

Impacto da Radioterapia no *stress* oxidativo em modelos celulares radiorresistentes em contexto de obesidade



ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Impacto da Radioterapia no *stress* oxidativo em modelos celulares radiorresistentes em contexto de obesidade

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, ramo de Bioquímica Clínica e Metabólica realizada sob a orientação do Professor Doutor Rúben Fernandes, da Professora Isabel Maria Faria e da Mestre Joana Almeida.

Outubro, 2014

Impacto da Radioterapia no *stress* oxidativo em modelos celulares radorresistentes em contexto de
obesidade

Impacto da Radioterapia no *stress* oxidativo em modelos celulares radiorresistentes em contexto de
obesidade

À minha Mãe, à minha família, aos meus amigos
e a ti que partiste cedo de mais e que sempre acreditaste em mim!

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Ruben Fernandes, Especialista Isabel Faria e à Mestre Joana Almeida pela sua orientação admirável, pelo apoio, entusiasmo, críticas e sugestões e por todo o tempo que cederam para à concretização deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Coelho e ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina do Porto, pela espetacular ajuda, esforço, paciência, críticas e sugestões construtivas, positivismo, preciosos conhecimentos e entusiasmo com que me ajudou neste estudo desde a primeira hora, louvando e admirando todo o trabalho que foi desenvolvido da sua parte.

À Professora Doutora Mónica Vieira, pela cooperação, ajuda, sugestões, ensinamentos, apoio e simpatia que em muito ajudaram na realização deste estudo.

À Dr.^a Armanda Monteiro e a todo o Serviço de Radioterapia do Centro Hospital de S. João, por todo o apoio prestado na concretização deste estudo, pela disponibilidade e espírito de ajuda que sempre revelou.

À Professora Doutora Isabel Bravo, pela cooperação e apoio na concretização deste estudo.

À minha família, em especial à minha Mãe, pelo suporte familiar, ajuda, compreensão em todos os momentos de ausência familiar e incentivo que sempre revelaram ao longo de todo o meu percurso académico.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial à Larissa Batista, Liliana Correia, Marta Louçano, Paula de Brito, Patrick Pais, mas também à Nutricionista Rita Ferreira e à Audiologista Natália Oliveira pela paciência, apoio, espírito de entreaajuda, suporte e boa disposição que sempre revelaram ao longo de todo o meu percurso académico e ao longo da concretização deste estudo.

A todos os meus grandes amigos de Guimarães, pelo companheirismo, força, paciência e sobretudo ânimo que sempre me deram, quer ao longo do meu percurso académico quer ao longo da vida.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste projeto, os meus profundos e sinceros agradecimentos.

Resumo

Introdução: Estudos anteriores em modelos tumorais de glioma e melanoma, tumores radorresistentes, indicaram que a obesidade pode estar relacionada com um aumento do *status* oxidativo e com a diminuição da resistência à radiação. Como a Radioterapia é o tratamento frequentemente utilizado para esta patologia, propomo-nos, desta forma, a explorar a influência da obesidade em células de glioma, as BC3H1, e melanoma, B16F10, submetidas a Radioterapia, na presença de agentes oxidantes e antioxidantes, para o estudo da sua influência ao nível da viabilidade celular e do impacto do *stress* oxidativo.

Métodos: As células BC3H1 e B16F10 foram tratadas com t-BOOH (150µM e 50 µM, respetivamente), TUDCA (25µM e 1µM, respetivamente) e com a mistura de t-BOOH+TUDCA em meio DMEM sem soro e meio condicionado (CM), a partir de adipócitos 3T3-L1. Em seguida, parte das células foram irradiadas com uma dose total de 2Gy. Posteriormente avaliou-se a viabilidade celular (teste MTT) e o *stress* oxidativo (teste TBARS, atividade da catalase, concentração da GSH, e status antioxidante total), às 4h e 12h.

Resultados: Observou-se um aumento da capacidade antioxidante total das células irradiadas, comparativamente com as células não irradiadas. O meio condicionado reduziu o *stress* oxidativo nas BC3H1, ao mesmo tempo que reduziu a sua viabilidade celular. O TUDCA nas células incubadas com MC e submetidas a radioterapia, tendencialmente diminuiu a viabilidade celular, nas concentrações em estudo.

Discussão/Conclusão: O meio condicionado e a radioterapia, por si só, aumentam a resposta antioxidante total na célula, às 4h e às 12h. O TUDCA nas células incubadas com meio condicionado e submetidas a radioterapia, teve um comportamento citotóxico para as BC3H1, nas concentrações testadas. Revelando a necessidade de aprofundar os estudos da ação deste composto como agente radiosensibilizador, neste e noutros modelos celulares de carcinogénese.

Palavras-chave: *Stress* oxidativo; Radioterapia; Obesidade; Glioma; Melanoma

Abstract

Introduction: Previous studies, in brain tumor and melanoma, radioresistant tumors, indicated that obesity may be related with a decreased of resistance to radiation and increased redox status. Since Radiotherapy is the most commonly treatment used in this type of tumor, we propose to explore the influence of the obesity in radiated glioma cells, the BC3H1, and melanoma, the B16F10, in the presence of oxidative and antioxidant agents, for the study the influence of them in cells viability and in oxidative stress.

Methods: BC3H1, glioma cells, and B16F10, melanoma cells, were treated with t-BOOH (150 μ M and 50 μ M, respectively), TUDCA (25 μ M and 1 μ M, respectively) and a mix of t-BOOH and TUDCA in serum-free DMEM or conditioned media (CM) from differentiated 3T3-L1 adipocytes. Afterwards the cells were irradiated with a total dose of 2 Gy. Subsequently BC3H1 viability were evaluated (MTT assay) and the oxidative *stress* (TBARS Assay, Catalase Assay, GSH concentration and total antioxidant status) after 4 and 12 hours.

Results: We observed an increase the total antioxidant status in the irradiated cells compared with the non-irradiated cells. The CM reduced the oxidative *stress* in BC3H1, at the same time to decrease the cells viability. The TUDCA in the BC3H1 cells with CM and under irradiation revealed a decrease of cells viability, in the tested concentrations.

Discussion / Conclusion: The 3T3-L1 MC and radiation, *per se*, increase the total antioxidant status in BC3H1, at 4h and 12h after treatment. The TUDCA in the BC3H1 cells with CM under irradiation showed a cytotoxic effect, in the tested concentrations. At this point, we need to deepen the studies to understand the TUDCA's radiosensitizing mechanism of action.

Palavras-chave: Oxidative stress; radiotherapy; obesity; glioma; melanoma

Índice

Resumo.....	V
Abstract	VI
Índice de Abreviaturas	IX
Índice de Figuras.....	XII
Índice de Tabelas	XIII
1. Introdução.....	2
1.1. Radiação e Biologia	2
1.2. <i>Stress</i> Oxidativo.....	9
2. Revisão Bibliográfica.....	13
2.1. Glioma.....	13
2.2. Melanoma.....	16
2.3. Antioxidantes e Radioterapia	18
2.4. Obesidade, Cancro e Radioterapia.....	24
2.5. Objetivos.....	27
3. Material e Métodos	30
3.1. Culturas Celulares.....	30
3.2. Meio Condicionado.....	30
3.3. Tratamentos das culturas celulares	30
3.4. Extração celular e recolha de meios	31
4. Métodos.....	31
4.1. Irradiação Celular	31
4.2. Ensaio MTT (<i>4,5-dimethylthiazol-2-yl</i>)- <i>2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>).....	32
4.3. TBARS (<i>Thiobarbituric Acid-Reactive Substances</i>)	32
4.4. Atividade da catalase	32
4.5. Glutationas: rácio GSH/GSSG	33
4.6. <i>Total Antioxidant Status (TAS)</i>	33

4.7. Análise Estatística.....	34
5. Resultados	36
5.1. Curva de concentração-resposta de t-BOOH e TUDCA nas linhas celulares BC3H1	36
5.2. Efeitos t-BOOH e TUDCA nas linhas celulares BC3H1	38
5.2.1. Viabilidade Celular	38
5.2.2. Avaliação do <i>Stress</i> Oxidativo	39
5.3. Efeito da radiação nas linhas celulares nas diferentes condições	41
5.3.1. Viabilidade Celular	41
5.3.2. Avaliação do <i>stress</i> Oxidativo	42
Figura 8:	43
5.4. Efeito do Compostos nas linhas celulares em estudo com Meio Condicionado ...	44
5.4.1. Viabilidade Celular	45
5.4.2. Avaliação do <i>Stress Oxidativo</i>	45
5.5. Efeito dos tratamentos nas linhas celulares em estudo com Radioterapia e Meio Condicionado	47
5.5.1. Viabilidade Celular	47
5.5.2. Avaliação do <i>stress Oxidativo</i>	49
6. Discussão	52
7. Conclusão	59
8. Perspetivas Futuras	61
9. Referências Bibliográficas	62

Índice de Abreviaturas

8-oxodG: 8-oxo-2'-desoxiguanosina

8-oxoGua: 8-oxoguanina

ALARA: *As Low As Reasonably Achievable*

AP-1: *Activator protein 1*

BED: *Biologically Effective Dose*

BRAF: Proto-oncogene B-Raf

Ca: Carcinoma

CAT: Catalase

CDK2A: *Cyclin-dependent kinase 2*

CDK4: *Cyclin-dependent kinase 4*

CDKN2A: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2*

c-KIT: Proto-oncogene c-Kit

CR: Cirurgia

CTC: *Common Toxicity Criteria*

CTV: *Clinical Target Volume*

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

DNPH : *2,4-dinitrofenilhidrazina*

DRF: Factor de Redução de Dose

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*

FS2: Fração de células que sobrevivem a uma única dose de 2 Gy de irradiação

G2: Gap 2

GPX: Glutathione Peroxidase

GR- Glutathione Redutase

Gy: Gray

H₂O₂: Peroxido de Hidrogénio

HIF-1 α : *Hypoxia-inducible factors-1 α*

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

ICRP: *International Commission on Radiological Protection*

IDH1: *Isocitrate dehydrogenase 1*

IGRT: Radioterapia de Imagem Guiada

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IMC: Índice de Massa Corporal

IMRT: Radioterapia de Intensidade Modelada

LET: Transferência Linear de Energia

LQ: linear quadrático

M: Mitose

MC: Meio Condicionado

MDA: Malonaldeído

mRNA- Ácido Ribonucleico mensageiro;

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato;

NCI: *National Cancer Institute*

NF-Kb: Factor Nuclear kappa B

NO: Oxido Nítrico

N-RAS: Oncogene N-Ras

OER: *Oxygen Enhancement Ratio*

p16INK4: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptors*

PIK3CA: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PIKR1: *Prokineticin Receptor 1*

PPAR-γ: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

QT: Quimioterapia

RB: Radiobiologia

RBE: Eficácia Biológica Relativa

RC: Restrição Calórica

RM: Ressonância Magnética

RORENO: Registo Oncológico do Norte

ROS: Espécies Reativas de Oxigénio

RT: Radioterapia

RTOG: *Radiation Therapy Oncology Group*

SBRT: Radioterapia Corporal Estereotáxica

SNC: Sistema Nervoso Central

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

SOD: Dismutase do Superóxido

TAC: Capacidade Antioxidante Total.

tBOOH: tert-butilhidroperóxido

TC: Tomografia Computorizada (TC),

TCP: *Tumor Control Possibility*

TNF-alfa: Factor de Necrose Tumoral alfa

TNF-β: Factor de necrose tumoral beta

TNM: Classificação de Tumores Malignos

TUDCA: Ácido Tauroursodesoxicólico

WHO: *World Health Organization*

Índice de Figuras

Figura 1: Escala de efeitos de sistemas biológicos expostos à radiação.....	2
Figura 2: Ação direta e indireta da radiação nas células.....	4
Figura 3: Histograma Dose-Volume e Curvas de Isodose.....	32
Figura 4: Curvas de dose-resposta para o t-BOOH e TUDCA.....	37
Figura 5: Viabilidade das linhas BC3H1.....	38
Figura 6: Avaliação do <i>stress</i> Oxidativo nas BC3H1.....	40
Figura 7: Viabilidade das BC3H1 com Radioterapia.....	42
Figura 8: Avaliação do <i>stress</i> oxidativo na linha celular BC3H1, tratada com t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA, submetidas a radioterapia, às 4 e 12h.....	43
Figura 9: Efeito de t-BOOH (150 µM), TUDCA (50 µM) e t-BOOH + TUDCA na viabilidade células BC3H1, após a exposição ao meio condicionado durante 4 e 12horas..	45
Figura 10: Avaliação do <i>stress</i> Oxidativo na linha celular BC3H1, tratada com t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA, e expostas a meio condicionado (MC).....	46
Figura 11: Efeito de t-BOOH (150 µM), TUDCA (50 µM) e t-BOOH + TUDCA na viabilidade da linha celular BC3H1, após a exposição ao meio condicionado durante 4 e 12horas e Radiação.....	48
Figura 12: Avaliação do <i>stress</i> oxidativo na linha celular BC3H1, tratada com t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA, e expostas a radiação e meio condicionado durante 4 e 12h	49

Índice de Tabelas

Tabela I: Fatores que influenciam as interações da radiação com a matéria.....	5
Tabela II: Antioxidantes, <i>Stress</i> Oxidativo e Radioterapia.....	20
Tabela III: Descrição do Método Cromatográfico.....	34

- Introdução -

1. Introdução

Exposições acidentais e as consequentes descrições dos efeitos observados foram os percursos para o estudo dos efeitos biológicos da radiação nos tecidos, levando ao aparecimento da Radiobiologia (Suntharalingam,2010).

1.1. Radiação e Biologia

A radiação eletromagnética é constituída por um amplo espectro de ondas com características distintas, diferenciando-se a radiação não-ionizante da radiação ionizante pela capacidade desta última em emitir partículas, conferindo-lhe energia para alterar/ionizar átomos e moléculas. A radiação ionizante pode se diferenciar ainda em duas categorias: as diretamente ionizantes, que emitem eletrões, protões, as partículas α e os iões pesados; e as indiretamente ionizantes, que têm capacidade de emitir fotões, raios X e raios γ e os neutrões (Joiner, 2009).

Os dois tipos de radiação ionizante podem ser utilizadas para diagnóstico e tratamento clínico, por exemplo, em Radioterapia (RT), a energia produzida nos aceleradores lineares pode variar entre 100 keV e 25MeV (Kisling, 2010).

A irradiação de qualquer sistema biológico desencadeia uma sucessão de processos que se diferenciam vincadamente pela escala temporal em que se desenvolvem, diferenciando-se três fases de acontecimentos: a **fase física**, a **fase química** e a **fase biológica** (Figura 1).

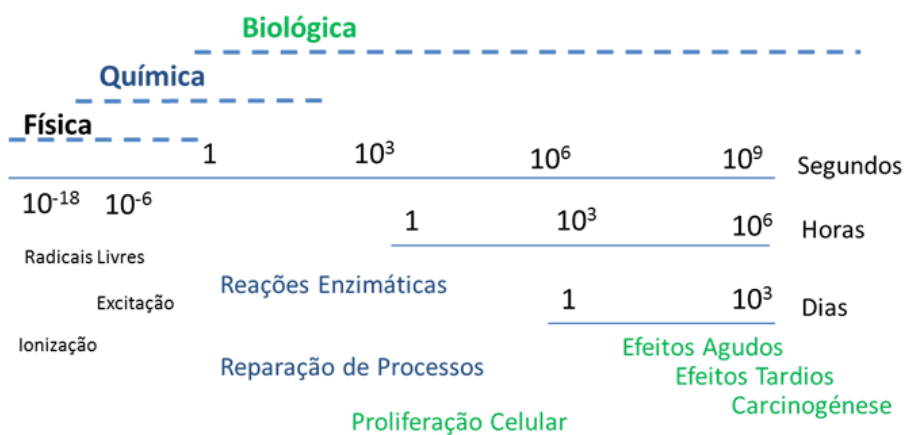


Figura 1: Escala de efeitos ao nível dos sistemas biológicos expostos à radiação. Adaptado de (Joiner, .2009).

Na fase física, observam-se interações entre as partículas carregadas e os átomos que constituem as moléculas do tecido em exposição, o que acontece nos primeiros milésimos de segundo após interação da radiação com a matéria (Joiner,2009).

A fase química, por sua vez, corresponde ao período em que as moléculas danificadas reagem com os componentes celulares, observando-se reações químicas rápidas que podem originar radicais livres, numa escala temporal de segundos (Joiner,2009).

Já a fase biológica, inclui todos os processos subsequentes iniciados por reações enzimáticas aos processos despoletados na fase química, com uma escala temporal de acontecimentos maior, com o aparecimento de efeitos agudos, tardios ou até mesmo carcinogénicos ou hereditários (Joiner,2009).

Dependendo da energia depositada na célula e dependendo do tipo de célula irradiada, diferenciam-se vários efeitos, com várias caracterizações que ocorrem ao nível dos tecidos normais. Os efeitos somáticos caracterizam-se pelo desenvolvimento de danos celulares por diferentes exposições à radiação ao longo da vida, exclusivamente no indivíduo e ao nível das células somáticas; e, os efeitos genéticos ou hereditários relacionam-se com irradiações que provocam mutações genéticas, principalmente ao nível das células reprodutoras, com a capacidade de se perpetuar nas gerações posteriores (Joiner,2009).

A categorização dos danos provocados pela radiação ionizante assume um carácter complexo, tendo em conta o tipo de células irradiadas, o tempo de exposição, parâmetros de tolerância biológica dos tecidos, entre outros (Woźniak et al., 2012).

Tendo em conta o tempo de exposição à radiação, pode-se observar efeitos determinísticos e efeitos estocásticos nos indivíduos expostos.

Por sua vez, os efeitos determinísticos ou reações de tecido, segundo a *International Commission on Radiological Protection (ICRP)*, originam-se pela diminuição ou perda de função de um órgão devido a danos ou morte celular. Caracterizando-se por uma correlação de dose-efeito com o limite dose de tolerância dos tecidos, ou seja, só se observa determinado efeito biológico quando a dose de irradiação ultrapassa o limite de dose de tolerância do tecido em exposição. Exemplos destes efeitos são as

malformações fetais radioinduzidas, durante o período de organogénese (3-8 semanas de gestação).

Os efeitos estocásticos ou probabilísticos, por sua vez, resultam de modificações radioinduzidas em células que mantêm a sua capacidade de divisão; não dependem de um limite de dose, mas a probabilidade da sua ocorrência é proporcional à dose. Por isso, a probabilidade de indução deve ser reduzida pela manutenção da dose tão baixa quanto possível (**ALARA: As Low As Reasonably Achievable** - princípio base de radioproteção, com o objetivo de minimizar as exposições desnecessárias). A carcinogénese radioinduzida é um bom exemplo de um efeito estocástico (Suntharalingam, et al., 2010.)(ICRP).

Pode-se ainda caracterizar a ação da radiação como direta ou indireta, tendo em conta a sua ação ao nível dos danos moleculares. Ou seja, uma ação direta da radiação pressupõe a penetração da radiação nos tecidos, observando-se um efeito imediato ao nível das macromoléculas, em especial ao nível do DNA. Uma ação indireta, por sua vez, prevê a formação de espécies reativas de oxigénio, do inglês *reactive oxygen species* (ROS) (Figura 2) (Joiner, 2009).

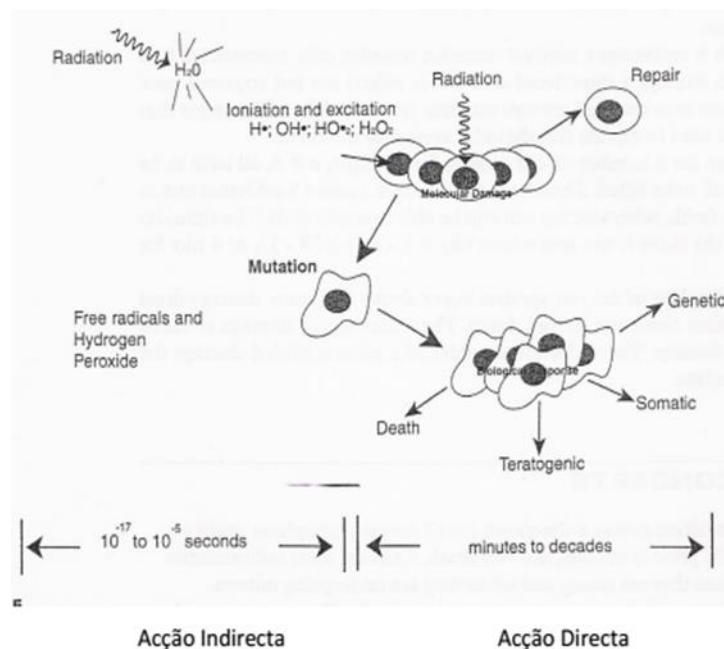


Figura 2: Ação direta e indireta da radiação nas células. O DNA é a molécula alvo da radiação e como tal, por si só o núcleo é um dos locais mais sensíveis da célula à radiação. Facto comprovado através de estudos feitos *in vivo*, concluiu que o núcleo é muito mais radiosensível que o citoplasma. Adaptado de (Joiner, 2009)

Para além de alterações funcionais, os efeitos biológicos da radiação precedem alterações morfológicas, que podem levar ou à morte celular ou a alterações metabólicas, com influência nas funções de sobrevivência celular (Selenius et al., 2012).

Assim, os danos celulares podem ser classificados em três categorias: **danos letais**, **danos subletais** e **danos potencialmente letais**. Os danos letais caracterizam-se por serem irreversíveis, irreparáveis e conduzem à morte celular. Nos danos subletais, as células têm a capacidade de se reparar em algumas horas; no entanto, se durante esse período a mesma célula for sujeita a um segundo dano subletal esta tem a capacidade de desenvolver um dano letal, por acumulação de erros celulares. Já nos danos potencialmente letais, as células têm a capacidade de se repararem, mas perdem a capacidade de replicação (Selenius et al., 2012; Suntharalingam et al., 2010)

A capacidade de penetração da radiação ionizante nos tecidos é irrefutável, contudo a suscetibilidade dos diferentes tipos de células à radiação é variável. Nem todas as células têm a mesma sensibilidade à radiação, embora todas as moléculas biológicas possam ser alteradas e as consequências decorrentes dessas alterações variem segundo a importância dessas moléculas nos sistemas biológicos (Joiner, 2009).

As lesões moleculares mais graves são as que ocorrem ao nível do DNA e encontram-se dependentes de vários fatores, tais como o tipo de radiação, o pH do meio, a temperatura, a concentração do oxigénio, a presença de radioprotetores, características do próprio DNA e a possibilidade de reparação dos produtos radioinduzidos; isto é, dependem de fatores físicos, químicos e biológicos (Tabela 1).

Tabela I: Fatores que influenciam as interações da radiação com a matéria

Fatores Físico	Fatores Químicos	Fatores Biológicos
Dose	Radiossensibilizadores	Estado proliferativo
Taxa de Dose	Radioprotetores	Fase do ciclo celular
Fracionamento de Dose	Antioxidantes	Estado fisiológico ou metabólico
Exposição aguada ou crónica		Constituição genética da célula
Tipo de radiação (LET, RBE)		

Em termos radiobiológicos é necessário ainda descrever cinco princípios base que relacionam o tempo de exposição, a dose e o número de frações, que influenciam o efeito biológico da radiação no tecido. São eles os **5 R's da Radiobiologia: reparação, repopulação, redistribuição, reoxigenação e radiosensibilidade:**

- Reparação celular após um dano subletal induzido por radiação. A capacidade de reparação dos danos, levada a cabo pelos mecanismos de reparação celular têm comportamentos diferentes dependendo do tipo de célula e tecido celular. O exemplo de um tecido de reparação lenta é o tecido do sistema nervoso, porque caso a dose seja baixa, poderão observar-se mecanismos de reparação celular, reduzindo as taxas de morte celular.
- Repopulação das células tumorais durante o fracionamento. Este processo é dependente do ciclo celular de cada tipo de célula; desta forma, observa-se uma dinâmica de crescimento celular que difere de carcinoma para carcinoma, existindo uma adequação do fracionamento à capacidade de repopulação celular específica para cada tipologia.
- Redistribuição das células tumorais no ciclo celular, em subpopulações sensíveis e resistentes à radiação após danos radioinduzidos. As células em fase S são tipicamente mais resistentes, enquanto que, as células em fases M ou G2 são geralmente mais sensíveis. Desta forma, uma fração de radiação elimina as células mais radiosensíveis, observando-se uma progressão no ciclo celular das células que não foram eliminadas, e numa segunda irradiação observa-se uma diminuição da resistência dessas células, repetindo-se o ciclo, sucessivamente.
- Reoxigenação das células tumorais hipoxicas após exposição repetida à radiação. A sensibilidade celular à radiação é inversamente proporcional à taxa de oxigénio, a heterogeneidade de oxigenação celular confer resistência ao tratamento com radiações, já que se sabe que existe uma percentagem de células que se encontram em hipoxia (baixo índice de oxigénio). Quanto maior for o nível de hipoxia das células tumorais mais resistentes à radiação serão, daí a aplicação de radiação fracionada que induz a morte das células oxigenadas, induzindo a oxigenação das células em hipoxia, tornando-as mais sensíveis à radiação fração a fração (Elkind, Sutton-Gilbert, & Moses, 1965).
- Radiossensibilidade. A radiosensibilidade celular intrínseca é um fator importante para a compreensão da resposta à radioterapia, definindo-se como a

fração de células sobrevivente a uma única dose de radiação de 2 Gy. Valores altos de sobrevivência indicam radorresistência celular (Hall et al., 2014).

Quanto maior for a resposta celular dada à radiação mais radiosensível é a estrutura, logo menor terá de ser a dose de radiação para o despoletar de um determinado efeito desejado. Não existe célula nem tecido normal ou patológico radorresistente de forma absoluta, uma vez que, se a dose não for limitada observar-se-á a destruição celular (Joiner, 2009).

A capacidade de quantificação da radiosensibilidade tumoral poderá ser um dos maiores avanços para a individualização terapêutica, aumentando a sobrevida e diminuindo a mortalidade, existindo uma necessidade de compreensão dos mecanismos genéticos de radiosensibilidade (Hall et al., 2014).

O uso de marcadores genéticos, como *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), podem ser utilizados como parâmetros de risco individual de toxicidade dos tecidos normais. Há um grande interesse no desenvolvimento de métodos capazes de diagnosticar o risco individual de desenvolvimento de efeitos agudos nos tecidos normais após irradiação (Raabe et al., 2012).

Do ponto de vista metabólico, as células tumorais apresentam um metabolismo alterado, influenciando a progressão tumoral, sendo que, o conhecimento específico das vias metabólicas que se encontram alteradas pode influenciar o desenvolvimento de novas estratégias de terapia enzimática e biomarcadores, que possibilitem uma melhor seleção dos pacientes e uma melhor abordagem terapêutica (Heiden, 2013). Durante o processo de carcinogénese, existem vários mecanismos que se encontram alterados e são característicos das células tumorais, são eles: evasão à apoptose; autossuficiência em fatores de crescimento; evasão ao sistema imunológico; insensibilidade aos sinais de anticrescimento; potencial replicativo ilimitado e angiogénese sustentada. Há a ativação de cascatas de sinalização que estimulam o crescimento celular, refletindo-se no aumento do metabolismo anabólico nestas células (Kroemer, Galluzzi, & Brenner, 2007).

A apoptose é o processo de morte celular mais comum e utilizado pela célula quando exposta a agentes patogénicos, principalmente, quando existem danos ao nível do DNA

irreparáveis. As vias de ativação deste processo biológico são a extrínseca (recetores de morte) e a intrínseca (mitocondrial) (Hotchkiss, Strasser, McDunn, & Swanson, 2009; Ouyang et al., 2012). Contudo, embora as vias de ativação sejam diferentes, ambas culminam em modificações morfológicas e bioquímicas específicas incluindo a diminuição do tamanho celular, condensação e fragmentação nuclear, formação de saliências irregulares na membrana plasmática e a perda de adesão da matriz extracelular e das paredes das células vizinhas (Checler & Alves, 2014).

Por sua vez, o mecanismo de morte celular por necrose diferencia-se da apoptose principalmente pela forma como a célula é destruída, caracterizando-se por um processo biológico “violento”. Na necrose pressupõe-se a perda de integridade da membrana celular plasmática, existindo um influxo de iões extracelulares e fluídos para o meio intracelular, ou seja, existe uma rotura abrupta dimensional na célula, observando-se uma mistura dos componentes celulares internos e externos que levam à inviabilidade celular e, conseqüentemente, à morte da célula (Ouyang et al., 2012).

A regulação positiva do metabolismo necessário para o crescimento celular ilimitado resulta de mutações que promovem a proliferação, a hipoxia e alterações de funcionamento mitocondrial resultando assim na acidificação do microambiente tumoral. Os mesmos sinais que permitem a proliferação celular sem restrições inibem por exemplo a autofagia, mecanismo que possibilita aquisição de nutrientes em casos de escassez dos mesmos e promove a morte celular. A inativação da via de autofagia interfere nos mecanismos de necrose e inflamação, promovendo a instabilidade genética e potenciando a proliferação celular (Jin, DiPaola, Mathew, & White, 2007).

Nestas células o metabolismo glicolítico encontra-se alterado, ou porque as células se encontrarem em hipoxia (níveis de oxigénio reduzido) ou pela expressão de oncogenes, verificando-se uma produção elevada de lactato. No entanto, o lactato, embora seja um subproduto da glicólise pode ser utilizado em mecanismos de produção de energia por vias anaeróbias, contribuindo para a proliferação celular (Draoui & Feron, 2011).

Em contraste com as células normais diferenciadas, que se baseiam na fosforilação oxidativa mitocondrial para gerar a energia necessária para os processos celulares, a obtenção de energia por parte das células tumorais é sustentada pelo efeito de *Warburg*, incrementando a radorresistência nas células tumorais (Klement et al., 2014).

Do ponto de vista do metabolismo humano, justifica-se ressaltar a importância do tecido adiposo no desenvolvimento tumoral, não só por indivíduos obesos terem um maior risco de desenvolvimento de determinados tipos de carcinogênese (como é o exemplo do carcinoma do endométrio, esôfago ou mama) mas também, relativamente a outras tipologias (melanoma, reto e ovário), onde o risco não é alterado pela massa corporal do indivíduo (Nieman, Romero, Van Houten, & Lengyel, 2013). Na obesidade observa-se um estado de inflamação de baixo grau, com o aumento de adipocitoquinas e citocinas que promovem o desenvolvimento tumoral, estimulando a adesão, migração e invasão de células tumorais, promovendo a troca dinâmica de metabolitos que suportam o microambiente tumoral, a progressão e o crescimento tumoral (Zadra, Photopoulos, & Loda, 2013). Mas não só, os lípidos enquadram-se em mecanismos de sinalização, respostas inflamatórias, resistência à insulina e o conhecimento dos pontos-chave das cascatas de regulação destes mecanismos que interligam a obesidade com a carcinogênese podem, também, ajudar no desenvolvimento de novas terapias oncológicas personalizadas (Schoors et al., 2014).

A Restrição Calórica (RC) tem sido descrita pelo benefício ao nível da reparação dos danos subletais ao nível dos tecidos normais após irradiação, possibilitando ainda a diminuição da taxa de replicação celular incrementando uma diminuição do crescimento tumoral (Klement et al., 2014).

1.2. *Stress* Oxidativo

A desigualdade entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e os mecanismos de defesa antioxidantes do organismo designa-se por *stress* oxidativo, envolvendo na sua ação mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Yi Zhang et al., 2011).

O *stress* oxidativo encontra-se amplamente envolvido em processos de carcinogênese e de diferenciação tumoral, provocando alterações e quebras ao nível do DNA, influenciando o normal funcionamento de genes supressores tumorais e aumentando a expressão de protooncogenes (Malathi, Vijay, & Shivashankara, 2011). Os ROS ativam a expressão de vários fatores de transcrição, nomeadamente NF- κ B, AP-1, p53, HIF-1 α , PPAR- γ , entre outros, despoletando uma cascata de intervenientes envolvidos em várias vias de regulação do ciclo celular e de processos pró e anti-inflamatórios,

implicitamente envolvidos em processos de carcinogênese (Reuter, Gupta, Chaturvedi, & Aggarwal, 2010).

A resposta celular à radiação é dinâmica, envolvendo inúmeros mediadores e uma resposta imune, induzindo o aumento da regulação de várias citocinas, incluindo a IL-6, IL-8, TNF-alfa (Wu, Chen, Chen, & Hsieh, 2013). A interação das moléculas de água, ao nível intra e extracelulares com a radiação, despoleta várias reações químicas que levam à formação de radicais livres, como o $\text{OH}\cdot$, o OH^- , $\text{O}_2\cdot^-$ e H_2O_2 , provocando danos em quase todos os constituintes celulares, tais como o DNA, proteínas e lípidos membranares (Shiota, Yokomizo, & Naito, 2012).

Os mecanismos de defesa contra estes efeitos podem ser categorizados como: 1) mecanismos de reparação de DNA; 2) mecanismos envolvidos na modificação do metabolismo celular, e; 3) mecanismos envolvidos em modificações das interações celulares. Os mecanismos de oxidação-redução (redox) interferem na homeostasia celular, despoletando uma resposta celular à radiação, induzindo a morte celular em alguns casos (Selenius et al., 2012).

Uma causa indireta de introdução de danos celulares, descrito ao nível de vários órgãos, e nomeadamente no sistema nervoso central (SNC), é o *stress* oxidativo (Kimura et al., 2012). O dano oxidativo das macromoléculas causado pela acumulação progressiva de ROS constitui e possibilita o declínio das funções fisiológicas celulares (Knoefler et al., 2012).

Os ROS que derivam da regulação da oxidase do NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) são conhecidos como uma fonte de *stress* oxidativo após irradiação de tecidos normais, desempenhando um papel importante na sinalização celular, particularmente de macrófagos e neutrófilos, bem como da regulação de determinadas citocinas e fatores de crescimento, tal como TNF- β , induzindo apoptose e fibrose (Kimura et al., 2012). A peroxidação lipídica é um indicador do metabolismo dos radicais livres e de *stress* oxidativo, quantificando-se pela percentagem de Malonaldeído (MDA) produzido, que é inerente à carcinogênese, observando-se diferenças ao nível dos valores séricos em pacientes tratados com RT (Kushwaha, Sahani, Sharma, Saeed, & Barman, 2013).

Os mecanismos antioxidantes são os responsáveis pela resistência e proteção celular à ação dos radicais livres e a importância da sua ação observa-se em vários processos fisiológicos, incluindo na regeneração de enzimas antioxidantes por mecanismos de redução dos íons de oxigênio, na regulação de fatores de transcrição, na atividade das peroxidases e na replicação e reparação de DNA (Woźniak et al., 2012).

Os principais mecanismos enzimáticos de regulação antioxidantes incluem a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase da glutatona (GPx) (Frustaci et al., 2012). Alterações genéticas do funcionamento de genes envolvidos em mecanismos antioxidantes poderão levar a um aumento de ROS, despoletando condições desfavoráveis ao normal funcionamento celular. Neste caso, os polimorfismos associados aos genes SOD, CAT e GPX estão envolvidos em processos patogênicos e carcinogênicos (Yi Zhang et al., 2011).

A glutatona, ou γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, é um tripéptido com um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos, que se encontra na linha da frente para proteção das células contra o *stress* oxidativo. Localiza-se intracelularmente em altas concentrações, principalmente em organismos aeróbios, a oxidação da glutatona reduzida (GSH) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é catalisada pela ação da enzima glutatona reduzida, sendo que desta forma, a glutatona oxidada é por sua vez reduzida, com o auxílio do cofator NADPH que fica oxidado em NADP⁺ (Ma, Rahmat, & Lam, 2013).

Em situações de *stress* oxidativo, ocorre a depleção da glutatona na sua forma reduzida, GSH, ao mesmo tempo que ocorre o aumento do seu produto de oxidação, a glutatona dissulfureto (GSSG), ou glutatona oxidada (Ercal et al., 2001). Apesar da concentração aumentar, a GSSG é rapidamente reconvertida a GSH pela ação da enzima redutase da glutatona (GR). A GR é uma flavoenzima de estrutura conhecida que catalisa a redução dependente de NADPH de Glutatona oxidada. Altos níveis de GSH endógenos potenciam a taxa de sobrevivência e a resistência das células cancerígenas ao tratamento, nomeadamente à Radioterapia (Hanot et al., 2012).

CAPITULO I

-Revisão Bibliográfica-

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Glioma

O Sistema Nervoso Central (SNC) apresenta uma hierarquia celular com vários intervenientes, incluindo células estaminais, células com potencial replicador e de suporte, assim como, células altamente especializadas e diferenciadas, o que de certo modo pode justificar a grande heterogeneidade das lesões malignas ao nível deste Sistema (Prestegarden et al., 2010).

Na América do Norte, Europa Ocidental e Austrália, as taxas de mortalidade por lesões tumorais malignas a nível cerebral (todos os tipos histológicos, incluindo meningiomas), são cerca de 4-7 em cada 100.000 habitantes por ano nos homens e 3-5 em cada 100.000 habitantes nas mulheres, com taxas de sobrevida média que variam entre os 12 e os 15 meses (Little et al., 2013; Ohgaki, 2009).

Salientando que as taxas de incidência e de mortalidade são semelhantes na maioria das áreas geográficas, as diferenças verificadas interligam-se com as diferenças das intervenções terapêuticas e com o sucesso das mesmas. Em Portugal, os dados recolhidos no Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO), em 2013, a taxa padronizada de incidência por 100.000 habitantes é de 7,8% nos homens e de 6,4% nas mulheres, dados que vão ao encontro aos dados internacionais (RORENO, 2013).

Os gliomas representam cerca de 80-90% dos tumores cerebrais em adultos, sendo que os fatores de risco conhecidos inerentes a esta patologia estão relacionados com altas doses de radiação ionizante e com síndromes genéticas raras, como é o exemplo da síndrome de *Li Fraumeni*, que geralmente se encontra associada a mutações de genes supressores tumorais, tais como p53 (Paunu et al., 2001), PTEN, CDK2A, p16INK4A, p14ARF, CDK4 e RB e em protooncogenes como EGFR, PDGFR, PIK3CA, PIKR1, Kras e IDH1 (Modrek, Bayin, & Placantonakis, 2014).

Entre vários eventos biomoleculares diferentes, a existência de ligações moleculares entre a inflamação e as vias de *stress* oxidativo e o desenvolvimento deste tipo de lesão tumoral é algo que já é conhecido. Em particular, o microambiente em que o tumor se desenvolve, amplamente constituído por moléculas inflamatórias, revela-se um agente

indispensável no processo neoplásico de proliferação, promoção, crescimento e migração da lesão (Conti et al., 2010).

Os gliomas apresentam uma grande heterogeneidade histológica e, conseqüentemente, uma distinta variedade de graus de malignidade. Pela sua localização, os procedimentos de diagnóstico e estadiamento deste tipo de lesões, baseiam-se em técnicas de neuroimagem que podem usar radiação ionizante, como é o exemplo da tomografia computadorizada (TC), ou não-ionizante, como é o exemplo da ressonância magnética (RM) (que tem aumentado a precisão do diagnóstico) (Perez C. A, 2008). O exame histopatológico da lesão é um pré-requisito para a escolha do tratamento mais adequado (Pittella, 2008).

O estadiamento e classificação das lesões tumorais devem descrever a extensão anatômica da doença com base na avaliação da extensão do tumor primário, ausência ou presença de invasão ganglionar regional e ausência ou presença de metástases à distância, sistema TNM (Cancer Research UK, 2012).

Os gliomas de alto grau têm um prognóstico muito reservado (Modrek et al., 2014) e, conseqüentemente, a abordagem clínica dos gliomas assenta em esquemas terapêuticos multidisciplinares, incluindo modalidades terapêuticas como a Cirurgia (CR), Radioterapia (RT) e Quimioterapia (QT). No entanto, determinadas lesões malignas como os astrocitomas anaplásicos e os glioblastomas multiformes permanecem incuráveis. A identificação de alvos específicos, nomeadamente de moléculas específicas, ajudará a estabelecer terapias alternativas para a patologia (Güttler et al., 2013).

As abordagens cirúrgicas realizam-se em casos cuidadosamente analisados que indiquem benefício ao doente, embora uma ótima ressecção da lesão tumoral seja extremamente difícil de se obter, devido à natureza infiltrativa deste tipo de lesões e estando associado ao alto risco de mortalidade (Minniti et al., 2013). A utilização de corticosteroides é usualmente necessária para estabilizar os sintomas neurológicos (Perez C. A, 2008).

A Radioterapia (RT) é uma modalidade terapêutica que utiliza feixes de radiação ionizante para o tratamento de lesões malignas e benignas, com o objetivo de irradiar uma lesão alvo com uma dose pré-determinada a um volume conformado, poupando ao

máximo os tecidos saudáveis adjacentes à lesão (Barbosa, 2010). No tratamento específico de lesões cerebrais, a RT assume-se como a modalidade terapêutica de eleição, contudo toda a planificação do tratamento tem em consideração determinados fatores, tais como o tipo de lesão, o volume de irradiação e as doses de irradiação, que nestes casos podem variar entre os 50-60 Gy de 1,8 a 2Gy por fração, em prol do controlo tumoral (Perez C. A, 2008). As técnicas mais avançadas de RT, que incluem a Radioterapia de Intensidade Modulada (IMRT), a Radioterapia de Imagem Guiada (IGRT) e a Radioterapia Corporal Estereotáxica (SBRT), caracterizam-se pela capacidade de conformação dos feixes ao volume alvo com uma escalada de dose maior (Fakir, Hlatky, Li, & Sachs, 2013), poupando os tecidos adjacentes de receberem radiação.

Distribuições de dose não-homogêneas e não-uniformes são técnicas cada vez mais comuns nas unidades hospitalares de tratamento, criando um *bloom* de protocolos hospitalares, existindo uma necessidade de aumentar os *inputs* ao nível dos conhecimentos radiobiológicos (Fakir et al., 2013).

Como em todas as intervenções terapêuticas, também a RT, apresenta efeitos secundários que se podem distinguir entre efeitos agudos e efeitos tardios da terapêutica. Segundo a *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) e o *National Cancer Institute* (NCI) no relatório *Common Toxicity Criteria* (CTC), com base nas observações de esquemas de fracionamento convencional, classificaram-se como efeitos agudos aqueles que surgem até um período de 90 dias após a primeira irradiação, e como efeitos tardios os efeitos que ocorrem após esse período.

Os efeitos agudos do tratamento de RT, relativamente ao tratamento de gliomas, manifestam-se sob a forma de alopecia no local da irradiação, fadiga, eritema ou dor no couro cabeludo, observando-se a predisposição para sintomas como náuseas e vômitos, cefaleias, convulsões e fraqueza. Pode ainda observar-se complicações ao nível dos canais auditivos, que a curto prazo podem levar a alteração dos parâmetros da audição, assim como, ao aparecimento de letargia e défices cognitivos que podem ocorrer 1-3 meses após o tratamento com RT. Os efeitos tardios da terapêutica podem contemplar o risco de necrose radiogênica, assim como disfunção endócrina. Os défices neurocognitivos podem levar a lentidão mental e a uma mudança comportamental (RTOG 1205) (Tsien et al., 2014).

A categorização dos danos provocados pela radiação ionizante assume um caráter complexo, tendo em conta o tipo de células irradiadas, o tempo de exposição, parâmetros de tolerância biológica dos tecidos, área irradiada, dose total, fracionamento e técnica de tratamento (Selenius et al., 2012; Woźniak et al., 2012a).

As respostas agudas inflamatórias após irradiação são observadas com a ativação do *stress* sensitivo das cinases, fatores de transcrição e aumento das citocinas inflamatórias, podendo ser despoletada uma resposta antioxidante para estas respostas inflamatórias à irradiação (Kimura et al., 2012).

A resistência dos Gliomas à RT e à QT tem sido atribuída à variedade de mecanismos intrínsecos, que incluem a radorresistência, hipóxia tumoral, aumento dos mecanismos de reparação do DNA e alteração da expressão das enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes previnem os danos celulares, pela sua capacidade de interceptar a ação das ROS e óxido nítrico (NO). Os antioxidantes e enzimas antioxidantes sustentam o normal funcionamento celular aumentando a sobrevivência das mesmas; desta forma, a radorresistência dos gliomas pode ser atribuída, em parte, à alteração das enzimas-antioxidantes, particularmente da catalase (Smith, Zhao, Spitz, & Robbins, 2007).

Cerca de 20% dos pacientes com tumores cerebrais que realizam Radioterapia apresentam reações severas dos tecidos normais ao tratamento. A identificação de pacientes com radiosensibilidade baixa, moderada e alta antes do início do tratamento poderá permitir uma adaptação da dose máxima, com o aumento global da taxa de cura. A caracterização de fatores que podem modificar os efeitos biológicos das radiações ionizantes no tratamento tem sido objeto de estudo de várias equipas de investigação (Haghdoost, 2005), com o intuito de identificar biomarcadores (genes específicos, proteínas, produtos de metabolismos) que permitam avaliar a resposta celular às estratégias terapêuticas (Jacob, Noren Hooten, Trzeciak, & Evans, 2013).

2.2. Melanoma

O comportamento celular, como já foi descrito anteriormente, assume um papel extremamente complexo. Contudo a origem embrionária das várias tipologias celulares confere-lhes uma origem comum, como é o caso das células da glia e dos melanócitos. Esta correlação deriva das células da crista neural, uma população de células multipotentes com capacidade de originar uma variedade de linhas celulares incluindo

neurónios periféricos e entéricos e glia, cartilagem craniofacial e osso, músculo liso e melanócitos (Huang & Saint-Jeannet, 2004).

Os melanócitos são células localizadas na camada inferior da epiderme, mas não só, podem-se observar a existência de melanócitos no úvea (olho humano), ouvido interno, meninges, osso e coração. A melanina produzida pelos melanócitos é uma proteína essencial na defesa do organismo contra as radiações ionizantes, em especial contra os UV's. Exposições intermitentes, assim como características do próprio indivíduo, tais como características pigmentares, cor do cabelo e olhos, sensibilidade da pele a queimaduras solares, capacidade de bronzear interligam-se com o risco de desenvolvimento deste tipo de lesão. Observando-se uma maior incidência deste tipo de lesões em indivíduos caucasianos (Veierød, Adami, Lund, Armstrong, & Weiderpass, 2010). As lesões ou doenças de pele associadas à exposição crónica de UV são causadas, principalmente devido à inflamação tecidual, danos no DNA e stress oxidativo (Nichols & Katiyar, 2010). Mas também a mutações em genes específicos como BRAF, que proporciona o aumento da divisão celular; N-RAS, que promove a proliferação celular; perda do CDKN2A, que codifica proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular a p16INK4a e IRA; subexpressão do MITF, que promove a sobre a inapropriada progressão do ciclo celular; c-KIT, envolvida na invasão e processos de metastização; Slug, EDNRB e E-caderina, envolvidos no processo de metastização. Mutações no p53 são facilmente evidenciadas na resposta de danos no DNA, relacionando-se de certa forma com a radorresistência de algumas linhas celulares de melanoma humano (Khan et al., 2012).

A deteção precoce deste tipo de lesões é fundamental para as taxas de sobrevida do doente, a taxa de sobrevida aos 5 anos é de 91-95% em caso de lesões de estadio I, baixando para 7-19% em estadio IV (Heymann, 2006).

O melanoma representa 3% de todos os carcinomas da pele, contudo é o responsável por 75% das mortes provocadas por neoplasias cutâneas (Perez C. A, 2008). Em Portugal, segundo dados dos RORENO (2013), verificaram-se 258 casos de melanoma na zona Norte o que corresponde a uma taxa padronizada de 6,7% de incidência.

O tratamento atual de melanoma permanece essencialmente cirúrgico (Smithers, Moaveni, & De Groot, 2011), mas o tratamento do melanoma metastático envolve uma abordagem multidisciplinar (Merten et al., 2014). A RT pode desempenhar vários

papéis importantes no tratamento multidisciplinar do melanoma: como tratamento adjuvante, após a ressecção da lesão primária ou nódulos regionais metastáticos; como o tratamento principal em lesões de alto risco de doença subclínica; ou tratamento paliativo, em lesões metastáticas distantes e recorrências locais, e, raramente, é o tratamento definitivo de lesões primárias. Contudo, a Radioterapia é utilizada em apenas entre 1% a 13% dos casos pelo o facto deste tumor ser radorresistente, possivelmente devido à sua grande capacidade de reparação de danos subletais. Estes tumores são indicados para esquemas de hipofracionamento, pois há uma administração de dose maior por fração (Perez C. A, 2008).

2.3. Antioxidantes e Radioterapia

A sobrevivência do organismo na presença de radiação de baixa dose (radiação de fundo) sugere a ocorrência de mecanismos de adaptação fisiológica, apoiados por nutrientes que protegem contra os danos da radiação excessiva, os antioxidantes (Weiss & Landauer, 2003). Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações quando comparada com as concentrações de um substrato oxidável (qualquer molécula encontrada *in vivo*), atrasa significativamente ou evita a oxidação do substrato (Halliwell, 1995).

Os ROS desempenham um papel duplo nos sistemas biológicos, prejudicam mas também beneficiam. Ou seja, níveis intracelulares de ROS são produzidos por enzimas intracelulares no decorrer do seu normal funcionamento, tais como a xantina, ciclo-oxigenases, citocromo P450, ou a produção mitocondrial de ROS utilizada pelas células fagocíticas como mecanismo de defesa (Giustarini, Dalle-Donne, Milzani, & Rossi, 2011). As células tumorais normalmente apresentam um aumento do *stress* oxidativo, devido ao aumento da produção de ROS intracelular, por aumento da taxa metabólica celular necessária para sustentar a proliferação celular, provocando a desregulação dos mecanismos *redox*, comparativamente às células dos tecidos normais, conduzindo a uma maior radorresistência dos tecidos (Yinghao Zhang et al., 2014). Estudos efetuados demonstraram que se observa um diminuição dos níveis de vitamina C e E na medula óssea em doentes com carcinoma da mama, bem como uma diminuição sérica das vitaminas A, C e E, selénio e zinco, durante o tratamento de RT (Matos et al., 2014). Desta forma, o uso de antioxidantes na terapia de doentes submetidos a RT, tais como vitamina A, C e E, selénio, cobre, zinco e N-acetil-cisteína, sensibilizam as

células tumorais à terapia contribuindo para que os tecidos adjacentes obtenham uma boa recuperação dos danos subletais, induzindo a redução dos efeitos agudos do tratamento (Kushwaha et al., 2013).

Os efeitos moduladores dos antioxidantes no tratamento dependem de vários parâmetros, como: o estado metabólico no paciente; o estágio; a localização da lesão e a modalidade terapêutica utilizada (Radioterapia, Quimioterapia, Hormonoterapia, entre outros). Contudo, os mecanismos de radiosensibilidade dos tecidos nem sempre estão ativados, por exemplo devido a alterações nos mecanismos de reparação do DNA, comprometendo a suscetibilidade celular à radiação (Greenberger et al., 2014) e a dose de tolerância para um dado tecido depende da radiosensibilidade das suas células-alvo, da velocidade de desenvolvimento de lesões, interligando-se com a sua atividade proliferativa (Kaya, Delibas, Serteser, Ulukaya, & Ozkaya, 1999).

A administração de agentes radioprotetores, numa fase precoce ganha cada vez mais peso clínico, como medida profilática ao nível dos efeitos agudos nos tecidos normais (Puspitasari et al., 2014), aumentando os efeitos terapêuticos da QT e/ou RT, e influenciando as taxas de sobrevivência dos doentes (Pese, Kirdpon, Puapairoj, Kirdpon, & Prathnadi, 2013), contradizendo a proibição da utilização de antioxidantes em simultâneo durante o tratamento de Radioterapia (Moss, 2007).

A tabela 2, faz referência a alguns estudos realizados nos últimos anos, que relacionam *stress* oxidativo, carcinomas e antioxidantes.

Tabela II: Antioxidantes, *Stress* Oxidativo e Radioterapia

Localização	Âmbito	Matriz	Esquema de Fracionamento	Parâmetros Observados	Resultados	Referência
Ca Ovário	<i>Stress</i> oxidativo em RT	Animais	720 cGy em duas frações, com um intervalo de 12h entre cada fração.	MDA, SOD, GPX, Melatonina.	A melatonina, em ratos, reduz os níveis de MDA, a adição de terapias com antioxidantes poderá ajudar na proteção contra os efeitos agudos do tratamento com radiação.	Kaya et al. (1999)
Ca Pulmão	<i>Stress</i> oxidativo no DNA	Amostras de urina e de sangue	Amostra de urina: aos 8Gy e aos 10 Gy, de uma dose total de 20 Gy; aos 30 Gy de uma dose total de 40 Gy, bem como 3 meses após o início da RT. Amostra de sangue foram coletadas aos 20 Gy e 3 meses após a RT.	8-oxoGua e 8-oxodG	Tratamentos com RT aumentam o <i>Stress</i> oxidativo, o que demonstra a importância da monitorização destes parâmetros durante a terapia.	Crohns et al. (2009)
Ca Cabeça e Pescoço	<i>Stress</i> oxidativo em RT	Amostras de urina e de sangue	69.96 Gy, em 33 frações	F2-Isoprostanos	Ca Nasofaringe está associado a índices elevados de F2-isoprostanos na urina e no plasma. RT não aumentou estes níveis, existindo a alteração sequencial dos níveis deste marcador de <i>stress</i> oxidativo durante tratamento e após o tratamento.	Lim et al. (2010)
	<i>Stress</i> oxidativo e RT	Amostras de Plasma, antes e depois da RT	50-60 Gy, em 25 e 30 frações	MDA, SOD, vitamina A, vitamina C e a ceruloplasmina	O <i>Stress</i> oxidativo neste tipo de lesão é observado pelo aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de antioxidantes no plasma. Contudo, verificou-se nos doentes tratados com RT uma redução na peroxidação lipídica e uma melhoria do <i>status</i> antioxidante nestes doentes.	Malathi et al., (2011)
	<i>Stress</i> oxidativo e Antioxidantes em RT	Amostras de sangue e de tecido	Não faz referência	SOD, MDA, GR e efeitos secundários da RT	A utilização de antioxidantes em combinação com RT em lesões da cavidade oral, não só contribui para um bom resultado	Kushwaha et al., (2013)

					do tratamento, mais também, para o aumento da sobrevida observando-se a diminuindo dos efeitos secundários da RT e aumentando a tolerâncias dos tecidos normais aos mesmos.	
Ca Cérvix	<i>Stress</i> oxidativo em RT	Amostras de sangue	50 Gy, em 25 frações	MDA, SOD, NO, Mieloperoxidase, GPX, Catalase e Vitamina C	O <i>Stress</i> oxidativo encontra-se aumentado no Ca Cérvix, com danos ao nível dos neutrófilos e consequentemente diminuição da resposta imunitária. A RT induz ao aumento dos índices de antioxidantes e protege os neutrófilos dos danos dos radicais livres, aumentando a defesa imunológica, nesta patologia.	Gunalan et al., (2012)
	Antioxidantes em RT	Amostras de Sangue	50 Gy, em 25 frações	MDA, DNPH	A suplementação com antioxidantes aparentemente diminuiu os níveis de <i>Stress</i> oxidativo, especialmente no que diz respeito aos danos proteicos.	Fuchs-Tarlovsky et al., (2013)
Glioma	<i>Stress</i> oxidativo	Tecido	Sem irradiação	MDA, 8-OHdG, mRNA, DNPH, SOD	Altos níveis de <i>Stress</i> oxidativo em células de Glioma humano está significativamente relacionado com grau do tumor. Lesões de alto grau produzem mais radicais livres, aumentando os biomarcadores de <i>Stress</i> oxidativo.	Hardiany et al., (2012)
	Antioxidantes em RT	Linhas Celulares	6Gy com Cesium137	Vitamina C e radiosensibilidade do tecido	Níveis elevados de <i>stress</i> oxidativo são causados pela irradiação celular e por altos níveis de ácido ascórbico.	Castro et al., (2014)
Melanoma	Antioxidantes e <i>Stress</i> oxidativo	Linhas Celulares	Irradiação com UV	Ácido Gálico e redox status	O ácido gálico apresenta efeitos protetores na melatogénese após irradiação, possivelmente através da melhoria das defesas antioxidantes relacionados com GSH.	Panich et al., (2011)
Ca Próstata	<i>Stress</i> oxidativo em RT e disfunção erétil (DE)	Animais	Fração única de 20 Gy	Pressão intracavernosa; Expressão da oxidase do NADPH (subunidades Nox4 e	<i>Stress</i> oxidativo desempenha um papel crucial no desenvolvimento de DE induzida por radiação, pela observação dos índices NADPH oxidase e por respostas inflamatórias crónicas nos tecidos	Kimura et al. (2012)

				gp91phox); 8-OHdG; 4HNE; sintetase do NO; ED-1; nitrotirosina e Nrf2.	após a RT.	
Ca Cervix, Mama, Cabeça e Pescoço e Pulmão	Antioxidantes em RT	Amostras de Sangue	40-60 Gy, entre 20-30 frações	MDA, NO, Vitamina E e TAC	A RT aumenta o <i>status</i> de <i>stress</i> oxidativo, já elevado em pacientes com neoplasia. A suplementação com antioxidantes, em pacientes a realizar RT, poderá ajudar na prevenção e aumento do <i>Stress</i> oxidativo.	<i>Patil RY</i> , (2013)
Ca Mama	Antioxidantes em RT	Amostras de Sangue	50 Gy em 25 frações, mais um <i>boost</i> de 10Gy em 5 frações	Níveis de Selênio em sangue total, determinados por Espectrometria de Absorção Anatómica.	As células tumorais utilizam de forma mais eficientes os antioxidantes que as células normais, provocando uma diminuição dos níveis selênio circulantes. Os baixos níveis de Selênio são então uma consequência da carcinogênese.	<i>Franca et al.</i> , (2011)
	Antioxidantes em RT	Dados do processo individual do doente	Sim, mas não refere o esquema de tratamento	Comparação e correlação estatística dos dados	O tratamento complementar de doentes com Ca da Mama com Vitamina C intravenosa demonstrou ser bem tolerado pelos doentes, diminuindo os efeitos secundários da terapia, em particular das náuseas, perda de apetite, fadiga, depressão, tonturas, entre outros.	<i>Vollabracht et al.</i> (2012)
	Antioxidantes em RT	Amostras de Sangue	50 Gy em 25 frações, mais um <i>boost</i> de 10Gy em 5 frações.	Vitamina A e níveis de β - carotenos, por HPLC, depois de RT	Alguns antioxidantes parecem ser promissores na prevenção de efeitos secundários radioinduzidos na pele, contudo, alguns interferem com os mecanismos de apoptose induzidos pela ação terapêutica.	<i>Amber et al.</i> , (2014)

Legenda: **8-oxoGua**- 8-oxoguanina; **8-oxodG**- 8-oxo-2'-desoxiguanosina; **Ca**- Carcinoma; **DNPH** - 2,4-dinitrofenilhidrazina; **DE**- Disfunção Eréctil **GPX**- Glutationa Peroxidase; **GR**- Glutationa Redutase; **HPLC**- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; **MDA**- Malonaldeído; **NADPH** - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato; **NO**- Oxido Nítrico; **mRNA**- Ácido Ribonucleico mensageiro; **RT**- Radioterapia; **SOD**- Superóxido Dismutase; **TAC**- Capacidade Antioxidante Total.

A tabela II referência resultados observados em várias tipologias tumorais com dinâmicas diferenciadas do ponto de vista oncobiológico, comorbilidades, proliferação e desenvolvimento carcinogénico, taxas de sobrevivência e ação dos agentes terapêuticos. Os vários estudos permitiram inferir e avaliar a ação da relação direta do *stress* oxidativo, com os agentes antioxidantes e a sua relação com o tratamento de Radioterapia. Os resultados obtidos pelos diversos autores corroboram a relação existente entre o *stress* oxidativo e a carcinogénese, demonstrando a importância da monitorização deste parâmetro antes (Ry & Hn, 2013.) durante (Crohns, Saarelainen, Erhola, Alho, & Kellokumpu-Lehtinen, 2009) e após o tratamento (Kimura et al., 2012).

O papel da suplementação de antioxidantes aquando a terapêutica com radiações, poderá ajudar na diminuição dos níveis de *stress* oxidativo, especialmente no que diz respeito aos danos proteicos (Fuchs-Tarlovsky, Rivera, Altamirano, Lopez-Alvarenga, & Ceballos-Reyes, 2013), e até mesmo culminar com aumento da capacidade de resposta do sistema imunitário (Gunalan & Krishnamurthy, 2012). Observando-se mesmo, que em casos de doentes com tumores na cavidade oral, um aumento do *status* antioxidante devido à suplementação (Malathi et al., 2011). No caso de carcinoma da Mama, a suplementação com ácido ascórbico intravenoso, para além de bem tolerado pelas doentes, proporcionou a diminuição dos efeitos associados à Radioterapia (eritema, náuseas, perda de apetite, fadiga, depressão, tonturas, entre outros) (Vollbracht et al., 2011). Tal como nos carcinomas da mama, a mesma ação dos agentes antioxidantes foi descrita por Franca et al., em 2011, mas em doentes com carcinomas gastrointestinais, observando-se que os antioxidantes induzem apoptose nas células tumorais e protegem os doentes dos efeitos colaterais do tratamento com RT, corroborando a hipótese de utilização da suplementação com antioxidantes como uma terapia adjuvante útil, principalmente com a aplicação de altas dosagens. As células tumorais utilizem as fontes de antioxidantes de forma mais eficiente que as células normais, provocando a diminuição dos antioxidantes circulantes (em especial do selénio) estabelece-se uma relação direta entre a diminuição antioxidante-carcinogénese e aumento do *stress* oxidativo (Amber, Shiman, & Badiavas, 2014; Franca et al., 2011; Gunalan & Krishnamurthy, 2012; Lim, Lee, Earnest, Seet, & Halliwell, 2010; Malathi et al., 2011).

No caso específico dos tecidos neuronais, a sua sensibilidade aos danos provocados pelo *stress* oxidativo são elevados devido ao baixo nível de antioxidantes endógenos, nomeadamente Vitamina E e da enzima dismutase do superóxido. A Vitamina E protege a integridade neuronal, prevenindo a toxicidade e apoptose (Borek et al., 2004), verificando-se que por exemplo a utilização de ácido ascórbico em altos níveis está associado ao aumento do *stress* oxidativo, tendo um comportamento inverso do da Vitamina E ao nível da proteção do tecido (M. L. Castro, McConnell, & Herst, 2014).

2.4. Obesidade, Cancro e Radioterapia

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde, 3,4 milhões de adultos morrem por ano devida a excesso de peso e obesidade, relacionando-se diretamente com a incidência de 44% dos casos de diabetes, 23% dos casos de isquemias cardíacas e entre 7-41% alguns tipos de cancro (site da WHO).

O tecido adiposo é um tecido endócrino, dinâmico que secreta ácidos gordos, citocinas, fatores de crescimento, adipocitoquinas envolvidas não só na regulação do metabolismo de todo o organismo, mas também, em respostas inflamatórias e imunitárias (Arnet et al., 2014). As adipocitoquinas abrangem uma ampla gama de funções metabólicas, incluindo a regulação do apetite, do equilíbrio energético, sensibilidade à insulina, angiogénese, regulação da pressão arterial, homeostasia vascular, inflamação e resposta imunitária (Gilbert et al., 2012).

O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à associação entre a obesidade e a carcinogénese são extremamente importantes para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e terapia, já que a obesidade não se encontra somente relacionada com a mortalidade por carcinogénese mas também com o aumento da incidência de determinadas neoplasias. A obesidade e o excesso de peso são um importante fator de risco direto no desenvolvimento do cancro da mama, próstata e colón (Siegel et al., 2013). O aumento do índice de massa corporal (IMC) e o sedentarismo, também, foram identificados como fatores de risco direto no desenvolvimento de neoplasia do endométrio (Low, Ho, Too, Yap, & Ng, 2014). Contudo a relação entre a obesidade e o desenvolvimento de glioma não se encontra totalmente definida, sabendo-se que a obesidade pré-mórbida é significativamente associada a um pior prognóstico do doente, independente do tratamento (Little et al., 2013). Estudos realizados com modelos celulares de glioma, revelaram que a obesidade

influencia o comportamento fisiológico e metabólico das células tumorais de glioma. Verificando-se a expressão alterada de proteínas envolvidas em diversas vias de sinalização responsáveis pelo controlo da remodelação da matriz, proliferação e progressão, migração e invasão. Concluindo-se, que paradoxalmente ao esperado, as células de glioma incubadas com meio enriquecido em adipocinas pode apresentar um efeito protetor contra o glioma, pela *underexpression* de STI1, hnRNPs e PGK1, que normalmente se encontram *overexpressed* (Costa et al., 2013).

Em doentes com neoplasia da mama, o aumento do IMC antes, durante e após o tratamento diminui a qualidade de vida do doente, devido ao aumento dos efeitos agudos do tratamento, quer de RT e QT, aumentando a sintomatologia de apneia, fadiga, náuseas, insónias, depressão e lapsos de memória (Fang et al., 2013). Mas não só, as complicações adversas relativas ao linfedema (edema do plexo braquial), efeito comum após tratamento de RT na mama a doentes submetidas a cirurgia conservadora, aumentam com a obesidade recomendando-se cirurgia redutora da mama, para facilitar a irradiação homogénea do tecido e aumentar a performance do tratamento adjuvante de RT (Carmichael, 2006).

No caso de doentes com carcinoma da próstata, um aumento do IMC, traduz-se igualmente na diminuição da qualidade de vida do doente, assim como na agressividade do tumor (estádios elevados, volumes tumorais elevados, maiores margens cirúrgicas positivas) (Strom et al., 2006), com uma diminuição da irradiação do *Clinical Target Volume* (CTV), no tratamento de RT, por problemas técnicos que advém do volume visceral do doente refletindo-se na necessidade de aumentar o numero de imagens portais no decorrer do tratamento para correção de desvios, refletindo-se quer no aumento da dose total de tratamento como no resultado final do tratamento (Geinitz et al., 2011).

Um IMC elevado em doentes que estão a receber tratamento de RT em casos de neoplasia do endométrio pode interferir no correto posicionamento da doente, levando a erros de configuração e erros no tratamento, colocando em causa toda a performance do tratamento de RT e sobrevida do doente (Lin, Hertan, Rengan, & Teo, 2012).

Também em casos de craniofaringioma, as comorbilidades do tratamento estão amplamente relacionadas com a obesidade, principalmente no que respeita a danos ao

Impacto da Radioterapia no *stress* oxidativo em modelos celulares radiorresistentes em contexto de
obesidade

nível do hipotálamo (Elowe-Gruau et al., 2013). O tratamento da obesidade e de distúrbios alimentares neste tipo de lesões são extremamente complicados, tendo recomendações para início precoce de intervenções profiláticas em doentes com risco de obesidade (Iughetti & Bruzzi, 2011).

2.5. Objetivos

Objetivo Geral

Verificar e avaliar a interligação entre a ação de antioxidantes e do *stress* oxidativo num modelo celular obesidade de tumores radorresistentes (Glioma e Melanoma) submetidas a Radioterapia.

Objetivos Específicos

1. Verificar e avaliar a interligação entre a indução de *stress* oxidativo em células tumorais de glioma e melanoma.
 - a. Em células cultivadas em meio de cultura condicionado com adipócitos e submetidas a Radioterapia.
 - b. Em células cultivadas em meio não condicionado e submetidas a Radioterapia.

2. Verificar e avaliar a interligação entre a utilização de antioxidantes, nomeadamente do ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) em células tumorais de Glioma.
 - a. Em células cultivadas em meio de cultura condicionado com adipócitos e submetidas a Radioterapia.
 - b. Em células cultivadas em meio não condicionado e submetidas a Radioterapia.

3. Avaliar a interligação entre a utilização de antioxidantes e a indução de *stress* oxidativo em células tumorais de glioma e melanoma.
 - a. Em células cultivadas em meio de cultura condicionado com adipócitos e submetidas a Radioterapia.
 - b. Em células cultivadas em meio não condicionado e submetidas a Radioterapia.

4. Avaliar as glutatonas pelo rácio GSH/GSSG, mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

5. Avaliar o *status* antioxidante total (TAS), nas condições em avaliação supracitadas.
6. Avaliação da peroxidação lipídica pelo método TBARS, nas condições em avaliação supracitadas, por métodos colorimétricos.
7. Avaliação a atividade da enzimática da catalase (CAT) por utilização de métodos colorimétricos, nas condições em avaliação supracitadas.

CAPITULO II

-Material e Métodos-

3. Material e Métodos

O desenho deste estudo experimental assenta no propósito de estudar os mecanismos redox nas linhas celulares de glioma e melanoma, pela ação de um agente oxidante (tBOOH), de um agente antioxidante (TUDCA) e da sua combinação (tBOOH+TUDCA), em modelo *in vitro* de obesidade (meio condicionado) e em modelo de não obesidade (meio de cultura não condicionado). Com posterior irradiação das linhas celulares em estudo, objetivando-se a análise do comportamento biológico celular.

3.1. Culturas Celulares

As células BC3H1 (ATCC CRL®-143) de tumor glioma de ratinho e a linha celular B16F10 (ATCC CRL®-6475) de melanoma de ratinho foram mantidas em atmosfera humidificada com 5% de dióxido de carbono (CO₂) a uma temperatura de 37°C. Ambas as linhas celulares foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma), suplementado com soro fetal de bovino (Sigma) a uma concentração final de 20% para as células BC3H1 e 10% para os melanócitos B16F10.

3.2. Meio Condicionado

Diferenciação dos Adipócitos e colheita do Meio Condicionado

Os pré-adipócitos 3T3-L1 foram semeados, aguardando-se que os mesmos atingissem o estado de confluência. Dois dias (Dia 0) após confluência, iniciou-se o processo de diferenciação, com a adição de vários compostos hormonais no meio, nomeadamente 2 µM de insulina (Sigma), 1 µM de dexametasona (Sigma) e 0,25 mM de isobutilmetilxantina (Sigma). Após 3 dias (Dia 3), o meio de indução foi substituído por meio exclusivamente suplementado por insulina. No Dia 6, as culturas foram lavadas com uma solução salina de fosfato tamponado (PBS) e incubadas em meio DMEM sem soro. Depois de 24h (Dia 7), o meio condicionado foi recolhido a partir das culturas de adipócitos, centrifugado a 3000g durante 5 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -80° C para tratamentos subsequentes.

3.3. Tratamentos das culturas celulares

Os tratamentos utilizados consistiram em soluções com concentrações entre 0,25 e 150 µM de tert-butil hidroperóxido (t-BOOH; Sigma) e de ácido tauroursodesoxicólico

(TUDCA, Sigma) em meio DMEM sem soro ou em meio condicionado de adipócitos 3T3-L1. Como controlos foram utilizados os respetivos meios com os compostos em questão.

3.4. Extração celular e recolha de meios

Para a realização dos ensaios recolheu-se o meio de cultura das células BC3H1 após tratamentos/irradiação, sendo este armazenado a -80°C . Em seguida procedeu-se à lavagem das células, com tampão *Phosphate Buffered Saline* (PBS), $\text{pH}=7,6$, realizando-se a lise das mesmas por processamento mecânico (por pipetagem e com recurso à utilização de seringas) em tampão fosfato (0.1M $\text{pH}=6.8$) armazenando-se a -80°C os extratos recolhidos.

4. Métodos

4.1. Irradiação Celular

Após tratamento procedeu-se à irradiação das células BC3H1 semeadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/mL) e placas de 96 poços (5×10^4 células/mL).

Os procedimentos utilizados obedeceram aos normalmente utilizados nos tratamentos de Radioterapia (RT), ou seja, inicialmente realizou-se uma tomografia computadorizada (TC) às placas, para obtenção de imagens necessárias para a realização do plano dosimétrico. As placas foram colocadas no fantoma com 5cm de espessura, de forma a recriar virtualmente uma estrutura biológica. O planeamento dosimétrico foi realizado com recurso à utilização do *software XIO-Release 4.70.02*, com prescrição de dose ao isocentro, 2 campos de tratamento (um antero-posterior (AP) e um postero-anterior (PA)) utilizando a técnica de SAD. A verificação dos dados foi feita através da distância foco-pele, para posicionamento e alinhamento do fantoma aquando a irradiação. A única estrutura delineada para o planeamento dosimétrico foi o *Planned Treatment Volume* (PTV), para prescrição de dose total e avaliação do histograma de dose-volume indicado na **figura 3**.

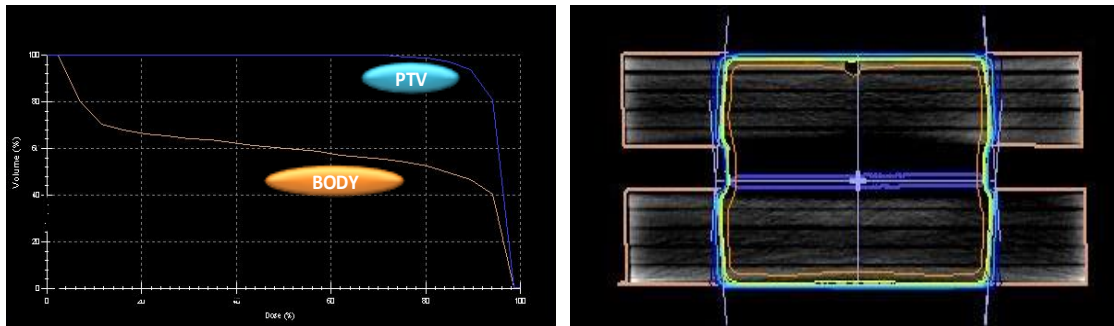


Figura 3: Histograma Dose-Volume e Curvas de Isodose

Assim, as células foram submetidas a Radioterapia num acelerador linear PRIMUS da Siemens®, com uma dose total de 2Gy numa fração única, com energia de feixe de 6 MV num total de 204 unidades monitoras.

4.2. Ensaio MTT (*4,5-dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Semearam-se as células BC3H1 (1×10^5 células/mL) em placas de 96 poços. Após 24 horas o meio foi removido e as células lavadas com PBS. Em seguida aplicaram-se os tratamentos e submeteram-se as células à radiação. Após 4 e 12 horas dos tratamentos/irradiação, adicionaram-se 20µL de MTT por poço, incubando-se a uma temperatura de 37°C, durante 3 horas. Após esse período, dissolveu-se o precipitado de formazano em 100 µL de DMSO. De seguida, determinou-se a absorvância (*ThermoElectrocorporation Multiskan Ascent®*) a 550nm e 650nm.

4.3. TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*)

Utilizou-se um total de 500 µL de amostra (células), adicionando-se 200µL de ácido tricloroacético (50mM, Merk), ficando a incubar em gelo durante 15 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 2200 x g por 15 minutos a 4° C, sendo depois adicionado 100µL de ácido tiobarbitúrico (10% (m/v), Merk) ao sobrenadante, sendo colocadas em banho em ebulição durante 30 minutos.

Após esse tempo, as amostras foram arrefecidas e colocadas numa microplaca de leitura espectrofotométrica para leitura com um comprimento de onda de 492nm.

4.4. Atividade da catalase

O ensaio foi realizado segundo o procedimento do *Enzymatic Assay of Catalase (EC 1.11.1.6) Sigma-Aldrich*, com a utilização do espectrofotómetro *Jenway 6405 UV/ Vis spectrophotometer®*, tendo em conta a absorvância do H₂O₂ de 240nm, nas amostras

(meio de cultura) das células BC3H1. Assim, mediu-se atividade das amostras, individualmente, numa covete QS 10.00mm, conjugando 100 μ L de amostra e 200 μ L de H₂O₂ a 5mM.

Após a leitura no espectrofotómetro, os valores resultantes da atividade da catalase foram registados e posteriormente estatisticamente analisados.

4.5. Glutationas: rácio GSH/GSSG

A avaliação do *stress* oxidativo ao nível das glutatonas foi realizado segundo o método cromatográfico, por HPLC para doseamento da GSH e GSSG, desenvolvido por Peixoto, 2012. A fase móvel utilizada consistiu numa solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) a 5% (v/v). O sistema de cromatografia utilizado denomina-se *Hitachi® High-Performance Liquid Chromatograph LaChrom Elite*, equipado com uma bomba quaternária HTA L-2130; autosampler L-2200, com uma coluna de fase reversa C18, forno de colunas L-2300 e detetor DAD L-2455.

A recolha e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados utilizando o *software* EZChrom Elite, serie LaChrom Elite.

Tabela III: Descrição do Método Cromatográfico

Tempo/min	Fase Móvel	Fluxo
0	H ₃ PO ₄ (5%)	0.8
15	H ₃ PO ₄ (5%)	0.8

A preparação das amostras (células) iniciou-se com adição de 100 μ L de TFA a 500uL de amostra, agitando-se a mistura no vórtex durante 20 segundos e centrifugou-se a 8000 rcf durante 20 minutos. Após a extração de 100 c de sobrenadante procedeu-se à preparação para injeção no sistema cromatográfico.

4.6. Total Antioxidant Status (TAS)

Para a determinação *in vitro* do status total de antioxidantes presentes numa determinada amostra biológica, utilizou-se o *Total Antioxidant Status* (TAS; Randox) de acordo com as instruções do fabricante.

Sucintamente, adicionou-se 4 μL de amostra a 200 μL cromogéneo e determinou-se a absorvância (A1) a 600nm. Em seguida adicionou-se 40 μL de substrato, incubou-se a 37°C durante 15 minutos e determinou-se novamente a absorvância (A2) a 600nm.

O valor do TAS foi calculado pela seguinte fórmula: $\frac{\text{Concentração do padrão}}{(\Delta A \text{ da amostra} - \Delta A \text{ do padrão})}$. Sendo que, $\Delta A = A2 - A1 =$ da amostra/padrão/branco.

4.7. Análise Estatística

Para os diferentes variáveis em observação, contemplado os diferentes tratamentos realizados nas amostras, foram calculados a média e o desvio-padrão das respectivas réplicas dos ensaios, com recurso ao *software* SPSS 20.0 (SPSS Inc., EUA).

Os testes estatísticos não paramétricos utilizados foram o de Wilcoxon para amostras emparelhadas, de Mann-Whitney para amostras independentes, e Kruskal-Wallis para análise simultânea de mais de uma variável, considerando uma significância estatística de $p < 0,05$.

Já a representação gráfica dos dados obtidos foi realizada e editada com o auxílio do *software* de análise gráfica e estatística *GraphPad Prism 6*.

CAPITULO III

-Resultados-

5. Resultados

A avaliação da ação de agentes oxidativos (t-BOOH) e antioxidantes (TUDCA) na viabilidade nas linhas celulares de Glioma (BC3H1) e da sua ação ao nível do *stress* oxidativo é um dos objetivos deste estudo. Esta relação foi abordada sob diferentes condições experimentais, tais como, exposição e não exposição a Radioterapia e em modelo celular de não obesidade e obesidade (com e sem Meio Condicionado obtido de adipócitos diferenciados da linha celular 3T3-L1).

5.1. Curva de concentração-resposta de t-BOOH e TUDCA nas linhas celulares BC3H1

O t-BOOH atua como substrato da enzima Catalase (Cesquini, Torsoni, Stoppa, & Ogo, 2003), apresentando-se como um composto orgânico oxidante com ação ao nível membranar, com ampla utilização na indução de *stress* oxidativo, incluindo em estudos de modelos tumorais cerebrais (Friedemann et al., 2014). Os mecanismos de ação do t-BOOH alteram as concentrações homeostáticas internas do Ca^{2+} , reduzem compostos com grupos tiol e provoca a rutura das cadeias de DNA e induzindo peroxidação lipídica (Pereira A.C, 2012)

O ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) é um ácido biliar endógeno, produzido em quantidades residuais. O TUDCA possui propriedades anti-apoptóticas (Yanguas-Casás, Barreda-Manso, Nieto-Sampedro, & Romero-Ramírez, 2014), por modulação da membrana mitocondrial, citocromo c, ativação das caspases e instabilidade nuclear associada, bloqueando a apoptose através do bloqueio dos sinais de sobrevivência via PI3K (R. E. Castro, Solá, Ramalho, Steer, & Rodrigues, 2004). Biologicamente, o TUDCA é também um composto antioxidante, pelas propriedades que possui na inibição direta da produção de ROS (Kim, Kwon, Jung, Sung, & Park, 2011a; Liu et al., 2013; Shi et al., 2013; Zhao & Lawless, 2013) e diminuição do *stress* do reticulo endoplasmático (Berger & Haller, 2011; Pusch et al., 2008; Rivard et al., 2007).

A resposta celular ao t-BOOH varia de linha celular para linha celular. Desta forma, elaborou-se uma reta de concentração-resposta entre a concentração do agente indutor de *stress* e a viabilidade celular perante a agressão, confirmada pelo método *MTT* 12h após o tratamento.

Por sua vez, as concentrações de TUDCA necessárias para desenvolver uma resposta celular no modelo celular em estudo não se encontram claramente descritas na literatura, sabendo-se que este composto pode exercer uma ação citotóxica a nível celular entre 50-800 μ mol/l (Carubbi, Guicciardi, & Concari, 2002).

Assim, testaram-se as seguintes concentrações dos dois compostos: 150 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M e 0,25 μ M na linha celular BC3H1 (Fig. 1 A).

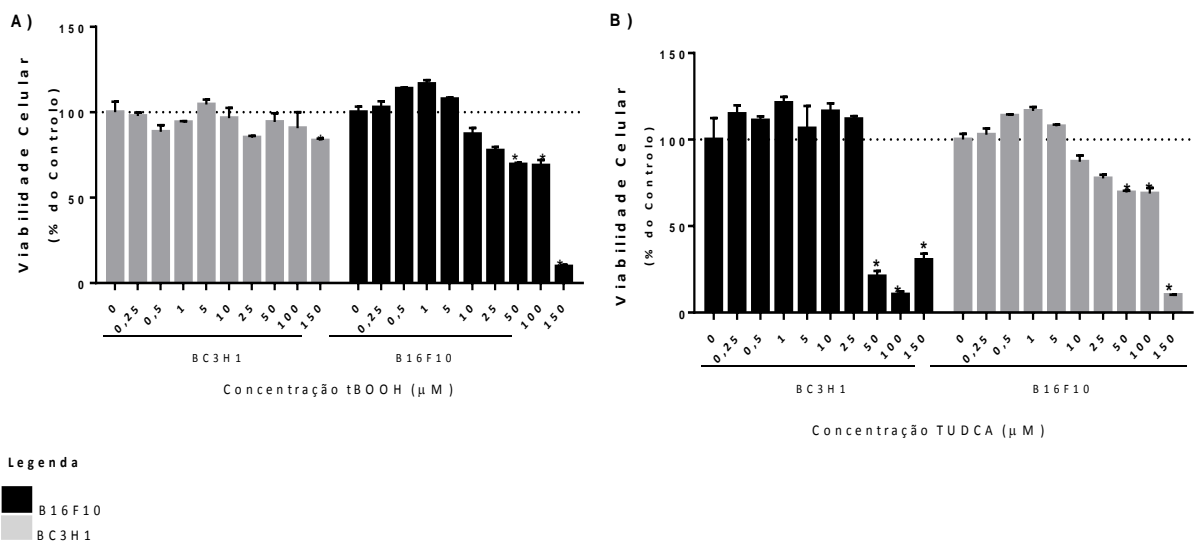


Figura 4: Curvas de dose-resposta para o t-BOOH e TUDCA. Avaliou-se a viabilidade das linhas celulares BC3H1 e B16F10 pelo método do *MTT*. As células foram tratadas com concentrações crescentes de t-BOOH (A), e TUDCA (B) (0,25; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100 e 150 μ M). Os resultados estão expressos como % do controlo e estão apresentados como média aritmética \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Após análise dos resultados obtidos com o t-BOOH, optou-se pela utilização da concentração de 150 μ M no caso das BC3H1 e uma concentração de 50 μ M, dado que se observou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular. Relativamente ao TUDCA, facilmente se constata que várias das concentrações utilizadas diminuem significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular quando comparadas com o controlo, permitindo fazer uma inferência sobre as doses de tolerância e toxicidade do TUDCA no modelo celular em estudo. Desta forma, utilizou-se para tratamento das BC3H1 uma concentração de 25 μ M e uma concentração de 1 μ M no caso das B16F10, já que o intuito deste estudo não contempla a citotoxicidade do TUDCA.

5.2. Efeitos t-BOOH e TUDCA nas linhas celulares BC3H1

Após determinação das concentrações de t-BOOH e TUDCA ideais para os ensaios, procedeu-se ao estudo da influência destes mesmos compostos na viabilidade celular e no *stress* oxidativo, ao longo tempo (às 4h e às 12h).

5.2.1. Viabilidade Celular

Após o tratamento das BC3H1 e das B16F10 com as concentrações dos compostos definidas anteriormente, realizou-se o teste *MTT* às 4h e 12h.

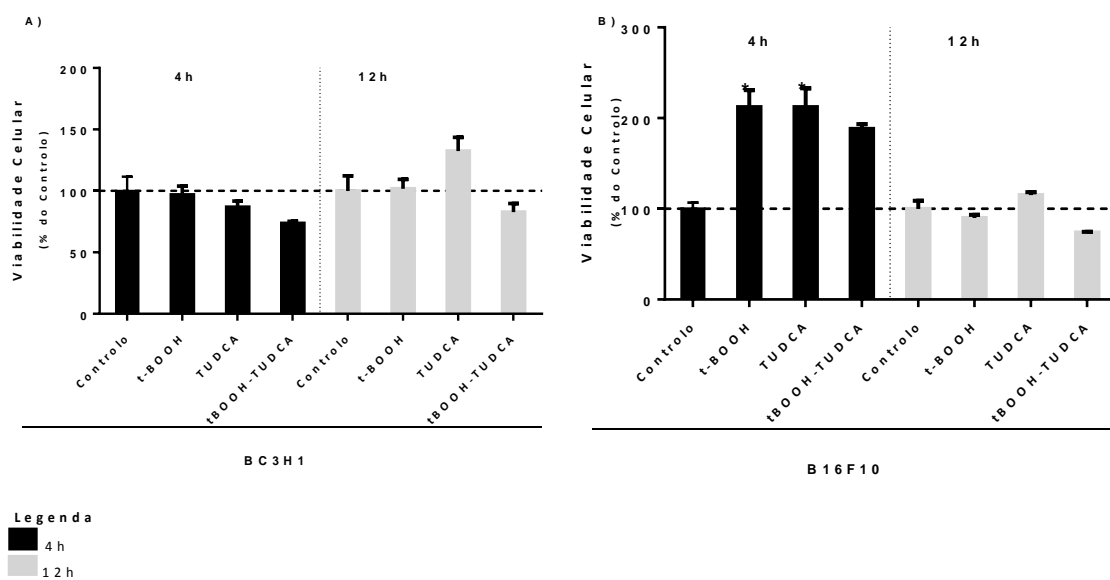


Figura 5: Efeito do t-BOOH e TUDCA na viabilidade das linhas celulares BC3H1 e B16F10. Efeito de t-BOOH (150 μ M e 50 μ M), TUDCA (25 μ M e 1 μ M) e t-BOOH + TUDCA na viabilidade da linha celular BC3H1 e B16F10, respetivamente, às 4horas e às 12horas. Os resultados estão expressos como % do controlo e estão apresentados como média aritmética \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Na linha celular BC3H1 (Fig. 5A) os resultados obtidos com o tratamento dos compostos em estudo permitiram inferir que a concentração de t-BOOH utilizada não provocou variações significativas na viabilidade, às 4h. Contudo, com o TUDCA observou-se um aumento da viabilidade, às 12h, o que pressupõe que o composto tem influência nos mecanismos de sobrevivência, neste modelo celular. Em relação aos resultados obtidos na conjugação dos dois compostos, t-BOOH + TUDCA, observou-se

uma diminuição ($p < 0,05$) da viabilidade celular às 4h e uma tendência de diminuição na viabilidade celular de 18% às 12h.

Na linha celular B16F10 (Fig. 5B) verificou-se um aumento significativo da viabilidade com adição de t-BOOH e TUDCA ($p=0,028$). Observando-se uma alteração da viabilidade ao longo do tempo, ou seja, há uma diminuição da viabilidade das 4h para as 12h nas amostras que receberam os compostos, existindo uma alteração do comportamento celular dependente do fator tempo de exposição.

5.2.2. Avaliação do *Stress* Oxidativo

Com o intuito de avaliar o efeito do t-BOOH e do TUDCA no *stress* oxidativo realizou-se o teste TBARS, para quantificação do malonaldeído (MDA; marcador celular de *stress* oxidativo por peroxidação lipídica); quantificação da atividade da catalase, enzima antioxidante responsável pela decomposição de H_2O_2 ; avaliação do índice redox da Glutathione, por quantificação da GSH; e, determinação do *status* antioxidante total (TAS), nos extratos recolhidos da linha celular BC3H1.

Impacto da Radioterapia no *stress* oxidativo em modelos celulares radorresistentes em contexto de obesidade

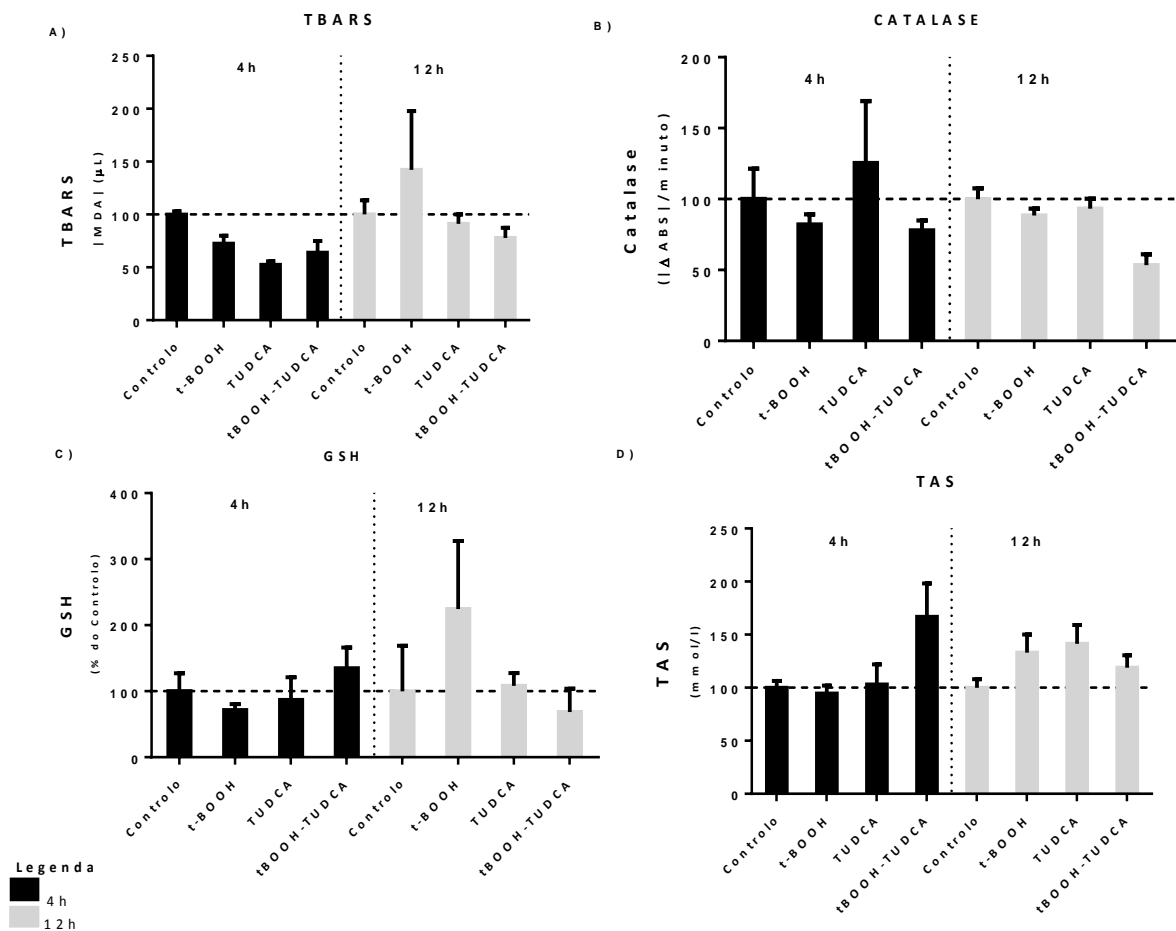


Figura 6: Avaliação do efeito do t-BOOH e TUDCA no *stress* oxidativo nas BC3H1. A) Teste TBARS, realizado em meio de cultura das BC3H1 em amostras sem tratamento, com t-BOOH, com TUDCA e com t-BOOH + TUDCA, às 4horas e às 12horas. B) Determinação da atividade da Catalase realizado em meio de cultura das BC3H1, em amostras sem tratamento, com t-BOOH, com TUDCA e com t-BOOH + TUDCA, às 4horas e às 12horas. C) Avaliação do índice redox da Glutaciona em células sem tratamento, com t-BOOH, com TUDCA e com t-BOOH + TUDCA, às 4horas e às 12horas. D) Total Antioxidant Assay realizado nas células BC3H1 em amostras sem tratamento, com t-BOOH, com TUDCA e com t-BOOH + TUDCA às 4horas e às 12horas. Os resultados estão expressos como % do controlo e estão apresentados como média aritmética \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Relativamente aos resultados obtidos pelo teste TBARS (Fig. 6A) observou-se que existem diferenças não significativas na % de MDA às 4h e às 12h, observando-se uma diminuição dos níveis deste marcador de peroxidação lipídica às 12h em todos os tratamentos (Controlo, t-BOOH, TUDCA e t-BOOH+TUDCA).

No que diz respeito à atividade da catalase (Fig. 6B), registou-se uma tendência de 25% de aumento da sua atividade após o tratamento com TUDCA, logo às 4h. Pelo contrário, às 12h verificou-se uma tendência de diminuição da atividade da catalase, sendo essa diminuição mais acentuada (47%) após o tratamento combinado entre o t-BOOH e TUDCA.

Na avaliação do índice *redox* da Glutathionas (Fig. 6C), observou-se, às 4h, uma tendência para o aumento da quantificação da GSH nas amostras tratadas com t-BOOH+TUDCA (34% face ao controlo). Às 12h, nas amostras tratadas com t-BOOH observou-se um aumento de 124% da GSH. Por outro lado, no tratamento com t-BOOH+TUDCA obteve-se uma diminuição de 60% face ao valor obtido às 4h para a mesma amostra. Neste ensaio, não foram observadas alterações significativas após o tratamento das linhas celulares com TUDCA.

Relativamente ao *status* antioxidante total (TAS) (Fig. 6D), registou-se uma tendência no aumento da atividade dos mecanismos celulares antioxidantes das 4h para as 12h, em todas as condições. Após o tratamento com t-BOOH+TUDCA foi observado um aumento de 66%, relativamente ao controlo. Por outro lado, às 12h, existiu um aumento da concentração dos antioxidantes de 33% e 41% nas amostras tratadas com t-BOOH e TUDCA, respetivamente. Observou-se também uma redução de 30% na capacidade antioxidante das células tratadas com t-BOOH+TUDCA relativamente ao controlo.

5.3. Efeito da radiação nas linhas celulares nas diferentes condições

Para perceber a influência da radiação no modelo celular em estudo e a sua interação com os compostos em análise, procedeu-se ao estudo nas mesmas condições e concentrações dos compostos, submetendo-se a Radioterapia a linha celular, com uma dose total de 2Gy.

5.3.1. Viabilidade Celular

Para a determinação da viabilidade, as células foram tratadas com t-BOOH (150 μ M e 50 μ M) e TUDCA (25 μ M e 1 μ M) e, posteriormente, sujeitas a Radioterapia. A viabilidade celular foi determinada, pelo método *MTT*, 4h e 12h após a irradiação.

Impacto da Radioterapia no *stress* oxidativo em modelos celulares radorresistentes em contexto de obesidade

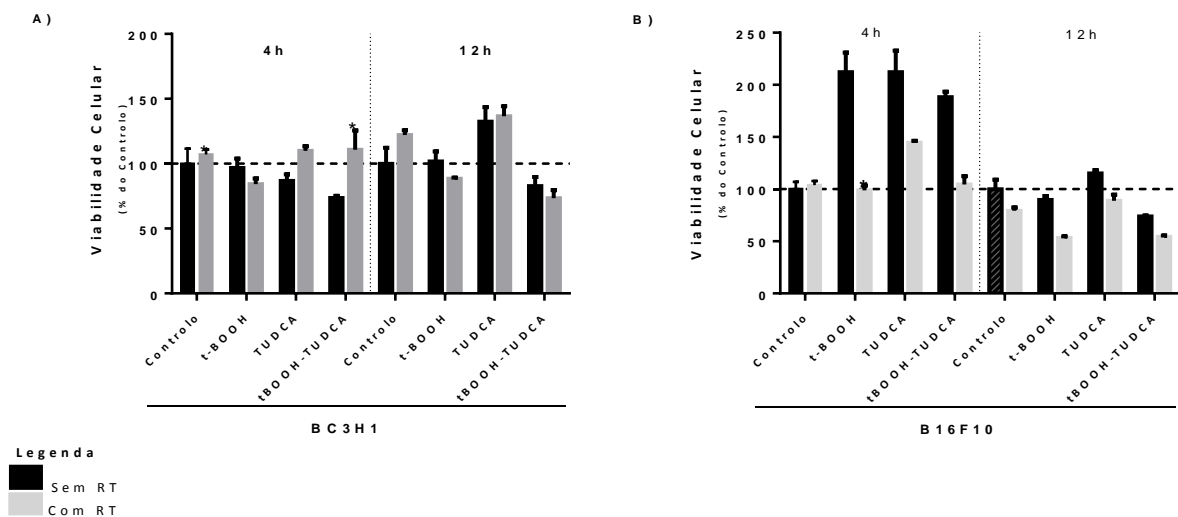


Figura 7: Viabilidade celular das BC3H1 e das B16F10 com Radioterapia. Efeito de t-BOOH (150 μ M e 50 μ M), TUDCA (25 μ M e 1 μ M) e t-BOOH + TUDCA na viabilidade das BC3H1 e B16F10, em meio sem soro, às 4 e 12 horas. Os resultados estão expressos como % do respetivo controlo e estão apresentados como média aritmética \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Na linha celular BC3H1 (Fig. 7A) às 4h, o aumento de viabilidade observado nas células tratadas com TUDCA e t-BOOH + TUDCA não é significativo, contudo realizando o paralelismo com as células não irradiadas, verificou-se um aumento estatisticamente significativo ($p=0,028$) nas células irradiadas e com TUDCA. Às 12h, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras irradiadas e não irradiadas, contudo verificou-se uma diminuição da viabilidade de 18% nas amostras com t-BOOH + TUDCA.

Na linha celular B16F10 (Fig. 7B) às 4h, observa-se uma diminuição significativa ($p=0,028$) da viabilidade celular nas células que receberam t-BOOH e foram irradiadas. Às 12h, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras irradiadas e não irradiadas, contudo verificou-se uma tendência de diminuição da viabilidade das 4h para as 12h, em todas as amostras.

5.3.2. Avaliação do *stress* Oxidativo

Para avaliação do *stress* oxidativo na linha celular BC3H1 após o tratamento com t-BOOH e TUDCA, t-BOOH+TUDCA e submetida a RT, realizou-se o teste TBARS;

quantificação da atividade da enzima catalase; avaliação do índice redox da Glutaciona, por quantificação da GSH; e, determinação do *status* antioxidante total (TAS).

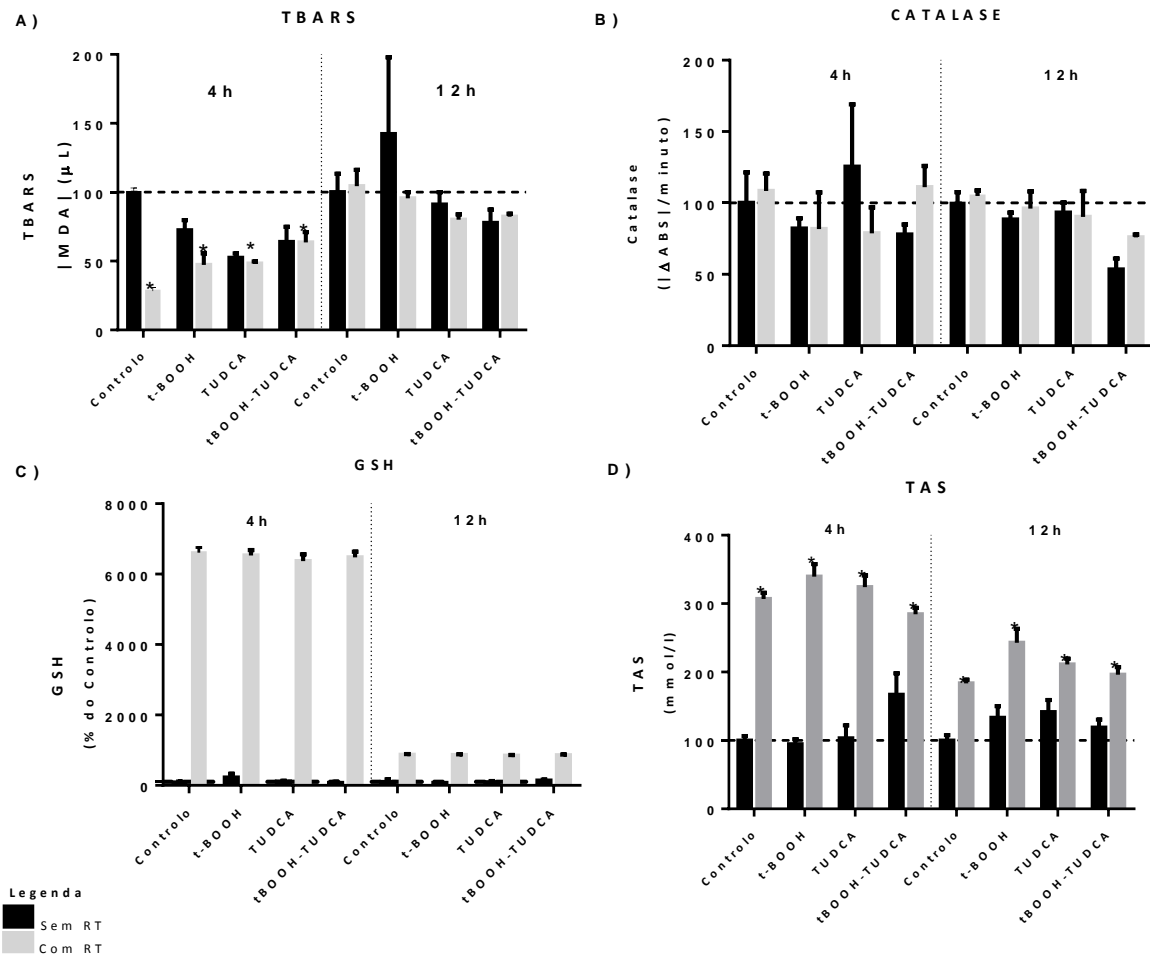


Figura 8: Avaliação do *stress* oxidativo na linha celular BC3H1, tratada com t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA, submetida a radioterapia, às 4 e 12h. A) Teste TBARS. B) Avaliação a atividade da Catalase. C) Avaliação das Glutacionas, por quantificação da GSH. D) *Total Antioxidant Status*. Os resultados estão expressos como % do respetivo controlo e são apresentados como média aritmética ± SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Na avaliação dos resultados obtidos com o teste TBARS (Fig. 8A) no meio de cultura das BC3H1 irradiadas todas as amostras apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os respetivos controlos, não irradiados, (amostra sem tratamento ($p=0,002$), tratadas com t-BOOH ($p=0,080$), com TUDCA ($p=0,002$) e com t-BOOH + TUDCA ($p=0,002$)). Observaram-se também diferenças estatisticamente significativas ($p=0,002$), quando comparadas às 4h e às 12h.

Relativamente ao ensaio da catalase (Fig. 8B), os dados obtidos às 4h e 12h, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as células irradiadas face às não irradiadas. Às 4h, observou-se uma diminuição de 20%, na atividade da catalase, nos tratamentos com t-BOOH e TUDCA face às células irradiadas sem compostos. Curiosamente, observou-se um aumento de 11% da atividade da catalase às 4 horas, no meio de cultura irradiado com os dois compostos. Já às 12h, as maiores diferenças verificaram-se nas amostras irradiadas e tratadas com os ambos compostos, que curiosamente tiveram uma tendência de diminuição de 25% face ao controlo, acompanhando a tendência das amostras tratadas com os dois compostos não irradiadas.

Por sua vez, comparando os resultados obtidos pela quantificação da GSH (Fig. 8C) nas células irradiadas às 4h obteve-se diferenças em todas as amostras face ao controlo na ordem dos 6000%, e também às 12h, também se verificam diferenças, mais baixas face às 4h, mas mesmo assim na ordem dos 800%.

Relativamente aos dados obtidos pela avaliação do TAS (Fig. 8D), nas células irradiadas sem tratamento, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p=0,041$) face às não irradiadas sem tratamento, independentemente da variável tempo. Às 4h em todas as células irradiadas da linha celular BC3H1 avaliadas obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas (amostra sem composto ($p=0,004$), com t-BOOH ($p=0,002$), com TUDCA ($p=0,002$) e com t-BOOH + TUDCA ($p=0,002$)). Às 12h observou-se uma tendência de diminuição do *status* antioxidante total face às 4h, mas mesmo assim observou-se diferenças significativas entre as amostras em avaliação (amostra sem composto ($p=0,015$), com t-BOOH ($p=0,002$), com TUDCA ($p=0,002$) e com t-BOOH + TUDCA ($p=0,002$)).

5.4. Efeito do Compostos nas linhas celulares em estudo com Meio Condicionado

Após a verificação da influência da radiação na alteração da viabilidade celular e do *stress* oxidativo na linha em estudo, decidiu-se explorar o efeito da obesidade para as mesmas condições e concentrações dos compostos em estudo (t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA), pelo condicionamento do meio de cultura (MC), proveniente da cultura da linha celular 3T3-L1.

5.4.1. Viabilidade Celular

Após a exposição das células, BC3H1 e B16F10, ao meio condicionado (MC), realizou-se o teste *MTT* para a avaliação da viabilidade celular às 4 e 12h.

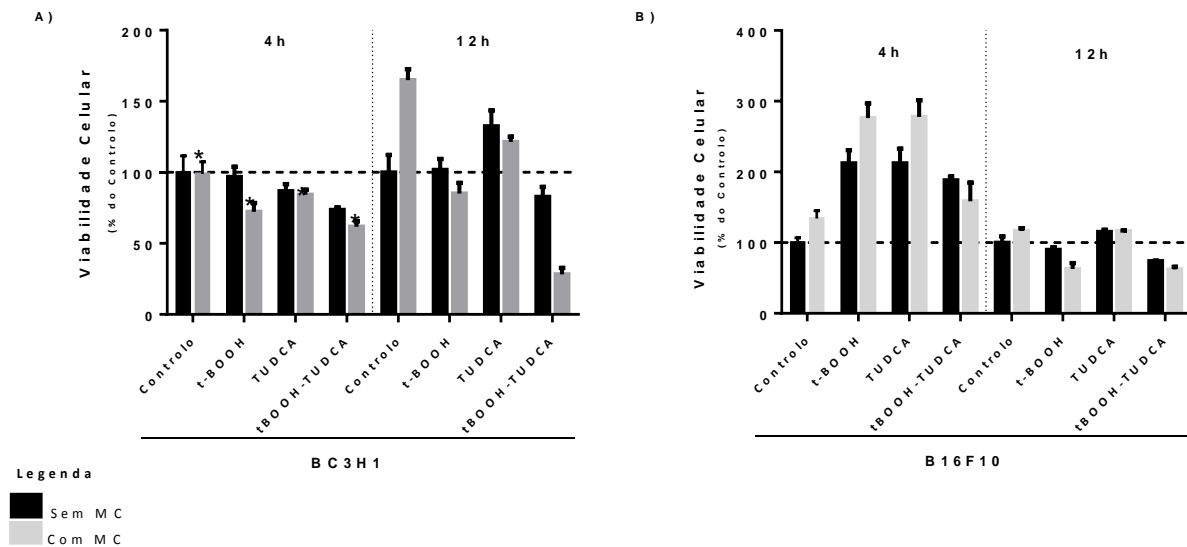


Figura 9: Efeito do t-BOOH (150 µM), TUDCA (25 µM) e t-BOOH + TUDCA na viabilidade células BC3H1, após a exposição ao meio condicionado durante 4 e 12horas. Os resultados estão expressos como % do respetivo controlo e estão apresentados como média aritmética ± SEM (* p <0,05 em relação ao controlo).

Atendendo aos resultados obtidos no ensaio *MTT* às 4h nas células BC3H1 (Fig. 9A), obteve-se uma diminuição da viabilidade nos tratamentos com MC face aos sem MC, ($p < 0,05$). Na comparação da variável tempo existem diferenças significativas entre as 4h e as 12h, ($p=0,029$), entre as várias amostras em análise.

Na linha celular B16F10 (Fig. 9B), obteve-se um aumento da viabilidade, não significativo, nos tratamentos com MC face aos sem MC, às 4h. Os resultados obtidos às 12h acompanharam a tendência de diminuição da viabilidade dos controlos para esse *timepoint*.

5.4.2. Avaliação do *Stress Oxidativo*

Com o intuito de avaliar o efeito dos tratamentos com t-BOOH e TUDCA no *stress* oxidativo e Meio Condicionado, realizou-se o teste TBARS, para quantificação do Malonaldeído (MDA) (marcador celular de *stress* oxidativo); quantificação da atividade

da Catalase; avaliação das Glutationas, por quantificação da GSH; e, determinação do *status* antioxidante total (TAS), nas amostras recolhidas da linha celular BC3H1.

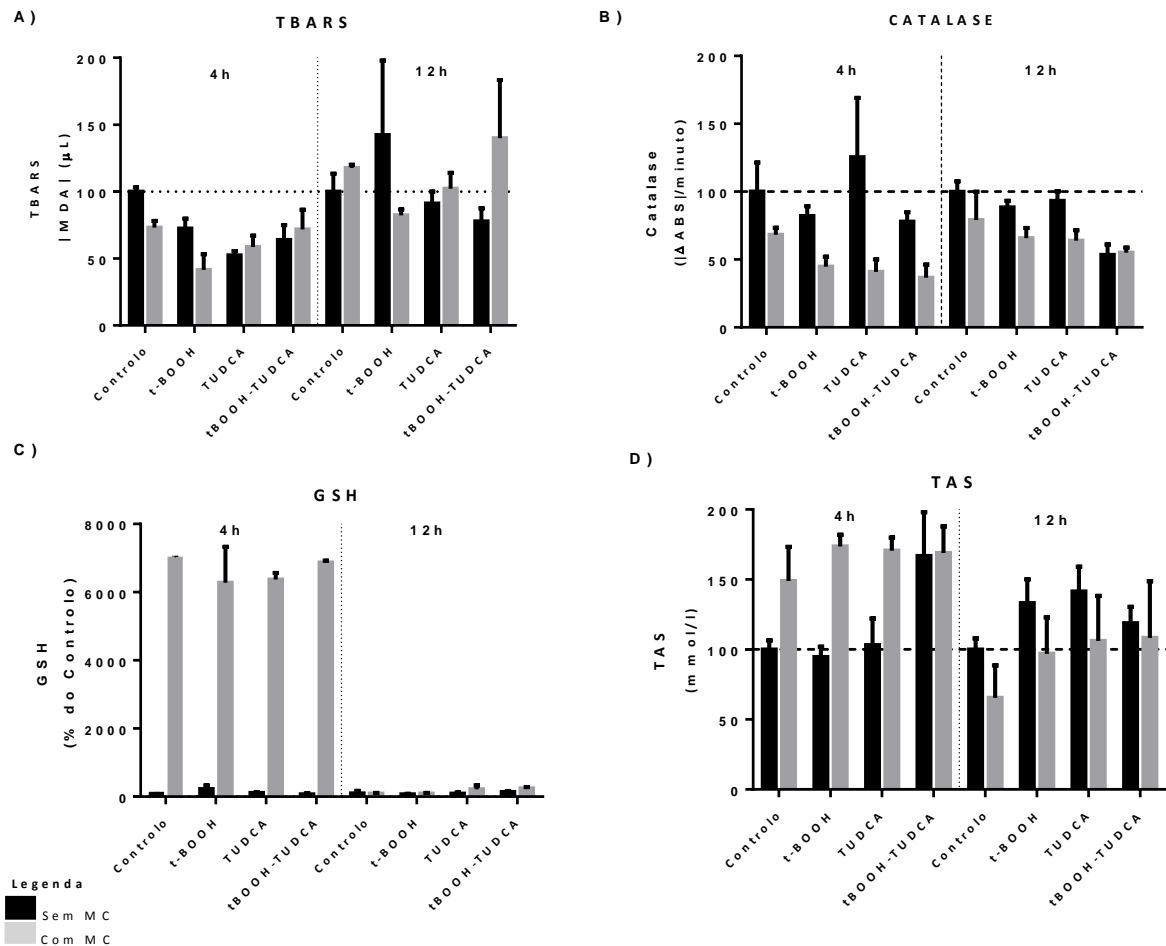


Figura 10: Avaliação do *stress* Oxidativo na linha celular BC3H1, tratada com t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA, e expostas a meio condicionado (MC). A) Teste TBARS. B) Avaliação da atividade da Catalase. C) Avaliação das Glutationas, por quantificação da GSH. D) Total Antioxidant Assay. Os resultados estão expressos como % do respetivo controlo e estão apresentados como média aritmética \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Após o teste TBARS (Fig. 10A) nas BC3H1 com MC, observaram-se diferenças entre as 4h e 12h, às 4h verificou-se uma diminuição na concentração de MDA no meio de cultura com MC. Após o tratamento com t-BOOH obteve-se uma redução de 59%, da concentração de MDA. Por outro lado, às 12h, os dois compostos (t-BOOH+TUDCA) aumentaram a quantidade de MDA em 40%, face às amostras sem compostos.

Em relação ao ensaio da catalase (Fig. 10B), obteve-se uma redução da sua atividade na presença de MC, quer às 4h como às 12h. Observou-se ainda, às 4h, uma redução de 32% da sua atividade nas amostras sem compostos, obtendo-se reduções mais acentuadas com adição dos compostos. Relativamente à quantificação da atividade da enzima catalase realizada às 12h, nas amostras com MC sem compostos registou-se uma redução de 21% face ao controlo.

Os resultados obtidos através da avaliação da GSH (Fig. 10C), após adição de MC, indicaram uma tendência de aumento da sua concentração, em todas as amostras, em especial às 4h após tratamento.

Na avaliação do *status* total de antioxidantes (Fig. 10D), às 4h, após o tratamento com t-BOOH, TUDCA e t-BOOH+TUDCA obteve-se um aumento de 73%, 70% e 68%, respetivamente e às 12h, verificou-se uma diminuição de 35% no meio de cultura celular com MC, sem compostos.

5.5. Efeito dos tratamentos nas linhas celulares em estudo com Radioterapia e Meio Condicionado

Os resultados relativos às amostras expostas a Radioterapia e incubadas com meio condicionado (MC), quando comparadas com amostras controlo (sem RT e sem MC), observam-se diferenças, quer ao nível da viabilidade celular como variações nos marcadores do *stress* oxidativo, que suscitaram a necessidade de estudar o comportamento celular das BC3H1 com as duas condições (Radioterapia e Meio Condicionado) simultaneamente, para os tratamentos em estudo (t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA).

Desta forma, as células foram expostas a meio condicionado (4h e 12h) e submetidas a Radioterapia, com uma dose total de 2Gy.

5.5.1. Viabilidade Celular

Após a exposição das células ao meio condicionado e o tratamento com t-BOOH e TUDCA, com as concentrações previamente determinadas anteriormente para as duas linhas celulares, submeteram-se as células a RT, realizando-se o teste *MTT* às 4h e 12horas.

Os resultados da viabilidade celular obtidos foram comparados com os resultados relativos às amostras sem exposição ao meio condicionado e sem tratamento de RT (o Controlo).

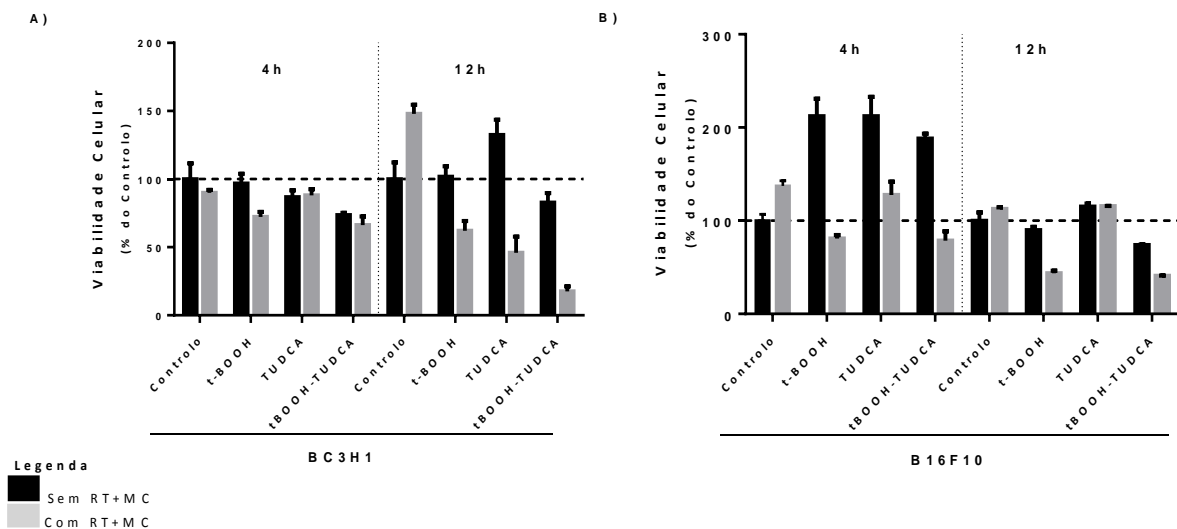


Figura 11: Efeito de t-BOOH (150 μ M e 50 μ M), TUDCA (25 μ M e 1 μ M) e t-BOOH + TUDCA na viabilidade da linha celular BC3H1 e B16F10, respetivamente, após a exposição ao meio condicionado durante 4 e 12 horas e Radiação. Os resultados estão expressos como % do respetivo controlo e estão apresentados como média aritmética \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Os resultados obtidos pelo ensaio *MTT* às 4h para a linha celular BC3H1 (Fig. 11A), demonstraram uma tendência da diminuição da viabilidade das células expostas a RT com MC. Já no teste *MTT* realizado às 12h, essa tendência é mais evidente principalmente comparando os dados obtidos nas amostras de t-BOOH (55%), as de TUDCA e de t-BOOH+TUDCA (83%) com as amostras sem compostos. Visto que, se observou uma tendência de aumento da viabilidade celular em cerca de (48%), face ao controlo, nas células sem compostos e com MC submetidas a RT.

Os resultados obtidos pelo ensaio *MTT* às 4h para a linha celular B16F10 (Fig. 11B), demonstraram uma tendência da diminuição da viabilidade das células expostas a RT com MC, comparativamente com os controlos. Já no teste *MTT* realizado às 12h, verifica-se uma diminuição da viabilidade face às 4h, sem nenhum resultado significativo.

5.5.2. Avaliação do *stress* Oxidativo

Para avaliação do *stress* oxidativo após a exposição a Radioterapia e Meio Condicionado realizou-se o teste TBARS; quantificação da atividade da catalase; avaliação das Glutationas, por quantificação da GSH; e, determinação do *status* antioxidante total (TAS), nas amostras recolhidas da linha celular BC3H1.

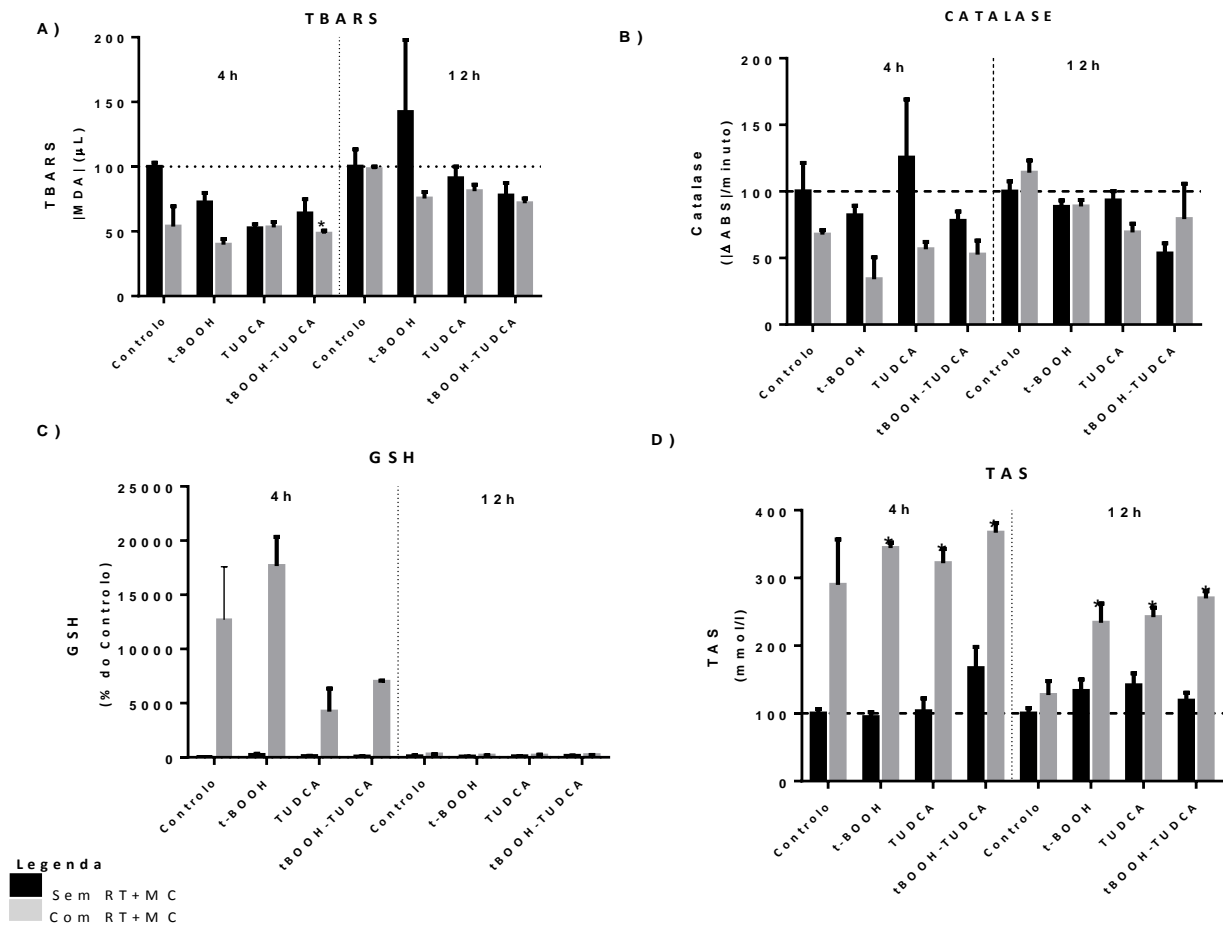


Figura 12: Avaliação do *stress* oxidativo na linha celular BC3H1, tratada com t-BOOH, TUDCA e t-BOOH + TUDCA, e expostas a radiação e meio condicionado durante 4 e 12h. A) Teste TBARS. B) Catalase. C) Avaliação das Glutationas. D) *Total Antioxidant Assay* (TAS). Os resultados estão expressos como % do respetivo controlo e estão apresentados como média aritmética \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controlo).

Avaliando os resultados obtidos com o teste TBARS na linha celular BC3H1 (Fig. 12A) nas amostras expostas a meio condicionado e submetidas a RT verificou-se uma tendência de diminuição da concentração de MDA quer às 4h como às 12h.

Relativamente às 4h, observou-se uma diminuição de 47% nas amostras sem compostos, de 61% com t-BOOH, de 47% com TUDCA e 52% nas células tratadas com t-BOOH+TUDCA ($p=0,002$). Às 12h obteve-se uma tendência de diminuição de 25% com t-BOOH, de 19% com TUDCA e 29% nas amostras com t-BOOH+TUDCA.

Após o estudo da atividade da enzima catalase (Fig. 12B) os resultados diferenciaram-se nas 4h para as 12h. Assim observou-se que às 4h a atividade da catalase diminuiu em todas as amostras em análise. Por outro lado, às 12h verificou-se uma tendência de aumento.

A avaliação das Glutationas pela quantificação da GSH (Fig. 12C), revelou um aumento tendencial da percentagem de GSH, para valores muito superiores aos registados nos ensaios anteriores, principalmente nas amostras com t-BOOH. Às 12h, observou-se uma tendência de diminuição acentuada em todas as amostras, registando-se ainda assim um aumento na concentração de GSH face ao controlo, em todas as amostras.

Da avaliação do TAS (Fig. 12D), facilmente se observam diferenças das amostras com e sem RT+MC para as 4h e 12h. Desta forma constataram-se diferenças significativas ($p=0,002$), às 4h, das amostras com RT+MC face ao controlo. Tendo sido ainda encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,002$) entre as amostras com compostos comparativamente às células não expostas aos compostos. Relativamente aos resultados obtidos nas amostras avaliadas às 12h, obteve-se uma tendência de aumento do TAS nas amostras tratadas com os compostos, verificando-se um aumento de 133% com t-BOOH, de 142% com TUDCA, e de 169% com t-BOOH+TUDCA.

CAPITULO IV

-Discussão-

6. Discussão

O estudo da bioatividade do t-BOOH e do TUDCA na linha celular BC3H1 revelou diferenças nos mecanismos de ação biológica, quer ao nível da viabilidade celular, quer no *stress* oxidativo.

Os dados obtidos ao nível da viabilidade celular das B16F10, embora não sejam significativos, demonstraram que os compostos utilizados poderão ter influência sobre o comportamento desta linha celular. Contudo, será necessário realizar mais estudos neste sentido, sendo que até à altura de publicação desta dissertação ainda se encontra em estudo e análise os resultados da influência dos compostos (t-BOOH e TUDCA) ao nível do *stress* oxidativo, para esta linha celular.

O t-BOOH +TUDCA diminui a viabilidade celular

Os biomarcadores de *stress* oxidativo analisados nas células e no meio de cultura das BC3H1, demonstraram que a concentração de t-BOOH utilizada não provocou variações significativas na viabilidade celular, ou seja, deveria ter sido utilizada uma concentração superior para se obter um efeito citotóxico mais exacerbado. Na avaliação do *stress* oxidativo nos substratos tratados com t-BOOH, a concentração de MDA e GSH aumentaram somente às 12h, acontecimento que poderá estar relacionado com a resistência do próprio modelo celular à ação oxidante do composto.

Os dados obtidos das amostras com TUDCA permitiram verificar a sua influência na diminuição do *stress* oxidativo, o aumento da atividade da catalase (principalmente às 4h), o aumento do *status* antioxidante total e do aumento da concentração de GSH, justificado pela sua ação antioxidante e neuroprotetora (Gaspar et al., 2013).

Ao nível da viabilidade celular, o TUDCA nas BC3H1 provocou um aumento da sua viabilidade às 12h, evidenciando um possível comportamento de ação anti-apoptótico que o TUDCA já apresentou noutros estudos com outros modelos celulares, nomeadamente ao nível dos hepatócitos (Benz et al., 1998).

O tratamento simultâneo das células BC3H1 com t-BOOH e TUDCA revelou que os dois compostos juntos tendencialmente diminuem o *stress* oxidativo nas células, aumentando o *status* antioxidante total às 4h. Estes resultados podem dever-se à ação neuroprotetora e anti-inflamatória do TUDCA, como anteriormente verificado por

outros autores, em modelos celulares e animais de doenças inflamatórias do SNC (Yanguas-Casás et al., 2014). Contudo, verificou-se uma tendência para a diminuição da viabilidade celular às 4h e às 12h nas amostras que receberam TUDCA e t-BOOH, o que poderá ser explicado por interferências nos mecanismos de modelação da apoptose que o TUDCA exerce nas células neuronais (R. E. Castro et al., 2004) em sinergia com a ação oxidativa do t-BOOH. ~

A Radioterapia influencia a resposta de defesa celular antioxidante, nas BC3H1.

A ação da radiação nas células permitiu perceber, que isoladamente, esta desencadeia uma forte resposta antioxidante, com o aumento do *status* antioxidante total e da concentração de GSH em todas as amostras submetidas a radioterapia às 4h e às 12h. Alterações na expressão das enzimas antioxidantes em gliomas, reportados na literatura, atribuem ao aumento da atividade enzimática a indução de mecanismos de radorresistência, característicos deste tipo de carcinoma (Smith et al., 2007).

O aumento da viabilidade celular observada nas amostras sem compostos e submetidas a radioterapia é explicado pelos mecanismos de reparação dos danos subletais induzidos pela radiação. A capacidade de reparação dos danos depende do tipo de célula e tecido celular, sabendo-se que em células radorresistentes os mecanismos de reparação celular atuam de forma mais ativa, as taxas de morte celular por efeitos da radiação diminuem (Joiner, 2009).

A complexidade dos danos provocados pela radiação ionizante varia com a tipologia celular, o tempo de exposição, parâmetros de tolerância biológica dos tecidos, entre outros fatores (Worzniak et al., 2012), e neste estudo em específico, a dose total de irradiação poderá ter influenciado a viabilidade celular. A dose total utilizada foi de 2Gy, uma dose capaz de provocar danos subletais e potencialmente letais nos tecidos em exposição, mas para se observar um efeito preeminente da ação da radiação ao nível da morte celular a dose total teria de ser superior.

Todavia, com a utilização desta dose total de 2Gy pretendeu-se avaliar os efeitos a nível celular, na primeira exposição a um tratamento de radioterapia no *stress* oxidativo e na viabilidade celular, com e sem a presença dos compostos em estudo.

A utilização de 2Gy na irradiação celular permitiu avaliar os parâmetros de radorresistência intrínseca “*in vitro*” deste modelo celular, as BC3H1, por análise do SF2 (fração de células que sobrevivem a uma única dose de 2Gy) (Hall et al., 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo sobre a viabilidade celular do glioma, sugerem que as BC3H1 são radorresistentes e que a adição dos compostos em estudo, nas concentrações utilizadas, não modificaram esse padrão.

O aumento da resposta antioxidante, face à ação da radiação, poderá ter sido desencadeada por uma resposta inflamatória aguda celular pós irradiação, pela ativação do *stress* sensitivo das cinases, fatores de transcrição e aumento das citocinas inflamatórias (Kimura et al., 2012). O aumento exponencial das concentrações de GSH pode dever-se a mecanismos de recuperação dos danos subletais radioinduzidos ou até mesmo a propriedades adaptativas das células tumorais (Jayakumar, Kunwar, Sandur, Pandey, & Chaubey, 2014). Elevados níveis de GSH endógenos potenciam a taxa de sobrevivência e a resistência das células tumorais ao tratamento, nomeadamente à radioterapia (Hanot et al., 2012).

Comparando os dados obtidos às 4h e às 12h, nas amostras irradiadas o aumento da concentração de MDA face à diminuição significativa da GSH e do TAS às 12h, pode ser justificada pelo aumento da ação do *stress* oxidativo introduzido pela ação indireta da radiação (formação de ROS responsáveis pelos danos nas macromoléculas), ou seja, os dados obtidos às 4h representam a uma primeira resposta de defesa celular face à ação direta da radiação, com uma ação rápida contra o *stress* radioinduzido por ativação dos mecanismos antioxidantes. Os dados obtidos às 12h, pressupõe a existência de mecanismos mais complexos de adaptação celular e efeitos indiretos da radiação, mediados pela produção de ROS (Joiner, 2009).

O meio condicionado (MC) aumenta as defesas antioxidantes das células e paralelamente diminui a viabilidade celular, nas BC3H1.

O MC, proveniente da cultura da linha celular 3T3-L1, despoleta nas BC3H1 uma resposta antioxidante celular por aumento do TAS e das concentrações de GSH logo às 4h, verificando-se uma tendência para o equilíbrio dos mecanismos de defesa antioxidante e dos marcadores de *stress* oxidativo com passar do tempo, por

recuperação da homeostasia celular e equilíbrio dos mecanismos *redox* (Selenius et al., 2012).

A diminuição do *stress* oxidativo observada nos dados obtidos pela atividade da catalase, concentração de GSH e aumento do TAS para todas as amostras testadas (sem composto, t-BOOH, TUDCA, t-BOOH+TUDCA), sustenta a influência que o MC tem, por si só, na regulação dos mecanismos *redox* induzindo a diminuição do *stress* oxidativo. Estes resultados corroboram o efeito encontrado por Costa et al., 2013, em particular a diminuição da anidrase carbónica e a reductase das aldoses, no MC, poderia estar associada a mecanismos de prevenção contra o *stress* oxidativo ligados à obesidade.

Os dados obtidos ao nível da viabilidade celular nas células expostas ao MC, indicam uma diminuição significativa da viabilidade celular às 4h com o t-BOOH e com TUDCA. Nos resultados obtidos com o t-BOOH, a diminuição da viabilidade observada poderá ser explicada pela sua ação ao nível da produção de ROS, com influência no funcionamento e viabilidade celular, descritos noutros modelos celulares, nomeadamente em células pancreáticas (Fernández-Millán et al., 2014).

Os resultados obtidos com o TUDCA contrariam os dados apresentados noutros modelos celulares, nomeadamente nos hepatócitos, onde a sua ação protetora e anti-apoptótica é observada (Liu et al., 2013). Por outro lado, estudos realizados com TUDCA em modelos de hiperplasia do músculo liso cardíaco, demonstraram uma ação pró-apoptótica deste composto, para concentrações de 50, 100, e 200 μM (Kim, Kwon, Jung, Sung, & Park, 2011), o que poderá explicar a diminuição da viabilidade observada nas curvas de concentração-resposta do composto. Embora a concentração utilizada neste estudo seja inferior (25 μM), os mecanismos de ação identificados por Kim et al., poderão estar a ser reproduzidos neste modelo, com o aumento da cinética do composto induzida pelo MC, daí a verificação da diminuição da viabilidade com concentrações inferiores mas na presença do meio condicionado com adipócitos 3T3-L1.

O TUDCA com meio condicionado e Radioterapia apresenta-se citotóxico para a linha celular BC3H1.

A obesidade e a radioterapia caracterizam-se por um aumento da produção de ROS e consequentemente estão associadas ao aumento do *stress* oxidativo (Ahn et al., 2006) (Savini, Catani, Evangelista, Gasperi, & Avigliano, 2013).

Os resultados obtidos no presente estudo para as células BC3H1, revelam uma tendência para a diminuição do *stress* oxidativo, para as concentrações de compostos utilizadas, na presença de MC e RT. A diminuição da concentração de MDA quer às 4h quer às 12h e o aumento do *status* antioxidante total celular, para as amostras de t-BOOH, TUDCA e t-BOOH+TUDCA às 4h e 12h, representam o ação dos mecanismos celulares na homeostasia celular interna, face às agressões externas provocadas quer pelos compostos, quer pela radiação e meio condicionado.

Como foi referido anteriormente, a radiação por si só, assim como o meio condicionado, influenciam a resposta de defesa antioxidante celular. O aumento exponencial da GSH face ao tratamento controlo, corrobora a influência destas duas condições (RT+MC) na ação das glutatonas. O tratamento com t-BOOH foi o mais representativo deste aumento exacerbado de GSH face ao controlo.

Estudos anteriores revelaram que o meio condicionado de adipócitos 3T3-L1 contém factores com propriedades protetoras nas células G1261 e conduz à sub-expressão de determinadas proteínas, nomeadamente a STI1, hnRNPs e PGK1, associadas à radorresistência (Costa et al., 2013). Este efeito poderá explicar o aumento da viabilidade celular, nas amostras sem compostos, incubadas em MC e submetidas a RT.

Os resultados mais interessantes observaram-se no MTT realizado às 12h, com um resultado que se distinguiu dos restantes, o tratamento com TUDCA. Os resultados das amostras apresentaram uma tendência de diminuição acentuada da viabilidade celular, quando comparada com o mesmo teste para a condição de TUDCA+RT e TUDCA+MC.

Obtendo-se um efeito citotóxico do composto, TUDCA, em RT+MC para as BC3H1, certamente por ativação de indutores de morte celular, desencadeando ativação das cascatas de sinalização de morte celular com estímulos aumentados pelo meio

condicionado e pela radiação, porque nas duas condições, independentemente uma da outra, verificam-se bloqueios de progressão do ciclo celular e indução de apoptose (Kimura et al., 2012;Fakir, Hlatky, Li, & Sachs, 2013).

Face à dupla agressão nas células que foram expostas, RT+MC, a ativação de mecanismos de defesa antioxidante foi superior, justificando o aumento da concentração de GSH e o aumento do *status* antioxidante total nas amostras (Hanot et al., 2012).

Relembrando que a concentração de TUDCA utilizada em todos ensaios, após elaboração da curva de concentração-resposta para este modelo celular (BC3H1), não interferia com a viabilidade celular (não citotóxica), obtendo-se até uma tendência para o aumento da viabilidade celular com a concentração utilizada (25µM).

A alteração do comportamento do composto na presença de MC e RT em conjunto, pode sugerir uma interferência nos mecanismos de radorresistência, ou seja, o TUDCA poderá estar a exercer um efeito radorresensibilizador nas BC3H1, quando incubadas com meio condicionado e submetidas a RT, mesmo numa concentração não citotóxica para o modelo em estudo.

Embora os efeitos biológicos da radiação se manifestem ao nível de alterações funcionais e alterações metabólicas, com influência na sobrevivência celular (Selenius et al., 2012), a radorresistência deste modelo interferiu na ação da radiação, bloqueando efeitos significativos a este nível. Todavia, o tratamento combinado com TUDCA+MC+RT diferencia-se visivelmente dos resultados obtidos comparativamente com os controlos, embora não existam dados na bibliografia para comparação quer dos efeitos quer dos valores observados. Acrescenta-se ainda que estes dados são os primeiros indicadores do efeito o TUDCA, ao nível da carcinogénese, em modelo celular de obesidade submetido a Radioterapia.

CAPITULO V

-Conclusão-

7. Conclusão

O TUDCA e t-BOOH modulam a viabilidade celular e *stress* oxidativo nas células BC3H1. A adição de t-BOOH às BC3H1 não provocou um efeito oxidativo exacerbado, revelando mecanismos de resistência celular ao *stress* oxidativo, nas concentrações utilizadas. A ação antioxidante e anti-apoptótica exercida pelo TUDCA nas células BC3H1 pode dever-se à diminuição do *stress* oxidativo, resultando num aumento da viabilidade celular. O tratamento combinado com t-BOOH+TUDCA, nas células BC3H1, provocou uma diminuição da viabilidade celular, acompanhada do aumento do *status* antioxidante total, revelando dois mecanismos de interação paralelos nas BC3H1, o primeiro associado à indução de morte celular e o segundo relativo à recuperação dos danos celulares.

O modelo celular utilizado, tal como os gliomas em geral, manifesta radorresistência, como se pode verificar pela análise da viabilidade celular. Os mecanismos intrínsecos de radorresistência das BC3H1 interligam-se com o aumento da atividade enzimática antioxidante, permitindo afirmar que o aumento do *status* antioxidante total está associado à resistência à radiação, assim como as concentrações elevadas de GSH endógena podem contribuir para a manutenção da viabilidade celular. Os compostos em estudo não influenciaram os resultados obtidos nas células irradiadas, uma vez que a sua ação ao nível celular poderá estar dissimulada pelas alterações funcionais, metabólicas e morfológicas que a radiação ionizante exerce sobre as células.

O tratamento com meio condicionado, promove uma diminuição do *stress* oxidativo total a que as células BC3H1 estão sujeitas, corroborando os resultados, anteriormente apresentados por Costa et al., para as linhas celulares GL261. O meio condicionado apresenta ainda propriedades protetoras face às agressões provocadas pelas ROS ao nível do *stress* oxidativo, com influência na concentração das glutatonas e no *status* antioxidante total. Observa-se ainda, aquando do condicionamento, que as BC3H1 apresentam uma diminuição da viabilidade celular, evidenciando as propriedades protetoras dos fatores libertados pelos adipócitos 3T3-L1 e da obesidade nos gliomas. Todavia, nas células condicionadas e submetidas à radiação, a viabilidade celular tendencialmente diminui, demonstrando o potencial radiosensibilizador do Meio Condicionado, possivelmente associado à supressão da expressão de proteínas associadas à radorresistência (TI1, hnRNPs e PGK1) (Costa et al., 2013). Aquando da

adição dos diferentes compostos às células incubadas com MC e submetidas a RT, o TUDCA e t-BOOH+TUDCA demonstram uma propensão de diminuição da viabilidade celular. Comparando os resultados obtidos no tratamento com TUDCA na presença de meio condicionado e radioterapia, a sua ação nas células BC3H1 diferencia-se do tratamento isolado com TUDCA e MC ou TUDCA e radiação, uma vez que diminui a sua viabilidade. Ou seja, o TUDCA nas células com meio condicionado e irradiadas apresenta atividade citotóxica, nas concentrações estudadas, interferindo nos mecanismos de radorresistência das BC3H1, sensibilizando-as à ação da radioterapia, na presença do meio condicionado.

Os resultados obtidos no presente estudo, nomeadamente sobre a ação do TUDCA, condicionada pela obesidade e/ou radioterapia, representam um primeiro contributo para a melhor compreensão do comportamento celular, em matéria de viabilidade e *stress* oxidativo, neste modelo de glioma. Tendo em consideração os resultados positivos obtidos, confirma-se a pertinência de futuras investigações sobre a ação deste composto como possível radiosensibilizador em tumores radorresistentes, nomeadamente Gliomas.

8. Perspetivas Futuras

No momento de entrega do presente trabalho, a investigadora encontra-se a realizar os estudos experimentais dos efeitos do TUDCA na presença e ausência de Meio Condicionado bem como os efeitos provocação com os esquemas terapêuticos com 2Gy na linha celular B16F10 de melanoma.

No decorrer do presente estudo surgiram algumas questões suscitadas pelos resultados obtidos, que pela sua pertinência deveriam ser clarificadas e aprofundadas com estudos futuros. Nomeadamente, os tempos de recolha das amostras deveriam ser prolongados, incluindo-se o *timepoint* das 24h e 72h.

Perspetiva-se o estudo de concentrações superiores de t-BOOH (superiores a 200 μ M) nas células BC3H1 e o estudo deste composto nas células G1261 de glioma.

Verificar a bioatividade do TUDCA nos modelos celulares de BC3H1 e G1261 em concentrações superiores e citotóxicas, tendo em conta as condições estudadas, nomeadamente a sua ação com radiação, com meio condicionado de adipócitos 3T3-L1 e na conjugação das duas condições (RT+MC), num número de amostras superiores.

Testar nas células BC3H1, com TUDCA e adição de MC, novos esquemas de dose total de radiação, com o fracionamento da dose idêntico aos normais esquemas de tratamento de Radioterapia, para o estudo das propriedades radiosensibilizadoras do TUDCA, com aplicabilidade futura noutros modelos celulares radiorresistentes, nomeadamente nas células B16F10 de melanoma.

Avaliar outros parâmetros do comportamento celular, tais como proliferação, apoptose e migração e quantificar marcadores adicionais de *stress* oxidativo: dismutase do superóxido, redutase do NADPH e nitrotirosinas.

Testar novos compostos bioativos orgânicos com inferências na modelação radiobiológica, por adaptação das metodologias aplicadas no presente estudo.

9. Referências Bibliográficas

Ahn, J., Ambrosone, C. B., Kanetsky, P. a, Tian, C., Lehman, T. a, Kropp, S., ... Chang-Claude, J. (2006). Polymorphisms in genes related to oxidative stress (CAT, MnSOD, MPO, and eNOS) and acute toxicities from radiation therapy following lumpectomy for breast cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(23), 7063–70. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0039

Amber, K. T., Shiman, M. I., & Badiavas, E. V. (2014). The use of antioxidants in radiotherapy-induced skin toxicity. *Integrative Cancer Therapies*, 13(1), 38–45. doi:10.1177/1534735413490235

Barbosa, B. (2010). *Implicações Radiobiológicas da IMRT em Carcinomas da Próstata*. Universidade do Porto.

Benz, C., Angermüller, S., Töx, U., Klöters-Plachky, P., Riedel, H. D., Sauer, P., ... Stiehl, a. (1998). Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 28(1), 99–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9726039>

Berger, E., & Haller, D. (2011). Structure-function analysis of the tertiary bile acid TUDCA for the resolution of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(4), 610–5. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.043

Carmichael, a R. (2006). Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 113(10), 1160–6. doi:10.1111/j.1471-0528.2006.01021.x

Carubbi, F., Guicciardi, M., & Concari, M. (2002). Comparative cytotoxic and cytoprotective effects of taurohyodeoxycholic acid (THDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in HepG2 cell line. ... *et Biophysica Acta (BBA ...)*, 1580, 31–39. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198101001846>

Castro, M. L., McConnell, M. J., & Herst, P. M. (2014). Radiosensitisation by pharmacological ascorbate in glioblastoma multiforme cells, human glial cells, and HUVECs depends on their antioxidant and DNA repair capabilities and is not cancer specific. *Free Radical Biology & Medicine*, *74C*, 200–209. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.022

Castro, R. E., Solá, S., Ramalho, R. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2004). The bile acid tauroursodeoxycholic acid modulates phosphorylation and translocation of bad via phosphatidylinositol 3-kinase in glutamate-induced apoptosis of rat cortical neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *311*(2), 845–52. doi:10.1124/jpet.104.070532

Cesquini, M., Torsoni, M. a., Stoppa, G. R., & Ogo, S. H. (2003). t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *57*(3-4), 124–129. doi:10.1016/S0753-3322(03)00018-0

Checler, F., & Alves, C. (2014). Pharmacology & Therapeutics p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. *Pharmacology and Therapeutics*, *142*(1), 99–113. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.009

Conti, A., Guli, C., La Torre, D., Tomasello, C., Angileri, F. F., & Aguenouz, M. (2010). Role of inflammation and oxidative stress mediators in gliomas. *Cancers*, *2*(2), 693–712. doi:10.3390/cancers2020693

Costa, J., Almeida, J., Coelho, P., Cea, V., Galesio, M., Jp, N., ... Fernandes, R. (2013). Original Article Proteomic analysis of the influence of the adipocyte secretome on glioma G1261 cells.

Crohns, M., Saarelainen, S., Erhola, M., Alho, H., & Kellokumpu-Lehtinen, P. (2009). Impact of radiotherapy and chemotherapy on biomarkers of oxidative DNA damage in lung cancer patients. *Clinical Biochemistry*, *42*(10-11), 1082–90. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.02.022

Draoui, N., & Feron, O. (2011). Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Disease Models & Mechanisms*, *4*(6), 727–32. doi:10.1242/dmm.007724

Elkind, M., Sutton-Gilbert, H., & Moses, W. (1965). Radiation response of mammalian cells grown in culture: V. Temperature dependence of the repair of x-ray damage in surviving cells (aerobic and hypoxic). *Radiation ...*, 25(2), 359–376. Retrieved from <http://www.rjournal.org/doi/abs/10.2307/3571978>

Elowe-Gruau, E., Beltrand, J., Brauner, R., Pinto, G., Samara-Boustani, D., Thalassinos, C., ... Puget, S. (2013). Childhood craniopharyngioma: hypothalamus-sparing surgery decreases the risk of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(6), 2376–82. doi:10.1210/jc.2012-3928

Fakir, H., Hlatky, L., Li, H., & Sachs, R. (2013). Repopulation of interacting tumor cells during fractionated radiotherapy: stochastic modeling of the tumor control probability. *Medical Physics*, 40(12), 121716. doi:10.1118/1.4829495

Fang, P., Tan, K. S., Troxel, A. B., Rengan, R., Freedman, G., & Lin, L. L. (2013). High body mass index is associated with worse quality of life in breast cancer patients receiving radiotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 141(1), 125–33. doi:10.1007/s10549-013-2663-2

Fernández-Millán, E., Ramos, S., Alvarez, C., Bravo, L., Goya, L., & Martín, M. Á. (2014). Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 66, 245–53. doi:10.1016/j.fct.2014.01.044

Franca, C. a S., Nogueira, C. R., Ramalho, a, Carvalho, a C. P., Vieira, S. L., & Penna, a B. R. C. (2011). Serum levels of selenium in patients with breast cancer before and after treatment of external beam radiotherapy. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 22(5), 1109–12. doi:10.1093/annonc/mdq547

Frustaci, A., Neri, M., Cesario, A., Adams, J. B., Domenici, E., Dalla Bernardina, B., & Bonassi, S. (2012). Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review

and meta-analyses. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(10), 2128–41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011

Fuchs-Tarlovsky, V., Rivera, M. A. C., Altamirano, K. A., Lopez-Alvarenga, J. C., & Ceballos-Reyes, G. M. (2013). Antioxidant supplementation has a positive effect on oxidative stress and hematological toxicity during oncology treatment in cervical cancer patients. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 21(5), 1359–63. doi:10.1007/s00520-012-1674-6

Gaspar, J. M., Martins, a, Cruz, R., Rodrigues, C. M. P., Ambrósio, a F., & Santiago, a R. (2013). Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience*, 253, 380–8. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.08.053

Geinitz, H., Thamm, R., Mueller, T., Jess, K., Zimmermann, F. B., Molls, M., & Nieder, C. (2011). Impact of body mass index on outcomes after conformal radiotherapy in patients with prostate cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 81(1), 16–22. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.05.059

Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., & Rossi, R. (2011). Detection of glutathione in whole blood after stabilization with N-ethylmaleimide. *Analytical Biochemistry*, 415(1), 81–3. doi:10.1016/j.ab.2011.04.013

Greenberger, J. S., Berhane, H., Shinde, A., Rhieu, B. H., Bernard, M., Wipf, P., ... Epperly, M. W. (2014). Can Radiosensitivity Associated with Defects in DNA Repair be Overcome by Mitochondrial-Targeted Antioxidant Radioprotectors. *Frontiers in Oncology*, 4(February), 24. doi:10.3389/fonc.2014.00024

Gunalan, G., & Krishnamurthy, V. (2012). IMPACT OF RADIOTHERAPY ON OXIDATIVE STRESS IN NEUTROPHILS OF CERVICAL CANCER, 5(2).

Güttler, A., Giebler, M., Cuno, P., Wichmann, H., Keßler, J., Ostheimer, C., ... Bache, M. (2013). Osteopontin and splice variant expression level in human malignant glioma: radiobiologic effects and prognosis after radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 108(3), 535–40. doi:10.1016/j.radonc.2013.06.036

Haghdoust, S. (2005). *Biomarkers of oxidative stress and their application for assessment of individual radiosensitivity*.

Hall, J. S., Iype, R., Senra, J., Taylor, J., Armenoult, L., Oguejiofor, K., ... West, C. M. L. (2014). Investigation of radiosensitivity gene signatures in cancer cell lines. *PLoS One*, 9(1), e86329. doi:10.1371/journal.pone.0086329

Halliwell, B. (1995). antioxidant; free radical; lipid peroxidation; oxidative damage; hydroxyl radical;, 49(10), 2952.

Hanot, M., Boivin, A., Malésys, C., Beuve, M., Colliaux, A., Foray, N., ... Rodriguez-Lafresse, C. (2012). Glutathione depletion and carbon ion radiation potentiate clustered DNA lesions, cell death and prevent chromosomal changes in cancer cells progeny. *PLoS One*, 7(11), e44367. doi:10.1371/journal.pone.0044367

Heiden, M. G. Vander. (2013). Review series introduction Exploiting tumor metabolism: challenges for clinical translation, 123(9), 7–10. doi:10.1172/JCI72391.3648

Heymann, W. (2006). New strategies in melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 147–148. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962205029658>

Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570–83. doi:10.1056/NEJMra0901217

Huang, X., & Saint-Jeannet, J.-P. (2004). Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Developmental Biology*, 275(1), 1–11. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.033

Iughetti, L., & Bruzzi, P. (2011). Obesity and craniopharyngioma. *Italian Journal of Pediatrics*, 37(1), 38. doi:10.1186/1824-7288-37-38

Jacob, K. D., Noren Hooten, N., Trzeciak, A. R., & Evans, M. K. (2013). Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(3-4), 139–57. doi:10.1016/j.mad.2013.02.008

Jayakumar, S., Kunwar, A., Sandur, S. K., Pandey, B. N., & Chaubey, R. C. (2014). Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(1), 485–94. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.006

Jin, S., DiPaola, R. S., Mathew, R., & White, E. (2007). Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 3), 379–83. doi:10.1242/jcs.03349

Joiner, M. (n.d.). Basic Clinical Radiobiology Edited by.

Joiner, M. (2009). *Basic Clinical Radiobiology Edited by.*

Kaya, H., Delibas, N., Serteser, M., Ulukaya, E., & Ozkaya, O. (1999). The effect of melatonin on lipid peroxidation during radiotherapy in female rats. *Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et Al]*, 175(6), 285–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392170>

Khan, L., Choo, R., Breen, D., Assaad, D., Fialkov, J., Antonyshyn, O., ... Barnes, E. (2012). Recommendations for CTV margins in radiotherapy planning for non melanoma skin cancer. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 104(2), 263–6. doi:10.1016/j.radonc.2012.06.013

Kim, S. Y., Kwon, Y.-W., Jung, I. L., Sung, J.-H., & Park, S. G. (2011a). Tauroursodeoxycholate (TUDCA) inhibits neointimal hyperplasia by suppression of ERK via PKC α -mediated MKP-1 induction. *Cardiovascular Research*, 92(2), 307–16. doi:10.1093/cvr/cvr219

Kim, S. Y., Kwon, Y.-W., Jung, I. L., Sung, J.-H., & Park, S. G. (2011b). Tauroursodeoxycholate (TUDCA) inhibits neointimal hyperplasia by suppression of ERK via PKC α -mediated MKP-1 induction. *Cardiovascular Research*, 92(2), 307–16. doi:10.1093/cvr/cvr219

Kimura, M., Rabbani, Z. N., Zodda, A. R., Yan, H., Jackson, I. L., Polascik, T. J., ... Koontz, B. F. (2012). Role of oxidative stress in a rat model of radiation-induced

erectile dysfunction. *The Journal of Sexual Medicine*, 9(6), 1535–49. doi:10.1111/j.1743-6109.2012.02716.x

Kisling, K. (2010). Volumetric Modulated Arc Therapy Evaluation with the Radiological Physics Center Head and Neck Phantom, 2010. Retrieved from http://digitalcommons.library.tmc.edu/utgsbs_dissertations/70/

Knoefler, D., Thamsen, M., Koniczek, M., Niemuth, N. J., Diederich, A.-K., & Jakob, U. (2012). Quantitative in vivo redox sensors uncover oxidative stress as an early event in life. *Molecular Cell*, 47(5), 767–76. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.016

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. doi:10.1152/physrev.00013.2006

Kushwaha, V., Sahani, K., Sharma, V., Saeed, S., & Barman, S. (2013). Role of free radical scavengers in oral malignancies treated with radiotherapy. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 2(6), 735. doi:10.5455/2319-2003.ijbcp20131212

Lim, K. H. C., Lee, C.-Y. J., Earnest, A., Seet, R. C. S., & Halliwell, B. (2010). Does radiotherapy increase oxidative stress? A study with nasopharyngeal cancer patients revealing anomalies in isoprostanes measurements. *Free Radical Research*, 44(9), 1064–71. doi:10.3109/10715762.2010.499906

Lin, L. L., Hertan, L., Rengan, R., & Teo, B.-K. K. (2012). Effect of body mass index on magnitude of setup errors in patients treated with adjuvant radiotherapy for endometrial cancer with daily image guidance. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 83(2), 670–5. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.07.026

Little, R. B., Madden, M. H., Thompson, R. C., Olson, J. J., Larocca, R. V, Pan, E., ... Nabors, L. B. (2013). Anthropometric factors in relation to risk of glioma. *Cancer Causes & Control: CCC*, 24(5), 1025–31. doi:10.1007/s10552-013-0178-0

Liu, N., Xu, Y., Sun, J.-T., Su, J., Xiang, X.-Y., Yi, H.-W., ... Sun, L.-K. (2013). The BH3 mimetic S1 induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in cisplatin-

resistant human ovarian cancer cells although it activates autophagy. *Oncology Reports*, 30(6), 2677–84. doi:10.3892/or.2013.2771

Low, S. Y. Y., Ho, Y. K., Too, H.-P., Yap, C. T., & Ng, W. H. (2014). MicroRNA as potential modulators in chemoresistant high-grade gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 21(3), 395–400. doi:10.1016/j.jocn.2013.07.033

Ma, N. L., Rahmat, Z., & Lam, S. S. (2013). A Review of the “Omics” Approach to Biomarkers of Oxidative Stress in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7515–41. doi:10.3390/ijms14047515

Malathi, M., Vijay, M., & Shivashankara, A. (2011). The role of oxidative stress and the effect of radiotherapy on the plasma oxidant-antioxidant status in head and neck cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic* Retrieved from http://www.jcdr.in/articles/PDF/1240/1631_6_4_11.pdf

Matos, A., Nogueira, C., Franca, C., Carvalho, A., Lannes Vieira, S., Penna, A., & Ramalho, A. (2014). The relationship between serum vitamin A and breast cancer staging before and after radiotherapy. *Nutrición Hospitalaria*, 29(1), 136–9. doi:10.3305/nh.2014.29.1.6997

Merten, R., Hecht, M., Haderlein, M., Distel, L., Fietkau, R., Heinzerling, L., & Semrau, S. (2014). Increased skin and mucosal toxicity in the combination of vemurafenib with radiation therapy. *Strahlentherapie Und Onkologie : Organ Der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et Al]*, (January), 1–4. doi:10.1007/s00066-014-0698-x

Minniti, G., Scaringi, C., De Sanctis, V., Lanzetta, G., Falco, T., Di Stefano, D., ... Enrici, R. M. (2013). Hypofractionated stereotactic radiotherapy and continuous low-dose temozolomide in patients with recurrent or progressive malignant gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 111(2), 187–94. doi:10.1007/s11060-012-0999-9

Modrek, A. S., Bayin, N. S., & Placantonakis, D. G. (2014). Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World Journal of Stem Cells*, 6(1), 43–52. doi:10.4252/wjsc.v6.i1.43

Moss, R. W. (2007). Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? *Integrative Cancer Therapies*, 6(3), 281–92. doi:10.1177/1534735407305655

Nichols, J. a., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 71–83. doi:10.1007/s00403-009-1001-3

Nieman, K. M., Romero, I. L., Van Houten, B., & Lengyel, E. (2013). Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(10), 1533–41. doi:10.1016/j.bbali.2013.02.010

Ohgaki, H. (2009). *Cancer Epidemiology*, 472. doi:10.1007/978-1-60327-492-0

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B., & Bao, J.-K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–98. doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x

Paunu, N., Syrjäkoski, K., Sankila, R., Simola, K. O., Helén, P., Niemelä, M., ... Haapasalo, H. (2001). Analysis of p53 tumor suppressor gene in families with multiple glioma patients. *Journal of Neuro-Oncology*, 55(3), 159–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859970>

Peixoto, V. (2012). Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil. Retrieved from <http://recipp.ipp.pt/handle/10400.22/1117>

Pereira, A. (2012). *Ana Claudia dos Santos Pereira EFFECT OF OXIDATIVE STRESS UPON ABSORPTION OF GLUCOSE BY THE HUMAN PLACENTA*.

Perez C. A, B. L. W. (2008). *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*.

Pesee, M., Kirdpon, W., Puapairoj, A., Kirdpon, S., & Prathnadi, P. (2013). Palliative treatment of advanced cervical cancer with radiotherapy and thai herbal medicine as

supportive remedy - analysis of survival. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(3), 1593–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23679241>

Pittella, J. (2008). Biópsia estereotáxica no diagnóstico de tumores cerebrais e lesões não-neoplásicas: indicações, acurácia e dificuldades diagnósticas. *J Bras Patol Med Lab*, 343–354. Retrieved from <http://files.lanncom.webnode.com/200000119-97525984e9/Artigo - biopsia estereotaxica.pdf>

Prestegarden, L., Svendsen, A., Wang, J., Sleire, L., Skaftnesmo, K. O., Bjerkvig, R., ... Enger, P. Ø. (2010). Glioma cell populations grouped by different cell type markers drive brain tumor growth. *Cancer Research*, 70(11), 4274–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3904

Pusl, T., Vennegeerts, T., Wimmer, R., Denk, G. U., Beuers, U., & Rust, C. (2008). Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(1), 208–12. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.122

Puspitasari, I. M., Abdulah, R., Yamazaki, C., Kameo, S., Nakano, T., & Koyama, H. (2014). Updates on clinical studies of selenium supplementation in radiotherapy. *Radiation Oncology (London, England)*, 9(1), 125. doi:10.1186/1748-717X-9-125

Raabe, A., Derda, K., Reuther, S., Szymczak, S., Borgmann, K., Hoeller, U., ... Dikomey, E. (2012). Association of single nucleotide polymorphisms in the genes ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with risk of severe erythema after breast conserving radiotherapy. *Radiation Oncology (London, England)*, 7(1), 65. doi:10.1186/1748-717X-7-65

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603–16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

Rivard, A. L., Steer, C. J., Kren, B. T., Rodrigues, C. M. P., Castro, R. E., Bianco, R. W., & Low, W. C. (2007). Administration of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) reduces apoptosis following myocardial infarction in rat. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35(2), 279–95. doi:10.1142/S0192415X07004813

Ry, P., & Hn, M. (n.d.). Effect of Antioxidant Supplementation in Cancer Patients on Radiotherapy, (Co 60), 71–73.

Savini, I., Catani, M. V., Evangelista, D., Gasperi, V., & Avigliano, L. (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 10497–538. doi:10.3390/ijms140510497

Schoors, S., De Bock, K., Cantelmo, A. R., Georgiadou, M., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., ... Carmeliet, P. (2014). Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metabolism*, *19*(1), 37–48. doi:10.1016/j.cmet.2013.11.008

Selenius, M., Hedman, M., Brodin, D., Gandin, V., Rigobello, M. P., Flygare, J., ... Fernandes, A. P. (2012). Effects of redox modulation by inhibition of thioredoxin reductase on radiosensitivity and gene expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(7), 1593–605. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01469.x

Shi, J.-M., Bai, L.-L., Zhang, D.-M., Yiu, A., Yin, Z.-Q., Han, W.-L., ... Ye, W.-C. (2013). Saxifragifolin D induces the interplay between apoptosis and autophagy in breast cancer cells through ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. *Biochemical Pharmacology*, *85*(7), 913–26. doi:10.1016/j.bcp.2013.01.009

Shiota, M., Yokomizo, A., & Naito, S. (2012). Pro-survival and anti-apoptotic properties of androgen receptor signaling by oxidative stress promote treatment resistance in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *19*(6), R243–53. doi:10.1530/ERC-12-0232

Siegel, E. M., Nabors, L. B., Thompson, R. C., Olson, J. J., Browning, J. E., Madden, M. H., ... Egan, K. M. (2013). Prediagnostic body weight and survival in high grade glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, *114*(1), 79–84. doi:10.1007/s11060-013-1150-2

Smith, P. S., Zhao, W., Spitz, D. R., & Robbins, M. E. (2007). Inhibiting catalase activity sensitizes 36B10 rat glioma cells to oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, *42*(6), 787–97. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.032

Smithers, F. a E., Moaveni, Z., & De Groot, C. (2011). The role of radiotherapy in the palliation of cutaneous melanoma metastases: a case series of 3 patients. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS*, 64(4), 550–3. doi:10.1016/j.bjps.2010.05.002

Strom, S. S., Kamat, A. M., Gruschkus, S. K., Gu, Y., Wen, S., Cheung, M. R., ... Kuban, D. a. (2006). Influence of obesity on biochemical and clinical failure after external-beam radiotherapy for localized prostate cancer. *Cancer*, 107(3), 631–9. doi:10.1002/cncr.22025

Suntharalingam, N. (n.d.). Chapter 14 BASIC RADIOBIOLOGY, 485–504.

Tsien, C., Arbor, A., Co-chair, R. O., Dicker, A. P., Co-chair, M. P., Matuszak, M. M., ... Zhang, P. (2014). *NRG ONCOLOGY RTOG 1205 RANDOMIZED PHASE II TRIAL OF CONCURRENT BEVACIZUMAB AND RE-IRRADIATION VERSUS BEVACIZUMAB ALONE AS TREATMENT FOR RECURRENT GLIOBLASTOMA* (pp. 1–61).

Veierød, M. B., Adami, H.-O., Lund, E., Armstrong, B. K., & Weiderpass, E. (2010). Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(1), 111–20. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0567

Vollbracht, C., Schneider, B., Leendert, V., Weiss, G., Auerbach, L., & Beuth, J. (2011). Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. *In Vivo (Athens, Greece)*, 25(6), 983–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021693>

Weiss, J. F., & Landauer, M. R. (2003). Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology*, 189(1-2), 1–20. doi:10.1016/S0300-483X(03)00149-5

Woźniak, A., Masiak, R., Szpinda, M., Mila-Kierzenkowska, C., Woźniak, B., Makarewicz, R., & Szpinda, A. (2012a). Oxidative stress markers in prostate cancer patients after HDR brachytherapy combined with external beam radiation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 789870. doi:10.1155/2012/789870

Woźniak, A., Masiak, R., Szpinda, M., Mila-Kierzenkowska, C., Woźniak, B., Makarewicz, R., & Szpinda, A. (2012b). Oxidative stress markers in prostate cancer patients after HDR brachytherapy combined with external beam radiation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 789870. doi:10.1155/2012/789870

Wu, C.-T., Chen, M.-F., Chen, W.-C., & Hsieh, C.-C. (2013). The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiation Oncology (London, England)*, 8(1), 159. doi:10.1186/1748-717X-8-159

Yanguas-Casás, N., Barreda-Manso, M. A., Nieto-Sampedro, M., & Romero-Ramírez, L. (2014). Tauroursodeoxycholic acid reduces glial cell activation in an animal model of acute neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 50. doi:10.1186/1742-2094-11-50

Zadra, G., Photopoulos, C., & Loda, M. (2013). The fat side of prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(10), 1518–32. doi:10.1016/j.bbali.2013.03.010

Zhang, Y., Chang, F.-M., Huang, J., Junco, J. J., Maffi, S. K., Pridgen, H. I., ... Wei, S.-J. (2014). DSSylation, a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress, and facilitates their degradation in cells. *Protein & Cell*, 5(2), 124–40. doi:10.1007/s13238-013-0018-8

Zhang, Y., Zhang, L., Sun, D., Li, Z., Wang, L., & Liu, P. (2011). Genetic polymorphisms of superoxide dismutases , catalase , and glutathione peroxidase in age-related cataract, (July), 2325–2332.

Zhao, J., & Lawless, M. W. (2013). Stop feeding cancer: pro-inflammatory role of visceral adiposity in liver cancer. *Cytokine*, 64(3), 626–37. doi:10.1016/j.cyto.2013.09.009