

ÍNDICE GENERAL**Capítulo 1**

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.	Preámbulo.....	3
1.2.	Objetivos.....	6
1.3.	Organización de la tesis.....	7

Capítulo 2

2.	ESTADO DEL ARTE.....	11
2.1.	Las radiaciones ionizantes.....	11
2.2.	Interacción de la radiación con la materia.....	12
2.3.	Daños en el ADN.....	15
2.4.	Reparación del daño radioinducido.....	16
2.5.	Las alteraciones cromosómicas.....	18
	2.5.1 <i>Inducción de alteraciones cromosómicas por las radiaciones ionizantes.....</i>	18
	2.5.2 <i>Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales.....</i>	20
	2.5.3 <i>Técnica de tinción cromosómica.....</i>	26
2.6.	Interacción con otros componentes celulares.....	28
2.7.	Dosimetría biológica.....	29
2.8.	Propóleos.....	32
	2.8.1 <i>Radioprotectores.....</i>	32
	2.8.2 <i>Origen y Composición del propóleos.....</i>	33
	2.8.3 <i>Efecto radioprotector del propóleos.....</i>	36

Capítulo 3

3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
3.1.	Elaboración de una curva de calibración dosis – respuesta.....	45
	3.1.1. <i>Obtención de la muestra.....</i>	45
	3.1.2. <i>Consideraciones Físicas.....</i>	46
	3.1.3. <i>Condiciones de Cultivo.....</i>	48
	3.1.4. <i>Análisis Citogenético.....</i>	52
	3.1.5. <i>Análisis estadístico.....</i>	52
3.2.	Extracto etanólico de propóleos (EEP). Extracción, evaluación de los extractos.....	55
3.3.	Determinación del índice mitótico e índice de proliferación celular.....	58
3.4.	Estudio citogenético del efecto radioprotector del extracto etanólico de propóleos.....	62

3.4.1. <i>Evaluación inicial del efecto radioprotector.</i>	62
3.4.2. <i>Influencia de la concentración del EEP.</i>	63
3.4.3. <i>Influencia de la dosis en el EEP.</i>	63

Capítulo 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
4.1. Elaboración de una curva de calibración dosis – respuesta.	67
4.2. Influencia de la variación de la concentración del EEP a una misma dosis y cálculo de la fracción máxima protegida.	79
4.2.1. <i>Evaluación inicial del efecto radioprotector del EEP.</i>	79
4.2.2. <i>Evaluación de la influencia de la concentración del EEP.</i>	83
4.3. Evaluación del efecto radioprotector del EEP a distintas dosis de radiación.	93
4.4. Índice mitótico e índice de proliferación celular	104

Capítulo 5

5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS.	113
5.1. Conclusiones.....	113
5.2. Líneas futuras de Investigación	116
5.3. Publicaciones y contribuciones.....	117

Capítulo 6

6. BIBLIOGRAFÍA	125
-----------------------	-----

ÍNDICE DE TABLAS**Capítulo 2**

Tabla 2.1: Composición, características y observaciones del propóleo.....	36
---	----

Capítulo 3

Tabla 3.1: Dosis absorbidas suministradas, tiempos de exposición por cada haz.....	48
--	----

Tabla 3.2: Preparados de propóleo partiendo de las cápsulas de extracto puro en polvo utilizando como solvente el metanol y el agua	56
---	----

Tabla 3.3: Preparados de propóleo partiendo de las cápsulas de extracto puro en polvo utilizando como solvente el etanol al 95%....	56
---	----

Tabla 3.4: Irradiaciones preliminares a 2 y 5 Gy y distintas concentraciones de propóleo y etanol al 95%.	62
---	----

Capítulo 4

Tabla 4.1: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes dosis de rayos γ (N: número de células; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace, acéntricos; Otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb, rotura de cromátidas, incluyendo radiales; Gaps de cromosoma y cromátida; NA: número total de alteraciones).....	67
--	----

Tabla 4.2: Para cada dosis (Gy), número de células analizadas (N), frecuencia por célula de dicéntricos (Dic), frecuencia por célula de dicéntricos más anillos (Dic + Ani), frecuencia por célula de	
---	--

acéntricos (Ace), número de alteraciones totales (NA) y su correspondiente error (SE).....	70
Tabla 4.3: Para cada dosis (Gy), distribución de dicéntricos (Dic) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).....	71
Tabla 4.4: Para cada dosis (Gy), distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).	72
Tabla 4.5: Para cada dosis (Gy), distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).....	73
Tabla 4.6: Valores de los coeficientes C, α y β de la función $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, y su error estándar de la curva dosis - efecto para dicéntricos.....	75
Tabla 4.7: Calidad de radiación, coeficientes y valor de α/β para distintas curvas de calibración en la bibliografía.....	76
Tabla 4.8: Frecuencias de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula sin irradiar y tras las irradiaciones preliminares a 2 y 5 Gy. Irradiaciones llevadas a cabo en ausencia de EEP o distintas concentraciones de EEP y etanol al 95% (N: número de células analizadas y N° alt: número de alteraciones totales).....	82
Tabla 4.9: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes concentraciones de EEP y a una dosis de rayos gamma de 2 Gy (N: número total de células; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace,	

acéntricos; Otr: otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb: rotura de cromátidas incluyendo radiales; Gaps de cromosoma y cromátida; NA: número de alteraciones totales).84

Tabla 4.10: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de dicéntricos (Dic) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).84

Tabla 4.11: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U). ..85

Tabla 4.12: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).85

Tabla 4.13: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, número de células analizadas (N), frecuencia (\pm error estándar) por célula de dicéntricos (Dic), frecuencia (\pm error estándar) por célula de dicéntricos más anillos (Dic + Ani), frecuencia (\pm error estándar) por célula de acéntricos (Ace) y número de alteraciones totales (NA).88

Tabla 4.14: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes dosis de rayos γ y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (N: células analizadas; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace, acéntricos; Otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb, rotura de cromátidas; NA: número de alteraciones totales).93

Tabla 4.15: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, distribución de dicéntricos (Dic) por célula

(Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).94

Tabla 4.16: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).95

Tabla 4.17: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).95

Tabla 4.18: Frecuencias de dicéntricos, dicéntricos más anillos, acéntricos y número de alteraciones totales (NA) por célula, para las muestras control y las muestras a una concentración de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, irradiadas a 0.25, 0.5, 1, 2 y 5 Gy.96

Tabla 4.19: Valores de los coeficientes C, α y β de la función $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, y su error estándar de las curvas dosis – efecto para dicéntricos y dicéntricos más anillos tratadas con EEP.98

Tabla 4.20: Índice de proliferación celular y su correspondiente error ($\pm\text{SE}$) para distintas concentraciones de EEP (N: células analizadas; M1: metafase en primera división celular; M2: metafase en segunda división celular; M3: metafase en tercera división celular).....105

Tabla 4.21: Índice mitótico y porcentaje de inhibición, a distintas concentraciones de EEP (N: células analizadas; Núc.: núcleos; Meta.: metafases; IM: índice mitótico).....107

ÍNDICE DE FIGURAS**Capítulo 2**

Figura 2.1: Metafase con un fragmento acéntrico.	20
Figura 2.2: Metafase con una rotura de cromosoma.	21
Figura 2.3: Metafase con un intercambio asimétrico tipo dicéntrico con su correspondiente acéntrico.	22
Figura 2.4: Metafase con un intercambio simétrico.....	22
Figura 2.5: Metafase con un intercambio asimétrico tipo inserción.	23
Figura 2.6: Metafase con un intercambio asimétrico tipo anillo.	23
Figura 2.7: Metafase con un “gap” de cromosoma.....	24
Figura 2.8: Metafase con un “gap” de cromátida.	25
Figura 2.9: Metafase con una rotura de cromátida.....	25
Figura 2.10: La figura muestra dos imágenes, la imagen a) muestra una metafase con un tetra-radial y la imagen b) una metafase con un tri-radial.....	26
Figura 2.11: Metafase normal en segunda división mitótica.....	27
Figura 2.12: Esquema que muestra el fundamento de la técnica Fluorescente Plus Giemsa. B= 5´bromo 2´deoxiuridina. T=timidina.	

A=adenina. C=citosina. G=guanina (Barquinero *et al.*, 1991).28

Figura 2.13: Propóleos y Abeja (del género *Apis*).34

Capítulo 3

Figura 3.1: Obtención de la muestra.....46

Figura 3.2: Equipo de irradiación, THERATRON PHOENIX.46

Figura 3.3: Cubeta de irradiación.47

Figura 3.4: Extracción del cultivo; Choque hipotónico.50

Figura 3.5: Extracción del cultivo; Lavados con Carnoy.51

Figura 3.6: Secuencia de pasos de la técnica de tinción *Fluorescente Plus*51

Figura 3.7: Fotografía que muestra tres núcleos (flecha rosa) y una metafase (flecha verde) en un total de cuatro células.58

Figura 3.8: Metafases en primera (a), segunda (b) y tercera (c) división61

Capítulo 4

Figura 4.1: Metafase en primera división mitótica con un gap de cromosoma.....68

Figura 4.2: Metafase en primera división mitótica con un cromosoma dicéntrico y su correspondiente acéntrico.....68

Figura 4.3: Curva de Calibración dosis –efecto para rayos γ (dic: dicéntricos, cel: célula, obs: observado, esp: esperado y SE: error estándar).....	78
Figura 4.4: Gráfica que representa la frecuencia de dicéntricos por célula a la dosis de 2 Gy y distintas concentraciones de EEP.....	89
Figura 4.5: Gráfica que representa la frecuencia de dicéntricos más anillos por célula a la dosis de 2 Gy y distintas concentraciones de EEP.....	90
Figura 4.6: Curvas dosis – efecto para rayos gamma con EEP (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y sin EEP de las frecuencias observadas y esperadas de dicéntricos, su correspondiente error y los límites al 95%.	100
Figura 4.7: Curvas dosis – efecto para rayos gamma con EEP (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y sin EEP, de las frecuencias observadas y esperadas de dicéntricos más anillos, su correspondiente error y los límites al 95%	101
Figura 4.8: Índice de proliferación celular (IP) a distintas concentraciones de EEP sin irradiar.	106
Figura 4.9: Índice mitótico de las distintas concentraciones de EEP sin irradiar.	108
Figura 4.10: Correlación entre el índice de proliferación y la inhibición del índice mitótico, a distintas concentraciones de EEP, sin irradiar.	110