja y distintiva de su sistema de glutatión frente a los agentes usados. En condiciones de control (C), estas células presentan un nivel de glutatión total intracelular de 269 RLU.

El tratamiento con Ácido Carnósico (AC) parece ejercer un efecto restaurador sobre el estado redox de estas células (Tabla 18 y Figura 67). Se observó un incremento de la reserva de glutatión total a 373 RLU , acompañado de una notable mejora en el equilibrio redox, manifestada como un aumento del +23% en la ratio GSH/GSSG. Este hallazgo sugiere que el Ácido Carnósico, es capaz de promover un ambiente intracelular más reducido, potenciando el sistema de defensa antioxidante de las células SKMEL1.

En contraste, la irradiación (CI) con 20 Gy desencadenó una respuesta dual: por un lado, indujo un aumento de la reserva de glutatión total hasta 506 RLU, un mecanismo compensatorio pro-supervivencia. Sin embargo, este incremento cuantitativo fue insuficiente para mantener la homeostasis del sistema, como lo demuestra la disminución del -19% en la ratio GSH/GSSG, indicando un desplazamiento hacia un estado prooxidante.

Cuando a las células irradiadas se le sumo el AC se aprecia que, aunque la reserva de glutatión total se mantuvo significativamente elevada en 443 RLU , la ratio GSH/GSSG sufrió una caída del -23%. Este descenso es más pronunciado que el observado con la irradiación sola (-19%), lo que sugiere un efecto paradójico: la presencia de Ácido Carnósico, que por sí solo es beneficioso, parece exacerbar el desequilibrio redox funcional inducido por la radiación.

El Ácido Carnósico tiene un papel diferente dependiente del contexto en las células SKMEL1. Mientras que el AC por si solo mejora la homeostasis del glutatión, en combinación con la irradiación parece comprometer la eficacia funcional del sistema antioxidante, a pesar de los intentos de la célula por defenderse mediante el aumento de su reserva de glutatión. Al impedir que la célula gestione

eficientemente el estrés inducido por la radiación, el Ácido Carnósico podría estar actuando como un agente radiosensibilizador, disminuyendo el umbral para la citotoxicidad.

V.DISCUSIÓN

La radioterapia es una de las modalidades más eficaces en el tratamiento oncológico; sin embargo, su éxito se ve limitado por dos desafíos fundamentales: la toxicidad en los tejidos sanos circundantes y la resistencia de algunas células tumorales a la radiación. La búsqueda de estrategias para superar estas limitaciones y así mejorar el índice terapéutico es un área de intensa investigación. En este contexto, ha surgido un gran interés por compuestos que puedan ejercer un efecto dual: proteger selectivamente las células normales (radioprotectores) y, al mismo tiempo, aumentar la sensibilidad de las células neoplásicas a la radiación (radiosensibilizadores). Los polifenoles, por sus propiedades biológicas, se han posicionado como candidatos prometedores para este fin.

El propósito de este estudio ha sido analizar los efectos paradójicos del ácido carnósico sobre la respuesta celular a la radiación ionizante. Se buscó determinar el potencial de este compuesto para actuar como agente radioprotector en células no tumorales y como radiosensibilizador en células tumorales de melanoma, explorando los mecanismos subyacentes a este posible comportamiento dual.

Para alcanzar este objetivo, se evaluó la capacidad genoprotectora del ácido carnósico mediante ensayos de micronúcleos *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, se determinó su impacto sobre la supervivencia, la muerte celular por apoptosis y la progresión del ciclo celular en un panel de líneas celulares que incluía células no tumorales (PNT2 y Melan-A6) y células tumorales de melanoma (B16F10 y SK-MEL-1) tras ser sometidas a radiación. Finalmente, se investigó la modulación del estado redox intracelular a través del análisis de los niveles de glutatión.

La interpretación de los hallazgos de este estudio se realiza para analizar de manera lógica y secuencial los efectos del ácido carnósico sobre la respuesta celular a la radiación ionizante. Se parte de la evidencia fundamental, su efecto radioprotector, para seguir analizando la supervivencia celular, donde se revela el comportamiento dual y selectivo del compuesto. Posteriormente, se profundiza en los mecanismos celulares que explican dicha dualidad, como la modulación de la apoptosis y del ciclo celular, para culminar en la explicación bioquímica centrada en el sistema del glutatión. Este enfoque permite construir una argumentación que

describe los fenómenos observados y que los explica en el contexto de la biología celular y molecular de cada línea estudiada.

El primer paso fue determinar si el ácido carnósico poseía la capacidad de proteger el material genético del daño inducido por la radiación ionizante. Para ello, se empleó el ensayo de micronúcleos, un biomarcador de genotoxicidad ampliamente validado. Los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, determinan de forma clara y consistente que el ácido carnósico presenta una actividad genoprotectora.

En el ensayo *in vitro* con linfocitos humanos, la radiación ionizante (2 Gy) demostró su potente capacidad clastogénica, llegando a triplicar la frecuencia de micronúcleos en comparación con las células no irradiadas. Frente a este daño, el hallazgo más relevante fue el potente efecto protector del ácido carnósico. Cuando las células se trataron con AC antes de la irradiación, la frecuencia de micronúcleos se redujo drásticamente, volviendo a niveles casi normales, lo que demuestra que el compuesto protege eficazmente a las células humanas del daño cromosómico. Este compuesto demostró ser seguro a la concentración estudiada, ya que no incrementó la aparición de micronúcleos, demostrando así su ausencia de genotoxicidad.

Para validar si este efecto protector observado en un sistema *in vitro* se mantenía en un organismo complejo, se trasladó el estudio a un modelo murino *in vivo*. Los resultados del ensayo de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea corroboraron los hallazgos *in vitro*. La irradiación de los animales con 0,5Gy indujo un marcado aumento en la formación de MN, mientras que la administración previa de AC redujo este daño en más de un 60 %. La médula ósea es uno de los tejidos más radiosensibles del organismo, y su protección es de gran importancia clínica.

Estos resultados fueron reforzados mediante una técnica sensible, la citometría de flujo para la cuantificación de MN en reticulocitos de sangre periférica (MN-RET). Este método confirmó el daño genotóxico inducido por la radiación y

reafirmó de manera significativa la capacidad protectora del AC en los animales pretratados.

Estos resultados consistentes y demostrados a través de tres ensayos diferentes, utilizando tanto modelos *in vitro* como *in vivo* y diversas metodologías de cuantificación, dan una gran solidez a la conclusión de que el ácido carnósico es un eficaz agente genoprotector frente a la radiación ionizante.

Una vez confirmada la capacidad genoprotectora del AC, el siguiente paso fue determinar si producía un aumento de la supervivencia celular. Para ello, se emplearon los ensayos de viabilidad MTT y XTT, que miden la actividad metabólica celular como un indicador de la citotoxicidad. Los resultados de estos ensayos revelaron un patrón de respuesta complejo y, lo que es más importante, diferencial entre las líneas celulares, sentando las bases del efecto dual que se estudia.

En la línea celular epitelial normal de próstata PNT2, la irradiación con 20 Gy redujo significativamente la viabilidad celular al 61 % a las 48 horas. Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con AC, se observó una radioprotección completa y sostenida. La supervivencia celular en este grupo se mantuvo en el 100 % tanto a las 24 como a las 48 horas, eliminando por completo el efecto citotóxico de la radiación. Este resultado es de una gran relevancia, ya que demuestra que el AC preserva la viabilidad y la función metabólica de las células normales frente a una dosis de radiación muy elevada.

El comportamiento observado en la línea de melanoma murino metastásico B16F10 fue radicalmente opuesto y constituye el hallazgo más significativo de este ensayo de citotoxicidad. En estas células, el AC presentó un efecto dependiente del tiempo: a las 24 horas, mostró una ligera protección, pero a las 48 horas, el efecto se revirtió drásticamente. La supervivencia en el grupo al que se le administro AC antes de la irradiación cayó al 39 %, un valor notablemente inferior al 59 % del grupo que solo recibió radiación. Este fenómeno es de radiosensibilización: el AC hizo que las células tumorales fueran más vulnerables al efecto citotóxico de la radiación a largo plazo.

La existencia de este efecto dual ,protección en células normales (PNT2) y sensibilización en células tumorales (B16F10), es el núcleo de este estudio.

Las otras dos líneas celulares, los melanocitos murinos no tumorales Melan-A6 y las células de melanoma humano SK-MEL-1, mostraron un patrón de respuesta diferente. En ambos casos, el AC proporcionó una protección inicial muy potente a las 24 horas, anulando casi por completo la citotoxicidad de la radiación. Sin embargo, este efecto protector fue transitorio. A las 48 horas, el beneficio había desaparecido, y la supervivencia de los grupos tratados con la combinación era prácticamente idéntica a la de los grupos que solo fueron irradiados.

En conjunto, los ensayos de citotoxicidad demuestran que el ácido carnósico no ejerce un efecto homogéneo, sino que su acción es selectiva y depende de la línea celular y del tiempo de evaluación post-irradiación.

El hallazgo más importante es la dicotomía observada entre las células normales y las tumorales más agresivas. Por un lado, el AC proporciona una protección sostenida y completa a las células epiteliales normales PNT2, preservando su viabilidad incluso tras una dosis elevada de radiación. Por otro lado, en la línea de melanoma murino metastásico B16F10, el mismo compuesto indujo un efecto de radiosensibilización, aumentando la muerte celular a las 48 horas. Este comportamiento opuesto es de gran relevancia , ya que sugiere que el AC es capaz de explotar diferencias intrínsecas en las vías de respuesta al estrés que distinguen a las células sanas de las neoplásicas.

A esta complejidad se suma el comportamiento de las células Melan-A6 y SK-MEL-1, en las que el AC indujo una potente protección que, sin embargo, fue transitoria y se perdió a las 48 horas. Esta respuesta intermedia podría indicar que, si bien estas células se benefician inicialmente de la capacidad antioxidante del compuesto, carecen de los mecanismos para mantener un estado de protección a largo plazo o, podría ser que se activen vías compensatorias que anulan el beneficio inicial.

Para comprender los mecanismos subyacentes a los efectos sobre la supervivencia celular observados previamente, se estudia el papel de la apoptosis

inducida por la radiación. Mediante el uso de la tinción con Anexina V se cuantificó el porcentaje de células que entraban en este proceso. Los resultados obtenidos se correlacionan con los datos de citotoxicidad.

En las células normales PNT2, el AC demostró un potente efecto anti-apoptótico. Mientras que la irradiación por sí sola indujo que un 17,78 % de la población celular entrara en apoptosis o necrosis, el pretratamiento con AC redujo esta cifra a un 11,59 %. Esta inhibición de la muerte celular programada explica la radioprotección observada en los ensayos de viabilidad . Esto podría ser debido a que el AC interfiere con las señales pro-apoptóticas desencadenadas por la radiación en las células normales, promoviendo así su supervivencia

En contraste con las células PNT2, la administración de Ácido Carnósico antes de la exposición a rayos X (CiCA) en las células de melanoma B16F10 no confirió un beneficio anti-apoptótico. Aunque se determinó una leve reducción en el porcentaje de células apoptóticas, esta, al igual que en las otras líneas productoras de melanina, no alcanzó significación estadística.

Esta ausencia de un efecto protector sobre la apoptosis, sumada a la disminución significativa de la supervivencia celular y la intensificación del bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular, demuestra que la radiosensibilización del AC en las células B16F10 se produce a través de mecanismos distintos a la alteración de la muerte celular programada

De manera igualmente significativa, en las líneas celulares Melan-A6 y SK-MEL-1, el AC no tuvo un efecto claro sobre los niveles de apoptosis inducidos por la radiación a las 48 horas. En ambos casos, el porcentaje de células apoptóticas en los grupos de tratamiento combinado fue prácticamente idéntico al de los grupos irradiados únicamente. Este resultado, aunque negativo, es importante, ya que explica por qué la protección observada en los ensayos de viabilidad era meramente transitoria. El beneficio inicial que el AC pudo proporcionar no fue suficiente para afectar la supervivencia celular. Al no inhibir la apoptosis, la tasa de

muerte celular a largo plazo no difirió significativamente de la observada en el control irradiado.

Posteriormente se analizó la distribución del ciclo celular. Este análisis es fundamental, ya que la detención del ciclo, especialmente en G2/M, es una respuesta al daño en el ADN inducido por la radiación, permitiendo a la célula un tiempo para reparar el genoma antes de entrar en mitosis.

Cabe destacar que no se han encontrado referencias previas que informen sobre el efecto del AC administrado antes de la exposición a rayos X en el ciclo celular de estas líneas celulares, lo que resalta la novedad de los hallazgos de este estudio.

En este estudio, la exposición a rayos X produjo los cambios característicos en los eventos del ciclo celular, siendo el aumento del porcentaje de células en G2/M la alteración más frecuente, tanto en las líneas celulares humanas como en las murinas. Este fenómeno está asociado con la activación de p53 y p21, así como con alteraciones en los niveles de Ciclina A y Ciclina B1 (461–463). Tras la exposición a la radiación, la proporción de células en la fase G0/G1 disminuyó o se mantuvo sin cambios, acompañado generalmente por una reducción en la población de la fase S (461–463). Los resultados muestran estas modificaciones en todas las líneas celulares irradiadas, aunque hemos determinado diferencias en la fase S, donde el número de células es similar en las células B16F10, se reduce en las células MELAN A y SK-MEL-1, y solo aumenta en las células PNT2.

Los resultados revelaron que la modulación de este punto de control por parte del ácido carnósico, es otro mecanismo que explica su efecto dual.

El patrón de respuesta diferencial más claro se observó al comparar las células normales PNT2 con las de melanoma murino B16F10. En las células normales PNT2, la irradiación provocó una detención en la fase G2/M, aumentando la población en esta fase de un 20 % a un 41,6 %. El pretratamiento con AC atenuó esta detención, reduciendo el porcentaje de células bloqueadas en G2/M. Este resultado confirma el efecto radioprotector del AC. El compuesto ayuda a las células normales a superar el bloqueo del ciclo celular, probablemente porque

facilita una reparación más eficiente del daño. Como consecuencia, las células pueden reanudar su división y sobrevivir, lo que es coherente con la menor tasa de apoptosis que observamos previamente

En contraste, en las células tumorales B16F10 el AC potenció el bloqueo del ciclo celular inducido por la radiación. Mientras la irradiación por sí sola ya causaba una acumulación en G2/M (aumentando del 6,7 % al 56,4 %), la adición de AC intensificó aún más esta detención, elevándola al 61,9 %. Un bloqueo prolongado e irreversible en G2/M, o "catástrofe mitótica" que es un precursor de la muerte celular apoptótica. Este hallazgo demuestra que el AC funciona como un radiosensibilizador al intensificar la detención del ciclo celular. Este bloqueo prolongado impide que las células cancerosas se dividan, lo que finalmente provoca su muerte por apoptosis.

El análisis del ciclo celular demuestra que el AC modula de forma selectiva la respuesta al daño por radiación. Facilita la recuperación del ciclo en células normales (PNT2), contribuyendo a su supervivencia, mientras que potencia el bloqueo en células de melanoma agresivo (B16F10), conduciéndolas a la muerte.

Las líneas celulares Melan-A6 y SK-MEL-1 mostraron, una vez más, respuestas diferentes y complejas. En las Melan-A6, la combinación de AC y radiación desencadenó una respuesta extrema: una alta tasa de apoptosis junto a un colapso del ciclo celular en las supervivientes. Este fallo generalizado en la regulación celular explica su falta de viabilidad final.

En cambio, las SK-MEL-1 tuvieron una respuesta más parecida a la de las células sanas, ya que el AC mejoró parcialmente su detención en el ciclo. A pesar de esta ayuda, no fue suficiente para garantizar su supervivencia, lo que sugiere que el daño inicial era irreparable o que se activaron otras vías de muerte a largo plazo.

Para obtener una explicación bioquímica, se investigó el estado del sistema de glutatión (GSH), el principal antioxidante intracelular y un regulador clave de la respuesta al estrés oxidativo inducido por la radiación. El análisis de los niveles de glutatión total y del ratio GSH/GSSG en % confirmó las diferencias intrínsecas entre

las líneas celulares y reveló el mecanismo fundamental que explica el efecto dual del ácido carnósico.

En primer lugar, los datos basales mostraron que las células de melanoma murino B16F10 poseen de forma natural una concentración de glutatión total significativamente mayor que las células normales PNT2. Esta importante reserva antioxidante inherente probablemente contribuye a su conocida radioresistencia. Tras la irradiación, las respuestas fueron opuestas: las células normales PNT2 agotaron sus reservas de GSH para combatir el estrés oxidativo, mientras que las células tumorales B16F10 respondieron aumentando activamente su producción de GSH, en un claro intento de defenderse del daño.

En las células normales PNT2, el ácido carnósico demostró ser un claro radioprotector a nivel bioquímico. El tratamiento ayudó a estas células a tolerar mejor el estrés oxidativo agudo inducido por la radiación, mitigando tanto la depleción del glutatión total como el desequilibrio funcional de la ratio GSH/GSSG.

Esta acción de soporte al sistema de defensa antioxidante es la razón fundamental que explica la mayor supervivencia, la menor tasa de apoptosis y la mejor recuperación del ciclo celular que se observaron en todos los ensayos previos.

El comportamiento en las células tumorales B16F10 fue el opuesto: el ácido carnósico debilitó su principal mecanismo de defensa. El compuesto bloqueó la producción extra de glutatión que estas células generan para sobrevivir a la radiación, dejándolas vulnerables. Este fallo en su escudo antioxidante provocó el bloqueo irreversible del ciclo y la muerte celular, lo que se traduce en un potente efecto de radiosensibilización.

La línea celular epitelial de próstata no tumoral PNT2, que sirvió como modelo de tejido sano, reveló una importante sensibilidad al estrés oxidativo, pero también una respuesta protectora por parte del Ácido Carnósico. En condiciones basales (C), estas células mostraron un nivel de glutatión total de 210 RLU. El tratamiento exclusivo con Ácido Carnósico (AC) por sí solo indujo una notable disminución del GSH total (a 97 RLU), sugiriendo que el compuesto puede modular

el metabolismo del glutatión incluso en ausencia de radiación. Como era de esperar, la irradiación (CI) con 20 Gy provocó un severo estrés oxidativo, disminuyendo la reserva de glutatión total a solo 24 RLU y causando un colapso del -40% en la ratio GSH/GSSG. El hallazgo clave se observó en el tratamiento combinado (I+AC): aunque los niveles de GSH total permanecieron bajos (40 RLU), fueron significativamente superiores a los de la irradiación sola (24 RLU). De manera crucial, esta protección de la reserva total se correspondió con una atenuación de la caída en la ratio funcional GSH/GSSG, que fue de un -34% en el grupo combinado frente al -40% en el grupo irradiado. Esta mitigación, tanto de la depleción total como del desequilibrio funcional, demuestra que el Ácido Carnósico ejerce un efecto radioprotector moderado pero claro en las células PNT2, ayudándolas a tolerar mejor el estrés oxidativo agudo inducido por la radiación.

La línea celular de melanoma B16F10, conocida por su alta radioresistencia, presentó un perfil antioxidante y una respuesta a los tratamientos que contrastan fuertemente con las células no tumorales. En su estado basal (C), estas células se caracterizaron por una reserva de glutatión total considerablemente elevada (462 RLU), lo que subraya su potente sistema de defensa endógeno. El tratamiento con Ácido Carnósico (AC) por sí solo tuvo un impacto mínimo en estas células, alterando de forma casi insignificante el GSH total (453 RLU) y la ratio GSH/GSSG (-2%). Frente a la irradiación (CI), las células B16F10 montaron una potente respuesta defensiva, aumentando su glutatión total a un máximo de 552 RLU. Sin embargo, este esfuerzo fue insuficiente para contrarrestar el daño, como evidencia el colapso de la ratio GSH/GSSG en un -40%. La interacción del AC con la radiación (I+AC) reveló su complejo papel. Aunque el tratamiento combinado atenuó ligeramente la caída de la ratio GSH/GSSG (-34% frente a -40%), su efecto más significativo fue la interferencia con la principal estrategia de defensa de la célula tumoral: la sobreproducción de glutatión. Al limitar el aumento del GSH total (512 RLU) que las células logran bajo irradiación sola (552 RLU), el Ácido Carnósico debilita su escudo antioxidante. Este impedimento para montar una respuesta

defensiva máxima es un mecanismo clave que fundamenta su acción como agente radiosensibilizador.

La respuesta de las células Melan-A6, utilizadas como modelo de melanocitos no tumorales, fue fundamental para entender la selectividad del ácido carnósico. En su estado basal, estas células mostraron un sistema antioxidante saludable, con niveles de glutatión total de 324 RLU. Tanto el tratamiento con Ácido Carnósico (AC) como la irradiación (CI) por separado promueven el estrés oxidativo, disminuyendo la ratio GSH/GSSG en un -26% y -40%, respectivamente. Sin embargo, al administrar el AC en combinación con la irradiación (I+AC), se observó un potente efecto radioprotector. Este beneficio se manifestó en una acción dual: por un lado, se restauró la reserva total de glutatión a niveles cercanos a los basales (327 RLU) , y por otro, se mitigó la severidad del desequilibrio redox, atenuando la caída de la ratio GSH/GSSG (-30%) en comparación con la irradiación sola (-40%). Este comportamiento protector, que ayuda a las células de tipo no tumoral a preservar su homeostasis antioxidante, contrasta fuertemente con los efectos observados en las células de melanoma.

Por su parte, la línea de melanoma humano SKMEL1 exhibió una respuesta compleja y distintiva que refuerza la hipótesis de la radiosensibilización. El Ácido Carnósico (AC) ejerció un efecto beneficioso en estas células, incrementando la reserva de glutatión total (de 269 a 373 RLU) y mejorando el equilibrio redox con un aumento del +23% en la ratio GSH/GSSG. En contraste, la irradiación (CI) desencadenó una potente respuesta defensiva, aumentando masivamente el glutatión total (506 RLU), aunque este esfuerzo fue insuficiente para mantener la homeostasis, como demuestra la caída de la ratio en un -19%. El hallazgo clave se produjo con el tratamiento combinado (I+AC): aunque la reserva de glutatión se mantuvo elevada (443 RLU), la ratio GSH/GSSG sufrió una caída del -23%, un descenso más pronunciado que el observado con la irradiación sola (-19%). Este efecto paradójico, donde el AC exacerba el desequilibrio redox funcional inducido por la radiación, sugiere que el compuesto compromete la eficacia del sistema

antioxidante, impidiendo que la célula gestione el estrés de forma eficiente y actuando, por tanto, como un agente radiosensibilizador.

Los efectos celulares observados son las consecuencias de profundos cambios bioquímicos subyacentes. Para comprender la raíz del efecto dual del ácido carnósico, es imprescindible analizar su impacto en el sistema de defensa antioxidante más importante de la célula: el glutatión (GSH). Los resultados confirman las diferencias intrínsecas entre las líneas celulares y revelan el mecanismo por el cual el AC ejerce su acción selectiva.

La capacidad del ácido carnósico para proteger las células sanas del daño inducido por la radiación no se debe a una simple acción de captación de radicales libres. Los resultados obtenidos demuestran que se basa en la activación de las defensas antioxidantes de la célula. Este proceso dirigido por la vía del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2), esencialmente "prepara" a la célula para resistir el ataque oxidativo de la radiación.

En el centro de esta respuesta citoprotectora se encuentra el eje Nrf2-Keap1. Nrf2 es un factor de transcripción que en condiciones normales está inactivo en el citoplasma por su represor, la proteína Keap1, que facilita su degradación constante. Sin embargo, el estrés oxidativo masivo generado por la radiación ionizante altera este equilibrio. La acumulación de ROS modifica a Keap1, liberando a Nrf2, que se transloca al núcleo y se une a los Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE) en los promotores de cientos de genes citoprotectores.

El ácido carnósico funciona como un potente activador de esta vía. Al ser un compuesto "pro-electrofílico", puede modificar directamente a Keap1, impidiendo la degradación de Nrf2 y provocando su acumulación y activación. El AC no actúa como un antioxidante pasivo, sino como una molécula de señalización, una "alarma" que desencadena un programa genético completo de defensa. Este mecanismo indirecto es más potente y duradero que la simple captación de radicales.

La consecuencia de esta activación es el fortalecimiento del sistema del glutatión a través de un mecanismo dual y eficiente. Por un lado se produce un aumento de la síntesis de Novo en la que el factor Nrf2 induce la expresión de las enzimas clave para la síntesis de GSH (GCLC, GCLM, GSS), aumentando así el pool total de GSH disponible. Y por otro lado hay un aumento del reciclaje en siendo también crucial el papel del Nrf2 que induce la expresión de la glutatión reductasa (GSR), la enzima que recicla el glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida y funcional (GSH).

Este doble control es lo que hace que la protección mediada por Nrf2 sea tan significativa. Aumenta la cantidad total de GSH y además asegura que una alta proporción se mantenga en su estado activo, lo que se refleja en un aumento de la relación GSH/GSSG. Este mecanismo explica los hallazgos de este estudio en las células PNT2, donde el tratamiento con AC atenuó el desequilibrio redox inducido por la radiación, reflejado en una caída menor de la ratio GSH/GSSG (-34%) en comparación con la irradiación sola (-40%).

Este proceso de "preacondicionamiento farmacológico" es la base de la radioprotección observada. Al preparar a las células sanas con un escudo de GSH reforzado, el AC les permite neutralizar la avalancha de ROS de la radiación de manera mucho más eficaz. Esto explica la reducción del daño al ADN, la menor inducción de apoptosis y, en última instancia, la mayor supervivencia celular que documentamos en las células PNT2.

Paradójicamente, los mismos mecanismos moleculares que el AC utiliza para proteger las células sanas sirven para inducir la vulnerabilidad en las células de melanoma. En lugar de reforzar el escudo de GSH, el AC lo debilita, desarmando las defensas de la célula tumoral. La clave de esta selectividad radica en que las células de melanoma poseen una reserva de glutatión basal significativamente elevada, lo que contribuye a su radioresistencia intrínseca, y en la capacidad del AC para "secuestrar" una vía metabólica única de estas células: la síntesis de melanina.

La ruta de la melanogénesis en las células de melanoma presenta una vulnerabilidad bioquímica inherente. La vía comienza con la oxidación de la L-tirosina a dopaquinona, un intermediario altamente reactivo. La dopaquinona puede ser conjugada directamente con GSH, un proceso que consume el antioxidante en su forma reducida y funcional para avanzar hacia la síntesis de feomelanina. Por tanto, una activación de la melanogénesis tiene el potencial de agotar las reservas de GSH celular.

La evidencia experimental indica que compuestos como el AC inducen activamente la melanogénesis en células de melanoma. Al hiperactivar esta vía, el AC la convierte en un mecanismo de agotamiento acelerado del GSH. El aumento masivo en la actividad de la tirosinasa genera un flujo elevado de dopaquinona que reacciona con el GSH disponible, consumiéndolo a un ritmo acelerado. El resultado es una disminución de la relación GSH/GSSG, llevando a la célula a un estado pro-oxidativo y a una depleción funcional de su capacidad antioxidante.

Este mecanismo de "secuestro" explica por qué, a pesar de que el AC mitiga ligeramente la caída de la ratio GSH/GSSG en B16F10 (una caída del -34% frente al -40% con la radiación sola), su efecto global es radiosensibilizador. La acción principal del AC en estas células es interferir con su capacidad para aumentar la producción total de GSH como respuesta defensiva, dejando a la célula tumoral con un escudo antioxidante debilitado en general. Así, esta célula de melanoma es incapaz de neutralizar eficazmente la avalancha de ROS generada por la radiación, lo que conduce a un daño oxidativo masivo en el ADN y las membranas, al deterioro de la función enzimática y, finalmente, a un drástico aumento de la apoptosis.

La base que explica la dicotomía de efectos del ácido carnósico se encuentra en la heterogeneidad metabólica de cada línea celular. La vía de la melanogénesis supone un objetivo metabólico diferencial que es explotado selectivamente por el AC. En estas células neoplásicas, la dinámica del glutatión está gobernada por un desequilibrio: la velocidad de la reacción de consumo de GSH, acoplada a la síntesis de feomelanina, es superior a la tasa de reposición del

pool de GSH, un proceso que es positivamente regulado por la vía Nrf2. Esta preponderancia del flujo catabólico se ve exacerbada por otros mecanismos propuestos: el AC podría ejercer un efecto inhibitorio directo sobre enzimas clave para el reciclaje del glutatión, como la glutatión reductasa (GR) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) además de sobre la glutatión S-transferasa (GST). Dicha inhibición limitaría la disponibilidad del cofactor NADPH, indispensable para la regeneración de GSH a partir de GSSG, comprometiendo aún más la capacidad de la célula para reponer su escudo antioxidante. Esta depleción neta del principal sistema de defensa anula el potencial efecto citoprotector que la activación de Nrf2 podría conferir, favoreciendo un fenotipo radiosensibilizado, una condición que podría verse agravada en líneas como la B16F10, donde se ha reportado una actividad reducida de la superóxido dismutasa (SOD), y potenciada por el microambiente tumoral ácido que favorece la actividad de ciertos compuestos.

Además, es probable que el efecto radiosensibilizador observado en las células de melanoma se deba a un mecanismo de acción multifactorial. Más allá de la alteración de la homeostasis del glutatión, la evidencia científica existente indica que el ácido carnósico y sus derivados ejercen un efecto inhibitorio sobre cascadas de señalización pro-supervivencia que se encuentran activadas en el melanoma, como la vía PI3K/Akt/mTOR y la del factor nuclear kappa B (NF- κ B), ambas implicadas directamente en la radioresistencia tumoral. Por lo tanto, la acción del AC se caracteriza por una doble estrategia: por un lado, compromete la capacidad antioxidante endógena de la célula y, por otro, suprime de forma concurrente las señales intracelulares que confieren resistencia a la apoptosis. Es la sinergia entre estos dos mecanismos distintos, la que proporciona un modelo más completo para explicar la eficacia radiosensibilizadora de los resultados de este estudio.

Los resultados obtenidos confirman hallazgos previos sobre las propiedades de los polifenoles del romero y aportan nuevas perspectivas que amplían el conocimiento actual.

Estos hallazgos han sido abordados previamente en literatura científica, tanto el papel de los compuestos naturales como radiomoduladores, como la radiobiología específica del melanoma por lo que es imprescindible, comparar los resultados propios con el conocimiento existente.

El concepto de radioprotectores, que surgió tras la Segunda Guerra Mundial con las investigaciones pioneras de Patt (607), ha encontrado en los flavonoides un campo de estudio de gran interés. Estos compuestos destacan por su capacidad de radioprotección y genoprotección, la cual se atribuye a su habilidad para neutralizar radicales libres y proteger el ADN del daño inducido por la radiación, una propiedad estrechamente ligada a su estructura química y capacidad antioxidante (608).

La evidencia experimental que respalda esta capacidad es sólida. Un estudio de Castillo et al. (609) demostró que los extractos de semilla de uva (GSE) reducían el daño cromosómico en linfocitos humanos, y que esta eficacia aumentaba con el grado de polimerización de las procianidinas. En otra investigación, Benavente-García (610) observó que, si bien la Rutina era el flavonoide más eficaz como pretratamiento contra los rayos X en modelos murinos, el extracto de hoja de olivo era el único que mantenía una actividad anticlastogénica significativa cuando se administraba después de la irradiación, gracias a su capacidad para eliminar lipoperoxiradicales.

De particular relevancia es el estudio que evaluó tres compuestos del romero (611), donde el ácido carnósico demostró ser el más efectivo como agente radioprotector, tanto antes como después de la exposición a rayos gamma. La eficacia del ácido carnósico fue corroborada por Alcaraz et al. (613), cuyo estudio concluyó que este compuesto, junto con el ácido rosmarínico y el D-tocoferol, lograba una reducción del daño genotóxico de hasta un 58%, superando incluso al radioprotector clínico amifostina.

La relación entre la estructura química de los flavonoides y su actividad protectora es compleja. Estudios como el de Alcaraz (614) han revelado que las

características estructurales más efectivas para la genoprotección *in vivo* incluyen la presencia de un grupo catecol y un cierto grado de polimerización, mientras que la ausencia de un grupo carbonilo en la posición C4 también parece ser favorable. Este mismo estudio destacó un hallazgo paradójico: la quercetina, un potente antioxidante *in vitro*, en realidad aumentó el daño genético *in vivo*, mientras que su forma glicosilada, la rutina, sí demostró ser protectora, lo que subraya la importancia de la estructura completa del compuesto.

Más allá de la simple captación de radicales, los mecanismos de acción de estos compuestos son más profundos. El resveratrol, otro polifenol natural, ha demostrado proteger múltiples tejidos mediante la reducción de la apoptosis y la estimulación de las defensas antioxidantes endógenas (615). De forma crucial, se ha demostrado que el efecto radioprotector del EGCG (un componente del té verde) está mediado por la activación de la vía de señalización Nrf2, un mecanismo que protege a las células del estrés oxidativo (616). Esta evidencia es fundamental, ya que establece un mecanismo de acción de otros polifenoles, incluido el ácido carnósico. La investigación en este campo es amplia, abarcando la protección contra la lesión intestinal (617, 618) y el potencial neuroprotector frente al daño por radiación (619, 620).

En este contexto, los hallazgos de este trabajo se alinean con la evidencia expuesta, y la refuerzan. Los resultados de este estudio demuestran la potente capacidad genoprotectora del ácido carnósico, observada a través de múltiples ensayos, incluyendo el daño cromosómico en linfocitos humanos *in vitro* y en modelos murinos *in vivo* (médula ósea y sangre periférica). La magnitud de la protección observada posiciona al ácido carnósico como uno de los compuestos fenólicos más eficaces descritos, en línea con los hallazgos previos sobre los derivados del romero (611, 613). Esta protección a nivel genético se traduce directamente en un beneficio funcional, como se evidencia en la capacidad del AC para garantizar una supervivencia de casi el 100% en células epiteliales normales (PNT2) incluso tras ser sometidas a altas dosis de radiación. A pesar de la conocida capacidad radioprotectora del AC, los estudios sobre su efecto específico en la

supervivencia de células PNT2 expuestas a radiación ionizante son muy escasos(464,465) Este trabajo fundamentalmente apoya que esta eficacia se debe a la captación directa de radicales libres y también a la activación de vías de defensa endógenas, una conclusión que concuerda con la literatura que apunta a la modulación de la vía Nrf2 como un mecanismo clave para otros polifenoles como el EGCG (616).

Además de su conocido papel como radioprotectores, la literatura científica también ha explorado el potencial de los flavonoides como radiosensibilizadores. Un estudio de Tiwari y Mishra (621) analiza en profundidad este enfoque, revisando los mecanismos moleculares implicados. Entre ellos, destacan la capacidad de los flavonoides para incrementar el daño al ADN, inhibir los procesos de reparación celular, inducir la apoptosis, modular el ciclo celular y frenar la angiogénesis tumoral.

En este sentido, la literatura describe varios mecanismos por los cuales el AC modula el ciclo celular. Se ha demostrado que el AC reduce significativamente la fase G2/M del ciclo en diversas células tumorales, incluyendo Caco-2, HT-29, LoVo y B16F10 (462,463,466). Esta detención impide que las células entren en mitosis, permitiendo la activación de mecanismos de reparación o, en casos de daño irreparable, la inducción de apoptosis. En otros contextos celulares, el AC induce una detención en G0/G1, asociada a la sobreexpresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas como p21, que bloquea la progresión a la fase S y la replicación del ADN(462). Además, el AC promueve la acumulación de células en la fase sub-G1, un marcador de fragmentación del ADN y apoptosis, efecto que es dosis-dependiente y está asociado a la activación de caspasas y a la escisión de PARP(467,468).

Este creciente interés en los fitocompuestos como potenciadores de la radioterapia se aleja de los radiosensibilizadores sintéticos tradicionales. En esta línea, el trabajo de Komorowska (622) resalta varios radiosensibilizadores naturales que ya se encuentran en fases de ensayo clínico o cuentan con una sólida evidencia científica. Entre los ejemplos más notables se encuentran la curcumina,

la genisteína y el resveratrol, consolidando la idea de que los compuestos naturales pueden jugar un papel crucial en la mejora de la eficacia de los tratamientos oncológicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo con el ácido carnósico respaldan esta línea de investigación sobre radiosensibilizadores naturales demostrando que el ácido carnósico actúa como un agente radiosensibilizador en células de melanoma, provocando un aumento del 200% en la muerte celular inducida por la radiación. Este efecto es coherente con los mecanismos descritos por Tiwari y Mishra (621), ya que este trabajo explica que la radiosensibilización se produce a través de una potenciación de la apoptosis y una intensificación del bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M, impidiendo la recuperación de las células tumorales. Además, se profundiza en la causa bioquímica, identificando la depleción selectiva de las defensas de glutatión en las células de melanoma como el evento subyacente que las deja vulnerables al daño por radiación. Por consiguiente, este trabajo posiciona al ácido carnósico como un eficaz radiosensibilizador de origen natural y aporta un modelo detallado que se alinea con el potencial descrito para otros fitocompuestos como la curcumina y el resveratrol (622).

Además de los mecanismos generales de radiosensibilización, es relevante señalar el contexto específico de la inducción de apoptosis por parte del Ácido Carnósico. Aunque no se han identificado estudios previos sobre su efecto en las líneas celulares de este trabajo, sí se ha reportado en otras investigaciones que el AC puede aumentar la apoptosis mediante la inducción de la expresión de las caspasas 3, 8 y 9, y afectando la vía de supervivencia Akt/mTOR(468–470) .

La literatura científica describe un efecto dual en ciertos compuestos naturales, donde una misma molécula puede actuar como radioprotector en células sanas y, paradójicamente, como radiosensibilizador en células tumorales. Este enfoque representa una estrategia terapéutica de gran interés para ampliar la ventana terapéutica de la radioterapia.

La genisteína, una isoflavona, es un ejemplo paradigmático de este comportamiento (623). En tejidos sanos, ejerce un claro efecto protector al reducir la apoptosis, mantener la estabilidad mitocondrial y actuar como un potente antioxidante que neutraliza las ROS y disminuye la inflamación. Sin embargo, en células tumorales, la genisteína potencia el efecto de la radiación a través de múltiples mecanismos: dificulta la reparación del ADN dañado, induce la detención del ciclo celular, promueve la muerte celular y aumenta selectivamente el estrés oxidativo, haciendo a las células cancerosas más vulnerables.

Este efecto dual no es exclusivo de la genisteína; otras isoflavonas como la daidzeína y la gliciteína presentan propiedades selectivas similares (624, 625), y se ha observado que combinaciones de la medicina tradicional, como la del *Astragalus mongholicus*, también aumentan la radiosensibilidad en modelos de cáncer de pulmón mientras protegen tejidos sanos (626).

Este fenómeno se extiende más allá de las isoflavonas a otros polifenoles ampliamente estudiados como la curcumina y el resveratrol. Ambos son conocidos por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en células normales, pero pueden inducir estrés oxidativo y detener el ciclo celular en la fase G2/M en células cancerosas, actuando así como radiosensibilizadores selectivos (627–630).

Debe destacarse la novedad de estos hallazgos en el contexto de la literatura científica. Aunque se ha reportado el efecto citotóxico de la radiación en células PNT2 y B16F10, los estudios sobre el efecto del AC en combinación con radiación en estas líneas son muy escasos o inexistentes (471,472). De hecho, no se encontraron referencias previas sobre el efecto del AC en la supervivencia de células B16F10 irradiadas (472). Asimismo, este trabajo presenta los primeros datos sobre el efecto de la radiación y el AC en la supervivencia de las líneas Melan-A y SK-MEL-1 .

Es interesante notar que la capacidad antiproliferativa del AC en células B16F10 ya ha sido demostrada en combinación con otros fármacos antitumorales, un efecto que se ha asociado a la inhibición de la adhesión y la migración

metastásica, posiblemente a través de la inhibición de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la inactivación de la quinasa AKT (473,474).

En conjunto, los resultados de este estudio confirman la alta capacidad radioprotectora del AC en las células PNT2, pero revelan una pérdida de esta protección en las líneas productoras de melanina. La magnitud de esta pérdida de radioprotección varía en intensidad, clasificándose de la siguiente manera: B16F10 < Melan-A = SK-MEL-1 < PNT2 .

De particular relevancia y en sintonía con este estudio, hay un estudio sobre el efecto paradójico observado en los polifenoles derivados del romero. El estudio de Alcaraz et al. (631) demostró que el carnosol actúa como un potente radioprotector en células normales de próstata (PNT2), pero radiosensibiliza las células de melanoma (B16F10). La explicación propuesta fue que en las células de melanoma, el carnosol activa la melanogénesis, un proceso que consume las defensas antioxidantes de la célula (el glutatión), dejándola vulnerable a la radiación. El mismo equipo de investigación confirmó este efecto dual con el ácido rosmarínico (632), observando que mientras protegía a las células PNT2, aumentaba la muerte celular en las B16F10 irradiadas. Un estudio posterior profundizó en el mecanismo, demostrando que en las células de melanoma el ácido rosmarínico disminuía el ratio GSH/GSSG, un indicador clave de estrés oxidativo, al activar la vía de la melanogénesis que consume el glutatión celular (633).

Finalmente, este estudio coincide y amplía una investigación sobre el ácido carnósico (634), compuesto estructuralmente relacionado pero más potente que el carnosol (635). Dicho estudio demostró que el AC exhibe una potente capacidad genoprotectora in vivo e in vitro. De forma paradójica, en las células normales PNT2, el AC logró una supervivencia celular del 97% tras la irradiación, disminuyendo la apoptosis y aumentando el ratio GSH/GSSG. En contraste, en las células de melanoma B16F10, la administración de AC aumentó la muerte celular en un 200% y disminuyó el ratio GSH/GSSG. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que, mientras en las células sanas el AC potencia las defensas antioxidantes,

en las células de melanoma explota la vía de la melanogénesis para agotar estas mismas defensas, logrando así un potente y selectivo efecto radiosensibilizador.

En este marco, este estudio se alinea con la literatura descrita. Es importante señalar que, para las líneas Melan A y SK-MEL-1, no existen referencias previas sobre el efecto de la radiación ionizante o del propio AC en su supervivencia, posicionando estos hallazgos como pioneros. Los hallazgos demuestran la capacidad del AC para ejercer una potente radioprotección en células no tumorales (PNT2 y Melan A1), un efecto fundamentado en la inhibición de la apoptosis y una mejor recuperación del ciclo celular. En marcado contraste, y en consonancia con los estudios sobre radiosensibilizadores naturales, estos resultados revelan un potente efecto pro-apoptótico y de bloqueo del ciclo celular en la línea de melanoma B16F10 y SKMEL-1, lo que resulta en un drástico aumento de la muerte celular. Además este trabajo propone el mecanismo que explica esta selectividad: mientras que en las células sanas el AC activa las defensas antioxidantes, en las de melanoma explota la vía de la melanogénesis para agotar el glutatión. Por lo tanto, este trabajo confirma que el ácido carnósico se une al grupo de radiomoduladores duales como la genisteína y el resveratrol, y además describe un modelo específico que explica cómo se puede lograr este efecto paradójico.

La melanogénesis es el proceso biológico de síntesis de melanina, el pigmento responsable del color de la piel y de la fotoprotección contra la radiación ultravioleta (UVR) (307). Este proceso, que también está implicado en la patogénesis del melanoma, comienza con la hidroxilación del aminoácido tirosina, una reacción catalizada por la enzima clave, la tirosinasa (TYR) (312). Esto da lugar a la dopaquinona, un intermediario que puede seguir dos rutas principales: la producción de eumelanina o, mediante la reacción con cisteína o glutatión, la producción de feomelanina (potencialmente pro-oxidante) (316). La cantidad y el tipo de melanina producida están regulados por un complejo sistema enzimático (TYR, TRP1, TRP2) y por vías de señalización como la del receptor MC1R y el factor de transcripción MITF, que a su vez son influenciadas por factores externos como la radiación UV (337, 344).

La melanina es una macromolécula con propiedades fisicoquímicas únicas que le confieren un papel complejo y dual en la radiobiología del melanoma. Por un lado, ejerce una clara acción radioprotectora a través de varios mecanismos: su amplio espectro de absorción le permite disipar la energía de la radiación ionizante (395, 396), su estructura rica en centros paramagnéticos le permite actuar como un eficaz eliminador de radicales libres (397), y su capacidad para secuestrar oxígeno molecular disminuye la formación de ROS en el entorno de orgánulos sensibles como el núcleo y las mitocondrias (392).

Sin embargo, y de forma paradójica, la melanina también puede contribuir a la radiosensibilización en determinadas circunstancias (400). Un mecanismo propuesto es su capacidad para secuestrar cationes metálicos como el manganeso (Mn^{2+}), formando complejos de baja simetría que pueden aumentar la susceptibilidad al daño por radiación, a diferencia de los complejos de alta simetría que se asocian con la radiorresistencia (386, 402). Por lo tanto, la melanina no es simplemente un escudo, sino un modulador complejo cuyo efecto neto (protección o sensibilización) puede depender del microambiente celular y del estado nutricional del tejido.

Los estudios en modelos animales han sido fundamentales para dilucidar la influencia de la pigmentación en la respuesta a la radioterapia. El modelo de hámster dorado sirio, utilizando las líneas de melanoma Bomirski (BHM), es particularmente revelador. Este modelo consiste en una línea celular melánica (Ma) y su variante amelanótica (Ab). Las primeras investigaciones en la década de 1970 ya mostraron que, tras la irradiación con rayos X, los tumores formados por la línea amelanótica (Ab) regresaban más rápidamente. Estudios posteriores *in vitro* e *in vivo* confirmaron que las células Ab eran significativamente más radiosensibles, con una dosis letal media (DL50) de 2.0 Gy, en comparación con los 4.8 Gy necesarios para las células Ma pigmentadas (421). Esta diferencia de más del doble en la dosis letal indica claramente que la presencia de melanina y una vía melanogénica activa confieren un grado significativo de radiorresistencia en este modelo. Es importante destacar que esta diferencia en la radiosensibilidad

desaparecía cuando se utilizaba radiación de alta LET (neutrones), lo que confirma que el efecto protector de la melanina está estrechamente ligado a mecanismos dependientes del oxígeno, como la eliminación de ROS. Por otro lado, el modelo del jerbo de Mongolia con el melanoma Zeman UJ90 ofreció un resultado sorprendente y contrapuesto. En este sistema, la melanina pareció ejercer un efecto radioprotector, y la radiorresistencia observada fue consistente con la alta resistencia general de esta especie a la radiación (446–449).

Para eliminar la influencia de las respuestas sistémicas del huésped, los estudios en líneas celulares han sido clave. Aunque los primeros trabajos arrojaron resultados contradictorios (228, 470), investigaciones más controladas han aportado una claridad decisiva. El estudio de Brożyna et al. (450), utilizando una línea celular de melanoma humano (SKMel-188) con melanogénesis inducible, es fundamental. En este sistema se demostró de forma concluyente que la sensibilidad a la radiación gamma es inversamente proporcional a la actividad de la vía melanogénica. Las células que producían más melanina eran más resistentes a la radiación (451). De manera aún más directa, cuando se bloqueaba la producción de melanina con inhibidores de la tirosinasa, las células se volvían significativamente más sensibles al daño por radiación.

La evidencia preclínica encuentra un fuerte respaldo en los estudios clínicos. Un estudio clínico retrospectivo de Brożyna et al. demostró que la presencia de melanogénesis en metástasis de melanoma se asociaba con una menor supervivencia general y libre de enfermedad en pacientes en estadios III y IV (366). El mismo grupo publicó posteriormente que los pacientes con metástasis amelanóticas mostraron una supervivencia significativamente mayor después de recibir radioterapia en comparación con aquellos con tumores pigmentados (452). La diferencia fue más pronunciada en los pacientes que recibieron únicamente radioterapia, lo que sugiere fuertemente que la melanina podría estar atenuando la eficacia del tratamiento. Estos resultados son consistentes con informes previos en melanoma uveal, donde los tumores pigmentados también tienen un peor pronóstico (453, 454). En conclusión, la convergencia de datos de modelos

animales, líneas celulares y estudios clínicos sugiere de manera sólida que la inhibición de la melanogénesis es una estrategia prometedora para radiosensibilizar las células de melanoma y mejorar la eficacia de la radioterapia.

Este trabajo propone que el efecto radiosensibilizador selectivo del ácido carnósico en las células de melanoma se debe, a su capacidad para realizar la melanogénesis. Se plantea que el ácido carnósico, al hiperactivar esta ruta metabólica, la convierte en un "sumidero" que consume de forma masiva el glutatión (GSH) intracelular. Este agotamiento de las defensas redox, confirmado por el colapso del ratio GSH/GSSG en nuestras células de melanoma, explica directamente la radiosensibilización observada a nivel celular: el aumento de la apoptosis, el bloqueo irreversible del ciclo celular y la drástica disminución de la supervivencia. Por lo tanto, este trabajo no solo valida la hipótesis de que la melanogénesis es el "talón de Aquiles" radiobiológico del melanoma, como sugieren los estudios clínicos (366, 452), sino que identifica al ácido carnósico como un agente capaz de explotar esta vulnerabilidad, transformando una vía celular característica en un mecanismo de autodestrucción inducida, lo que representa una estrategia terapéutica novedosa y prometedora.

Los resultados obtenidos en este estudio, que demuestran el efecto dual y selectivo del ácido carnósico, tienen profundas implicaciones tanto a nivel teórico para la radiobiología como a nivel práctico para la oncología clínica, especialmente en el tratamiento del melanoma.

Desde una perspectiva teórica, el hallazgo más significativo de este estudio es la explicación de un mecanismo de radiosensibilización que no se basa en una acción pro-oxidante directa, sino en la explotación de una vía metabólica específica de la célula tumoral. Tradicionalmente, la capacidad de un compuesto para radiosensibilizar se ha asociado a su habilidad para inhibir la reparación del ADN o para generar un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos resultados, sin embargo, proponen un modelo más sofisticado.

La literatura ya sugería que la melanogénesis activa podía ser un factor de mal pronóstico en pacientes con melanoma metastásico sometidos a radioterapia,

y que los melanomas amelanóticos presentaban una mejor respuesta. Sin embargo, el mecanismo bioquímico subyacente a esta observación clínica no estaba del todo claro. Este estudio proporciona una explicación : la radioresistencia del melanoma pigmentado no deriva únicamente de la capacidad de la melanina para actuar como un escudo físico o químico, sino de la solidez de su sistema antioxidante, con el glutatión (GSH) como eje central.

El ácido carnósico, al estimular la vía de la melanogénesis, provoca un "secuestro metabólico" de los precursores de GSH, agotando las defensas de la célula desde dentro. Esto redefine el concepto de radiosensibilizador en este contexto: en lugar de añadir un agente externo que cause más daño, se utiliza un compuesto que engaña a la célula tumoral para que agote sus propias defensas, dejándola vulnerable al daño de la radiación. Este principio de "sensibilización por agotamiento metabólico" es una implicación teórica novedosa .

Además, los resultados desafían la noción simplista de que un antioxidante siempre es un radioprotector. Demuestran que el efecto final de un compuesto depende críticamente del contexto celular. En una célula sin la vía metabólica específica (PNT2), el AC se comporta como un antioxidante clásico; en una célula que sí la posee (B16F10), el mismo compuesto se convierte en una herramienta para sabotear sus defensas.

Las implicaciones prácticas de estos hallazgos son directas y de un gran potencial clínico. Históricamente, el uso de la radioterapia en melanoma ha sido limitado por su fama de radioresistente. Estos resultados abren la puerta a una nueva estrategia para superar esta barrera.

La aplicación más evidente sería el uso del ácido carnósico como agente adyuvante a la radioterapia en el tratamiento del melanoma. Esta estrategia ofrecería un doble beneficio, que es el objetivo ideal de cualquier terapia combinada:

-Radiosensibilización del Tumor: Al administrar AC junto con la radiación, se podría aumentar significativamente la eficacia del tratamiento sobre las células de melanoma. Esto podría permitir el uso de dosis de radiación más bajas para lograr

el mismo control tumoral, o mejorar drásticamente las tasas de respuesta con las dosis estándar. La capacidad del AC para inducir una vulnerabilidad similar a la de los melanomas amelanóticos, que ya se sabe que responden mejor, es una perspectiva clínica muy atractiva.

-Radioprotección del Tejido Sano: Simultáneamente, el mismo compuesto protegería los tejidos sanos circundantes del daño radioinducido. Como se demostró en las células PNT2, el AC es un potente radioprotector de células no tumorales. Esto se traduciría en una reducción de los efectos secundarios agudos y crónicos de la radioterapia (como dermatitis, mucositis o fibrosis), mejorando enormemente la calidad de vida del paciente y ampliando el margen terapéutico.

Además, los resultados de este estudio ofrecen una posible explicación para el éxito de algunas terapias más antiguas, como el uso de la radioquelación en el melanoma uveal. Se había postulado que los agentes quelantes podían inhibir la producción de melanina. Estos resultados refuerzan esta idea, sugiriendo que la eficacia de dicha terapia podría radicar en su capacidad para afectar la vía de la melanogénesis, un mecanismo de radiosensibilización que este estudio ha descrito.

Por tanto, los hallazgos de este estudio proponen una estrategia prometedora. El uso de compuestos como el ácido carnósico podría transformar el enfoque de la radioterapia en el melanoma, pasando de ser un tratamiento de uso limitado a una opción mucho más eficaz y segura.

El siguiente paso lógico sería validar estos resultados en modelos animales *in vivo* con xenoinjertos de melanoma, para así poder diseñar futuros ensayos clínicos que evalúen la seguridad, dosificación y eficacia de esta nueva aproximación terapéutica.

En resumen, la sinergia del AC combinado con la RI en el melanoma es similar al efecto del cisplatino y otros quimioterápicos combinados con RI (475): ambos potencian el daño tumoral, modifican la apoptosis y detienen el ciclo celular en fases críticas, dificultando la reparación del ADN y promoviendo la muerte celular. Sin embargo, el ácido carnósico añade una mayor selectividad, ya que

protege las células normales mientras sensibiliza a las células productoras de melanina, lo que representa una ventaja terapéutica relevante.

Todo estudio de investigación tiene puntos fuertes que respaldan sus conclusiones y debilidades que limitan su alcance. Es fundamental realizar un análisis crítico de ambos aspectos para contextualizar adecuadamente los hallazgos de este trabajo.

La principal fortaleza de esta investigación radica en su diseño experimental riguroso y completo, que combinó estudios *in vitro* e *in vivo* para proporcionar una visión integral. El efecto genoprotector del ácido carnósico, por ejemplo, se demostró consistentemente en tres ensayos distintos: en linfocitos humanos, en médula ósea de ratón y en reticulocitos de sangre periférica. Esta triangulación de resultados, utilizando tanto técnicas clásicas de microscopía como modernas de citometría de flujo, confiere una gran solidez a las conclusiones. Así mismo, el rigor metodológico se aseguró mediante el análisis ciego por parte de múltiples especialistas, la realización de un alto número de réplicas por experimento y el uso de técnicas de alto rendimiento.

Quizás la fortaleza más significativa fue la elección de un panel de cuatro líneas celulares con características diferenciales. La inclusión de células normales (PNT2), melanocitos no tumorales (Melan-A6) y células de melanoma de distinto origen (la murina B16F10 y la humana SK-MEL-1) fue crucial para el éxito del estudio, ya que fue esta aproximación comparativa la que permitió descubrir y caracterizar el efecto selectivo y dual del AC, la principal conclusión de este trabajo. De particular relevancia es la inclusión de la línea Melan-A6, que actuó como el control fisiológico perfecto para las líneas de melanoma, al poseer la vía de la melanogénesis en un contexto no tumoral. Los efectos radioprotectores opuestos observados en Melan-A6 proporcionan la evidencia más sólida de la selectividad del compuesto. Asimismo, el uso de la línea SK-MEL-1, portadora de la mutación BRAF V600E de alta relevancia clínica, ancla los hallazgos directamente en el subgrupo más prevalente de pacientes con melanoma.

Además, el estudio no se limitó a describir el fenómeno, sino que profundizó en sus posibles causas, integrando análisis de viabilidad (MTT/XTT), supervivencia a largo plazo (clonogénico), muerte celular (apoptosis), progresión del ciclo celular y estado redox (glutación). Esta aproximación multidimensional fue esencial para poder postular un modelo coherente.

A pesar de estas fortalezas, es importante reconocer las limitaciones al diseño experimental, las cuales abren la puerta a futuras investigaciones. En primer lugar, la compleja respuesta observada en las líneas tumorales subraya la necesidad de validar y ampliar estos hallazgos. Sería fundamental ensayar el efecto del AC en un panel de líneas celulares de melanoma humano que representen la heterogeneidad del tumor. Por ejemplo, se podría utilizar la línea A375 (altamente pigmentada y con la mutación BRAF V600E) para confirmar el efecto en otro contexto genético similar, la línea MeWo (pigmentada pero BRAF de tipo salvaje) para disociar el efecto de esta mutación específica, y una línea amelanótica como C32 para verificar si la ausencia de pigmentación anula la radiosensibilización. Adicionalmente, para definir los límites de la hipótesis del mecanismo de acción, sería de gran valor realizar el estudio en líneas celulares de otros perfiles tumorales. Esto permitiría determinar si el AC puede radiosensibilizar otros tumores pigmentados no melanocíticos, como la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, y si, como predice la hipótesis, actúa como un radioprotector en cánceres radorresistentes no pigmentados, como la línea de glioblastoma U87 MG. La ausencia de estos experimentos limita, por ahora, el alcance de la conclusión a un fenómeno específico del melanoma.

Otra limitación metodológica es que el estudio se ha centrado en una única concentración de ácido carnósico y una dosis fija de radiación para la mayoría de los ensayos in vitro. Por lo tanto, se carece de un análisis de dosis-respuesta completo que podría revelar dependencias de la concentración y definir los umbrales en los que el efecto del AC cambia de protector a sensibilizador. Del mismo modo, no se exploró el posible impacto del tiempo de pre-tratamiento con el compuesto

Del mismo modo, aunque se propone que la activación de la melanogénesis es la causa de la depleción de GSH, este estudio no midió directamente la actividad de enzimas clave como la tirosinasa, por lo que futuros estudios deberían cuantificar estos parámetros para confirmar de manera inequívoca el mecanismo postulado.

La limitación más notable es la ausencia de un modelo tumoral *in vivo* para evaluar el efecto dual sobre la supervivencia. Si bien el fenómeno se demostró *in vitro*, la prueba definitiva de su potencial terapéutico requiere la validación en modelos animales con tumores, donde se pueda medir simultáneamente el control del crecimiento tumoral y la protección del tejido sano.

Este estudio proporciona una sólida base preclínica y una hipótesis sobre el mecanismo de acción. Las limitaciones expuestas dan la posibilidad para las futuras investigaciones que serán necesarias para trasladar estos hallazgos del laboratorio a la clínica.

Los hallazgos de este estudio, si bien son concluyentes en su ámbito, abren nuevas e interesantes preguntas y trazan una hoja de ruta para futuras investigaciones. Las líneas de trabajo propuestas a continuación se centran en validar y profundizar en el potencial terapéutico del ácido carnósico.

La prioridad fundamental es la validación de los hallazgos en modelos tumorales *in vivo*. Aunque el efecto dual se demostró claramente *in vitro*, el siguiente paso indispensable es trasladar estos experimentos a modelos animales con xenoinjertos de melanoma, preferiblemente utilizando tanto la línea B16F10 como líneas humanas. Estos estudios permitirían evaluar si la administración sistémica o local de AC junto a la radioterapia localizada puede, de manera simultánea, frenar o revertir el crecimiento del tumor (confirmando la radiosensibilización) y reducir el daño en los tejidos sanos circundantes (confirmando la radioprotección). La medición de la supervivencia y la toxicidad en estos modelos es fundamental para determinar el índice terapéutico real del compuesto.

Paralelamente, es necesario profundizar en la confirmación del mecanismo de acción postulado. Si bien estos resultados apuntan a que la depleción de glutatión (GSH) a través de la vía de la melanogénesis es la causa de la radiosensibilización, sería de gran valor corroborarlo con análisis más directos. Futuras investigaciones deberían medir la expresión y actividad de enzimas clave en esta ruta, como la tirosinasa, y de factores de transcripción como MITF, tras el tratamiento con AC. Asimismo, sería esclarecedor analizar directamente la actividad de las enzimas del ciclo del glutatión, como la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa, para entender completamente cómo el AC altera la homeostasis redox de la célula tumoral. Para confirmar la hipótesis de la melanogénesis, sería interesante realizar estudios paralelos en líneas de melanoma amelanótico, donde, si la hipótesis es correcta, se esperaría que el ácido carnósico actuara como un radioprotector en lugar de un radiosensibilizador.

Desde una perspectiva farmacológica, también sería importante realizar estudios de farmacocinética y farmacodinámica para determinar la biodisponibilidad, el metabolismo y la vida media del ácido carnósico en modelos *in vivo*. Paralelamente, el desarrollo de sistemas de nanotransportadores (como liposomas o nanopartículas) podría optimizar la liberación del compuesto en los tejidos de interés, mejorando su estabilidad y dirigiéndolo selectivamente al tumor para potenciar su efecto terapéutico.

Dado que una proporción muy significativa de melanomas presenta la mutación BRAF V600E, y que nuestros resultados en la línea SK-MEL-1 sugieren un efecto radiosensibilizador del AC en este contexto, una línea de investigación de enorme potencial sería evaluar una estrategia de "triple ataque". Esta consistiría en combinar la radioterapia con un inhibidor de BRAF (BRAFi) y el ácido carnósico. La hipótesis es que esta combinación generaría una sinergia muy potente: el BRAFi bloquearía la vía de supervivencia MAPK, el AC debilitaría las defensas antioxidantes al agotar el glutatión, y la radioterapia administraría el daño letal a una célula tumoral doblemente comprometida. Es importante destacar que, dado el aumento de la toxicidad en tejidos sanos al combinar radioterapia y BRAFi, el

efecto radioprotector del AC podría, además, mitigar estos efectos adversos, haciendo la triple terapia no solo más eficaz, sino también más segura.

Finalmente, para acercar estos hallazgos a una posible aplicación clínica, se debería ampliar el espectro de estudio y optimizar la estrategia. Sería importante ensayar el efecto del AC en un panel más amplio de líneas celulares de melanoma humano para definir qué subtipos de tumores serían los mejores candidatos. Además, se deben explorar sinergias con las modalidades terapéuticas actuales. En este sentido, sería de especial interés estudiar la combinación del AC con regímenes de radioterapia corporal estereotáctica (SBRT). La SBRT, que utiliza dosis muy altas por fracción, posee características radiobiológicas únicas, incluyendo un potente efecto inmunoestimulante. Investigar si el AC, al modular el estrés oxidativo tumoral, puede potenciar el conocido efecto sinérgico entre la SBRT y la inmunoterapia representa una vía de investigación de importante proyección clínica.

En síntesis, este estudio ha demostrado que el ácido carnósico posee un prometedor efecto dual, actuando de manera selectiva sobre células normales y tumorales en el contexto de la radioterapia. El hallazgo más relevante es la capacidad del compuesto para ejercer una acción diametralmente opuesta en función del tipo celular: protege a las células epiteliales normales del daño radioinducido mientras que, simultáneamente, sensibiliza a las células de melanoma, potenciando su eliminación. Esta selectividad es la característica más valiosa del compuesto, ya que aborda directamente el principal desafío de la oncología radioterápica: maximizar el daño al tumor minimizando la toxicidad en el tejido sano.

Más allá de describir este fenómeno, el presente trabajo ha propuesto un modelo de mecanismo coherente y específico para explicar dicha selectividad, que ha sido respaldado por la literatura existente. La radiosensibilización del melanoma no parece deberse a un efecto pro-oxidante inespecífico, sino a la explotación de una vía metabólica única de la célula tumoral: la melanogénesis. Al estimular este proceso, el ácido carnósico provoca el agotamiento del principal sistema de defensa antioxidante de la célula, el glutatión, dejándola vulnerable. Este

mecanismo, que no se activa en células no melanocíticas, explica la especificidad de la acción del compuesto y representa una contribución teórica significativa al entendimiento de la radioresistencia del melanoma.

Por todo ello, los resultados aquí discutidos no solo validan al ácido carnósico como un candidato excepcional para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, sino que también establecen un nuevo paradigma para el diseño de terapias adyuvantes. Este enfoque, basado en la explotación de las vulnerabilidades metabólicas intrínsecas del tumor, abre una vía de investigación con un enorme potencial para mejorar el índice terapéutico en el tratamiento de cánceres radorresistentes como el melanoma.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este estudio son:

1. El ácido carnósico demuestra un efecto dual y selectivo sobre la respuesta a la radiación ionizante: ejerce un efecto radioprotector en las células no tumorales , mientras que, de forma simultánea, induce radiosensibilización en las células de melanoma . Este efecto se explica por su capacidad para regular el sistema de glutatión a través de la vía de la melanogénesis.
2. El ácido carnósico es un potente agente genoprotector que reduce significativamente el daño cromosómico inducido por la radiación, tanto en ensayos *in vitro* con células humanas como *in vivo* en modelos murinos.
3. El ácido carnósico modifica la supervivencia celular post-irradiación de manera diferencial y selectiva. Aumenta de forma sostenida la supervivencia de las células epiteliales no tumorales (PNT2), mientras que reduce la viabilidad a largo plazo de las células de melanoma metastásico (B16F10). Este efecto protector no se observa en las líneas de melanocitos no tumorales (Melan-A6) ni en las de melanoma humano (SK-MEL-1).
4. El ácido carnósico altera el estado redox intracelular de forma selectiva. En las células no tumorales, como las epiteliales (PNT2) y los melanocitos (Melan-A6), ejerce un claro efecto radioprotector a nivel bioquímico, restaurando la reserva de glutatión. En cambio, en las células de melanoma metastásico (B16F10) y humano (SK-MEL-1), interfiere con sus defensas, lo que atenúa la respuesta de glutatión y causa un desequilibrio redox que explica su radiosensibilización.
5. El ácido carnósico presenta un notable potencial traslacional como adyuvante en la radioterapia del melanoma, ya que su capacidad para

proteger el tejido sano y sensibilizar el tumor podría mejorar significativamente el índice terapéutico del tratamiento.

VII. RESUMEN

El ácido carnósico (AC), un diterpeno fenólico presente en el romero, es conocido por su elevada actividad antioxidante. Sin embargo, su potencial para regular la respuesta a la radiación en el contexto oncológico no ha sido completamente explorado. Este estudio tuvo como objetivo investigar los efectos del AC sobre la respuesta a la radiación ionizante, con el fin de determinar su potencial como agente radioprotector selectivo en células no tumorales y como radiosensibilizador en células de melanoma, así como explorar los mecanismos subyacentes a este comportamiento.

Para ello, se evaluó la capacidad genoprotectora del AC mediante ensayos de micronúcleos *in vitro* (linfocitos humanos) e *in vivo* (modelos murinos). La regulación de la supervivencia y los mecanismos de muerte celular se analizaron en un panel de cuatro líneas celulares (PNT2, Melan-A6, B16F10 y SK-MEL-1) utilizando ensayos de viabilidad (MTT/XTT), apoptosis, ciclo celular y la determinación de glutatión (GSH) intracelular.

Los resultados demuestran que el ácido carnósico es un potente agente genoprotector, capaz de reducir significativamente el daño cromosómico inducido por la radiación. De manera más relevante, el estudio revela un efecto dual y selectivo: en las células normales (PNT2, Melan A6), el AC actúa como un radioprotector, aumentando la supervivencia, reduciendo la apoptosis y preservando el estado redox celular. Por el contrario, en las células tumorales de melanoma (B16F10, SK-MEL-1), el AC ejerce un efecto radiosensibilizador paradójico, disminuyendo drásticamente la supervivencia a largo plazo, potenciando el bloqueo del ciclo celular y la muerte por apoptosis. Este efecto se explica por la capacidad del AC para interferir con la respuesta defensiva del glutatión en las células de melanoma, probablemente a través de la activación de la vía de la melanogénesis.

Estos hallazgos posicionan al ácido carnósico como un prometedor candidato a agente adyuvante en radioterapia, con el potencial de mejorar el índice terapéutico al proteger los tejidos sanos y sensibilizar simultáneamente al tumor.

Palabras clave: Ácido carnósico, radioprotección, radiosensibilización, melanoma, PNT2, B16F10, glutatión, melanogénesis, apoptosis, ciclo celular, radioterapia.

ABSTRACT

Carnosic acid (CA), a phenolic diterpene present in rosemary, is known for its high antioxidant activity. However, its potential to modulate the radiation response in the oncological context has not been fully explored. This study aimed to investigate the effects of CA on the response to ionizing radiation, in order to determine its potential as a selective radioprotective agent in non-tumoral cells and as a radiosensitizer in melanoma cells, as well as to explore the mechanisms underlying this behavior.

To this end, the genoprotective capacity of CA was evaluated using *in vitro* (human lymphocytes) and *in vivo* (murine models) micronucleus assays. The regulation of survival and cell death mechanisms was analyzed in a panel of four cell lines (PNT2, Melan-A6, B16F10, and SK-MEL-1) using assays for viability (MTT/XTT), apoptosis, cell cycle, and the determination of intracellular glutathione (GSH).

The results demonstrate that carnosic acid is a potent genoprotective agent, capable of significantly reducing radiation-induced chromosomal damage. More importantly, the study reveals a dual and selective effect: in normal cells (PNT2, Melan-A6), CA acts as a radioprotector, increasing survival, reducing apoptosis, and preserving the cellular redox state. Conversely, in melanoma tumor cells (B16F10, SK-MEL-1), CA exerts a paradoxical radiosensitizing effect, drastically decreasing long-term survival, and enhancing cell cycle arrest and apoptotic cell death. This effect is explained by the ability of CA to interfere with the glutathione-mediated defensive response in melanoma cells, likely through the activation of the melanogenesis pathway.

These findings position carnosic acid as a promising candidate for an adjuvant agent in radiotherapy, with the potential to improve the therapeutic index by protecting healthy tissues while simultaneously sensitizing the tumor.

Keywords: Carnosic acid, radioprotection, radiosensitization, melanoma, PNT2, B16F10, glutathione, melanogenesis, apoptosis, cell cycle, radiotherapy.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Pereira GC, Traughber M, Muzic RF. The Role of Imaging in Radiation Therapy Planning: Past, Present, and Future. 2014 [cited 2024 Dec 30]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/231090>
2. Howell JD. Early Clinical Use of the x-ray. *Trans Am Clin Clim Assoc*. 2016;127:341-349.
3. Haas LF. Wilhelm Conrad Von Rontgen (1845–1923). . *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70:126.
4. Bouten RM, Young EF, Selwyn R, Iacono D, W. Bradley Rittase, Day RM. Effects of radiation on endothelial barrier and vascular integrity. *Tissue Barriers in Disease, Injury and Regeneration*. 2021 Jan 1;43–94.
5. Huh H Do, Kim S. History of Radiation Therapy Technology. *Progress in Medical Physic* [Internet]. 2020 Sep 30 [cited 2024 Dec 28];31(3):124–34. Available from: <https://www.progmedphys.org/journal/view.html?doi=10.14316/pmp.2020.31.3.124>
6. Grubbé EH, Mould RF. Emil Herman Grubbé (1875–1960) with special reference to priority for X-ray cancer therapy. *Nowotwory Journal of Oncology* [Internet]. 2018 [cited 2024 Dec 28];68(5–6):286–9. Available from: https://journals.viamedica.pl/nowotwory_journal_of_oncology/article/view/2018.0046
7. Stea B, Hazard LJ, Gonzalez VJ, Hamilton R. The role of radiation therapy in the control of locoregional and metastatic cancer. *J Surg Oncol* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2024 Dec 28];103(6):627–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jso.21837>
8. Lederman M. The early history of radiotherapy: 1895-1939. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 1981 May 1 [cited 2024 Dec 30];7(5):639–48. Available from: <http://www.redjournal.org/article/0360301681903795/fulltext>
9. Zaider M, Bardash M, Fung A. Molecular damage induced directly and indirectly by ionizing radiation in DNA. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 1994 [cited 2024 Dec 30];66(5):459–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7983432/>
10. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999 Mar 8;424(1–2):9–21.
11. Cadet J, Bellon S, Douki T, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, et al. Radiation-Induced DNA Damage: Formation, Measurement, and Biochemical Features. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* [Internet]. 2004 [cited 2024 Dec 28];23(1):33–43. Available from: <https://www.dl.begellhouse.com/journals/0ff459a57a4c08d0,72780bba1bf964e3,74fd7437f02f229.html>

12. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations : clustered damage in DNA. *INT J RADIAT BIOL*. 1994;65(1):7–17.
13. Goodhead DT, Nikjoo H. Track structure analysis of ultrasoft x-rays compared to high- and low-LET radiations. *Int J Radiat Biol*. 1989;55(4):513–29.
14. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Dec 28];58(5):235. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5474181/>
15. Xue C, Greene EC. DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Trends Genet* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Dec 28];37(7):639. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8187289/>
16. Pouget JP, Georgakilas AG, Ravanat JL. Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2018 Nov 20 [cited 2024 Dec 28];29(15):1447. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6199630/>
17. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* (1979). 2010 Jan 1;327(5961):46–50.
18. Seideman JH, Stancevic B, Rotolo JA, McDevitt MR, Howell RW, Kolesnick RN, et al. Alpha Particles Induce Apoptosis through the Sphingomyelin Pathway. *Radiat Res* [Internet]. 2011 Oct [cited 2024 Dec 28];176(4):434. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3185310/>
19. Winnie Wai-Ying Kam RBB. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic Biol Med* . 2013;Dec:65:607–19.
20. Betzold JM, Saeger W, Lüdecke DK. Ultrastructural-morphometric effects of radiotherapy on pituitary adenomas in acromegaly. *Exp Clin Endocrinol* [Internet]. 1992 [cited 2024 Dec 30];100(3):106–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1305059/>
21. Somosy Z. Radiation response of cell organelles. *Micron*. 2000 Apr 1;31(2):165–81.
22. Hall JC, Goldstein AL, Sonnenblick BP. Recovery of Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria after Whole Body Irradiation*. *Journal of Biological Chemistry*. 1963;238(3):1137–40.
23. Hwang JJ, LGL, SSC, & LFJ. Effect of ionizing radiation on mitochondrial respiratory functions of the liver in mice. *Chin Med J (Engl)*. 1999;112(4):340–4.
24. Dong C, Tu W, He M, Fu J, Kobayashi A, Konishi T, et al. Role of Endoplasmic Reticulum and Mitochondrion in Proton Microbeam Radiation-Induced Bystander Effect. *Radiat Res* [Internet]. 2020 [cited 2025 Jan 7];193(1):63–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31714866/>

25. Souto J. Tumour development in the rat induced by blood of irradiated animals. *Nature*. 1962;195(4848):1317–8.
26. Hollowell JG, Littlefield LG. Chromosome Damage Induced by Plasma of X-Rayed Patients: An Indirect Effect of X-Ray. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1968;129(1):240–4.
27. Littlefield LG, Hollowell JG, Pool WH. Chromosomal Aberrations Induced by Plasma from Irradiated Patients: An Indirect Effect of X Radiation. <https://doi.org/10.1148/934879> [Internet]. 1969 Oct 1 [cited 2024 Dec 30];93(4):879–86. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/93.4.879>
28. Goh K, Sumner H. Breaks in normal human chromosomes: are they induced by a transferable substance in the plasma of persons exposed to total-body irradiation? *Radiat Res*. 1968;35(1):171–81.
29. Scott D. THE EFFECT OF IRRADIATED PLASMA ON NORMAL HUMAN CHROMOSOMES AND ITS RELEVANCE TO THE LONG-LIVED LYMPHOCYTE HYPOTHESIS. *Cell Prolif* [Internet]. 1969 Oct 1 [cited 2024 Dec 30];2(4):295–305. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2184.1969.tb00239.x>
30. Demoise CF, Conrad RA. Effects of age and radiation exposure on chromosomes in a Marshall Island population. *J Gerontol*. 1972;27(2):197–201.
31. Shankar Pant G, Kamada N. Chromosome aberrations in normal leukocytes induced by the plasma of exposed individuals. *Hiroshima J Med Sci*. 1977;26(2–3):149–54.
32. Faguet GB, Reichard SM, Welter DA. Radiation-induced clastogenic plasma factors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1984;12(1):73–83.
33. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1994 Jan 1;16(1):99–109.
34. Emerit I, Khan SH, Esterbauer H. Hydroxynonenal, a component of clastogenic factors? *Free Radic Biol Med*. 1991;10(6):371–7.
35. Emerit I, Arutyunyan R, Oganessian N, Levy A, Cernjavsky L, Sarkisian T, et al. Radiation-induced clastogenic factors: Anticlastogenic effect of ginkgo biloba extract. *Free Radic Biol Med*. 1995 Jun 1;18(6):985–91.
36. Emerit I, Oganessian N, Sarkisian T, Arutyunyan R, Pogolian A, Asrian K, et al. Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: Anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. *Radiat Res*. 1995;144(2):198–205.
37. Emerit I, Quastel M, Goldsmith J, Merkin L, Levy A, Cernjavski L, et al. Clastogenic factors in the plasma of children exposed at Chernobyl. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1997 Jan 3;373(1):47–54.

38. Emerit I, Levy A, Cernjavski L, Arutyunyan R, Oganessian N, Pogolian A, et al. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994 Sep;120(9):558–61.
39. Gemignani F, Ballardini M, Maggiani F, Rossi AM, Antonelli A, Barale R. Chromosome aberrations in lymphocytes and clastogenic factors in plasma detected in Belarus children 10 years after Chernobyl accident. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1999 Dec 13;446(2):245–53.
40. Marozik P, Mothersill C, Seymour CB, Mosse I, Melnov S. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident. *Exp Hematol*. 2007 Apr;35(4 SUPPL.):55–63.
41. Alaoui-Youssefi A, Lamproglou I, Drieu K, Emerit I. Anticlastogenic effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and some of its constituents in irradiated rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1999 Sep 15;445(1):99–104.
42. Léonard A, Léonard ED, Gerber GB, Crutzen-Fayt MC, Richard F, Gueulette JG, et al. No evidence for radiation-induced clastogenic factors after in vitro or in vivo exposure of human blood. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998 Dec 3;420(1–3):33–6.
43. Lindholm C, Acheva A, Koivistoinen A, Perl M, Heinvaara S, Jahns J, et al. Search for Clastogenic Factors in the Plasma of Locally Irradiated Individuals. <https://doi.org/10.1667/RR27211> [Internet]. 2011 Dec 13 [cited 2025 Jan 2];177(3):298–306. Available from: <https://bioone.org/journals/radiation-research/volume-177/issue-3/RR2721.1/Search-for-Clastogenic-Factors-in-the-Plasma-of-Locally-Irradiated/10.1667/RR2721.1.full>
44. Nylund R, Lemola E, Hartwig S, Lehr S, Acheva A, Jahns J, et al. Profiling of low molecular weight proteins in plasma from locally irradiated individuals. 2014;
45. Klovov D, Criswell T, Leskov KS, Araki S, Mayo L, Boothman DA. IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004 Dec 2;568(1):97–110.
46. Vinnikov V, Lloyd D, Finnon P. Bystander apoptosis in human cells mediated by irradiated blood plasma. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012 Mar 1;731(1–2):107–16.
47. Long G V., Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *The Lancet* [Internet]. 2023 Aug 5 [cited 2025 Jan 14];402(10400):485–502. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673623008218/fulltext>
48. Sociedad española de oncología médica (SEOM) www.seom.org.

49. Red española de registros de cancer (REDECAN) www.redecan.org.
50. Barranco SC, Romsdahl MM, Humphrey RM. The Radiation Response of Human Malignant Melanoma Cells Grown in Vitro. *Cancer Res.* 1971;31(6):830–3.
51. Dewey DL. The radiosensitivity of melanoma cells in culture. *Br J Radiol.* 1971;44(526):816–7.
52. Fertil B, Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1985;11(9):1699–707.
53. Dossagg LL, Memula N. The radioresponsiveness of melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1982;8(7):1131–4.
54. Rofstad EK. Radiation Biology of Malignant Melanoma. *Acta Radiol Oncol* [Internet]. 1986 [cited 2025 Jan 11];25(1):1–10. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ionc20>
55. Bentzen SM, Overgaard J, Thames HD, Overgaard M, Hansen PV, von der Maase H, et al. Clinical radiobiology of malignant melanoma. *Radiotherapy and Oncology.* 1989;16(3):169–82.
56. Overgaard J. The role of radiotherapy in recurrent and metastatic malignant melanoma: a clinical radiobiological study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1986;12(6):867–72.
57. Chang DT, Amdur RJ, Morris CG, Mendenhall WM. Adjuvant radiotherapy for cutaneous melanoma: Comparing hypofractionation to conventional fractionation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Nov 15;66(4):1051–5.
58. Sause WT, Cooper JS, Rush S, Ago CT, Cosmatos D, Coughlin CT, et al. Fraction size in external beam radiation therapy in the treatment of melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;20(3):429–32.
59. Hedblad MA, Mallbris L. Grenz ray treatment of lentigo maligna and early lentigo maligna melanoma. 2012 [cited 2025 Jan 11]; Available from: www.progressusmedica.se
60. Ballo MT AKK. Radiotherapy for cutaneous malignant melanoma: rationale and indications. *Oncology (Williston Park)* . 2004 Jan;18(1):99–107.
61. Hellriegel W. RADIATION THERAPY OF PRIMARY AND METASTATIC MELANOMA. *Ann N Y Acad Sci.* 1963;100(1):131–41.
62. Rao NG, Yu HHM, Iii AT, Sondak VK. The Role of Radiation Therapy in the Management of Cutaneous Melanoma. 2011;
63. Al-Qurayshi Z, Hassan M, Srivastav S, Sperry S, Pagedar N, Hamner J, et al. Risk and Survival of Patients with Head and Neck Cutaneous Melanoma: National Perspective. *Oncology (Switzerland).* 2017 Jul 1;93(1):18–28.

64. Mendenhall WM, Shaw C, Amdur RJ, Kirwan J, Morris CG, Werning JW. Surgery and adjuvant radiotherapy for cutaneous melanoma considered high-risk for local-regional recurrence ☆. 2013 [cited 2025 Jan 12]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjoto.2012.12.014>
65. Ang KK, Peters LJ, Weber RS, Morrison WH, Frankenthaler RA, Garden AS, et al. Postoperative radiotherapy for cutaneous melanoma of the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994 Nov 15;30(4):795–8.
66. Guadagnolo BA, Prieto ; Victor, Weber R, Merrick ;, Ross I, Zagars GK. The Role of Adjuvant Radiotherapy in the Local Management of Desmoplastic Melanoma. *Cancer* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 12];120. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.28415>
67. Varey AHR, Goumas C, Hong AM, Mann GJ, Fogarty GB, Stretch JR, et al. Neurotropic melanoma: An analysis of the clinicopathological features, management strategies and survival outcomes for 671 patients treated at a tertiary referral center. *Modern Pathology*. 2017 Nov 1;30(11):1538–50.
68. Chen LL, Jaimes N, Barker CA, Busam KJ, Marghoob AA. Desmoplastic Melanoma: A Review. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2012 May [cited 2025 Jan 6];68(5):825. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4703041/>
69. Strom T, Caudell JJ, Han D, Zager JS, Yu D, Cruse CW, et al. Radiotherapy Influences Local Control in Patients With Desmoplastic Melanoma. *Cancer* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2025 Jan 12];120(9):1369. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4515972/>
70. Lewis GD, Guzman AK, Haque W, McLellan BN, Teh BS. Comparison of Survival Outcomes With/Without Adjuvant Radiation Therapy in Desmoplastic Melanoma. *Dermatologic Surgery*. 2021 Oct 1;47(10):1333–6.
71. Rule WG, Allred JB, Pockaj BA, Markovic SN, DiCaudo DJ, Erickson LA, et al. Results of NCCTG N0275 (Alliance) – a phase II trial evaluating resection followed by adjuvant radiation therapy for patients with desmoplastic melanoma. *Cancer Med* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Jan 12];5(8):1890. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4971918/>
72. Abbott JL, Qureshi MM, Truong MT, Sahni D. Comparing survival outcomes in early stage desmoplastic melanoma with or without adjuvant radiation. *Melanoma Res*. 2019 Aug 1;29(4):413–9.
73. Eroglu Z, Zaretsky JM, Hu-Lieskovan S, Kim DW, Algazi A, Johnson DB, et al. High response rate to PD-1 blockade in desmoplastic melanomas. *Nature* [Internet]. 2018 Jan 18 [cited 2025 Jan 12];553(7688):347. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5773412/>

74. Postow MA, Hamid O, Carvajal RD. Mucosal melanoma: Pathogenesis, clinical behavior, and management. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2012 Oct 4 [cited 2025 Jan 12];14(5):441–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11912-012-0244-x>
75. Gilligan D, Slevin NJ. Radical radiotherapy for 28 cases of mucosal melanoma in the nasal cavity and sinuses. *British Journal of Radiology*. 1991;64(768):1147–50.
76. Trotti A, Peters LJ. Role of radiotherapy in the primary management of mucosal melanoma of the head and neck. *Semin Surg Oncol*. 1993;9(3):246–50.
77. Temam S, Mamelie G, Marandas P, Wibault P, Avril MF, Ois Janot F, et al. Postoperative Radiotherapy for Primary Mucosal Melanoma of the Head and Neck. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.20775>
78. Kingdom TT, Kaplan MJ. Mucosal melanoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Head Neck*. 1995;17(3):184–9.
79. Owens JM, Roberts DB, Myers JN. The Role of Postoperative Adjuvant Radiation Therapy in the Treatment of Mucosal Melanomas of the Head and Neck Region. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2025 Jan 12];129(8):864–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaotolaryngology/fullarticle/483925>
80. Lee SP, Shimizu KT, Tran LM, Juillard G, Calcaterra TC. Mucosal melanoma of the head and neck: The impact of local control on survival. *Laryngoscope*. 1994 Feb;104(2):121–6.
81. Benlyazid A, Thariat J, Temam S, Malard O, Florescu C, Choussy O, et al. Postoperative Radiotherapy in Head and Neck Mucosal Melanoma: A GETTEC Study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2010 Dec 20 [cited 2025 Jan 12];136(12):1219–25. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaotolaryngology/fullarticle/497079>
82. Kirschner AN, Kidd EA, Dewees T, Perkins SM. Treatment Approach and Outcomes of Vaginal Melanoma. 2013;
83. Falch C, Stojadinovic A, Hann-Von-Weyhern C, Protic M, Nissan A, Faries MB, et al. Anorectal malignant melanoma: Extensive 45-year review and proposal for a novel staging classification. *J Am Coll Surg*. 2013 Aug;217(2):324–35.
84. Ramaiya KJ HJW. Current management of uveal melanoma. *Expert Rev Ophthalmol* . 2007;2:939.
85. Earle J, Kline RW, Robertson DM. Selection of Iodine 125 for the Collaborative Ocular Melanoma Study. *Archives of Ophthalmology*. 1987;105(6):763–4.
86. Marinkovic M, Horeweg N, Laman MS, Bleeker JC, Ketelaars M, Peters FP, et al. Ruthenium-106 brachytherapy for iris and iridociliary melanomas. *British Journal of Ophthalmology*. 2018 Aug 1;102(8):1154–9.

87. Lommatzsch PK, Werschnik C, Schuster E. Long-term follow-up of Ru-106/Rh-106 brachytherapy for posterior uveal melanoma. Vol. 238, Arch Clin Exp Ophthalmol. 2000.
88. Char DH, Quivey JM, Castro JR, Kroll S, Phillips T. Helium Ions versus Iodine 125 Brachytherapy in the Management of Uveal Melanoma: A Prospective, Randomized, Dynamically Balanced Trial. Ophthalmology. 1993;100(10):1547–54.
89. Williams DF, Mieler WF, Lewandowski M, Greenberg M. Echographic Verification of Radioactive Plaque Position in the Treatment of Melanomas. Archives of Ophthalmology. 1988;106(11):1623–4.
90. Pavlin CJ, Japp B, Simpson EB, McGowan HD, Fitzpatrick PJ. Ultrasound Determination of the Relationship of Radioactive Plaques to the Base of Choroidal Melanomas. Ophthalmology. 1989;96(4):538–42.
91. Harbour JW, Char DH, Kroll S, Quivey JM, Castro J, Gragoudas ES, et al. Metastatic risk for distinct patterns of postirradiation local recurrence of posterior uveal melanoma. Ophthalmology. 1997;104(11):1785–93.
92. Badiyan SN, Rao RC, Apicelli AJ, Acharya S, Verma V, Garsa AA, et al. Outcomes of iodine-125 plaque brachytherapy for uveal melanoma with intraoperative ultrasonography and supplemental transpupillary thermotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2014 Mar 15;88(4):801–5.
93. Tabandeh H, Chaudhry NA, Murray TG, Ehliès F, Hughes R, Scott IU, et al. Intraoperative Echographic Localization of Iodine-125 Episcleral Plaque for Brachytherapy of Choroidal Melanoma. 2000.
94. Almony A, Breit S, Zhao H, Garcia-Ramirez J, Mansur DB, Harbour JW. Tilting of Radioactive Plaques After Initial Accurate Placement for Treatment of Uveal Melanoma. Archives of Ophthalmology [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2025 Jan 12];126(1):65–70. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/fullarticle/420204>
95. Vrabec TR, Augsburger JJ, Gamel JW, Brady LW, Hernandez C, Woodleigh R. Impact of Local Tumor Relapse on Patient Survival after Cobalt 60 Plaque Radiotherapy. Ophthalmology. 1991;98(6):984–8.
96. Egger E, Schalenbourg A, Zografos L, Bercher L, Boehringer T, Chamot L, et al. Maximizing local tumor control and survival after proton beam radiotherapy of uveal melanoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001 Sep 1;51(1):138–47.
97. Lane AM, Kim IK, Gragoudas ES. Long-term Risk of Melanoma-Related Mortality for Patients With Uveal Melanoma Treated With Proton Beam Therapy. JAMA Ophthalmol [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2025 Jan 12];133(7):792–6. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/fullarticle/2240315>

98. Caujolle JP, Mammar H, Chamorey E, Pinon F, Joe" J, Herault J, et al. PROTON BEAM RADIOTHERAPY FOR UVEAL MELANOMAS AT NICE TEACHING HOSPITAL: 16 YEARS' EXPERIENCE. 2010;
99. Tsuji H, Ishikawa H, Yanagi T, Hirasawa N, Kamada T, Mizoe JE, et al. CARBON-ION RADIOTHERAPY FOR LOCALLY ADVANCED OR UNFAVORABLY LOCATED CHOROIDAL MELANOMA: A PHASE I/II DOSE-ESCALATION STUDY. 2007;
100. Saunders WM, Char DH, Quivey JM, Castro JR, Chen GTY, Michael Collier J, et al. Precision, high dose radiotherapy: Helium ion treatment of uveal melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1985;11(2):227–33.
101. Sikuade MJ, Salvi S, Rundle PA, Errington DG, Kacperek A, Rennie IG. Outcomes of treatment with stereotactic radiosurgery or proton beam therapy for choroidal melanoma. *Eye* [Internet]. 2015 Sep 11 [cited 2025 Jan 12];29(9):1194. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4565940/>
102. Modorati G, Miserocchi E, Galli L, Picozzi P, Rama P. Gamma knife radiosurgery for uveal melanoma: 12 years of experience. *British Journal of Ophthalmology*. 2009 Jan;93(1):40–4.
103. Muller K, Naus N, Nowak PJCM, Schmitz PIM, De Pan C, Van Santen CA, et al. Uveal melanoma Fractionated stereotactic radiotherapy for uveal melanoma, late clinical results. *Radiotherapy and Oncology*. 2012;102:219–24.
104. Dieckmann K, Georg D, Zehetmayer M, Rottenfusser A, Pötter R. Stereotactic photon beam irradiation of uveal melanoma: Indications and experience at the university of Vienna since 1997. In: *Strahlentherapie und Onkologie*. 2007. p. 11–3.
105. Dunavoelgyi R, Dieckmann K, Gleiss A, Sacu S, Kircher K, Georgopoulos M, et al. Clinical Investigation: Central Nervous System Tumor Radiogenic Side Effects After Hypofractionated Stereotactic Photon Radiotherapy of Choroidal Melanoma in 212 Patients Treated Between 1997 and 2007 *Radiation Oncology*. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* [Internet]. 2012 [cited 2025 Jan 12];83(1):121–8. Available from: www.redjournal.org
106. Krema H, Heydarian M, Beiki-Ardakani A, Weisbrod D, Xu W, Simpson ER, et al. A comparison between 125Iodine brachytherapy and stereotactic radiotherapy in the management of juxtapapillary choroidal melanoma. *British Journal of Ophthalmology*. 2013 Mar;97(3):327–32.
107. Burmeister BH, Henderson MA, Ainslie J, Fisher R, Iulio J Di, Smithers M, et al. Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. 2012 [cited 2025 Jan 12]; Available from: www.thelancet.com/oncologyVol
108. Fisher R, Di Iulio J, MacCallum Cancer Centre P, Melbourne E, Hong A, Shannon FRACS K, et al. Adjuvant lymph-node field radiotherapy versus observation only in patients

with melanoma at high risk of further lymph-node field relapse after lymphadenectomy (ANZMTG 01.02/TROG 02.01): 6-year follow-up of a phase 3, randomised controlled trial. *Articles Lancet Oncol* [Internet]. 2015 [cited 2025 Jan 12];16:1049–60. Available from: www.thelancet.com/oncology

109. Michielin O, van Akkooi A, Lorigan P, Ascierto PA, Dummer R, Robert C, et al. ESMO consensus conference recommendations on the management of locoregional melanoma: under the auspices of the ESMO Guidelines Committee. In: *Annals of Oncology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 1449–61.
110. Maurichi A, Barretta F, Patuzzo R, Miceli R, Gallino G, Mattavelli I, et al. Survival in patients with sentinel node–positive melanoma with extranodal extension. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021 Oct 1;19(10):1165–73.
111. Ballo MT, Garden AS, Myers JN, Lee JE, Diaz EM, Sturgis EM, et al. Melanoma metastatic to cervical lymph nodes: Can radiotherapy replace formal dissection after local excision of nodal disease? *Head Neck* [Internet]. 2005 Aug [cited 2025 Jan 15];27(8):718–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15952196/>
112. Kroon HM, van der Bol WD, Tonks KT, Hong AM, Hruby G, Thompson JF. Treatment of Clinically Positive Cervical Lymph Nodes by Limited Local Node Excision and Adjuvant Radiotherapy in Melanoma Patients with Major Comorbidities. *Ann Surg Oncol*. 2018 Nov 1;25(12):3476–82.
113. Chow R, Hoskin P, Hollenberg D, Lam M, Dennis K, Lutz S, et al. Efficacy of single fraction conventional radiation therapy for painful uncomplicated bone metastases: A systematic review and meta-analysis. Vol. 6, *Annals of Palliative Medicine*. AME Publishing Company; 2017. p. 125–42.
114. Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Altendorf-Hofmann A, Urban A, Schell H, Hohenberger W, et al. Palliative radiotherapy for recurrent and metastatic malignant melanoma: Prognostic factors for tumor response and long-term outcome: A 20-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999 Jun 1;44(3):607–18.
115. Katz HR. The results of different fractionation schemes in the palliative irradiation of metastatic melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1981;7(7):907–11.
116. Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie A V., Haasbeek C, et al. Stereotactic Ablative Radiotherapy for the Comprehensive Treatment of Oligometastatic Cancers: Long-Term Results of the SABR-COMET Phase II Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2020 [cited 2025 Jan 12];38(25):2830. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7460150/>
117. Gerszten PC, Burton SA, Ozhasoglu C, Welch WC. Radiosurgery for Spinal Metastases Clinical Experience in 500 Cases From a Single Institution. Vol. 32, *SPINE*.

118. Gerszten PC, Burton SA, Quinn AE, Agarwala SS, Kirkwood JM. Radiosurgery for the treatment of spinal melanoma metastases. *Stereotact Funct Neurosurg*. 2006 Apr;83(5–6):213–21.
119. Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, Gast A, Sucker A, Mueller-Berghaus J, et al. B-RF and N-RAS Mutations Are Preserved during Short Time In Vitro Propagation and Differentially Impact Prognosis. *PLoS One* [Internet]. 2007 Feb 21 [cited 2025 Jan 12];2(2):e236. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1794595/>
120. Anker CJ, Grossmann KF, Atkins MB, Suneja G, Tarhini AA, Kirkwood JM. Avoiding Severe Toxicity From Combined BRAF Inhibitor and Radiation Treatment: Consensus Guidelines from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2025 Jan 12];95(2):632. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5102246/>
121. Pulvirenti T, Hong A, Clements A, Forstner D, Suchowersky A, Guminski A, et al. Acute radiation skin toxicity associated with BRAF inhibitors. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2016 Jan 20 [cited 2025 Jan 15];34(3):e17–20. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.49.0565>
122. Sharabi AB, Nirschl CJ, Kochel CM, Nirschl TR, Francica BJ, Velarde E, et al. Stereotactic Radiation Therapy Augments Antigen-Specific PD-1-Mediated Anti-Tumor Immune Responses via Cross-Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 12];3(4):345. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4390444/>
123. Park SS, Dong H, Liu X, Harrington SM, Krco CJ, Grams MP, et al. PD-1 Restrains Radiotherapy-Induced Abscopal Effect. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2025 Jan 12];3(6):610. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4827718/>
124. Chandra RA, Wilhite TJ, Balboni TA, Alexander BM, Spektor A, Ott PA, et al. A systematic evaluation of abscopal responses following radiotherapy in patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. *Oncoimmunology* [Internet]. 2015 Nov 2 [cited 2025 Jan 12];4(11):e1046028. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4589983/>
125. Hiniker SM, Reddy SA, Maecker HT, Subrahmanyam PB, Rosenberg-Hasson Y, Swetter SM, et al. A Prospective Clinical Trial Combining Radiation Therapy with Systemic Immunotherapy in Metastatic Melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2025 Jan 12];96(3):578. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5077166/>
126. Mohiuddin M, Park H, Hallmeyer S, Richards J. High-Dose Radiation as a Dramatic, Immunological Primer in Locally Advanced Melanoma. *Cureus* [Internet]. 2015 Dec 18

[cited 2025 Jan 12];7(12):e417. Available from:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4725734/>

127. Liniker E, Menzies AM, Kong BY, Cooper A, Ramanujam S, Lo S, et al. Activity and safety of radiotherapy with anti-PD-1 drug therapy in patients with metastatic melanoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2025 Jan 12];5(9):e1214788. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5048757/>
128. Sundahl N, Seremet T, Van Dorpe J, Neyns B, Ferdinande L, Meireson A, et al. Clinical Investigation Phase 2 Trial of Nivolumab Combined With Stereotactic Body Radiation Therapy in Patients With Metastatic or Locally Advanced Inoperable Melanoma Radiation Oncology. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* [Internet]. 2019 [cited 2025 Jan 12];104(4):828–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.03.041>
129. Spaas M, Sundahl N, Kruse V, Rottey S, De Maeseneer D, Duprez F, et al. Checkpoint Inhibitors in Combination With Stereotactic Body Radiotherapy in Patients With Advanced Solid Tumors: The CHEERS Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* [Internet]. 2023 Sep 21 [cited 2025 Jan 12];9(9):1205. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10326732/>
130. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. Vol. 445, *Nature*. Nature Publishing Group; 2007. p. 843–50.
131. Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Mü T, et al. Schwann Cell Precursors from Nerve Innervation Are a Cellular Origin of Melanocytes in Skin.
132. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii* [Internet]. 2013 [cited 2025 Jan 12];30(1):30. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3834696/>
133. Thody AJ; HEM; WK; IS; BSA; MJM. Pheomelanin as well as Eumelanin Is Present in Human Epidermis. *Investig Dermatol*. 1991;97:340–4.
134. Del Bino S, Ito S, Sok J, Nakanishi Y, Bastien P, Wakamatsu K, et al. Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. *Pigment Cell Melanoma Res* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2025 Jan 15];28(6):707–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26285058/>
135. Nasti TH, Timares L. Invited Review MC1R, Eumelanin and Pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 12];91(1):188. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4299862/>
136. Del Marmol V, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. Vol. 381, *FEBS Letters*. Elsevier B.V.; 1996. p. 165–8.

137. Ito S, Wakamatsu K. Quantitative Analysis of Eumelanin and Pheomelanin in Humans, Mice, and Other Animals: a Comparative Review. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0749.2003.00072.x>
138. Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, et al. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* [Internet]. 1994 Dec 15 [cited 2025 Jan 12];13(24):5818. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC395555/>
139. Ito S, Wakamatsu K, Sarna T. Invited Review Photodegradation of Eumelanin and Pheomelanin and Its Pathophysiological Implications †. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2018 [cited 2025 Jan 12];94:409–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/php.12837>
140. Seruggia D, Josa S, Fernández A. The official journal of INTERNATIONAL FEDERATION OF PIGMENT CELL SOCIETIES · SOCIETY FOR MELANOMA RESEARCH The structure and function of the mouse tyrosinase locus. 2020 [cited 2025 Jan 12];34(2):212–21. Available from: www.ifpcs.orgatwww.societymelanomaresarch.org<http://mc.manuscriptcentral.com/pcmr>
141. Vaish U, Kumar AA, Varshney S, Ghosh S, Sengupta S, Sood C, et al. Micro RNAs upregulated in Vitiligo skin play an important role in its aetiopathogenesis by altering TRP1 expression and keratinocyte-melanocytes cross-talk. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2025 Jan 12];9(1):10079. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6625998/>
142. Xue L, Li Y, Zhao B, Chen T, Dong Y, Fan R, et al. TRP-2 mediates coat color pigmentation in sheep skin. *Mol Med Rep* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2025 Jan 12];17(4):5869. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5866032/>
143. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* [Internet]. 2004 Oct [cited 2025 Jan 12];84(4):1155–228. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00044.2003>
144. Videira IF dos S, Lima Moura DF, Vasconcelos Magina SBLM. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2025 Jan 12];88(1):76. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3699939/>
145. Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Apr 8;280(14):14006–16.
146. Hoashi T, Muller J, Vieira WD, Rouzaud F, Kikuchi K, Tamaki K, et al. The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2006 Jul 28 [cited 2025 Jan

12];281(30):21198–208. Available from:
<http://www.jbc.org/article/S0021925818952476/fulltext>

147. Theos AC, Berson JF, Theos SC, Herman KE, Harper DC, Tenza D, et al. Dual Loss of ER Export and Endocytic Signals with Altered Melanosome Morphology in the silver Mutation of Pmel17. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2006 Aug [cited 2025 Jan 12];17(8):3598. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1525253/>
148. Alaluf S, Atkins D, Barrett K, Blount M, Carter N, Heath A. Ethnic Variation in Melanin Content and Composition in Photoexposed and Photoprotected Human Skin. *Original Research Article* [Internet]. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0749.2002.1o071.x>
149. Murase D, Hachiya A, Takano K, Hicks R, Visscher MO, Kitahara T, et al. Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(10):2416–24.
150. Ebanks JP, Koshoffer A, Wickett RR, Schwemberger S, Babcock G, Hakozaiki T, et al. Epidermal keratinocytes from light vs. Dark skin exhibit differential degradation of melanosomes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011;131(6):1226–33.
151. Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L. ACUTE EFFECTS OF NEAR ULTRAVIOLET AND VISIBLE LIGHT ON THE CUTANEOUS ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM. *Photochem Photobiol*. 1989;50(6):739–44.
152. Jablonski NG, Chaplin G. The colours of humanity: the evolution of pigmentation in the human lineage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet]. 2017 [cited 2025 Jan 12];372(1724):20160349. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5444068/>
153. Tadokoro T, Yamaguchi Y, Batzer J, Coelho SG, Zmudzka BZ, Miller SA, et al. Mechanisms of Skin Tanning in Different Racial/Ethnic Groups in Response to Ultraviolet Radiation. Vol. 124, *J Invest Dermatol*. 2005.
154. Garmyn M, Young AR, Miller SA. Mechanisms of and variables affecting UVR photoadaptation in human skin. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2018;17(12):1932–40.
155. Kawaguchi M, Valencia JC, Namiki T, Suzuki T, Hearing VJ. Diacylglycerol Kinase Regulates Tyrosinase Expression and Function in Human Melanocytes. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2012 [cited 2025 Jan 12];132(12):2791. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3502659/>
156. Friedmann PS, Wren FE, Matthews JNS. Ultraviolet stimulated melanogenesis by human melanocytes is augmented by di-acyl glycerol but not TPA. *J Cell Physiol*. 1990;142(2):334–41.

157. Eller MS, Ostrom K, Gilchrist BA. DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Feb 6 [cited 2025 Jan 12];93(3):1087. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC40035/>
158. Khlgatian MK; HIM; AP; YM; EMS; GBA; FM; NDA. Tyrosinase Gene Expression is Regulated by p53. *J Invest Dermatol*. 2002;118:126–32.
159. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, et al. Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. *Cell*. 2007 Mar 9;128(5):853–64.
160. Goding CR, Arnheiter H. Mitf—the first 25 years. *Genes Dev* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2025 Jan 12];33(15–16):983–1007. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6672050/>
161. Yuan XH, Jin ZH. Paracrine regulation of melanogenesis. *British Journal of Dermatology* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2025 Jan 12];178(3):632–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjd.15651>
162. Li W, Wang Z, Xiao M, Miyoshi T, Yang X, Hu Z, et al. Mechanism of UVA Degradation of Synthetic Eumelanin. *Biomacromolecules* [Internet]. 2019 Dec 9 [cited 2025 Jan 15];20(12):4593–601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31696706/>
163. Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, Yamaguchi Y, et al. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *The FASEB Journal* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2025 Jan 12];17(9):1177–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.02-0865fje>
164. Hennessy A, Oh C, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S, Rees J. Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0749.2005.00233.x>
165. Gantzso I, Kondan Y, Tashiron T, Shimotoq Y, Miwan H, Munzertll G, et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Molecular Cloning of a Novel Melanocortin Receptor*. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(11):8246–50.
166. Guida S, Guida G, Goding CR. MC1R Functions, Expression, and Implications for Targeted Therapy. Vol. 142, *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier B.V.; 2022. p. 293-302.e1.
167. Wolf Horrell EM, Boulanger MC, D’Orazio JA. Melanocortin 1 Receptor: Structure, Function, and Regulation. *Front Genet* [Internet]. 2016 May 31 [cited 2025 Jan 12];7(MAY):95. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4885833/>
168. Neves SR; RPT; IR. G protein pathways. *Science* (1979). 2002;296:1636–9.
169. Ji RL, Tao YX. Melanocortin-1 receptor mutations and pigmentation: Insights from large animals. *Prog Mol Biol Transl Sci* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 Jan 17];189(1):179–213. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35595349/>

170. Chen S, Zhu B, Yin C, Liu W, Han C, Chen B, et al. Palmitoylation-dependent activation of MC1R prevents melanomagenesis. *Nature* [Internet]. 2017 Sep 21 [cited 2025 Jan 12];549(7672):399. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5902815/>
171. Rees JL. Genetics of Hair and Skin Color. *Rev Genet*. 2003;37:67–90.
172. Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: A meta-analysis. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.23396>
173. Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.25804>
174. Robles-Espinoza CD, Roberts ND, Chen S, Leacy FP, Alexandrov LB, Pornputtapong N, et al. Germline MC1R status influences somatic mutation burden in melanoma. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Jul 12 [cited 2025 Jan 12];7:12064. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4945874/>
175. Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Im S, Lamoreux ML, et al. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1997 [cited 2025 Jan 17];108(6):838–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9182807/>
176. Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet*. 1995 Feb;4(2):223–30.
177. Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: Signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*. 2000 Jul 15;14(14):1712–28.
178. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2014 Mar 18 [cited 2025 Jan 12];72(7):1249. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4363485/>
179. Ploper D, De Robertis EM. The MITF family of transcription factors: Role in endolysosomal biogenesis, Wnt signaling, and oncogenesis. *Pharmacol Res*. 2015 Jun 4;99:36–43.
180. Hertwig P. Neue Mutationen und Koppelungsgruppen bei der Hausmaus. *Z Indukt Abstamm Vererbungs*. 1942;80(1):220–46.
181. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):395–404.
182. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and

- melanoma. *Am J Pathol* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2025 Jan 17];163(1):333–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12819038/>
183. Goshima Y, Masukawa D, Kasahara Y, Hashimoto T, Aladeokin AC. I-DOPA and Its Receptor GPR143: Implications for Pathogenesis and Therapy in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019 [cited 2025 Jan 12];10:1119. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6785630/>
 184. Chiaverini C, Beuret L, Flori E, Busca R, Abbe P, Bille K, et al. Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 May 2;283(18):12635–42.
 185. Carreira S, Liu B, Goding CR. The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Jul 21;275(29):21920–7.
 186. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 Regulation by the Melanocyte Master Regulator Mitf Modulates Lineage Survival and Melanoma Cell Viability in and adult mouse. Mitf expression is also clinically employed in the diagnosis of human melanocytic neoplasms, especially melanoma (Chang and Folpe, 2001; Dorvault et al Mutations in Mitf produce loss of viable melanocytes, a phenotype similar to mice or humans harboring mutations in the Kit receptor and [Internet]. Vol. 109, *Cell*. 2002. Available from: <http://www.cell.com/>
 187. Carreira S; GJ; AI; LRSA; GMD; DL; LL; GCR. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*. 2005;433:764–9.
 188. Slominski A, Paus R, Mihm MC. Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: Selective review and hypothesis. *Anticancer Res*. 1998 Sep;18(5 B):3709–15.
 189. Brozyna AA, Jóźwicki W, Carlson JA, Slominski AT. Melanogenesis Affects Overall and Disease-Free Survival in Patients with Stage III and IV Melanoma. *Hum Pathol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2025 Jan 13];44(10):2071. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3783651/>
 190. Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clément M, Lallemand D, Ortonne JP, Ballotti R. Mitogen-activated Protein Kinase Pathway and AP-1 Are Activated during cAMP-induced Melanogenesis in B-16 Melanoma Cells*. 1995.
 191. Ortonne JP, Ballotti R. Melanocyte biology and melanogenesis: what's new? *Journal of Dermatological Treatment* [Internet]. 2000 [cited 2025 Jan 12];11(SUPPL. 1):15–26. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09546630050517621>
 192. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. 2004 [cited 2025 Jan 12]; Available from: www.prv.org

193. Jean D, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol Cell Biochem*. 2000;212:19–28.
194. Buscà R, Bertolotto C, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/p70 S6-Kinase Pathway Induces B16 Melanoma Cell Differentiation* [Internet]. 1996. Available from: <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>
195. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Sep 10;24(26):4340–6.
196. Albino AP, Strange R Le, Oliff AI, Furth ME, Old LJ. Transforming ras genes from human melanoma: A manifestation of tumour heterogeneity? *Nature*. 1984;308(5954):69–72.
197. Padua RA, Barrass N, Currie GA. A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. *Nature*. 1984;311(5987):671–3.
198. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. 2002 [cited 2025 Jan 12]; Available from: www.nature.com/nature
199. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, et al. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2025 Jan 17];64(7):2338–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15059882/>
200. Smalley KSM. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2010 [cited 2025 Jan 17];130(1):28–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19571822/>
201. Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Res* [Internet]. 2006 Dec [cited 2025 Jan 17];19(6):572–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17083485/>
202. D’Ischia M, Napolitano A, Pezzella A, Meredith P, Sarna T. Chemical and structural diversity in eumelanins: unexplored bio-optoelectronic materials. *Angew Chem Int Ed Engl* [Internet]. 2009 May 18 [cited 2025 Jan 17];48(22):3914–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19294706/>
203. Meredith P, Powell BJ, Riesz J, Nighswander-Rempel SP, Pederson MR, Moore EG. Towards structure-property-function relationships for eumelanin. *Soft Matter* [Internet]. 2006 [cited 2025 Jan 17];2(1):37–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32646091/>
204. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* [Internet]. 1954 [cited 2025 Jan 19];174(4432):689–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13213980/>

205. Blois MS, Zahlan AB, Maling JE. ELECTRON SPIN RESONANCE STUDIES ON MELANIN. *Biophys J* [Internet]. 1964 [cited 2025 Jan 19];4(6):471–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14232133/>
206. Sarna T, Pilas B, Land EJ, Truscott TG. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1986 Aug 6 [cited 2025 Jan 19];883(1):162–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3015231/>
207. Sarna T, Plonka PM. Biophysical Studies of Melanin. *Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology* [Internet]. 2006 Jan 18 [cited 2025 Jan 19];125–46. Available from: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.springer-04143283-5a6e-3395-bc20-aa3856796af6>
208. Sarna T, Hyde JS, Swartz HM. Ion-exchange in melanin: an electron spin resonance study with lanthanide probes. *Science* [Internet]. 1976 [cited 2025 Jan 19];192(4244):1132–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/179142/>
209. Zecca L, Swartz HM. Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1993 Oct;5(3):203–13.
210. Korytowski W, Pilas B, Sarna T, Kalyanaraman B. PHOTOINDUCED GENERATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND HYDROXYL RADICALS IN MELANINS. *Photochem Photobiol*. 1987;45(2):185–90.
211. Borovansky'1 J, Borovansky'1 B, Elleder M, Borovansky', J. Melanosome Degradation: Fact or Fiction. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0749.2003.00040.x>
212. Samokhvalov A. HL, LY, GJ, NRJ, EGS, SJD. Oxidation potentials of human eumelanosomes and pheomelanosomes. *Photochem Photobiol*. 2005;81:145–8.
213. Simon JD, Peles DN. The red and the black. *Acc Chem Res*. 2010 Nov 16;43(11):1452–60.
214. ELObeid AS, Kamal-Eldin A, Abdelhalim MAK, Haseeb AM. Pharmacological Properties of Melanin and its Function in Health. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017 Jun 1;120(6):515–22.
215. Sarna T, Dulęba A, Korytowski W, Swartz H. Interaction of melanin with oxygen. *Arch Biochem Biophys*. 1980;200(1):140–8.
216. Pathak MA, Riley FJ, Fitzpatrick TB, Curwen WL. Melanin formation in human skin induced by long-wave ultra-violet and visible light. *Nature*. 1962;193(4811):148–50.
217. Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, et al. Supranuclear Melanin Caps Reduce Ultraviolet Induced DNA Photoproducts in Human Epidermis. 1998.

218. Schweitzer AD, Howell RC, Jiang Z, Bryan RA, Gerfen G, Chen CC, et al. Physico-Chemical Evaluation of Rationally Designed Melanins as Novel Nature-Inspired Radioprotectors. *PLoS One* [Internet]. 2009 Sep 30 [cited 2025 Jan 12];4(9):e7229. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2749938/>
219. Turick CE, Ekechukwu AA, Milliken CE, Casadevall A, Dadachova E. Gamma radiation interacts with melanin to alter its oxidation-reduction potential and results in electric current production. *Bioelectrochemistry*. 2011 Aug;82(1):69–73.
220. Rózanowska M, Sarna T, Land EJ, Truscott TG. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic Biol Med*. 1999 Mar;26(5–6):518–25.
221. Land EJ, Ramsden CA, Riley PA. Quinone Chemistry and Melanogenesis. *Methods Enzymol*. 2004;378:88–109.
222. Pey AL, Martinez A, Charubala R, Maitland DJ, Teigen K, Calvo A, et al. Specific interaction of the diastereomers 7(R)-and 7(S)-tetrahydrobiopterin with phenylalanine hydroxylase: implications for understanding primapterinuria and vitiligo. *The FASEB Journal • FJ Express Full-Length Article* [Internet]. [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.06-5835fje>
223. Grossi GF, Durante M, Gialanella G, Pugliese M, Mosse I. Effects of melanin on high- and low- linear energy transfer (LET) radiation response of human epithelial cells. *Radiat Environ Biophys*. 1998 Apr;37(1):63–7.
224. Sava V, Mosquera D, Song S, Cardozo-Pelaez F, Sánchez-Ramos JR. Effects of melanin and manganese on DNA damage and repair in PC12-derived neurons. *Free Radic Biol Med*. 2004 May 1;36(9):1144–54.
225. Sharma A, Gaidamakova EK, Grichenko O, Matrosova VY, Hoeke V, Klimenkova P, et al. Across the tree of life, radiation resistance is governed by antioxidant Mn²⁺, gauged by paramagnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2017 Oct 31 [cited 2025 Jan 12];114(44):E9253–60. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5676931/>
226. Murphy MR. History of the Capture and Domestication of the Syrian Golden Hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse).
227. McGuire KL, Duncan WR, Tucker PW. Syrian hamster DNA shows limited polymorphism at class I-like loci. *Immunogenetics*. 1985 Sep;22(3):257–68.
228. Silvers WK, Gasser DL, Murphy MR. Number of Histocompatibility Loci in Syrian Hamsters. *The Journal of Immunology*. 1975 Nov 1;115(5):1309–11.
229. Pour P, Althoff J, Saimasi SZ, Stepan K. Spontaneous tumors and common diseases in three types of hamsters. *J Natl Cancer Inst*. 1979;63(3):797–811.
230. Kusewitt DF. Animal models of melanoma. *Cancer Surv*. 1996;26:35–70.

231. Greene HSN. A Spontaneous Melanoma in the Hamster with a Propensity for Amelanotic Alteration and Sarcomatous Transformation during Transplantation. *Cancer Res.* 1958 May 1;18(4):422–5.
232. Fortner J, Allen A. Hitherto Unreported Malignant Melanomas in the Syrian Hamster: An Experimental Counterpart of the Human Malignant Melanomas. *Cancer Res.* 1958;
233. Fortner JG. Spontaneous tumors, including gastrointestinal neoplasms and malignant melanomas, in the syrian hamster. *Cancer.* 1957;10(6):1153–6.
234. BOMIRSKI A, DOMINICZAK T, NOWINSKA L. Spontaneous transplantable melanoma in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Unio Int Contra Cancrum.* 1962;18:178–80.
235. Bardeesy N, Wong KK, DePinho RA, Chin L. Animal models of melanoma: Recent advances and future prospects. *Adv Cancer Res.* 2000;79:123–56.
236. Slominski A, Costantino R. L-tyrosine induces tyrosinase expression via a posttranscriptional mechanism. *Experientia.* 1991 Jul;47(7):721–4.
237. Slominski AT, Carlson JA. Melanoma Resistance: A Bright Future for Academicians and a Challenge for Patient Advocates. *Mayo Clin Proc [Internet].* 2014 [cited 2025 Jan 12];89(4):429. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4050658/>
238. Bomirski A, Słominski A, Bigda J. The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters. *CANCER AND METASTASIS REVIEW.* 1988 Jun;7(2):95–118.
239. Slominski A, Kobzdej D. Transplantability of Bomirski melanomas in Syrian hamsters. *Neoplasma.* 1983;30(1):51–6.
240. Ścisłowski PWD, Słomiński A, Bomirski A. Biochemical characterization of three hamster melanoma variants--II. Glycolysis and oxygen consumption. *Int J Biochem [Internet].* 1984 [cited 2025 Jan 19];16(3):327–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6698297/>
241. Slominski A, Paul R. Bomirski melanomas - a versatile and powerful model for pigment cell and melanoma research (review). *Int J Oncol [Internet].* 1993 [cited 2025 Jan 19];2(2):221–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21573540/>
242. Cichorek M, Kozłowska K, Bryl E. Cancer Biology & Therapy The activity of caspases in spontaneous and camptothecin-induced death of melanotic and amelanotic melanoma cell. 2007 [cited 2025 Jan 12]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kcbt20>
243. Cichorek M. Camptothecin-induced death of amelanotic and melanotic melanoma cells in different phases of cell cycle. *Neoplasma.* 2011;58(3):227–34.
244. Pajak S, Subczynski W, Panz T, Lukiewicz S. Rate of oxygen consumption of hamster melanoma cells as a factor influencing their radioresistance. *Folia Histochem Cytochem (Krakow).* 1980;18(1):33–9.

245. Scislowski PWD, Slominski A, Bomirski A, Zydowo M. Metabolic characterization of three hamster melanoma variants. *Neoplasma*. 1985;32(5):593–8.
246. Cichorek M, Kozłowska K, Bryl E. Mitochondrial transmembrane potential in spontaneous and camptothecin-induced apoptosis of melanotic and amelanotic melanoma cells. *Neoplasma*. 2007;54(1):29–36.
247. Li W, Slominski R, Slominski AT. High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance analysis of metabolic changes in melanoma cells after induction of melanogenesis. *Anal Biochem* [Internet]. 2008 Mar 15 [cited 2025 Jan 12];386(2):282. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2643318/>
248. Śniegocka M, Podgórska E, Plonka PM, Elas M, Romanowska-Dixon B, Szczygiel M, et al. Transplantable Melanomas in Hamsters and Gerbils as Models for Human Melanoma. Sensitization in Melanoma Radiotherapy—From Animal Models to Clinical Trials. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2025 Jan 12];19(4):1048. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5979283/>
249. Romanowska B, Kukiełczak B, Bryk J, Mirkiewicz-Sieradzka B, Heitzmann J, Lukiewicz S. New technique for implanting Bomirski melanoma into the anterior chamber of Syrian hamster eyes. *Klin Oczna*. 1995;97(11–12):324–7.
250. Urbanska K. RDB, EM, PS, PE, BJ, KB, SA, ZMH, LS. Experimental ruthenium plaque therapy of amelanotic and melanotic melanomas in the hamster eye. *Melanoma Res*. 2000;10:26–35.
251. Romanowska-Dixon B, Urbanska K, Elas M, Pajak S, Zygulska-Mach H, Miodonski A. Angiomorphology of the pigmented Bomirski melanoma growing in hamster eye. *Annals of Anatomy*. 2001;183(6):559–65.
252. Romanowska-Dixon B, Elas M, Swakoń J, Sowa U, Ptaszkiewicz M, Szczygieł M, et al. Metastasis inhibition after proton beam, β - and γ -irradiation of melanoma growing in the hamster eye. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(3):307–11.
253. Ogata T, Teshima T, Kagawa K, Hishikawa Y, Takahashi Y, Kawaguchi A, et al. Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Jan 1;65(1):113–20.
254. Lorimore SA, Rastogi S, Mukherjee D, Coates PJ, Wright EG. The Influence of p53 Functions on Radiation-Induced Inflammatory Bystander-Type Signaling in Murine Bone Marrow. *Radiat Res*. 2013;179:406–15.
255. Kukielczak B. CK, MZ. Experimental photodynamic therapy of Bomirski hamster melanoma using merocyanine 540 and visible light. *Curr Top Biophys*. 1995;19:66–70.
256. Naito M, Aoyama H, Fujioka Y, Ito A. Induction of gliomas in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) following neonatal administration of N-ethyl-N-nitrosourea. *J Natl Cancer Inst*. 1985;75(3):581–7.

257. Kleihues P, Biicheler J, Riede UN. Selective Induction of Melanomas in Gerbils (*Meriones unguiculatus*) Following Postnatal Administration of N-Ethyl-N-nitrosourea. *J Natl Cancer Inst.* 1978;61(3):859–63.
258. Yukawa M, Onodera T, Suzuki K, Yokomizo Y, Suzuki M, Mochizuki K. Impairment of macrophage function in Mongolian gerbils. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;33(4):353–64.
259. Karavodin LM, Ash LR. Weak graft versus host response in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Sci.* 1977;27(6):1035–6.
260. Karavodin LM, Ash LR. Weak mixed lymphocyte culture response in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Sci.* 1977;27(2):195–203.
261. Samlowski W.E. MJR, BNR. Nitric Oxide in Transplant Rejection and Anti-Tumor Defense. Springer; Boston, MA, Uldentification of Nitric Oxide-Derived EPR Signals in Human Cancers. Springer; Boston MU, editor. 1998. 341–352 p.
262. Lukiewicz S. EM, RJ, BA, PS, CK. EPR signals detectable in human tumors; In: Lukiewicz S, E Nitric Oxide in Allograft Rejection and Anti-Tumor Responces. Springer; Boston, MA, ; 1998. p. 353–70.
263. Plonka P, Płonka B. ESR studies on the generation of nitric oxide in rejecting rat heart allografts and in situ growing tumors [Internet]. 1996. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/234166923>
264. Plonka P. PB, CK, RJ, LS. Nitric Oxide in Transplant Rejection and Anti-Tumor Defense. Springer; Boston MU, editor. 1998. 313–326 p.
265. Lancaster JR, Hibbs JB. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990 [cited 2025 Jan 13];87(3):1223. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC53443/>
266. Gray JM, Pierce GB. Relationship between growth rate and differentiation of melanoma in vivo. *J Natl Cancer Inst.* 1964;32(6):1201–11.
267. Grin CM, Kopf AW, Welkovich B, Bart RS, Levenstein MJ. Accuracy in the Clinical Diagnosis of Malignant Melanoma. *Arch Dermatol.* 1990;126(6):763–6.
268. Bomirski A, Wrzolkowa T, Arendarczyk M, Rta Bomirska M, Kuklinska E, Slominsk A, et al. Pathology and Ultrastructural Characteristics of a Hypomelanotic Variant of Transplantable Hamster Melanoma With Elevated Tyrosinase Activity*. 1987.
269. Słomiński A, Bomirski A, Scisłowski PW, Arendarczyk M. Effect of tissue selection on melanization of MI hamster melanoma. *Neoplasma.* 1984;31(5):551–6.
270. Chang MC, Hunt DM, Turbyfill C. High resistance of mongolian gerbils to irradiation [32]. *Nature.* 1964;203(4944):536–7.

271. Nelson JM. Survival time response of the Mongolian gerbil after total body irradiation. *Radiat Res.* 1971;48(1):189–98.
272. Jacobson AP, Sullivan MT, Lutkenhoff DW, Parkinson WC, Overway DJ. Radioresistance of mongolian gerbils: Fast neutrons. *Int J Radiat Biol.* 1977;31(3):265–73.
273. Suzuki F, Nakao N, Nikaido O, Kondo S. High resistance of cultured Mongolian gerbil cells to X-ray-induced killing and chromosome aberrations. *Radiat Res.* 1992;131(3):290–6.
274. Slominski A. EG, WJ. Modification of melanogenesis in cultured human melanoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999;35:564–5.
275. Brozyna AA, VanMiddlesworth L, Slominski AT. Inhibition of melanogenesis as a radiation sensitizer for melanoma therapy. *Int J Cancer [Internet].* 2008 Sep 15 [cited 2025 Jan 13];123(6):1448–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.23664>
276. Brozyna AA, Józwicki W, Roszkowski K, Filipiak J, Slominski AT. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. *Oncotarget [Internet].* 2016 [cited 2025 Jan 13];7(14):17844. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4951254/>
277. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer Classification of Uveal Melanoma (Anatomic Stage) Predicts Prognosis in 7731 Patients The 2013 Zimmerman Lecture. *Ophthalmology [Internet].* 2015 [cited 2025 Jan 13];122:1180–6. Available from: www.aaojournal.org.
278. Shields CL, Kaliki S, Cohen MN, Shields PW, Furuta M, Shields JA. Prognosis of uveal melanoma based on race in 8100 patients: The 2015 Doyne Lecture. *Eye [Internet].* 2015 Aug 14 [cited 2025 Jan 13];29(8):1027. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4541345/>
279. Żygulska-Mach H, Maciejewski Z, Lukiewicz S, Iwasiów B, Link E. Clinical trials on chemical radiosensitization of malignant melanoma of the choroid. *Ophthalmologica [Internet].* 1979 [cited 2025 Jan 19];178(4):194–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/113716/>
280. Kanadaswami C, Lee LT, Lee PPH, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, et al. The Antitumor Activities of Flavonoids. *In Vivo (Brooklyn) [Internet].* 2005 Sep 1 [cited 2024 Dec 30];19(5):895–909. Available from: <https://iv.iiarjournals.org/content/19/5/895>
281. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):673–751.
282. Agullo G, Gamet-Payraastre L, Manenti S, Viala C, Révész C, Chap H, et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a

- comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1997 Jun 1 [cited 2025 Jan 3];53(11):1649–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9264317/>
283. Kang TB, Liang NC. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1997 Nov 1 [cited 2025 Jan 3];54(9):1013–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9374422/>
 284. Gamet-Payraastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payraastre B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol* [Internet]. 1999 Mar [cited 2025 Jan 3];32(3):279–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10211581/>
 285. Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, et al. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1999 Nov 1 [cited 2025 Jan 3];128(5):999–1010. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.bjp.0702879>
 286. Lung-Ta Lee 1 YTHJJHPPHLFCKMPNCKMTL. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res* . 2002;22(3):1626-1627.
 287. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* [Internet]. 1999 [cited 2025 Jan 3];71(3–4):435–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10354709/>
 288. Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* [Internet]. 2000 Nov 20 [cited 2025 Jan 3];19(49):5606–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11114741/>
 289. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2000 [cited 2025 Jan 3];2(5):249–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10806474/>
 290. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota SI, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* [Internet]. 1998 Jun 5 [cited 2025 Jan 3];280(5369):1614–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9616126/>
 291. E M Suolinna RNBER. The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res* . 1975 Jul;35:1865–72.
 292. Molnar J BIDKFSBK and VA. Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells. . *Neoplasma*. 1981;28:11–8.

293. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, et al. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* 1990 Jan 15;260(1):10–3.
294. Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Marui N, Nishino H, et al. Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells. *Int J Cancer [Internet]*. 1990 [cited 2025 Jan 3];45(6):1119–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2351487/>
295. Mirazimi SMA, Dashti F, Tobeiha M, Shahini A, Jafari R, Khoddami M, et al. Application of Quercetin in the Treatment of Gastrointestinal Cancers. *Front Pharmacol [Internet]*. 2022 Apr 6 [cited 2025 Jan 3];13:860209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35462903>
296. Murtaza I, Marra G, Schlapbach R, Patrignani A, Künzli M, Wagner U, et al. A preliminary investigation demonstrating the effect of quercetin on the expression of genes related to cell-cycle arrest, apoptosis and xenobiotic metabolism in human CO115 colon-adenocarcinoma cells using DNA microarray. *Biotechnol Appl Biochem.* 2006 Jul;45(1):29–36.
297. Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res.* 2008 Oct;31(10):1281–5.
298. Beylerli O, Beilerli A, Shumadalova A, Wang X, Yang M, Sun H, et al. Therapeutic effect of natural polyphenols against glioblastoma. Vol. 10, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
299. Shi M, Wang FS, Wu ZZ. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol.* 2003 Jan 15;9(1):73–8.
300. Hofmann J, Ueberall F, Posch L, Maly K, Herrmann DBJ, Grunicke H. Synergistic enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) by the ether lipid analogue BM41440, an inhibitor of protein kinase C. *Lipids [Internet]*. 1989 Apr [cited 2025 Jan 3];24(4):312–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2755309/>
301. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E. Ascorbic acid-enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer Drugs [Internet]*. 1993 [cited 2025 Jan 3];4(1):91–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8457720/>
302. Kandaswami C, Perkins E, Drzewiecki G, Soloniuk DS, Middleton E. Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids. *Anticancer Drugs*

[Internet]. 1992 [cited 2025 Jan 3];3(5):525–30. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1450447/>

303. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999 Jan 1;63(5):896–9.
304. Traganos F ABHNBSDZ. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. . *Cancer Res*. 1992;Vol. 52 (22):6200-8.
305. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJW. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1992 [cited 2025 Jan 3];6(11):1942–50. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1480180/>
306. G Bergamaschi 1 VRMDLPCLMC. Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. *Leukemia* . 1993;7(12):2012-8.
307. Ye B, Yang JL, Chen LJ, Wu XX, Yang HS, Zhao JM, et al. Induction of apoptosis by phenylisocyanate derivative of quercetin: Involvement of heat shock protein. *Anticancer Drugs*. 2007 Nov;18(10):1165–71.
308. Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res*. 2000;20(6 B):4339–45.
309. Hirano T, Abe K, Gotoh M. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br J Cancer* [Internet]. 1995 [cited 2025 Jan 3];72(6):1380–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8519648/>
310. Shukla S, Gupta S. Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Mol Carcinog* [Internet]. 2004 Feb [cited 2025 Jan 3];39(2):114–26. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14750216/>
311. Shukla S, Fu P, Gupta S. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis*. 2014;19(5):883–94.
312. Jeong SH, Kim HH, Park MY, Bhosale PB, Abusaliya A, Won CK, et al. Flavones: The Apoptosis in Prostate Cancer of Three Flavones Selected as Therapeutic Candidate Models. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 1;24(11).
313. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene*. 2002 May 23;21(23):3727–38.

314. Shiozawa J, Ito M, Nakayama T, Nakashima M, Kohno S, Sekine I. Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Modern Pathology*. 2000;13(9):925–33.
315. Ozden F, Saygin C, Uzunaslani D, Onal B, Durak H, Aki H. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Aug;139(8):1373–82.
316. Zucker S, Balkwill FR. Correspondence re: N-B. Liabakk et al., Matrix metalloprotease 2 (MMP- 2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 56: 190-196, 1996. *Cancer Res*. 1996;56(15):3610.
317. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst [Internet]*. 1997 Sep 3 [cited 2025 Jan 3];89(17):1260–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9293916/>
318. McDonnell S, Fingleton B. Role of matrix metalloproteinases in invasion, and metastasis: biology, diagnosis and inhibitors. *Cytotechnology*. 1993 Feb;12(1–3):367–84.
319. Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Modulation of u-PA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in adult human sarcoma cell lines. *Int J Oncol*. 2013 Jul;43(1):39–49.
320. Katiyar S. Matrix Metalloproteinases in Cancer Metastasis: Molecular Targets for Prostate Cancer Prevention by Green Tea Polyphenols and Grape Seed Proanthocyanidins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012 Oct 30;6(1):17–24.
321. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2000;10(6):415–33.
322. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*. 2002 Mar 29;21(14):2245–52.
323. Zhang XM, Huang SP, Xu Q. Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. *Cancer Chemother Pharmacol [Internet]*. 2004 Jan [cited 2025 Jan 3];53(1):82–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14593496/>
324. Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem*. 2006 Jul;287(1–2):109–16.
325. Magee PJ, McGlynn H, Rowland IR. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer Lett [Internet]*. 2004 May 10 [cited 2025 Jan 3];208(1):35–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15105043/>

326. Ende C, Gebhardt R. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med* [Internet]. 2004 Oct [cited 2025 Jan 3];70(10):1006–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15490332/>
327. Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2000 Mar 16 [cited 2025 Jan 3];1478(1):51–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10719174/>
328. Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Pageé M, Gingras D, Beéliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2002 Jan 30;1542(1–3):209–20.
329. Djerir D, Iddir M, Bourgault S, Lamy S, Annabi B. Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophys Chem*. 2018 Mar 1;234:34–41.
330. Chowdhury A, Nandy SK, Sarkar J, Chakraborti T, Chakraborti S. Inhibition of pro-/active MMP-2 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking studies. *Mol Cell Biochem*. 2017 Mar 1;427(1–2):111–22.
331. Bagli E, Stefaniotou M, Morbidelli L, Ziche M, Psillas K, Murphy C, et al. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2025 Jan 3];64(21):7936–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15520200/>
332. He L, Wu Y, Lin L, Wang J, Wu Y, Chen Y, et al. Hispidulin, a small flavonoid molecule, suppresses the angiogenesis and growth of human pancreatic cancer by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Cancer Sci*. 2011 Jan;102(1):219–25.
333. Rocchetti MT, Bellanti F, Zadorozhna M, Fiocco D, Mangieri D. Multi-Faceted Role of Luteolin in Cancer Metastasis: EMT, Angiogenesis, ECM Degradation and Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2023 May 1;24(10).
334. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Journal of Nutrition*. 1995;125(3 SUPPL.).
335. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993 Apr 1 [cited 2025 Jan 3];90(7):2690–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7681986/>
336. Huang Z, Fang F, Wang J, Wong CW. Structural activity relationship of flavonoids with estrogen-related receptor gamma. 2009;

337. Krych J, Gebicka L. Catalase is inhibited by flavonoids. *Int J Biol Macromol*. 2013 Jul 1;58:148–53.
338. Amrutha K, Nanjan P, Shaji SK, Sunilkumar D, Subhalakshmi K, Rajakrishna L, et al. Discovery of lesser known flavones as inhibitors of NF- κ B signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells—A SAR study. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014 Oct 1;24(19):4735–42.
339. Lee HJ, Lee WJ, Chang SE, Lee GY. Hesperidin, A Popular Antioxidant Inhibits Melanogenesis via Erk1/2 Mediated MITF Degradation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Aug 7 [cited 2025 Jan 6];16(8):18384. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4581251/>
340. Kim DS, Park SH, Kwon SB, Li K, Youn SW, Park KC. (-)-Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2004 Mar 31 [cited 2025 Jan 6];27(3):334–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15089040/>
341. Huang YC, Liu KC, Chiou YL. Melanogenesis of murine melanoma cells induced by hesperetin, a Citrus hydrolysate-derived flavonoid. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2025 Jan 6];50(3–4):653–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22266363/>
342. Li X, Guo L, Sun Y, Zhou J, Gu Y, Li Y. Baicalein inhibits melanogenesis through activation of the ERK signaling pathway. *Int J Mol Med* [Internet]. 2010 [cited 2025 Jan 6];25(6):923–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20428797/>
343. Anu SM, Kim HJ, Kim JE, Boo YC. Flavonoids, taxifolin and luteolin attenuate cellular melanogenesis despite increasing tyrosinase protein levels. *Phytother Res* [Internet]. 2008 Sep [cited 2025 Jan 6];22(9):1200–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18729255/>
344. Wang HZ, Zhang Y, Xie LP, Yu XY, Zhang RQ. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* [Internet]. 2002 [cited 2025 Jan 6];13(7):421–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12121829/>
345. Nagata H, Takekoshi S, Takeyama R, Homma T, Osamura RY. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. *Pigment Cell Res* [Internet]. 2004 Feb [cited 2025 Jan 6];17(1):66–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14717847/>
346. Rho HS, Ghimeray AK, Yoo DS, Ahn SM, Kwon SS, Lee KH, et al. Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules* [Internet]. 2011 Apr [cited 2025 Jan 6];16(4):3338. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6260593/>

347. Ye Y, Chou GX, Wang H, Chu JH, Yu ZL. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells. *Phytomedicine* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2025 Jan 6];18(1):32–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20638260/>
348. Choi MY, Song HS, Hur HS, Sim SS. Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in alpha-MSH-stimulated B16 melanoma cells. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2008 Sep [cited 2025 Jan 6];31(9):1166–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18806960/>
349. Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, et al. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 2008 [cited 2025 Jan 6];40(7):886–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18488027/>
350. Liu-Smith F, Meyskens FL. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2025 Aug 23];60(6):1264–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26865001/>
351. Liu-Smith F, Meyskens F, Hall I, Meyskens FL. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2025 Jan 6];60(6):1264. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4900912/>
352. Choi MY, Song HS, Hur HS, Sim SS. Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in alpha-MSH-stimulated B16 melanoma cells. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2008 Sep [cited 2025 Jan 6];31(9):1166–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18806960/>
353. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2008 Apr 14 [cited 2025 Jan 6];613(1):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18374697/>
354. Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2025 Jan 6];86(3):345–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22102161/>
355. Sak K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. *Nutr Cancer* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2025 Jan 6];66(2):177–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24377461/>
356. Cai Q, Rahn RO, Zhang R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett* [Internet]. 1997 Oct 28 [cited 2025 Jan 6];119(1):99–107. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18372528/>

357. Liu Y, Guo M. Studies on transition metal-quercetin complexes using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Molecules* [Internet]. 2015 [cited 2025 Jan 6];20(5):8583–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25985359/>
358. Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK. A Novel HPLC-Assisted Method for Investigation of the Fe²⁺-Chelating Activity of Flavonoids and Plant Extracts. *Molecules* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2025 Jan 6];19(11):18296. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6270772/>
359. Jovanovic S V., Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc*. 1994 Jun 1;116(11):4846–51.
360. Liu-Smith F, Dellinger R, Meyskens FL. Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2025 Jan 6];0:51. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4209333/>
361. Chou DS, Hsiao G, Lai YA, Tsai YJ, Sheu JR. Baicalein induces proliferation inhibition in B16F10 melanoma cells by generating reactive oxygen species via 12-lipoxygenase. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Apr 15 [cited 2025 Jan 6];46(8):1197–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19439216/>
362. Denkert C, Köbel M, Berger S, Siegert A, research ALC, 2001 undefined. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. AACRC Denkert, M Köbel, S Berger, A Siegert, A Leclerc, U Trefzer, S Hauptmann Cancer research, 2001•AACR [Internet]. [cited 2025 Jan 6]; Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/61/1/303/507377>
363. Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 6];93(1–2):76–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24315690/>
364. Denat L, Kadekaro AL, Marrot L, Leachman SA, Abdel-Malek ZA. Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 6];134(6):1512. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4418514/>
365. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2013 Dec [cited 2025 Jan 6];12(12):931–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24287781/>
366. Tang X, Wang H, Fan L, Wu X, Xin A, Ren H, et al. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2025 Jan 6];50(11):1599–609. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21402146/>
367. Pandurangan AK, Ananda Sadagopan SK, Dharmalingam P, Ganapasam S. Luteolin, a bioflavonoid inhibits Azoxymethane-induced colorectal cancer through activation of

- Nrf2 signaling. *Toxicol Mech Methods* [Internet]. 2014 Jan [cited 2025 Jan 6];24(1):13–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24024667/>
368. Zhang YC, Gan FF, Shelar SB, Ng KY, Chew EH. Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2025 Jan 6];59:272–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770353/>
 369. Zhang YC, Gan FF, Shelar SB, Ng KY, Chew EH. Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2025 Jan 6];59:272–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770353/>
 370. Balyan R, Kudugunti SK, Hamad HA, Yousef MS, Moridani MY. Bioactivation of luteolin by tyrosinase selectively inhibits glutathione S-transferase. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2015 Oct 5 [cited 2025 Jan 6];240:208–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26279214/>
 371. Wu PS, Yen JH, Kou MC, Wu MJ. Luteolin and Apigenin Attenuate 4-Hydroxy-2-Nonenal-Mediated Cell Death through Modulation of UPR, Nrf2-ARE and MAPK Pathways in PC12 Cells. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun 18 [cited 2025 Jan 6];10(6):e0130599. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4472230/>
 372. Paredes-Gonzalez X, Fuentes F, Jeffery S, Saw CLL, Shu L, Su ZY, et al. Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones apigenin and luteolin. *Biopharm Drug Dispos* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2025 Jan 6];36(7):440–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25904312/>
 373. Huang CS, Lii CK, Lin AH, Yeh YW, Yao HT, Li CC, et al. Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes. *Arch Toxicol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2025 Jan 6];87(1):167–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22864849/>
 374. Paredes-Gonzalez X, Fuentes F, Su ZY, Kong ANT. Apigenin Reactivates Nrf2 Anti-oxidative Stress Signaling in Mouse Skin Epidermal JB6 P + Cells Through Epigenetics Modifications. *AAPS J* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 6];16(4):727. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4070251/>
 375. Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2012 Jan 25 [cited 2025 Jan 6];195(2):154–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22197970/>

376. Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, et al. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2025 Jan 6];47(2):253–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17433488/>
377. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2025 Jan 6];42(11):1690–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17462537/>
378. Kimura S, Warabi E, Yanagawa T, Ma D, Itoh K, Ishii Y, et al. Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Sep 11 [cited 2025 Jan 6];387(1):109–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19576171/>
379. Na HK, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2025 Jan 6];46(4):1271–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18082923/>
380. Zhai X, Lin M, Zhang F, Hu Y, Xu X, Li Y, et al. Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2013 Feb [cited 2025 Jan 6];57(2):249–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23255485/>
381. Wang R, Tu J, Zhang Q, Zhang X, Zhu Y, Ma W, et al. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling. *Hippocampus* [Internet]. 2013 Jul [cited 2025 Jan 6];23(7):634–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23536494/>
382. Cha MH, Kim IC, Lee BH, Yoon Y. Baicalein inhibits adipocyte differentiation by enhancing COX-2 expression. *J Med Food* [Internet]. 2006 Jun [cited 2025 Jan 6];9(2):145–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16822198/>
383. Hu C, Kitts DD. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2004 [cited 2025 Jan 6];265(1–2):107–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15543940/>
384. Pandurangan AK, Kumar S, Sadagopan A, Dharmalingam P, Ganapasam S, Sudhandiran G. Luteolin, a bioflavonoid inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis: Involvement of iNOS and COX-2. *Pharmacogn Mag* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 6];10(Suppl 2):S306. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4078326/>
385. Chung MH, Kim DH, Na HK, Kim JH, Kim HN, Haegeman G, et al. Genistein inhibits phorbol ester-induced NF- κ B transcriptional activity and COX-2 expression by blocking the phosphorylation of p65/RelA in human mammary epithelial cells. *Mutat Res*

[Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 6];768(C):74–83. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24742714/>

386. Van Dross RT, Hong X, Pelling JC. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin through downregulation of Akt signal transduction in human keratinocytes. *Mol Carcinog* [Internet]. 2005 Oct [cited 2025 Jan 6];44(2):83–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16044407/>
387. Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Naka T, Ogata A, Shima Y, et al. Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006 Feb 3 [cited 2025 Jan 6];340(1):1–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16343431/>
388. Wattel A, Kamel S, Prouillet C, Petit JP, Lorget F, Offord E, et al. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF kappa B and AP-1. *J Cell Biochem* [Internet]. 2004 [cited 2025 Jan 6];92(2):285–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15108355/>
389. Patil RH, Babu RL, Naveen Kumar M, Kiran Kumar KM, Hegde SM, Ramesh GT, et al. Apigenin inhibits PMA-induced expression of pro-inflammatory cytokines and AP-1 factors in A549 cells. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2025 Jan 6];403(1–2):95–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25666088/>
390. Das S, Das J, Samadder A, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2012 [cited 2025 Jan 6];237(12):1433–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23354402/>
391. Selvendiran K, Koga H, Ueno T, Yoshida T, Maeyama M, Torimura T, et al. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2025 Jan 6];66(9):4826–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16651438/>
392. Cao HH, Tse AKW, Kwan HY, Yu H, Cheng CY, Su T, et al. Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2025 Jan 6];87(3):424–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24275163/>
393. Meeran SM, Mantena SK, Katiyar SK. Prevention of ultraviolet radiation-induced immunosuppression by (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice is mediated through interleukin 12-dependent DNA repair. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2025 Jan 6];12(7 Pt 1):2272–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16609044/>

394. Duarte J, Francisco V, Perez-Vizcaino F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food Funct* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jan 6];5(8):1653–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24901042/>
395. S Caltagirone 1 CRAPFORPGNMBFBAMP. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* . 2000;Aug 15;87(4):595-600.
396. Liu JD, Chen SH, Lin CL, Tsai SH, Liang YC. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J Cell Biochem* [Internet]. 2001 [cited 2025 Jan 6];83(4):631–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11746506/>
397. Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer* [Internet]. 2005 Apr 20 [cited 2025 Jan 6];114(4):513–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15609335/>
398. Kim DS, Park SH, Kwon SB, Li K, Youn SW, Park KC. (-)-Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2004 Mar 31 [cited 2025 Jan 6];27(3):334–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15089040/>
399. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2001 May 15 [cited 2025 Jan 6];61(10):1205–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11322924/>
400. Serafino A, Sinibaldi Vallebbona P, Lazzarino G, Tavazzi B, Rasi G, Pierimarchi P, et al. Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *FASEB J* [Internet]. 2004 Dec [cited 2025 Jan 6];18(15):1940–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15451888/>
401. Kwak IH, Shin YH, Kim M, Cha HY, Nam HJ, Lee BS, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits paracrine and autocrine hepatocyte growth factor/scatter factor-induced tumor cell migration and invasion. *Exp Mol Med* [Internet]. 2011 [cited 2025 Jan 6];43(2):111. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3047192/>
402. Cao HH, Cheng CY, Su T, Fu XQ, Guo H, Li T, et al. Quercetin inhibits HGF/c-Met signaling and HGF-stimulated melanoma cell migration and invasion. *Mol Cancer* [Internet]. 2015 May 14 [cited 2025 Jan 6];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25971889/>
403. Syed DN, Chamcheu JC, Khan MI, Sechi M, Lall RK, Adhami VM, et al. Fisetin inhibits human melanoma cell growth through direct binding to p70S6K and mTOR: findings from 3-D melanoma skin equivalents and computational modeling. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2025 Jan 6];89(3):349. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4116133/>

404. Pal HC, Sharma S, Strickland LR, Katiyar SK, Ballestas ME, Athar M, et al. Fisetin Inhibits Human Melanoma Cell Invasion through Promotion of Mesenchymal to Epithelial Transition and by Targeting MAPK and NFκB Signaling Pathways. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan 23 [cited 2025 Jan 6];9(1):e86338. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3900533/>
405. Pal HC, Diamond AC, Strickland LR, Kappes JC, Katiyar SK, Elmets CA, et al. Fisetin, a dietary flavonoid, augments the anti-invasive and anti-metastatic potential of sorafenib in melanoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2025 Jan 6];7(2):1227–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517521/>
406. Pal HC, Baxter RD, Hunt KM, Agarwal J, Elmets CA, Athar M, et al. Fisetin, a phytochemical, potentiates sorafenib-induced apoptosis and abrogates tumor growth in athymic nude mice implanted with BRAF-mutated melanoma cells. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2025 Jan 6];6(29):28296. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4695061/>
407. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2009 Sep 13 [cited 2025 Jan 6];31(1):27. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2802667/>
408. Vahid F, Zand H, Nosrat-Mirshekarlou E, Najafi R, Hekmatdoost A. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: a review. *Gene* [Internet]. 2015 May 10 [cited 2025 Jan 6];562(1):8–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25701602/>
409. Katiyar SK, Singh T, Prasad R, Sun Q, Vaid M. Epigenetic Alterations in Ultraviolet Radiation-Induced Skin Carcinogenesis: Interaction of Bioactive Dietary Components on Epigenetic Targets. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2025 Jan 6];88(5):1066. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3288155/>
410. Prasad R, Katiyar SK. Polyphenols from green tea inhibit the growth of melanoma cells through inhibition of class I histone deacetylases and induction of DNA damage. *Genes Cancer* [Internet]. 2015 [cited 2025 Jan 6];6(1–2):49. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4362484/>
411. Fan T, Jiang S, Chung N, Alikhan A, Chyi-Chia CN, Lee R, et al. EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2011 Apr [cited 2025 Jan 6];9(4):418. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3078218/>
412. Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, Kikuchi K, Otsuka F, Sugimura T, et al. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci* [Internet]. 2005 Dec [cited 2025 Jan 6];95(12):962. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11160084/>

413. Venza M, Visalli M, Biondo C, Lentini M, Catalano T, Teti D, et al. Epigenetic regulation of p14ARF and p16INK4A expression in cutaneous and uveal melanoma. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2025 Jan 6];1849(3):247–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25497382/>
414. Rodríguez J, Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-García O, Castillo J, et al. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity. Vol. 12, *Melanoma Research*. 2002.
415. Martínez C, Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-García O, Castillo J, et al. Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. *Melanoma Res* [Internet]. 2003 Feb [cited 2025 Jan 2];13(1):3–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12569278/>
416. Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-García O, Canteras M, et al. Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. Vol. 49, *NUTRITION AND CANCER*. 2004.
417. Conesa CM, Ortega VV, Yáñez Gascón MJ, Baños MA, Jordana MC, Benavente-García O, et al. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. *J Agric Food Chem*. 2005 Aug 24;53(17):6791–7.
418. OBDULIO BENAVENTE-GARCIA JCJLMAJYCMVVJALOZANO. Antiproliferative activity of several phenolic compounds against melanoma cell lines: relationship between structure and activity. *AgroFOOD industry hi-tech*. 2005;16(4):30–4.
419. Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smith DE. Cysteine Protection against X Irradiation. *Science* [Internet]. 1949 [cited 2025 Jan 11];110(2852):213–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17811258/>
420. Faramarzi S, Piccolella S, Manti L, Pacifico S. Could Polyphenols Really Be a Good Radioprotective Strategy? *Molecules* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2025 Jan 11];26(16). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34443561/>
421. Castillo J, Benavente-García O, Dj F, Baño MJ Del, Lorente J, Alcaraz M, et al. Radioprotective Effects Against Chromosomal Damage Induced in Human Lymphocytes by γ -Rays as a Function of Polymerization Grade of Grape Seed Extracts. Vol. 4, *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*. Mary Ann Liebert, Inc; 2001.
422. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M. Radioprotective Effects In Vivo of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves Against X-Ray-Induced Chromosomal Damage: Comparative Study Versus Several Flavonoids and Sulfur-Containing Compounds. Vol. 5, *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*. 2002.
423. Del Baño MJ, Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Martín-Gil R, Acevedo C, et al. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal

damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2006 Mar 22 [cited 2025 Jan 11];54(6):2064–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16536576/>

424. Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2025 Jan 11];47(2):386–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19084569/>
425. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernandez H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. [cited 2025 Jan 11]; Available from: <http://dmfr.birjournals.org>
426. Alcaraz M, Olivares A, Achel DG, García-Gamuz JA, Castillo J, Alcaraz-Saura M. Genoprotective Effect of Some Flavonoids against Genotoxic Damage Induced by X-rays In Vivo: Relationship between Structure and Activity. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2021 Dec 30 [cited 2025 Jan 2];11(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35052599>
427. Agbele AT, Fasoro OJ, Fabamise OM, Oluyide OO, Idolor OR, Bamise EA. Protection Against Ionizing Radiation-Induced Normal Tissue Damage by Resveratrol: A Systematic Review. *Eurasian J Med* [Internet]. 2020 [cited 2025 Jan 11];52(3):298–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33209085/>
428. Xie LW, Cai S, Zhao TS, Li M, Tian Y. Green tea derivative (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) confers protection against ionizing radiation-induced intestinal epithelial cell death both in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 Jan 11];161:175–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33069855/>
429. Wu S, Tian C, Tu Z, Guo J, Xu F, Qin W, et al. Protective effect of total flavonoids of *Engelhardia roxburghiana* Wall. leaves against radiation-induced intestinal injury in mice and its mechanism. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2023 Jul 15 [cited 2025 Jan 11];311. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36997130/>
430. Meena SK, Joriya PR, Yadav SM, Kumar R, Meena P, Patel DD. Modulation of radiation-induced intestinal injury by radioprotective agents: A cellular and molecular perspectives. *Rev Environ Health*. 2023 Jun 1;38(2):295–311.
431. Wang Q, Xie C, Xi S, Qian F, Peng X, Huang J, et al. Radioprotective Effect of Flavonoids on Ionizing Radiation-Induced Brain Damage. *Molecules* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 Jan 11];25(23). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33287417/>
432. Guo L, Du QQ, Cheng PQ, Yang TT, Xing CQ, Luo XZ, et al. Neuroprotective Effects of *Lycium barbarum* Berry on Neurobehavioral Changes and Neuronal Loss in the Hippocampus of Mice Exposed to Acute Ionizing Radiation. *Dose Response* [Internet]. 2021 Nov 22 [cited 2025 Jan 11];19(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34887716/>

433. Tiwari P, Mishra KP. Flavonoids sensitize tumor cells to radiation: molecular mechanisms and relevance to cancer radiotherapy. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2020 Mar 3 [cited 2025 Jan 11];96(3):360–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31738629/>
434. Komorowska D, Radzik T, Kalenik S, Rodacka A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 Jan 11];23(18). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36142554/>
435. Liu X, Zheng T, Bao Y, Li P, Zhao T, Liu Y, et al. Genistein Implications in Radiotherapy: Kill Two Birds with One Stone. *Molecules* 2025, Vol 30, Page 188 [Internet]. 2025 Jan 5 [cited 2025 Jan 11];30(1):188. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/30/1/188/htm>
436. Liu X, Zheng T, Bao Y, Li P, Zhao T, Liu Y, et al. Genistein Implications in Radiotherapy: Kill Two Birds with One Stone. *Molecules* 2025, Vol 30, Page 188 [Internet]. 2025 Jan 5 [cited 2025 Aug 23];30(1):188. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/30/1/188/htm>
437. Hillman GG, Singh-Gupta V, Hoogstra DJ, Abernathy L, Rakowski J, Yunker CK, et al. Differential Effect of Soy Isoflavones in Enhancing High Intensity Radiotherapy and Protecting Lung Tissue in a Pre-Clinical Model of Lung Carcinoma. *Radiother Oncol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2025 Jan 13];109(1):10.1016/j.radonc.2013.08.015. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3840154/>
438. Hillman GG. Soy Isoflavones Protect Normal Tissues While Enhancing Radiation Responses. *Semin Radiat Oncol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Jan 13];29(1):62–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30573186/>
439. Zhang YM, Miao ZM, Chen YP, Song ZB, Li YY, Liu ZW, et al. Ononin promotes radiosensitivity in lung cancer by inhibiting HIF-1 α /VEGF pathway. *Phytomedicine*. 2024 Mar 1;125:155290.
440. Akbari S, Kariznavi E, Jannati M, Elyasi S, Tayarani-Najaran Z. Curcumin as a preventive or therapeutic measure for chemotherapy and radiotherapy induced adverse reaction: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*. 2020 Nov 1;145:111699.
441. Boretti A. Evidence for the use of curcumin in radioprotection and radiosensitization. *Phytotherapy Research* [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2025 Jan 13];38(2):464–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.7803>
442. Sebastià N, Montoro A, Hervás D, Pantelias G, Hatzi VI, Soriano JM, et al. Curcumin and trans-resveratrol exert cell cycle-dependent radioprotective or radiosensitizing effects as elucidated by the PCC and G2-assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014 Aug 1;766–767:49–55.

443. Komorowska D, Radzik T, Kalenik S, Rodacka A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 10627 [Internet]. 2022 Sep 13 [cited 2025 Jan 13];23(18):10627. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/18/10627/htm>
444. Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J. Carnosol, radiation and melanoma: A translational possibility. *Clinical and Translational Oncology*. 2013 Sep;15(9):712–9.
445. Radiosensitizing effect of rosmarinic acid in metastatic melanoma B16F10 cells. *Anticancer Res* . 2014;34(4):1913–21.
446. Olivares A, Alcaraz-Saura M, Achel DG, Alcaraz M. Effect of rosmarinic acid and ionizing radiation on glutathione in melanoma B16F10 cells: A translational opportunity. *Antioxidants*. 2020 Dec 1;9(12):1–14.
447. Alcaraz M, Olivares A, Andreu-Gálvez M, Achel DG, Mercado AM, Alcaraz-Saura M. Paradoxical Radiosensitizing Effect of Carnosic Acid on B16F10 Metastatic Melanoma Cells: A New Treatment Strategy. *Antioxidants*. 2022 Nov 1;11(11).
448. Del Baño MJ, Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Martín-Gil R, Acevedo C, et al. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by γ -rays. *J Agric Food Chem*. 2006 Mar 22;54(6):2064–8.
449. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1986 Jul 1;161(2):193–8.
450. Fenech M. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Nucleated Cells. . *Prog Clin Biol Res* . 1990;340B:195–206.
451. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000 Nov 20;455(1–2):81–95.
452. Min Y, Roche KC, Tian S, Eblan MJ, McKinnon KP, Caster JM, et al. Antigen-capturing nanoparticles improve the abscopal effect and cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2025 Mar 26];12(9):877–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28650437/>
453. Almásy Z, Krepinsky AB, Bianco A, Köteles GJ. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Int J Rad Appl Instrum A*. 1987 Jan 1;38(4):241–9.
454. Schmid W. The Micronucleus Test. . *Mutat Res* . 1975;31:9–15.

455. Von Ledebur M, Schmid W. The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutat Res* [Internet]. 1973 [cited 2025 Mar 26];19(1):109–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4792278/>
456. Alley MC SDMAHMCMDABMJSRBM. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res* . 1988;47:589–601.
457. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1983 [cited 2025 Mar 26];52:711–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6137189/>
458. Noctor G, Gomez L, Lè Ne Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling.
459. Asensi M, Sastre J, Pallardo F V., Lloret A, Lehner M, Garcia-De-La Asuncion J, et al. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzymol* [Internet]. 1999 [cited 2025 Mar 26];299:267–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9916205/>
460. Kleinman WA, Richie JP. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol*. 2000 Jul 1;60(1):19–29.
461. Wu G, Xiu H, Luo H, Ding Y, Li Y. A mathematical model for cell cycle control: graded response or quantized response. *Cell Cycle* [Internet]. 2022 [cited 2025 Aug 18];21(8):820–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35107036/>
462. Visanji JM, Thompson DG, Padfield PJ. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett* [Internet]. 2006 Jun 8 [cited 2025 Aug 18];237(1):130–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383505005422>
463. Tang J feng, Li G li, Zhang T, Du Y mei, Huang S ying, Ran J hua, et al. Homoharringtonine inhibits melanoma cells proliferation in vitro and vivo by inducing DNA damage, apoptosis, and G2/M cell cycle arrest. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2021 Mar 30 [cited 2025 Aug 18];700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33548212/>
464. Achel DG, Alcaraz-Saura M, Castillo J, Olivares A, Alcaraz M. Radioprotective and antimutagenic effects of *Pycnanthus angolensis* warb seed extract against damage induced by x rays. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2025 Aug 9];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31861474/>
465. Alcaraz M, Olivares A, Andreu-Gálvez M, Achel DG, Mercado AM, Alcaraz-Saura M. Paradoxical Radiosensitizing Effect of Carnosic Acid on B16F10 Metastatic Melanoma Cells: A New Treatment Strategy. *Antioxidants* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2025 Aug 9];11(11):2166. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/11/2166/htm>

466. Li M, You L, Xue J, Lu Y. Ionizing radiation-induced cellular senescence in normal, non-transformed cells and the involved DNA damage response: A mini review. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 May 22 [cited 2025 Aug 18];9(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29872395/>
467. Rodman SN, Spence JM, Ronnfeldt TJ, Zhu Y, Solst SR, O'Neill RA, et al. Enhancement of Radiation Response in Breast Cancer Stem Cells by Inhibition of Thioredoxin- and Glutathione-Dependent Metabolism. *Radiat Res* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2025 Aug 18];186(4):385–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27643875/>
468. Moore J, Yousef M, Tsiani E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients* [Internet]. 2016 Nov 17 [cited 2025 Aug 18];8(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27869665/>
469. El-Huneidi W, Bajbouj K, Muhammad JS, Vinod A, Shafarin J, Khoder G, et al. Carnosic acid induces apoptosis and inhibits akt/mtor signaling in human gastric cancer cell lines. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2025 Aug 18];14(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33800129/>
470. Patwardhan RS, Sharma D, Checker R, Thoh M, Sandur SK. Spatio-temporal changes in glutathione and thioredoxin redox couples during ionizing radiation-induced oxidative stress regulate tumor radio-resistance. *Free Radic Res* [Internet]. 2015 Oct 3 [cited 2025 Aug 18];49(10):1218–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26021764/>
471. Achel DG, Alcaraz-Saura M, Castillo J, Olivares A, Alcaraz M. Radioprotective and antimutagenic effects of *Pycnanthus angolensis* warb seed extract against damage induced by x rays. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2025 Aug 18];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31861474/>
472. Alcaraz M, Olivares A, Andreu-Gálvez M, Achel DG, Mercado AM, Alcaraz-Saura M. Paradoxical Radiosensitizing Effect of Carnosic Acid on B16F10 Metastatic Melanoma Cells: A New Treatment Strategy. *Antioxidants* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2025 Aug 18];11(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36358539/>
473. Lin KI, Lin CC, Kuo SM, Lai JC, Wang YQ, You HL, et al. Carnosic acid impedes cell growth and enhances anticancer effects of carmustine and lomustine in melanoma. *Biosci Rep* [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2025 Aug 18];38(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29789400/>
474. Huang SC, Ho CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappaB and c-Jun. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2005 Jan 15 [cited 2025 Aug 18];69(2):221–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15627474/>
475. Arienti C, Zoli W, Pignatta S, Carloni S, Paganelli G, Ulivi P, et al. Efficacy of different sequences of radio- and chemotherapy in experimental models of human melanoma. *J*

Cell Physiol [Internet]. 2014 [cited 2025 Aug 18];229(10):1548–56. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24591063/>

IX. ANEXOS

Subdirección General de Ganadería

Miguel Alcaraz Baños
Área de Radiología y Medicina Física
Facultad de Medicina/Odontología
Universidad de Murcia

- Ejecución de algún procedimiento fuera de un establecimiento usuario, concretamente, en las dependencias del Servicio de Radioprotección del SAI de la Universidad de Murcia.

MAURITIE INAREZ, ENRIQUE PUSO	14/12/2021	13:56:53
-------------------------------	------------	----------





INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Lucía Perriago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de Investigación y del Plan Propio y Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA:

Que D. Miguel Alcaraz Baños presentó la memoria de trabajo el Proyecto de Investigación titulado *"Efecto antimutagénico y genoprotector de diferentes sustancias frente a la radiación ionizante: análisis comparativo mediante ensayo de micronúcleos in vitro"*, al Comité de Bioseguridad en Experimentación.

Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día siete de abril de dos mil veintidós¹, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión.

Vº Bº
LA PRESIDENTA DEL COMITÉ
DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: 472/2021

¹ A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación



Código seguro de verificación: RUxFMnkC-8pEuM+oO-pUY+74eK-/1yy8382

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

II.- *Salvia Rosmarinus*.



