

Estudio experimental sobre los efectos de la quercetina en la disfunción orgánica y cognitiva originada por radiación ionizante

Experimental study about the effects of quercetin on the organic and cognitive dysfunction induced by ionizing radiation

Barrio JP¹, Marina R¹, Costilla SM², Rodríguez JR³, Fernández CL⁴, Ferreras MC⁵, González P¹

¹ Universidad de León, Departamento de Ciencias Biomédicas, Instituto de Biomedicina, León, España. ² Hospital Universitario Central de Asturias, Servicio de Radiodiagnóstico, Sección de Neuroimagen. Oviedo, Asturias, España. ³ Hospital Universitario de León, Servicio de Radioterapia, León. ⁴ Complejo Hospitalario de Segovia, Servicio de Radiodiagnóstico, Unidad de Resonancia, Segovia, España.

⁵ Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, León, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Comprobar el efecto de la incorporación de quercetina por vía oral sobre las alteraciones comportamentales, bioquímicas e histológicas de una dosis subletal de rayos X en la rata.

Material y método: Se irradiaron a cuerpo entero con 6 Gy de rayos X ratas Wistar macho suplementadas o no con 50 mg/kg de quercetina. Se obtuvieron imágenes por RM a los dos, siete, 15 y 30 días tras la irradiación, y se observó el comportamiento exploratorio mediante *open field* antes y después de la irradiación. Los animales se sacrificaron a los siete y 30 días, obteniéndose muestras de sangre, cerebro, médula espinal y médula ósea.

Resultados: Se observó un fuerte descenso en el recuento eritrocitario, leucocitario y plaquetario a los siete días, recuperándose a los 30 días los recuentos leucocitario y plaquetario, sin efecto de la quercetina. La RM mostraba focos de microsangrado consistentes con los hallazgos histológicos de infiltración celular por alteraciones neurovasculares, más evidentes en animales no suplementados. La quercetina atenuó estas alteraciones y revertió la disminución de la actividad exploratoria ocasionada por la irradiación.

Conclusiones: El uso preventivo de quercetina podría mejorar los síntomas comportamentales y disminuir el daño tisular a corto plazo tras sesiones de radioterapia.

Palabras clave:

Comportamiento, quercetina, radiación ionizante, rata, rayos X.

Abstract

Objective: To assess the effect of oral quercetin supplementation on the behavioral, biochemical, and histological alterations by a sublethal X-ray dose in rats.

Materials and method: Male Wistar rats, supplemented with 50 mg/kg quercetin or solvent, were whole-body irradiated with 6 Gy X-rays. MRI was obtained at 2, 7, 15, and 30 days post-irradiation. Open field exploratory behavior was observed before and after irradiation. Rats were sacrificed at 7 and 30 days post-irradiation, and blood, brain, spinal cord, and bone marrow samples were obtained.

Results: Red cell, white cell, and platelet counts strongly decreased at 7 days post-irradiation. White cell and platelet counts recovered at 30 days post-irradiation, with no effect by quercetin. MRI shows focal microbleeds consistent with the histological findings of cell infiltration by neurovascular alterations, more evident in non-supplemented rats. Quercetin improved these changes and reverted the decrease in exploratory activity due to X-irradiation.

Conclusions: Preventive use of quercetin could improve early behavioral symptoms and decrease tissue damage appearing shortly after radiotherapy.

Key words:

Behavior, ionizing radiation, quercetin, rat, X rays.

Correspondencia

JP Barrio Lera
Universidad de León, Departamento de Ciencias Biomédicas, León, España.
e-mail:jpbarl@unileon.es

■ Introducción

Los efectos agudos de la exposición del organismo a la radiación ionizante incluyen, entre otros, inmunosupresión, pérdida de células hematopoyéticas y alteraciones en distintos tejidos [1]. El hígado es radiosensible, pudiendo aparecer fallo hepático y hepatitis inducida por radiación [2]. A largo plazo pueden aparecer diversas disfunciones orgánicas, fibrosis y cáncer. El síndrome hematopoyético es importante en exposiciones a cuerpo entero con radiación ionizante que supere 1 Gy. La irradiación de la médula ósea y de las células progenitoras provoca la muerte celular dosis dependiente a escala exponencial [3]. Una crisis hematólogica puede conducir a una mayor probabilidad de aparición de infecciones, hemorragias y dificultad para la cicatrización, además de una temprana leucocitopenia [4].

La irradiación terapéutica, radical o paliativa, de los tumores o malformaciones vasculares del sistema nervioso central presenta un alto riesgo de causar lesiones en los tejidos neurales perilesionales sanos y también al radiar zonas cercanas al sistema nervioso [5-7], destacando las alteraciones inducidas por la radiación ionizante en el hipocampo, donde se forman neuronas a lo largo de toda la vida que representan el soporte esencial de la memoria y el aprendizaje [8]. La radiación ionizante impide el aprendizaje por suprimir la neurogénesis en el hipocampo, pero se desconoce en gran medida el efecto de las radiaciones ionizantes sobre las alteraciones funcionales inducidas en el sistema nervioso del adulto [9]. Después de la radiación, la activación microglial y la presencia de infiltrados de monocitos indican una reacción inflamatoria crónica en conjunción con una reducida neurogénesis [10].

La búsqueda de agentes químicos capaces de proteger de los efectos negativos de la radiación ionizante es un tema prioritario en radiobiología [11]. El aumento de estrés oxidativo asociado a la radiación experimental constituye la base para uno de los enfoques de radioprotección frente al daño a tejidos sanos inducido por la radioterapia [12]. Las moléculas con características de inactivación (*scavenging*) de radicales libres son potenciales agentes radioprotectores y, en este sentido, la amifostina (ácido S-2-(3-amino-propilamino-etilfosforotioico) se utiliza en oncología a pesar de los efectos secundarios graves y de su elevado coste [13]. Para evitar las desventajas de compuestos radioprotectores sintéticos, existe un interés creciente en la identificación de compuestos radiomodificadores que tengan la capacidad de minimizar los efectos de la radiación. Entre estos compuestos figuran los alimentos ricos en flavonoides y otros polifenoles capaces de mitigar el estrés oxidativo [14][15].

Los objetivos de este estudio son, por una parte, comprobar los efectos deletéreos de la irradiación a cuerpo entero

de ratas Wistar a dosis subletal de rayos X, sobre aspectos comportamentales, bioquímicos e histológicos, y por otro, impedir o mitigar dichas alteraciones mediante la incorporación por vía oral de quercetina, un flavonoide con reconocida actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticarcinogénica [14][16].

■ Material y métodos

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250 g, al comienzo de los experimentos, divididas en grupos de ocho cada uno. Se sometieron a dos tratamientos, control y exposición con rayos X, en dos tiempos de análisis, siete y 30 días. La administración de la quercetina, disuelta en propilenglicol, se realizó por vía intragástrica a la dosis de 50 mg por kg de peso corporal. Los animales no suplementados con quercetina recibieron el mismo volumen de propilenglicol.

Las ratas fueron mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, con un ciclo de 12 horas de luz, alojadas en condiciones de mantenimiento en jaulas adyacentes con suministro *ad libitum* de agua y alimento. Después de una semana de adaptación se iniciaron los tratamientos. Todos los experimentos con los animales de laboratorio se realizaron siguiendo las pautas recogidas en la normativa internacional, así como en la normativa 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 22 de septiembre de 2010, y en la legislación española R.D. 1201/2005, referente a la protección de los animales utilizados para la experimentación.

Los animales irradiados fueron sometidos a una única irradiación de rayos X de cuerpo entero a una dosis de 6 Gy, durante un periodo de 15 minutos, bajo anestesia inducida por pentobarbital sódico (50 mg/kg). Los animales control siguieron el mismo tratamiento, salvo que no recibieron irradiación. La irradiación se llevó a cabo por personal cualificado del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León respetando la normativa vigente sobre funcionamiento y uso de equipos e instalaciones de rayos X.

Se recogieron muestras de sangre a los siete y 30 días post-irradiación, obteniéndose los recuentos eritrocitario, leucocitario y plaquetario, valor hematocrito y concentración de hemoglobina (Diatron Abacus Junior Vet, Diatron LaB, Austria).

Tanto los animales suplementados con quercetina como los grupos control fueron sometidos a una resonancia magnética (RM) previamente a la radiación. Se efectuó el registro de las alteraciones de señal inducidas por la radiación experimental en encéfalo, médula espinal y médula ósea de los cuerpos vertebrales, mediante RM de 3 T (Genesis Sigma, General Electric Medical Systems, Milwaukee WI,

Tabla 1. Peso corporal, hepático y del cerebro en los grupos experimentales a los siete y 30 días post-irradiación (valores medios \pm EEM)

Grupo	Efecto	Peso corporal (g)	Peso hepático (g)	Peso del cerebro (g)
CS	Temprano (7 días)	320,3 \pm 18,8	11,9 \pm 0,9	2,00 \pm 0,10
CQ		324,6 \pm 19,3	11,2 \pm 1,2	2,02 \pm 0,04
RS		294,9 \pm 25,3	11,4 \pm 1,6	1,86 \pm 0,16
RQ		293,5 \pm 13,5	12,1 \pm 1,0	1,96 \pm 0,07
CS	Tardío (30 días)	352,3 \pm 22,9	12,5 \pm 1,4	2,02 \pm 0,10
CQ		368,4 \pm 28,1	13,1 \pm 2,0	1,98 \pm 0,07
RS		344,0 \pm 17,4	12,3 \pm 1,3	1,92 \pm 0,12
RQ		322,7 \pm 21,1	12,4 \pm 1,4	1,98 \pm 0,10

EE.UU.), a los dos, siete, 15 y 30 días post-irradiación, obteniendo imágenes en planos axiales y coronales T2SE y T2*EG (en cerebro) y sagital T1 y axiales T2SE y T2*EG (en columna vertebral y médula espinal).

Para los estudios histológicos se obtuvieron muestras de encefalo, médula espinal y médula ósea de los cuerpos vertebrales, fijadas en formol al 10%. Tras su deshidratación e inclusión en parafina, se procedió a la obtención de cortes seriados de 4 μ m de grosor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Para el análisis de motilidad, actividad exploratoria y ansiedad se utilizó un *open field* de 100 x 100 cm y 40 cm de altura. Se registró la actividad de los animales en una sesión diaria durante los cuatro días previos y los tres siguientes a la irradiación, registrando de nuevo observaciones comportamentales durante los días 14, 19 y 29 post-irradiación. Cada animal fue colocado en el centro del *open field*, donde permaneció cinco minutos, procediéndose a filmar la actividad de los animales y almacenando los *tracks* (*software* Noldus Ethovision, Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda) para su posterior análisis. Transcurrido el periodo de observación, el animal fue devuelto a su jaula. Con el propósito de analizar la respuesta de los animales, la superficie del *open field* fue dividida virtualmente en cuatro esquinas de 25 x 25 cm, que definieron zonas laterales de 50 x 25 cm. Los parámetros analizados fueron la frecuencia de entrada en cada tipo de zona, la distancia total recorrida, la duración de la estancia y la frecuencia de exploración vertical (*rearing*).

Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) factorial para el estudio hematológico y ANOVA de medidas repetidas para el estudio comportamental. Las diferencias entre grupos fueron comprobadas por medio del test de Newman-Keuls, asumiendo diferencias significativas cuando $p < 0,05$. El *software* utilizado fue Statistica v.8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, EE.UU.).

Resultados

Al final de los experimentos, no hubo diferencias entre los grupos en el peso corporal, hepático y del cerebro (Tabla I). Se observó que la pérdida media de peso corporal, medida tanto a los dos días (RS = 7,52, DE: 3,13; RQ = 3,13, DE: 1,02) como a los cinco días (RS = 13,16, DE: 6,1; RQ = 6,88; DE: 3,2) post-irradiación, experimentada por las ratas no suplementadas que sufrieron irradiación a cuerpo entero de 6 Gy (grupo RS), fue aproximadamente el doble que la pérdida acaecida en las ratas suplementadas oralmente con quercetina (grupo RQ). Se apreció un descenso en el valor de leucocitos a los siete días tras la irradiación, con o sin administración con quercetina, que revertió a los 30 días post-irradiación especialmente tras la administración de quercetina (figura 1). Algo similar sucedió con las plaquetas, con una práctica desaparición del plasma a los siete días post-

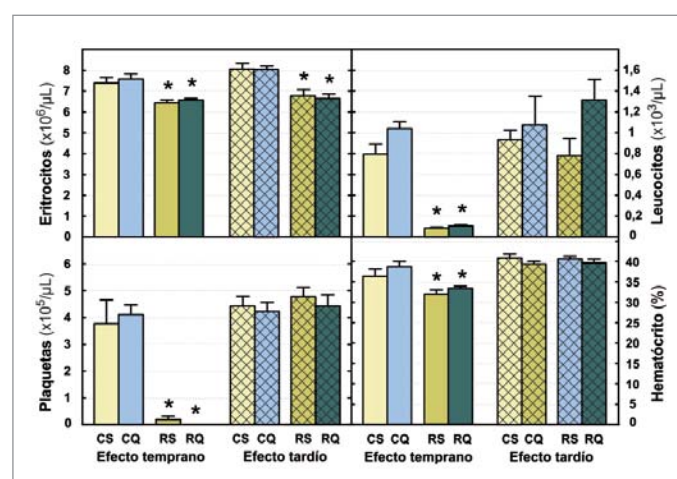


Fig. 1. Cambios a los siete y a los 30 días post-irradiación en parámetros hematológicos (ratas control suplementadas con quercetina (CQ) o no (CS)) (ratas irradiadas suplementadas (RQ) o no (RS) con quercetina) (* $p < 0,05$ respecto a CS).

irradiación, salvo que en este caso no se apreció ningún efecto de la administración de quercetina en el experimento tardío (Figura 1).

El número de glóbulos rojos disminuyó tanto a los siete como a los 30 días post-irradiación y no se apreció recuperación en relación a la suplementación con quercetina (figura 1). Sin embargo, se obtuvo un descenso del hematócrito a los siete días post-irradiación con una recuperación a los 30 días post-irradiación, sin efectos producidos por la quercetina (figura 1).

En la RM no se observó evidencia de gliosis, edema, ni hemorragias durante las dos primeras semanas. El único cambio objetivado fue un aumento de señal en secuencias T1 de las vértebras como consecuencia de la radiación de la médula ósea. No vimos diferencias significativas entre los

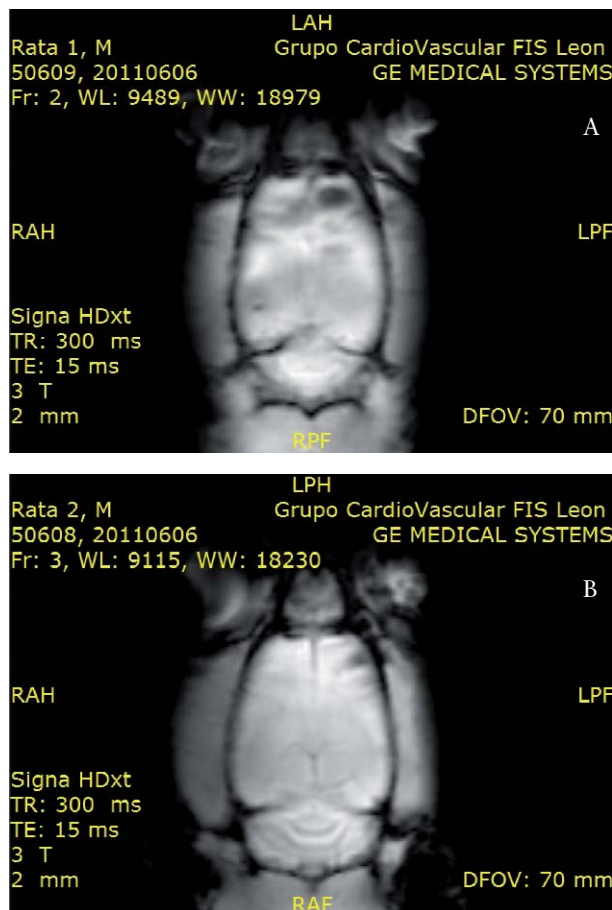


Fig. 2. a) Secuencia T2* eco de gradiente en plano coronal en una rata irradiada 15 días antes con 6 Gy de rayos X, sin suplementación con quercetina, en la que se aprecia un foco puntiforme aislado de baja señal localizado en hemisferio cerebral derecho que podría corresponder con un microsangrado aislado. b) Secuencia T2* eco de gradiente en plano coronal en una rata irradiada 15 días antes con 6 Gy de rayos X suplementada con quercetina; no se observan microsangrados.

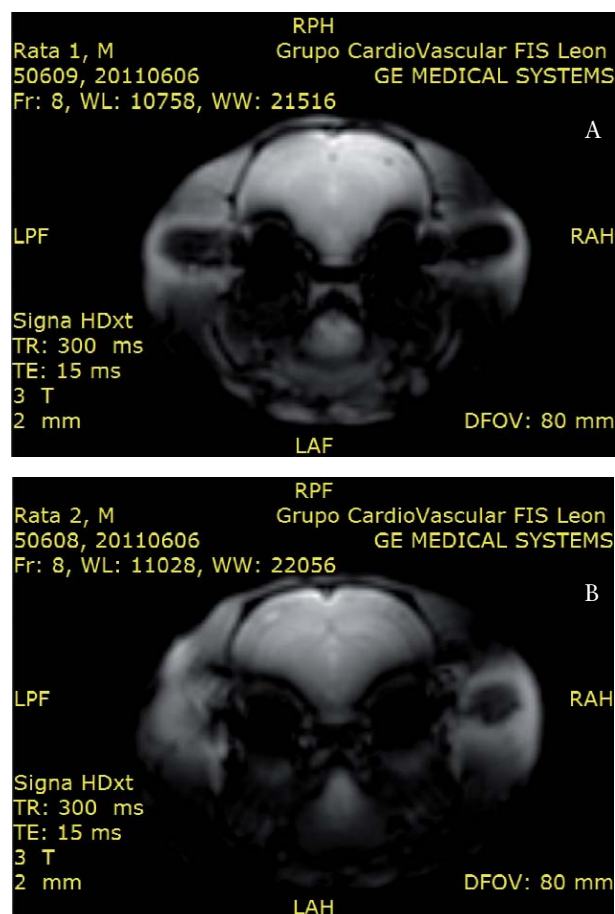


Fig. 3. a) Secuencia T2* eco de gradiente, plano axial en una rata irradiada 15 días antes con 6 Gy de rayos X, sin suplementación con quercetina, que muestra un foco puntiforme aislado de baja señal en hemisferio cerebeloso izquierdo sugestivo de microsangrado aislado. b) Secuencia T2* eco de gradiente, plano axial, en una rata irradiada con 6 Gy de rayos X suplementada con quercetina.

dos grupos de ratas irradiadas. En las RM realizadas a los 15 días y al mes se distinguió algún foco aislado puntiforme de microhemorragias, identificados en secuencia T2*EG, quizá algo más llamativos en la ratas irradiadas sin quercetina (Figura 2) (Figura 3).

El examen histológico de las muestras de ratas irradiadas sin suplementación con quercetina reveló alteraciones significativas en los tejidos estudiados. En la médula ósea se observó, a los siete días post-irradiación, una disminución de células precursoras tanto de la serie roja como de la blanca, alteraciones menos evidentes a los 30 días post-irradiación. Los animales tratados con quercetina no revertieron la alteración (Figura 4).

Las alteraciones de la médula espinal estuvieron relacionadas con una ligera espongirosis a los siete días post-irradiación, tanto en los animales control como en los tratados. A los 30 días post-irradiación el grupo control

presentó hemorragias en meninges, espacio endimario, sustancia gris y blanca, no siendo tan evidentes en los animales tratados (Figura 5). En el hipocampo se observó, a los siete días post-irradiación, un infiltrado focal de células mononucleadas en meninges, y a los 30 días se registró edema perivascular (Figura 6). Estos efectos no se apreciaron en los animales irradiados suplementados con quercetina. Respecto al neocórtex, los animales irradiados presentaron ligera disminución neuronal y gliosis, efectos que también se aprecian en los animales tratados.

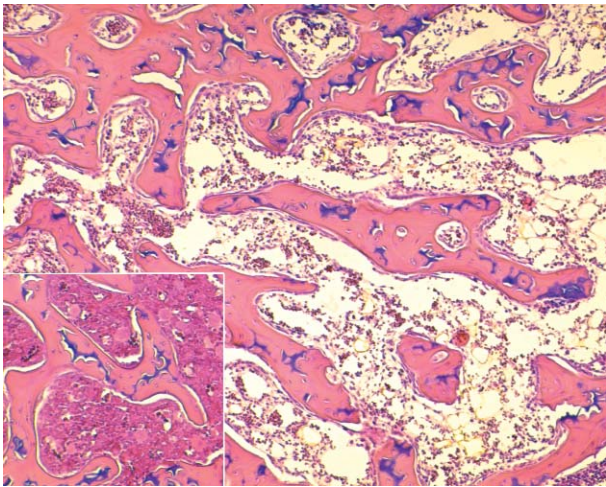


Fig. 4. Sección transversal de médula ósea cervical de rata irradiada, suplementada con quercetina, sacrificada a los siete días post-irradiación. Puede apreciarse una clara disminución del número de células hematopoyéticas en relación a las ratas no irradiadas (ángulo inferior izquierdo) (Hematoxilina-eosina. 20X).

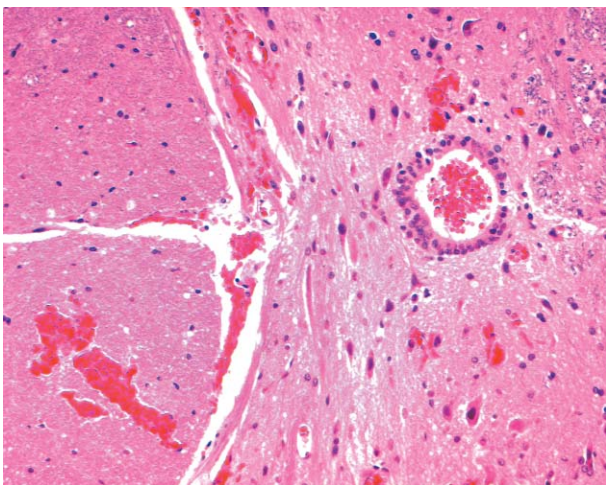


Fig. 5. Sección transversal de médula espinal de una rata irradiada no suplementada con quercetina y sacrificada a los 30 días post-irradiación. Hemorragias en el espacio endimario, sustancia gris y sustancia blanca (Hematoxilina-eosina. 42X).

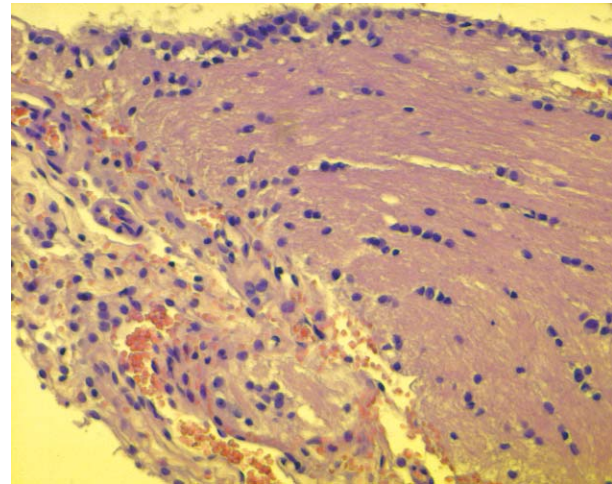


Fig. 6. Sección del hipocampo de una rata irradiada no suplementada con quercetina y sacrificada a los 30 días post-irradiación. Puede apreciarse infiltración de células mononucleadas por alteración neurovascular (Hematoxilina-eosina. 50,1X).

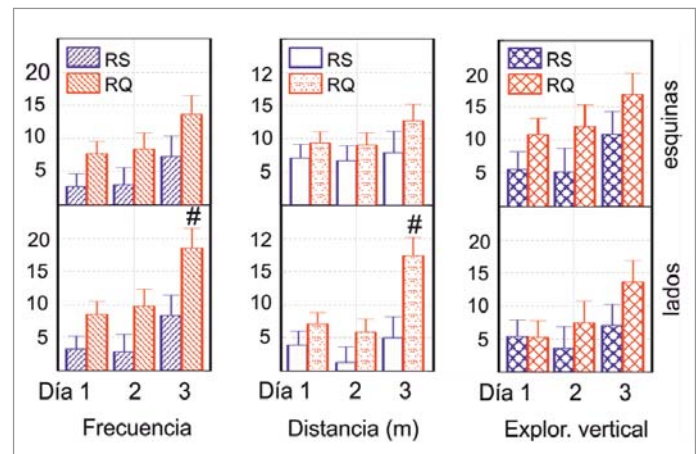


Fig. 7. Comportamiento exploratorio de las ratas irradiadas durante el primer, segundo y tercer días post-irradiación (valores medios \pm E.E.M) (RS: Ratas irradiadas no suplementadas; RQ: Ratas irradiadas suplementadas con quercetina. N=8. # $p < 0,05$ respecto a RS).

Los resultados del análisis comportamental demostraron un efecto de la radiación en la disminución de la actividad de los animales, tanto en la frecuencia de acceso a las diferentes zonas como en la distancia recorrida y la frecuencia de exploración vertical. La administración de quercetina mejoró los parámetros comportamentales en las ratas irradiadas, aumentando de forma significativa en el día 3 post-irradiación la frecuencia de acceso y la distancia recorrida a lo largo de los lados del *open field* (Figura 7). Considerando los valores medios de los parámetros comportamentales registrados antes y después de la irradiación experimental (Tabla 2) (Figura 8), se apreció un efecto positivo de la quercetina, mitigando

Tabla 2. Parámetros comportamentales

Radiación	Zona	Grupo	Frecuencia de acceso	EEM	Distancia (cm)	EEM	Exploración vertical	EEM
Pre-	esquinas	CS	13,4	1,5	855,0	59,6	27,4	2,7
Pre-	esquinas	CQ	18,4	1,5	1000,6	58,2	33,0	3,7
Pre-	esquinas	RS	14,6	1,7	857,5	70,9	25,0	2,6
Pre-	esquinas	RQ	16,9	1,7	935,5	69,6	31,3	3,0
Pre-	lados	CS	14,3	1,7	800,8	93,7	12,6	1,6
Pre-	lados	CQ	19,5	1,7	1230,4	103,2	18,8	2,0
Pre-	lados	RS	15,6	1,9	916,4	111,0	13,8	1,7
Pre-	lados	RQ	18,3	1,9	1024,3	109,5	17,9	2,1
Post-	esquinas	CS	12,9	2,4	691,6	87,8	20,0	3,5
Post-	esquinas	CQ	10,7	1,8	640,4	73,7	19,0	3,4
Post-	esquinas	RS	5,6 *	1,2	442,4 *	60,3	10,3 *	2,1
Post-	esquinas	RQ	9,9 #	1,6	582,2 #	62,5	15,9 #	2,5
Post-	lados	CS	14,6	2,9	764,0	150,0	13,6	3,1
Post-	lados	CQ	12,6	2,4	668,1	113,4	12,0	2,7
Post-	lados	RS	7,7 *	1,9	387,6 *	85,0	6,7 *	1,9
Post-	lados	RQ	10,9	1,9	610,1 #	106,1	10,5	2,1

(EEM = error estándar de la media; sesiones de registro en 'open field' efectuadas durante los cuatro días previos (Pre) y los tres días siguientes (Post) a la irradiación experimental. Ratas control suplementadas (CQ) o no (CS) con quercetina, y ratas irradiadas suplementadas (RQ) o no (RS) con quercetina. N=8. * $p < 0,05$ respecto a CS. # $p < 0,05$ respecto a RS.

la reducción en frecuencia de acceso, distancia recorrida y frecuencia de exploración vertical en las esquinas del *open field*. Sin embargo, no se apreciaron modificaciones debidas a la quercetina en las observaciones realizadas entre los 14 y

los 29 días post-irradiación. Demostramos una disminución de actividad también en los animales control en el día 1, un efecto relacionado con la anestesia por pentobarbital que sufrieron todos los animales (Figura 8).

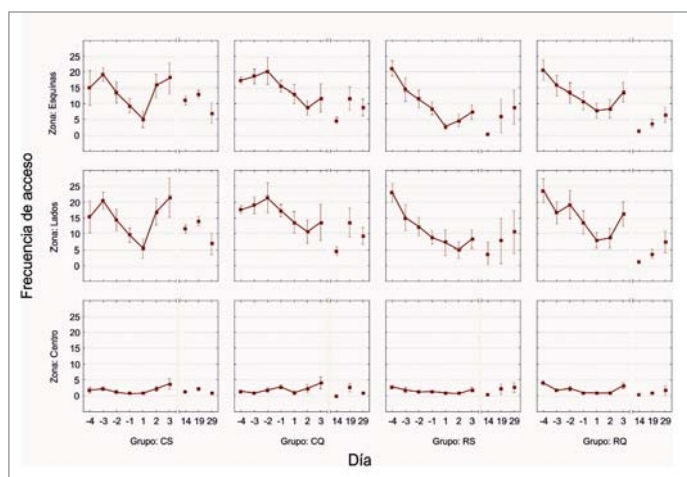


Fig. 8. Frecuencia de acceso a las diferentes zonas del *open field* en registros obtenidos durante los cuatro días previos a la irradiación (días -4 a -1), los tres días siguientes a la irradiación (días 1, 2, 3, efecto temprano) y los días 14, 19 y 29 post-irradiación (efecto tardío) en ratas control suplementadas (CQ) o no (CS) con quercetina y en ratas irradiadas suplementadas (RQ) o no (RS) con quercetina. Valores medios \pm E.E.M. de ocho animales por grupo.

Discusión

Nuestros resultados muestran un descenso significativo en el recuento eritrocitario tanto a los siete como a los 30 días post-irradiación, sin efectos de la suplementación con quercetina. No obstante, el valor hematocrito y la concentración de hemoglobina (no mostrada) se recuperan hacia valores normales a los 30 días en todos los animales irradiados. Este aumento del valor hematocrito y de la concentración de hemoglobina en el experimento tardío es consistente con la aparición de una gran proporción de células sanguíneas inmaduras tras la irradiación [17-19], de mayor tamaño que los eritrocitos. En este sentido, el recuento eritrocitario en animales irradiados a 30 días mostró la existencia de dos picos poblacionales, correspondientes a eritrocitos y a células inmaduras (reticulocitos), mientras que solo aparecía un pico de eritrocitos en los resultados correspondientes al experimento temprano. El conjunto de células inmaduras no se tiene en cuenta para el recuento eritrocitario, pero sí interviene en la obtención del valor hematocrito y de la concentración de hemoglobina.

Resultados previos realizados en nuestro laboratorio [20] indicaron la ausencia de cambios significativos en el recuento eritrocitario, hematócrito y concentración de hemoglobina durante los primeros dos días post-irradiación, mientras que a los 16 días se producía un descenso significativo (cerca de un 50%) en el recuento eritrocitario. Nuestras observaciones indican un descenso próximo al 20% en este parámetro a los siete y 30 días post-irradiación. En el mismo estudio, el valor hematócrito alcanzó un 60% del valor control a los 16 días post-irradiación, mientras que en el presente trabajo hemos encontrado una normalización del hematócrito a los 30 días post-irradiación. Todo ello está de acuerdo con la progresiva estimulación de la actividad eritropoyética de la médula ósea tras la irradiación apreciada por otros autores [19].

No puede hablarse de un efecto positivo de la quercetina sobre la recuperación de parámetros correspondientes a la serie roja, al igual que tampoco se observó este efecto en estudios previos realizados utilizando mosto de uva tinta, en cuya composición participa la quercetina como antioxidante [20]. No obstante, la suplementación con quercetina parece incrementar el recuento leucocitario a los 30 días post-irradiación.

Una de las características del daño inducido por la radiación ionizante al sistema nervioso central es su aparición tras largos intervalos de latencia desde la aplicación de la radiación. Aparece radionecrosis en muchas especies, entre ellas el hombre, en cerebro y médula espinal después de transcurridos entre cuatro y seis meses [21]. Sin embargo, existen daños histológicos aparentes tras tiempos mucho más cortos. El signo más temprano de daño celular consiste en el ensanchamiento nodal y desmielinización que aparece a las dos semanas tras dosis desde 5 Gy [22]. Esta expresión temprana de daño neural aparece reflejada en el grupo de ratas tratadas a los siete días de irradiación en forma de gliosis en el neocórtex. Se acepta actualmente que existen daños vasculares de aparición temprana tras la irradiación, atribuibles a la alteración de la barrera hematoencefálica como resultado de apoptosis endotelial [23] o neuroinflamación [24]. Nuestros resultados muestran estos efectos en ratas tras 30 días de irradiación en médula espinal e hipocampo, y en menor grado a los siete días en hipocampo. No aparecieron alteraciones neurovasculares notables en los animales irradiados suplementados con quercetina. Estos resultados histopatológicos presentan cierta correlación con los hallazgos de resonancia magnética, pero hay que resaltar que la tecnología de imagen empleada (T2) parece subestimar la magnitud de las lesiones histológicas [25], existiendo hoy día técnicas de imagen basadas en difusión de tensor (DTI) que permiten el estudio a escala microscópica de la estructura tisular y sus cambios [26].

Los experimentos en el *open field* comprueban los efectos comportamentales de los entornos no familiares, midiendo la actividad emocional del animal [26]. Los animales que presentan niveles de actividad bajos en este nuevo entorno se consideran más alterados que los animales con el comportamiento contrario [27][28]. Además, elevados niveles de actividad implican aumento de la exploración, mientras que su disminución indica habituación [29]. La prueba de «open field» permite además evaluar el grado de ansiedad de los animales, midiendo la relación entre la distancia recorrida por el animal mientras éste se mantiene en el centro del *open field* y la distancia total recorrida durante toda la sesión de registro [30]. En este sentido, nuestras observaciones no permiten apreciar efectos ansiolíticos en los animales tratados con quercetina, ya que mantuvieron una muy baja frecuencia de accesos al centro del *open field* en todos los casos, aunque cabe señalar que la irradiación provoca una disminución en la distancia recorrida por los animales en las esquinas, al igual que la frecuencia de exploración vertical, y estos dos parámetros aumentan hacia valores normales en el grupo de animales irradiados suplementados con quercetina. Además, la quercetina parece incrementar la respuesta de los animales radiados a corto plazo, como demuestran los aumentos de frecuencia de cambio de zona, de actividad locomotora en los lados del *open field* y el aumento de frecuencia de exploración vertical. A más largo plazo, los efectos de la radiación subletal con rayos X parecen mitigarse, sin que aparezcan diferencias significativas de comportamiento entre los grupos experimentales en pruebas efectuadas a los 14, 19 y 29 días post-irradiación. Debe también señalarse el efecto negativo de la anestesia inducida mediante pentobarbital sobre las pruebas comportamentales realizadas al día siguiente. Podría argumentarse que el supuesto efecto de la radiación estaría mediado asimismo por la anestesia practicada a los animales, tanto de los grupos control como de los grupos irradiados, pero no obstante la disminución de actividad continúa en los animales RS durante los siguientes días, mientras que mejora en los animales irradiados suplementados con quercetina. La administración de quercetina en los animales del grupo CQ parece prevenir este descenso de parámetros comportamentales.

Podemos señalar, a pesar de las limitaciones impuestas por la gran variabilidad individual inherente a todos los estudios comportamentales, que la quercetina estimula la vuelta a la normalidad comportamental de los animales, en un efecto temprano tras la radiación experimental con 6 Gy de rayos X, posiblemente como consecuencia de un menor daño neurovascular del tejido nervioso. Estas observaciones, unidas a la disminución de la pérdida de peso a los dos y cinco días en las ratas irradiadas o a la disminución del

aumento en células sanguíneas inmaduras tras la irradiación, permiten sugerir una posible utilización preventiva de quercetina para mejorar los síntomas que pueden aparecer a corto plazo tras las sesiones de radioterapia. ■

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. Teresa Ribas Ariño (Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de León), por su inestimable ayuda en la identificación histológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed RG. Damage pattern as function of various types of radiations. *Med J of Islamic World Acad of Sci* 2005; 15:135-47.
2. Hall EJ, Giaccia AJ. Clinical Response to Normal Tissues. En: *Radiobiology for the Radiologist*, 6th ed, 2006; p.349.
3. Walker RI, Cerveny RJ. *Medical Consequences of Nuclear Warfare*. Falls Church, VA: Office of the Surgeon General; 1989.
4. Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL, Dickerson WE, *et al*. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Ann Int Med* 2004; 140:1037-51.
5. Tsao MN, Lloyd NS, Wong RK, Rakovitch E, Chow E, Laperriere N. Radiotherapeutic management of brain metastases: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2005; 31:256-73.
6. Kantor G, Laprie A, Huchet A, Loiseau H, Dejean C, Mazeron JJ. Radiation therapy for glial tumors: technical aspects and clinical indications. *Cancer Radiother* 2008; 12:687-94.
7. Lengyel Z, Rékó G, Matjtényi K, Pisch J, Csornai M, Lesznayák Trón L, *et al*. Autopsy verifies demyelination and lack of vascular damage in partially reversible radiation myelopathy. *Spinal Cord* 2003; 41:577-85.
8. Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, *et al*. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat Res* 2004; 162:39-47.
9. Wong CS, Van der Kogel AJ. Mechanisms of radiation injury to the central nervous system: implications for neuroprotection. *Mol Interv* 2004; 4:273-84.
10. Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, Van den Berg SR, Morhardt DR, *et al*. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* 2004; 188:316-30.
11. Nair CK, Parida DK, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)* 2001; 42:21-37.
12. Lehnert S (ed.) *Biomolecular action of ionizing radiation*. New York: Taylor & Francis; 2007.
13. Mccumber LM. The potential influence of cell protectors for dose escalation in cancer therapy: An analysis of amifostine. *Med Dosim* 2004; 29:139-43.
14. González P, Andrade ER, Soares FA, Marina R, Barrio JP. Flavonoides como radioprotectores: Evidencias y mecanismos de acción. *Fisiología. Boletín informativo de la SECF* 2011; 13:11-7.
15. Andrade ER, Cruz IB, Andrade VV, Piccoli JC, González-Gallego J, Barrio JP, *et al*. Evaluation of the potential protective effects of ad libitum black grape juice against liver oxidative damage in whole-body acute X-irradiated rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:1026-32.
16. Tuñón MJ, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Gallego J. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: Modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr Drug Metab* 2009; 10:256-71.
17. Vatine JJ, Ratner A, Rosem D, Seltzer, Z. Differential sensory-motor effects of pentobarbital in intact rats genetically selected for high vs. low neuropathic pain-related behaviour. *Pain* 1998; 75:295-303.
18. Chaudhuri JP, Messerschmidt O. Amount of peripheral reticulocytes as biologic dosimetry of ionizing radiation. *Acta Radiol Oncol* 1982; 21:177-9.
19. Tanke HJ, Van Vianen PH, Emiliani FM, Neuteboom I, de Vogel N, Tates AD, *et al*. Changes in erythropoiesis due to radiation or chemotherapy as studied by flow cytometric determination of peripheral blood reticulocytes. *Histochem* 1986; 84:544-8.
20. Ramos de Andrade E, Da Costa Escobar Piccoli J, Mânica da Cruz IB, Teixeira Rocha JB, Garzo E, Marina R, *et al*. Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X irradiation in rats. *Nutr Hosp* 2009; 24:297-303.
21. Van der Kogel AJ. Radiation-induced damage in the central nervous system: An interpretation of target cell responses. *Br J Cancer* 1986; 53(Suppl VII):207-17.
22. Mastaglia FL, McDonald WI, Watson JV, Yogendran K. Effects of X-radiation on the spinal cord: An experimental study of the morphological changes in central nerve fibres. *Brain* 1976; 99:101-22.
23. Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, Reilly RM, Wong CS. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 2003; 63:5950-6.

24. Moore AH, Olschowka JA, Williams JP, Paige SL, O'Banion MK. Radiation-induced edema is dependent on cyclooxygenase 2 activity in mouse brain. *Radiat Res* 2004; 161:153-60.
25. Trivedi R, Khan AR, Rana P, Haridas S, Hemanth Kumar BS, Manda K *et al.* Radiation-induced early changes in the brain and behavior: Serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation. *J Neurosci Res* 2012; doi: 10.1002/jnr.23073.
26. Hall CS. Temperament: a survey of animal studies. *Psychol Bull* 1941; 38:909-43.
27. Walsh RN, Cummins RA. The Open Field test: A critical review. *Psychol Bull* 1976; 83:482-504.
28. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973; 21:205-35.
29. Van De Weerd HA. Environmental enrichment for laboratory mice: preferences and consequences [tesis doctoral], Utrecht, University of Utrecht; 1996.
30. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463:3-33.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.