

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SUCO DE UVA
ORGÂNICO COMO RADIOMODIFICADOR EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE RADIOBIOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

Robson Borba de Freitas

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SUCO DE UVA ORGÂNICO
COMO RADIOMODIFICADOR EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE RADIOBIOLOGIA**

Robson Borba de Freitas

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

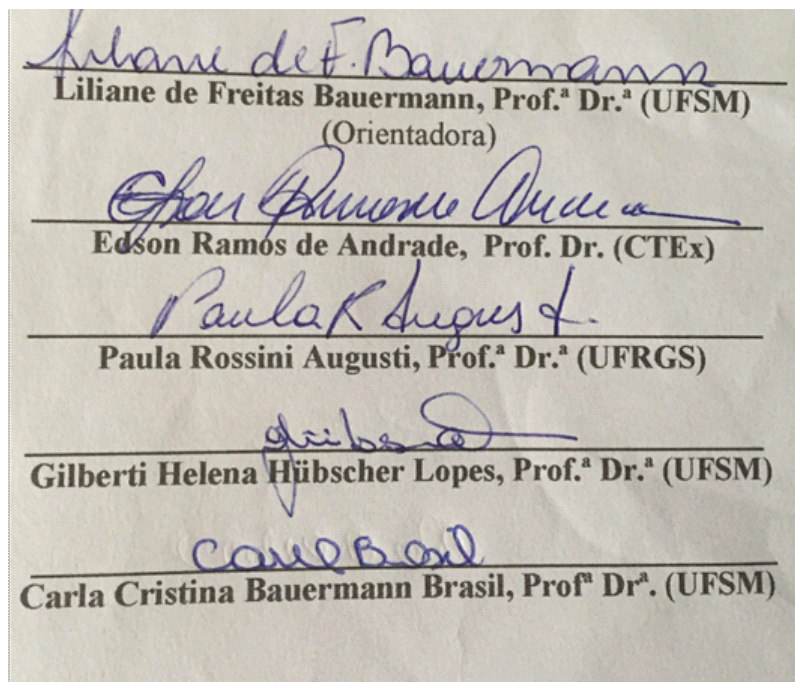
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**Avaliação do efeito do suco de uva orgânico como radiomodificador em
modelos experimentais de Radiobiologia**

elaborada por
Robson Borba de Freitas

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:



Liliane de F. Bauermann
Liliane de Freitas Bauermann, Prof.^a Dr.^a (UFSM)
(Orientadora)

Edson Ramos de Andrade
Edson Ramos de Andrade, Prof. Dr. (CTEx)

Paula Rossini Augusti
Paula Rossini Augusti, Prof.^a Dr.^a (UFRGS)

Gilberti Helena Hübscher Lopes
Gilberti Helena Hübscher Lopes, Prof.^a Dr.^a (UFSM)

Carla Cristina Bauermann Brasil
Carla Cristina Bauermann Brasil, Prof.^a Dr.^a (UFSM)

Santa Maria, 17 de dezembro de 2015

*“Se você não consegue virar a
página, troque o livro”.
Existem tantas histórias interessantes
esperando para serem lidas,
esperando para serem lindas.”*

Antônio (Pedro Gabriel Anhorn)

Dedico esta tese à minha avó Ilumina Oliveira de Borba (*In memorian*) e à Professora Margareth Linde Atayde (*In memorian*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Élide e João, por me darem força e apoio durante toda a minha vida. Vocês são a minha “*joie de vivre*”. Aos dois todo meu amor e carinho. Ao meu irmão Giordano pela amizade e por me dar sobrinhos que amo.

As minhas tias Enalda, Nalva, Clairá e Cleide e aos meus tios Élvio e Lairton por estarem presentes em todos os momentos, dando carinho e apoio.

Aos amigos do peito que mesmo longe estiveram pertos nas lembranças e nas mensagens trocadas via internet.

Ao meu amigo Luis de León por tornar minha vida no exterior menos dura. Obrigado pelas “*salidas de tapas*”.

Aos colegas do LAFEX e LABFITO pela ajuda nos experimentos, pelo companheirismo e amizade.

Agradeço a duas amigas que a vida de pós-graduando me deu: Roberta, obrigado por ser esta pessoa de coração infinito, amiga, verdadeira e delicada. As contingências da vida não nos permitem mais tomarmos nosso chá em xícaras floridas quase que diariamente. Mas a cada reencontro, ver-te me deixa muito feliz. Camille (Camille Vitória) obrigado pelo carinho e amizade. Bombeiros lotado sem você, não é bombeiros. Rir sem dúvida é o melhor que podemos fazer no trajeto quase infinito até o centro.

Ao meu amigo Márcio Lobo (Márcia) por me mostrar que comportamentos não politicamente corretos tornam a vida menos maçante e que um pouco de ironia e deboche não faz mal a ninguém.

Ao amigo Tiago Alfredo por me ensinar o que é uma pérgola, um cobogó, um pé direito, por me mostrar o mundo sem sair de casa. Saudade das nossas caminhadas eternas por Santa Maria atrás de prédios e casas interessantes. Agora tenho arquiteto para projetar minha futura casa.

A todos os professores que passaram por minha vida e deixaram bons exemplos e inspiração.

Ao Professor Juan Pablo Barrio Lera e a Professora Paqueta por terem me acolhido na Espanha e terem se empenhado para que parte deste trabalho fosse concretizada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo suporte, atenção e presteza.

À minha mestra e querida Professora Margareth Linde Athayde (*In memoriam*) pela ajuda em todos os momentos que precisei, pela amizade. Aprendi contigo que o bom humor

cura todas as mazelas humanas. Foi um exemplo de pessoa e profissional. E, no final das contas todo mundo tem problemas, até a bailarina. A bailarina perfeita só existe na canção do Chico Buarque de Holanda que tanto gostava.

À minha orientadora Liliane de Freitas Bauermann por ser uma mãe, uma amiga, uma confidente. Obrigado por ter me ajudado nos momentos mais difíceis dessa trajetória. Vencemos e crescemos juntos nestes quase 10 anos de convivência.

À professora Gilberti pela amizade e confiança.

Ao amigo Edson pelos puxões de orelha, incentivo e confiança. Fez e faz diferença na minha vida. Sem você não teria me jogado no velho mundo.

À Universidade Federal de Santa Maria por ter me oferecido ensino gratuito e de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e por me proporcionar uma experiência internacional incrível que me tornou um cidadão do mundo, um cosmopolita e principalmente uma pessoa mais resiliente.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AUTOR: ROBSON BORBA DE FREITAS
ORIENTADOR: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN
Dia e local da Defesa: Santa Maria, 17 de dezembro de 2015.

A radiação ionizante tanto em doses altas e exposição aguda ou em doses fracionadas afeta as funções orgânicas. A exposição aguda pode causar uma série de efeitos secundários como imunodepressão, alterações gastrointestinais, dermatite e dano cardíaco. Já a exposição fracionada que ocorre em pacientes oncológicos além causar efeitos na região afetada pelo câncer, pode causar alguns efeitos sistêmicos como anorexia e necrose tecidual. A presente tese mostra o resultado de dois modelos experimentais de Radiobiologia. O objetivo do primeiro estudo foi avaliar o efeito radiomodificador do suco de uva orgânico (SUO) no coração em modelo animal de síndrome aguda da radiação (SAR). Os 20 ratos Wistar utilizados no experimento foram divididos em 4 grupos, sendo que dois destes foram irradiados com radiação gama por meio de uma fonte de Co-60 e os outros dois grupos cumpriram o protocolo sem serem irradiados. Os animais (ratos Wistar machos) foram suplementados com SUO ou solução de glicose e frutose (2 mL/dia) administrado via intragástrica uma semana antes e 4 dias após a exposição de corpo inteiro aos raios gama. Após a eutanásia, o sangue foi coletado para a quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e o coração foi excisado e homogeneizado para a determinação da peroxidação lipídica (LPO). Concentrações elevadas dos metabólitos da LPO no coração foram determinadas pelo ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis elevados de LDH no soro foram encontrados apenas no grupo de ratos irradiados e suplementados com placebo, principalmente nas primeiras 24h. O suco atenuou a elevação desta enzima no soro. A análise fitoquímica do SUO foi realizada por meio da determinação de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostrou que o composto majoritário no SUO é o resveratrol (31.28 ± 0.04 mg/L). Os resultados deste estudo sugerem que o SUO é forte candidato a ser um radiomodificador positivo, pois, o SUO atenuou o dano oxidativo causado no coração pela radiação. O segundo estudo analisou o efeitos secundários da irradiação cranial fracionada em simulação à radioterapia, que é utilizada para o tratamento de tumores cerebrais. No entanto, a radiação cranial fracionada pode causar efeitos colaterais como déficits neurocognitivos, anorexia e osteorradionecrose. O SUO foi usado como medida preventiva contra os efeitos colaterais da irradiação. Os animais foram expostos a 8 sessões de irradiação cranial, totalizando 32 Gy de dose absorvida. Os animais foram divididos em 4 grupos, idênticos ao experimento anterior. Os animais receberam o SUO ou a solução de glicose e frutose 4 dias antes, durante e 4 dias após a irradiação. O peso corporal e o consumo de comida e bebida foram mensurados ao longo do protocolo experimental. O sangue foi coletado 2 meses após a irradiação e as mandíbulas foram dissecadas para a realização de análises morfométricas e histológicas. Os ratos do grupo irradiado e tratado com o suco (RJ) perderam menos peso corporal quando comparados com os animais do grupo controle irradiado (RG). O grupo RJ ingeriu mais comida e bebida que o RG. Após a irradiação todos os animais cresceram até o 61º dia. Entretanto, a partir deste momento os animais irradiados começaram a perder peso em comparação aos controles. A perda de peso foi relacionada à osteorradionecrose de mandíbula. Medidas realizadas na mandíbula mostram que os animais do grupo RG perderam peso devido a uma hipofunção mastigatória. A microscopia revelou elevada atividade osteoclástica e processo inflamatório nas mandíbulas dos ratos irradiados. O SUO também aumentou a contagem leucócitos e glóbulos vermelhos no grupo irradiado e suplementado com suco. Embora, o suco não tenha restaurado completamente as alterações induzidas pela irradiação cranial, essa bebida rica em antioxidante pode ser indicada para utilização com vistas a atenuação dos efeitos secundários da irradiação cranial. De modo geral os resultados sugerem benefício líquido para os animais quando da ingestão do SUO como agente radiomodificador positivo para exposição à radiação ionizante.

Palavras chave: radiobiologia, suco de uva, dano cardíaco, efeitos colaterais da irradiação fracionada

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

AUTHOR: ROBSON BORBA DE FREITAS

ADVISER: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

Day and Place of the Defense: December 17th, 2015, Santa Maria.

The ionizing radiation exposure is able to affect the organic functions. The acute exposure produce several side effects as immunosuppression, gastrointestinal diseases, dermatitis and cardiac damage. Fractionated and localized exposure used for cancer therapy can be produced systemic side effects as anorexia and tissue necrosis. The present thesis shows two the results of two different models of radiobiology. The aim of the first study was to evaluate the radiomodifier effect in heart of black grape juice (BGJ) by animal model of acute radiation syndrome. Twenty rats were divided into four groups, two of them being irradiated by gamma-rays from a Co-60 source and two groups were sham-irradiated. Animals were treated by gavage with 2 mL per day of BGJ or placebo for one week before and 4 days after 6 Gy whole body gamma-irradiation. After euthanasia, the blood was collected for lactate dehydrogenase (LDH) quantification on serum and the hearts were excised and homogenized for lipid peroxidation measurement. High concentration of metabolites from lipid peroxidation in heart determined by reactive thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS), and high LDH level on serum were found only in gamma-irradiated group treated with placebo, mainly at the first 24 h after radiation. Phytochemical analysis of BGJ was performed by determining total phenolics, flavonoids, and tannins followed by a high-performance liquid chromatography (HPLC/DAD) analysis, which showed resveratrol (31.28 ± 0.04 mg/L) as the majority compound. Results suggest that BGJ is a good protective candidate compound against heart damage from ARS and its effects suggest its use as a radiomodifier. The second study investigated the secondary effects of fractionated whole brain irradiation (WBI). Radiotherapy is used for brain tumour treatment. WBI causes side effects such as neurocognitive impairments, anorexia and osteoradionecrosis. We used the BGJ as countermeasure to the side effects of WBI. Forty rats were exposed to 8 sessions of fractionated WBI. The total dose absorbed was 32 Gy. Forty rats were exposed to 8 sessions of fractionated WBI. The total dose absorbed was 32 Gy. The animals were divided into 4 groups equals to the studied groups in the first experiment. The rats received the BGJ or glucose and fructose solution 4 days before, during, and 4 days after WBI. Body weight, food and water consumption were measured during the experiment. The blood was collected 2 months after WBI and the mandibles were collected for morphometric and histological analysis. The irradiated and BGJ supplemented rats lost less weight than irradiated control rats (RG) in some days of WBI sessions, indicating a protective effect of BGJ. In some days, RJ rats ingested more food and water then RG rats. After WBI, all rats grew until day 61. Irradiated animals started losing weight again compared with controls as a consequence of mandibular osteoradionecrosis (ORN). Measurements performed on mandible showed that RG animals lost weight due to masticatory hypofunction. At microscopic level, osteoclastic activity and inflammation were apparent in mandibles of RG rats. Nevertheless, although BGJ did not completely restore the alterations induced by WBI, this antioxidant-rich beverage can be used to attenuate side effects of brain irradiation. In general, the BGJ offer protection to side effects induced by radiation in rats.

Key words: radiobiology, black grape juice, heart damage, secondary effect of whole brain irradiation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Formação de raios-X	15
FIGURA 2 - Radiólise da água	20
FIGURA 3- Reações de rearranjo de radicais livres formados durante a radiólise da água	20
FIGURA 4- Reação de dismutação do ânion superóxido.....	21
FIGURA 5- Reação de catálise do H ₂ O ₂	22
FIGURA 6- Reação catalisada pela GPx.....	22
FIGURA 7- Relação entre dose (Gy) e síndromes da radiação relacionadas á SAR	24
FIGURA 8 - Estrutura molecular básica dos flavonoides	36
FIGURA 9 - Formas isoméricas do resveratrol.....	40
FIGURA 10 - Placas de Cerrobend [®] usadas para blindar o corpo dos animais.....	91

ARTIGO

FIGURE 1 - Representative high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) profile of BGJ, detection UV was set at 327 nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), resveratrol (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), quercetin (peak 6) and kaempferol (peak 7).....	47
FIGURE 2 - Serum lactate dehydrogenase (LDH) levels for all groups of male Wistar rats at 24, 48, 72 and 96 h after exposure to radiation	49
FIGURE 3 - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels expressed $\mu\text{mol MDA/mg protein}$	50

MANUSCRITO

FIGURE 1 – Experimental design.....	80
FIGURE 2 - Growing curves.....	81
FIGURE 3 - Food intake	82
FIGURE 4 - Water intake.....	83
FIGURE 5 - Mandibular points and measurements	84
FIGURE 6 - Hematoxilin and eosin-stained sections of mandible and cells count and necrotic area measurement	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resumo das ações radiomodificadoras do suco de uva orgânico.....	42
TABELA 2 - Grupos experimentais	89

ARTIGO

TABLE 1- Content of phenolics, flavonoids and condensed tannins of BGJ. LOD and LOQ variations for antioxidants compounds.....	48
--	----

MANUSCRITO

TABLE 1- Biometric points and measurements.....	86
TABLE 2- Hematological parameters	87

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- OH- radical hidroxil
- AST- asparato amino transferase
- CAT- catalase
- CK- creatina quinase
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
- Cu/ZnSOD – superóxido dismutase cobre/zinco.
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EGCG - (-)-epigallocatequina 3-O-galato
- ERO – espécie reativa de oxigênio
- FA – fosfatase alcalina
- GPx- glutationa peroxidase
- GSH – glutationa
- GT- glutationa transferase
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- ICI – irradiação de corpo inteiro
- LDH- lactato desidrogenase
- LPO – lipoperoxidação
- MDA - malondialdeído
- NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
- RI – radiação ionizante
- RL – radical livre
- SAR – síndrome aguda da radiação
- SOD- superóxido dismutase
- SUO – suco de uva orgânico
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho apresenta uma revisão sobre os temas centrais referentes às pesquisas desenvolvidas. A metodologia, resultados e discussão dos dados estão contidos em um artigo científico publicado na revista *Molecules* (ISSN 1420-3049) e em um manuscrito. Também, contém uma discussão geral dos dados seguida das conclusões obtidas.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	15
II OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	18
III REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Fatos históricos – Bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki e acidentes	19
3.2 Radiobiologia	19
3.3 Radiações ionizantes, processos oxidativos e defesas antioxidantes	20
3.4 Síndrome aguda da radiação (SAR)	23
3.4.1 Síndrome prodrômica	24
3.4.2 Síndrome hematopoiética	25
3.4.3 Síndrome gastrointestinal	26
3.4.4 Radiodermite	26
3.4.5 Síndrome cardiovascular	27
3.5 Radioterapia	28
3.5.1 Irradiação cranial e seus efeitos secundários	29
3.6 Radiomodificadores	32
3.6.1 Radiomodificadores de origem natural	33
3.6.1.1 Vitaminas e pigmentos	33
3.6.1.2 Plantas medicinais e seus metabólitos secundários	35
3.6.1.3 Suco de uva como radiomodificador	39
IV ARTIGO	43
V MANUSCRITO	60
VI DISCUSSÃO GERAL DOS DADOS	88
VII CONCLUSÕES	94
VIII REFERÊNCIAS	95

I-INTRODUÇÃO

Em 1895, foi descoberto o primeiro tipo de radiação ionizante. O físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen estudou os raios catódicos em tubos cilíndricos e, em ensaios, descobriu que estes emitiam luzes azuis ou verdes. Também, observou que os tais raios tinham o poder de ultrapassar superfícies quando analisados em câmara escura. Röntgen denominou estes de raios-X. O “X” fez alusão a algo desconhecido, porém esta designação ainda é especulada. (HALL, 2006).

Conceitualmente, a radiação ionizante é uma onda eletromagnética ou partícula altamente energética que ao interagir com o meio absorvedor, apresenta a propriedade de transferir, de forma integral ou parcial, energia para os átomos e moléculas deste meio, resultando no fenômeno conhecido como ionização (KAPLAN, 1978). A unidade de mensuração de dose de radiação é o Gray (1 joule/quilograma). Esta unidade pertence ao Sistema Internacional de Unidades (SIU), sendo utilizada para quantificar a dose de radiação absorvida pela matéria (ISAACS, 2009). No grupo das radiações ionizantes figuram de forma principal a radiação alfa (α), a beta (β) e a gama (γ). A radiação alfa ou partícula alfa é formada durante o processo de estabilização de um núcleo com excesso de energia e emite partículas de carga positiva, constituídas por dois prótons e dois nêutrons (CARDOSO, 2012). As radiações α apresentam elevada energia cinética e possuem poder de penetração bastante reduzido, sendo a capacidade de ionização desta radiação bastante elevada. Dessa forma, a partícula α não possui energia suficiente para causar danos às camadas epiteliais mais externas (SEVCOVA, 1979). No entanto, no caso de intoxicação por via oral, o sistema respiratório, o gastrointestinal e os tecidos subjacentes são gravemente afetados (LEHNERT, 1997). Já na existência de um excesso de nêutrons em relação a prótons, há emissão de um elétron, resultante da conversão de um nêutron em um próton. Este elétron é chamado de partícula beta negativa (β^-) (HALLIDAY, 2009). Quando ocorre o excesso de cargas positivas em um átomo, este emite partícula beta positiva (pósitron). Desta forma, a radiação beta é constituída de partículas emitidas por um núcleo, quando da transformação de nêutrons em prótons (partícula beta) ou de prótons em nêutrons (pósitrons). Partículas β possuem energia variável e poder penetrante baixo, sendo utilizada na cicatrização de procedimentos estéticos e de cirurgias do globo ocular (STEWART, 2012). Comumente, após a emissão de uma partícula α ou β , o núcleo resultante deste desfecho ainda apresenta energia em demasia e este se estabiliza emitindo uma onda eletromagnética, denominada radiação gama. Tal evento ocorre no momento em que um próton ou um nêutron transita para um nível de energia com menor valor. Desta forma

há formação de uma estrutura mais estável. A radiação gama apresenta elevado poder de penetração, tendo diversas aplicações. Entre eles, destaca-se a medição do nível de materiais em silos de grande espessura e, na área da saúde, é usada na radioterapia (HALL, 2006).

Os raios X originam-se a partir de interações entre elétrons. São produzidos em tubos de raios-X, resultantes da desaceleração rápida de elétrons que se chocam contra um anteparo metálico constituído normalmente por material pesado. O cátodo é constituído de um filamento aquecido de tungstênio e, o ânodo é um bloco de cobre. Assim, a energia dos elétrons é transformada, em grande parte, em energia térmica. E, os elétrons gerados no cátodo são focados em um anteparo com inclinação de aproximadamente 45° e como produto desta colisão, há formação de raios-X (LEHNERT, 2007).

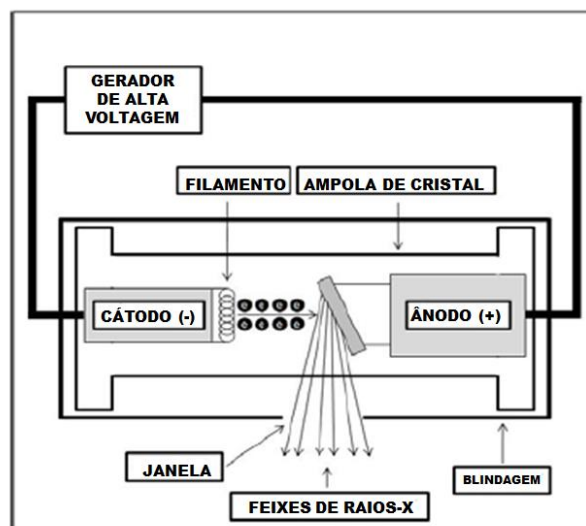


Figura 1 – Formação de raios-X. Figura adaptada de BIRAL, 2002.

O uso difuso da radiação ionizante representa um dos mais importantes pilares do controle de qualidade da cadeia produtiva em uma sociedade contemporânea, pois por meio desta tecnologia se obtêm-se resultados importantes em áreas fundamentais como a de energia e também na medicina com destaque para o diagnóstico e tratamento de várias patologias. Entretanto, é um tipo de energia que pode ser bastante danosa ao organismo. Já ocorreram acidentes nucleares e radiológicos que comprometeram populações inteiras devido à falta de intervenções rápidas e eficazes no tratamento de intoxicações (GUSKOVA, 2001). Não só em doses tóxicas, observam-se efeitos deletérios da radiação. Pacientes submetidos ao tratamento radioterápico apresentam sinais e sintomas em diversos órgãos, principalmente no órgão alvo

da terapia, hoje há um número expressivo de trabalhos científicos que buscam esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos secundários à exposição à radiação e possíveis formas de profilaxia e tratamento. Nosso grupo tem pesquisa, ao longo dos últimos anos, vem explorado o efeito protetor do suco de uva orgânico em modelos experimentos. Esta tese dá prosseguimento ao efeitos do suco de uva orgânico em danos causados pela exposição aguda a radiação e também, mostra os efeitos radiomodificadores do suco na exposição fracionada ao raios-X.

II- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar a ação radiomodificadora do suco de uva orgânico (SUO) sob o dano cardíaco induzido pela irradiação de corpo inteiro em ratos Wistar e seus efeitos protetores do SUO contra os danos induzidos pela irradiação cranial fracionada.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar o conteúdo total de polifenóis, flavonoides e taninos através de métodos colorimétricos e isolar e quantificar compostos bioativos no SUO por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Investigar os efeitos radioprotetores do SUO no coração de ratos por meio do ensaio do teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da dosagem sérica da lactato desidrogenase (LDH) em modelo experimental de síndrome aguda da radiação.
- Analisar o efeito protetor do suco de uva contra os efeitos secundários em ratos submetidos à irradiação cranial fracionada por meio de análises hematológicas, histopatologia e medidas morfométricas da mandíbula e comportamento ingestivo.

III – REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - Fatos históricos – Bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki e acidentes

Após a segunda guerra mundial, entrou em cena uma arma letal até então desconhecida – a bomba atômica. As bombas atômicas jogadas em 1945 sob as cidades japonesas Hiroshima e Nagasaki mostraram ao mundo o poder devastador da energia atômica. Muitos questionamentos surgiram após os acontecimentos como: o que a bomba causaria nas pessoas atingidas? Quais os efeitos biológicos da radiação emitida pela bomba? Os efeitos foram inúmeros (RIBEIRO, 2009). Os atingidos sofreram queimaduras de pele e de retina em decorrência da explosão e os efeitos da síndrome da radiação. A síndrome da radiação envolve um número significativo de injúrias celulares que afetam a funcionalidade sistêmica do organismo. Também foram relatados casos de alterações genéticas e tumores. A população ainda sofre com a consequência da exposição à radiação e muitos pacientes ainda apresentam hipertensão, diabetes, alterações hepáticas, distúrbios cardíacos, e doenças neoplásicas. Estimativas mostram que aproximadamente 140 mil pessoas morreram neste desastre. Ao decorrer do século XX, ocorreram acidentes radiológicos e nucleares em diversos países, entre eles Estados Unidos, China, Israel e Ucrânia (GUSKOVA, 2001).

Em 1986, ocorreu o acidente nuclear na usina de Chernobyl, Ucrânia. O acidente ocorreu quando operadores da usina faziam ensaios com um reator, utilizando baixos níveis de energia. O reator ficou superaquecido o que causou a tragédia no leste europeu, A explosão liberou quantidades elevadas de material radioativo (Urânio-235). Dentre as consequências da radiação de Chernobyl, está o aumento da prevalência de doenças cardiovasculares, hepáticas, neoplásicas, neurodegenerativas, do trato urinário, má formação congênita entre outras. Embora, as autoridades tenham feito diversos esforços para conter a radiação, houve contaminação do solo, leite e ar. No momento do ocorrido 26 pessoas morreram de imediato. No entanto, o número de óbitos foi crescendo devido aos efeitos deletérios da síndrome da radiação (VARTANIAN, 2004).

No Brasil, em setembro de 1987 aconteceu o acidente radiológico de Goiânia. A causa do acidente foi o manuseio indevido de um aparelho de radioterapia abandonado onde funcionava o Instituto Goiano de Radioterapia. O acidente envolveu centenas de pessoas. A fonte radioativa continha cloreto de cézio que é altamente solúvel e tem meia vida de aproximadamente 33 anos. Os acometidos pelo acidente tiveram contato direto através da pele

e por inalação. Os efeitos colaterais da intoxicação foram radiodermite, náusea, vômito, diarreia, tontura, imunodepressão e alterações neurológicas. Aproximadamente 120 mil pessoas foram monitoradas por profissionais da saúde. Oito pacientes desenvolveram a Síndrome Aguda da Radiação (SAR), 14 manifestaram falência da medula óssea e 01 sofreu amputação do antebraço. No total, vinte e oito pessoas desenvolveram a Síndrome Cutânea da Radiação ou Radiodermite. Os casos de óbito ocorreram entre 4 e 8 semanas após o acidente e estavam relacionados a complicações da SAR e a processos infecciosos. Estudos foram conduzidos estudos de dosimetria citogenética com intuito de se conhecer a dose de radiação que as vítimas foram expostas (CRUZ, 1997).

O último fato envolvendo energia nuclear foi em Fukushima (Japão) ocorrido em março de 2011. A causa do acidente foi um terremoto de 8,9 graus na escala Richter. Ocorreu vazamento de material radiativo das usinas nucleares. Houve contaminação do ambiente e por isso muitos habitantes da região ainda não puderam retornar para suas residências 3 anos após o acidente. A tragédia causou 1.700 mortes. Já há associação entre o aumento de cânceres em crianças e contaminação com a radiação (BEDWELL, 2015).

As graves consequências destes acidentes e o uso das radiações em diversos ramos como a área da saúde fomentam estudos na área de Radiobiologia com o intuito de criar medidas preventivas e curativas para os danos causados pela radiação ionizante no corpo humano.

3.2- Radiobiologia

A Radiobiologia entrelaça duas ciências: a física das radiações ionizantes e a biologia (ANDRADE, 2010). Estuda os eventos que ocorrem no princípio da absorção da energia da radiação ionizante pelo organismo vivo até o desfecho desta interação que pode ou não ser benéfico. Contempla a área da radioterapia na qual a energia ionizante é usada no tratamento de cânceres e tumores e é classificada como Radiobiologia clínica. Também, através busca por meio dela, a Radiobiologia, ferramentas para o manejo da síndrome aguda da radiação (SAR): causas, consequências e terapêutica (PLATERO, 2010).

3.3-Radiações ionizantes, processos oxidativos e defesas antioxidantes

A molécula de água é a mais abundante no corpo humano, participando praticamente de todas as reações metabólicas. Então, no caso de exposição a radiações ionizantes, as moléculas atingidas em maior número são as de água, que sofrem radiólise (FIGURA 2).

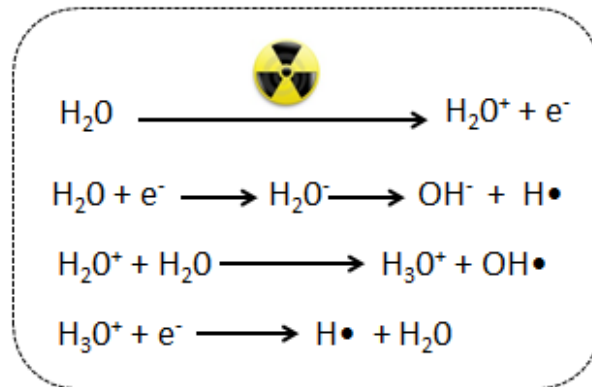


Figura 2 – Radiólise da água. Figura adaptada de ANDRADE, E. R., BAUERMANN, L. F., 2010.

Após a ionização da água, ocorre um rearranjo eletrônico no qual o equilíbrio químico se reestabelece, formando água novamente ou produzindo radicais livres (RLs) (KARBOWNIK, 2000) (FIGURA 3).

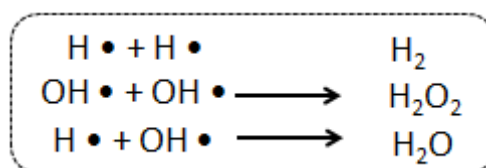


Figura 3 – Reações de rearranjo de radicais livres formados durante a radiólise da água. Figura adaptada de ANDRADE, E. R., BAUERMANN, L. F., 2010.

Os radicais livres (RLs) são agentes altamente reativos em decorrência da presença de elétrons desemparelhados na última camada. Com a finalidade de estabilizar-se, um RL irá interagir com biomoléculas, como: lipídeos e proteínas, que são constituintes das membranas celulares de mamíferos e que são basicamente formadas por uma dupla camada lipídica com moléculas de proteínas imersas ou ligadas à superfície (HALLIWELL, 2007). O principal

evento envolvido no dano celular é a lipoperoxidação (LPO). Inicialmente a LPO é causada pela reação dos lipídios da membrana com qualquer espécie reativa o suficiente para sequestrar um átomo de hidrogênio do grupo metileno (-CH₂-).

O radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) subtrai um átomo de hidrogênio de um lipídeo insaturado, gerando um radical lipídico. Este radical interagirá com outras moléculas lipídicas, gerando uma reação em cascata que origina produtos tóxicos para as células, entre eles o malondialdeído (MDA) (HALLIWEL, 2007). Quando um agente estressor exacerba a concentração de oxidantes no organismo, a LPO aumenta consideravelmente, levando a injúrias celulares. Vários estudos relacionam o dano oxidativo a doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, hepáticas e neoplásicas (GROTTO, 2008). Afortunadamente, o organismo humano apresenta um leque de defesas antioxidantes que neutralizam ou atenuam os efeitos nocivos dos RLs e de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são produzidas durante o metabolismo aeróbico e em condições patológicas. As defesas antioxidantes endógenas estratificam-se em enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as enzimáticas, destacam-se a enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona transferase (GT).

A SOD participa de um grupo de enzimas possuidoras de diferentes grupos prostéticos em sua estrutura. Nas células eucariotas há duas isoformas desta enzima. Elas diferem entre si, tanto na composição quanto no local onde estão presentes. A forma SOD-cobre-zinco (Cu/ZnSOD) localiza-se principalmente no citosol, enquanto a SOD-manganês é encontrada no espaço intermembranas mitocondrial. A ação antioxidante desta enzima é dada pela capacidade que possui de dismutar o ânion superóxido em O₂ e H₂O₂. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007) (FIGURA 4).

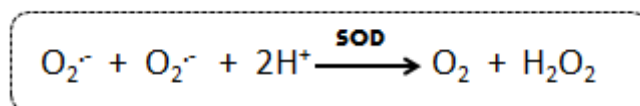


Figura 4 – Reação de dismutação do ânion superóxido. Figura adaptada de HALLIWELL, 2007.

A CAT é uma hemoproteína capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a água e oxigênio molecular. Esta enzima está presente no citosol de células sanguíneas, renais e hepáticas. Sua atividade é dependente de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P). O H₂O₂ é fracamente reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição

(ferro e cobre) No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por transpor facilmente as membranas celulares e gerar o radical $\cdot\text{OH}$ (SCOTT, 1991) (FIGURA 5).

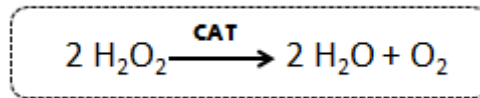


Figura 5 – Reação de catálise do H_2O_2 . Figura adaptada de HALLIWEL, 2007.

A GPx pode reagir com uma variedade de peróxidos e derivados dos ácidos graxos poliinsaturados. Para isto, a enzima emprega a glutathiona (GSH) como co-substrato. A GSH oxidada se reduz por ação da enzima GSH-redutase, que por sua vez utiliza NADPH como co-factor. A metabolização dos hidroperóxidos origina espécies radicalares (FLOHE, 1984) (FIGURA 6).

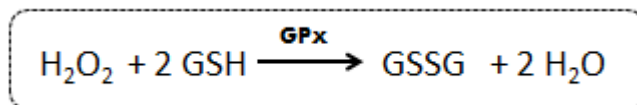


Figura 6 – Reação catalisada pela GPx. Figura adaptada de HALLIWEL, 2007.

A GT catalisa a metabolização de xenobióticos por conjugação com a GSH. Está presente nas células hepáticas e detoxifica o fígado eliminando glutathiona oxidada (GSSG) quando este órgão sofre dano oxidativo. A transferase também pode metabolizar aldeídos citotóxicos gerados durante a LPO (HUBER, 2008). Os compostos tiólicos apresentam poderosa ação antioxidante e no organismo humano fazem parte das defesas antioxidantes não enzimáticas, sendo a glutathiona (GSH) um dos principais. A GSH interage com hidroperóxidos produzidos em reações oxidativas, neutralizando-os (DICKINSON, 2002).

A radiação ionizante pode causar injúrias mediadas RLs e EROs mas, também, atua diretamente na molécula de DNA. O DNA é o responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as enzimas celulares. Dessa forma, ele passa a ser a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos. Porém ao sofrer ação direta das radiações ionizantes, a molécula de DNA torna-se vulnerável a mutações e a quebras estruturais. Tais eventos se ocorridos em células gaméticas, podem aumentar a probabilidade de doenças

hereditárias (NOUAILHETAS, 2005). Assim, o maquinário celular contra a nocividade dos oxidantes deve estar íntegro para impedir o agravamento de eventos agudos e crônicos causados pela ionização.

3.4- Síndrome aguda da radiação (SAR)

A SAR surge quando um organismo é atingido maciçamente pela radiação ionizante (RI) e caracteriza-se por um conjunto de sinais e sintomas. São conhecidos quatro estágios toxicológicos da SAR: o primeiro é físico e envolve a excitação de átomos. No caso de um organismo absorver uma dose de 1 Gy, esta dose será capaz de produzir 10^5 ionizações em um volume celular de 10 μm de diâmetro (PLATERO, 2010). O segundo é físico-químico. Neste ocorre a quebra de ligações químicas de moléculas e geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. O terceiro estágio é bioquímico, sendo desencadeado pela desorganização de macromoléculas. Assim, ocorrem reações enzimáticas que atuam sobre o dano celular radioinduzido na tentativa de reparar a maioria dos danos causados ao material genético e a outras biomoléculas (ZIMMERMANN, 2001). Quando o dano celular não é reparado, o mecanismo de morte celular programada (apoptose) é acionado. O último envolve o surgimento de manifestações e/ou alterações morfológicas e fisiológicas. Estudos em humanos e em animais de experimentação mostram que as células lábeis são os primeiros alvos da ionização (FREITAS, 2014).

Os efeitos tóxicos da RI, dependendo da dose de radiação, podem se manifestar em um curto espaço de tempo. As consequências da exposição à radiação para o indivíduo dependem intimamente da dose absorvida, da taxa de exposição (crônica ou aguda) e da forma de contato (corpo inteiro ou localizada). Os sintomas mais frequentes são: alterações gastrointestinais, neurológicas, comportamentais, hematológicas e cutâneas (ADRADADE, 2010) (FIGURA 7).

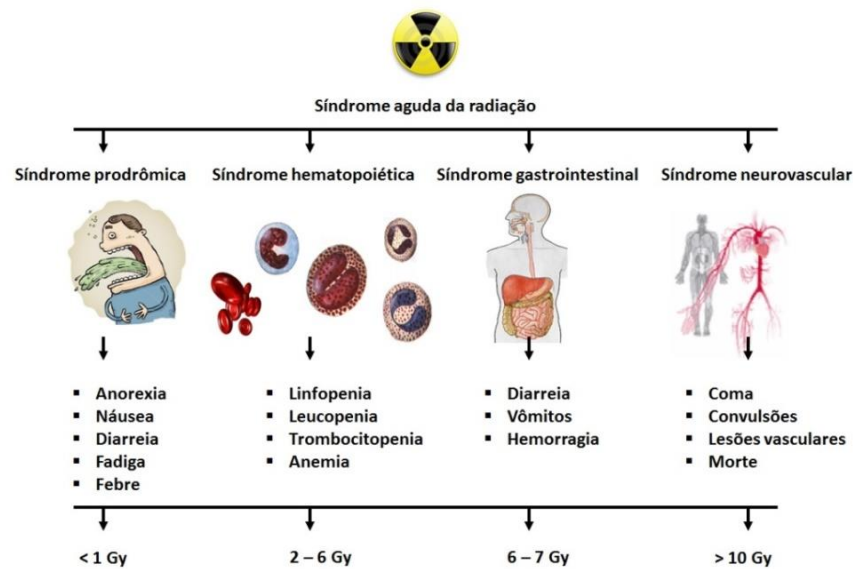


Figura 7 - Relação entre dose (Gy) e síndromes da radiação. Figura adaptada de ANDRADE, E. R., BAUERMANN, L. F., 2010.

3.4.1- Síndrome prodrômica

A síndrome prodrômica surge minutos a dias após a exposição a altas taxas de doses de RI e esta se caracteriza pelo surgimento de náusea, vômito, diarreia e mal estar generalizado. Os pacientes nesta fase também podem apresentar quadros de insônia, vertigem, tontura e confusão mental (OTTERSON, 2007). A dose letal 50 (DL50) da radiação ionizante para humanos está em torno de 4.5 Gy. Doses inferiores a DL50 já desencadeiam alterações no organismo e doses maiores são potencialmente letais (ANDRADE & BAUERMANN, 2010). Para doses iguais ou maiores que 10 Gy, o período de latência é praticamente inexistente. Sinais de prostração ou incapacitação transiente indicam intoxicação por doses extremamente tóxicas de radiação (PRASAD, 1995). Os sintomas neuromusculares desta síndrome incluem: fadiga, apatia, febre, dor de cabeça e hipertensão. Há relatos na literatura sobre insuficiência aguda do miocárdio. (MANSOUR, 2011). Em doses acima de 7,5 Gy

alguns pacientes apresentam pressão arterial baixa e hipovolemia. Alguns manifestaram inchaço na região das glândulas parótidas. E, aproximadamente 75% dos pacientes desenvolvem infecções orais provavelmente ocasionadas pela leucocitopenia e imunossupressão. Faringites fúngicas e virais podem aparecer dentro de 3 dias. Todos esses sinais e sintomas são apenas observados em pacientes expostos a doses letais ou quando o período de sobrevivência supera 48 horas após a irradiação. A exata patofisiologia da fase prodômica da SAR ainda não é conhecida (CHRISTENSEN, 2014). Porém, muitos fatores causais já foram sugeridos, incluindo efeitos diretos da radiação no sistema nervoso central, distúrbio no sistema endócrino e produção de substâncias tóxicas como os RLs e as EROs. Pacientes irradiados com fins terapêuticos também apresentam sintomas semelhantes, porém estes normalmente são mais brandos e tendem a desaparecer com a descontinuidade do tratamento (CHRISTENSEN, 2014).

3.4.2- Síndrome hematopoiética

As células-tronco hematopoiéticas são as mais radiosensíveis do corpo humano, por isso, a radiação tem a capacidade de destruir células em intensa atividade mitótica, diminuindo o número de células vermelhas maduras, leucócitos e plaquetas. Como o número de células maduras circulantes diminui e há formação deficiente de novas células, os danos ao sistema hematopoiético começam a surgir. As consequências fisiológicas causadas pelo dano à medula óssea e ao baço incluem: susceptibilidade aumentada a infecções, hemorragia, anemia e imunossupressão. (NOUAILHETAS, 2005). Como estratégia para avaliar-se o grau de contaminação, pode-se lançar mão da contagem de hemocomponentes. Um declínio de 50% na contagem de leucócitos 24 horas após a irradiação indica exposição a uma dose potencialmente letal e normalmente está associado à SAR (GOANS, 1997). Autores relatam que a predição de dose absorvida pode ser obtida pela contagem de linfócitos em diferentes tempos após a exposição à radiação ou através da velocidade de depleção destas células com base em registros de acidentes radiológicos ocorridos anteriormente (GOANS, 1997; GUSKOVA, 2001). Nosso grupo de pesquisa investigou o comportamento de células sanguíneas de ratos irradiados por uma fonte de cobalto. Vinte e quatro horas após receberem 6 Gy de radiação gama, houve uma redução de aproximadamente 9,75% destas células em relação ao grupo controle. Contagens realizadas 48, 72 e 96 horas após a radiação tiveram as

seguintes reduções para o grupo irradiado quando comparado ao controle: 80,48%, 96,25% e 97,5%, respectivamente (FREITAS, 2014). Os resultados estão de acordo com dados já descritos na literatura. Quanto mais rápido forem realizados os exames hematológicos, maiores serão as chances de se determinar uma estratégia terapêutica adequada que tenha impacto na sobrevida do indivíduo irradiado.

3.4.3- Síndrome gastrointestinal

Quando o organismo vivo é exposto a uma dose maior que 12 Gy, a síndrome gastrointestinal é a grande responsável pela letalidade da SAR. A síndrome gastrointestinal contempla anorexia, náusea, vômito, diarreia, salivação, perda de fluidos, cólicas intestinais, desidratação e perda de peso (NOUAILHETAS, 2005). Esta síndrome ocorre em roedores expostos a doses que podem variar entre 8 e 12 Gy. Uma dose dentro desta faixa resulta em morte uma semana após a irradiação e é causada pelo dano à mucosa gastrointestinal. Desta forma, o organismo torna-se suscetível a infecções bacterianas (WALKER, 1978). Pessoas expostas a uma dose menor que 10 Gy apresentam desconforto gástrico nas duas primeiras horas após a exposição. Já, a patologia intestinal contempla ulceração da mucosa, hemorragia, perda de eletrólitos, alterações da flora entérica e depleção do tecido linfóide intestinal. Os efeitos sistêmicos incluem: má nutrição relacionada à absorção reduzida de nutrientes, anemia por hemorragia gastrointestinal e sepse por alteração da integridade da mucosa intestinal (METTLER, 1995). Uma estratégia para atenuar os sinais e sintomas desta subsíndrome é a terapia com antibióticos e reposição de fluidos. Estes tratamentos podem prevenir a morte precoce dos pacientes que foram vítimas de acidentes radiológicos, porém estes pacientes podem morrer 98 horas após a contaminação devido à falência dos demais órgãos (DUBOIS, 1988).

3.4.4- Radiodermite

A radiodermite é consequência da absorção de energia das radiações pelas moléculas. Apresenta semelhança a queimaduras, provoca hiperemia e edema. Observa-se áreas de

despigmentação e hiperpigmentação e, por último, em um quadro mais severo, pode ocorrer necrose do tecido cutâneo.

As estruturas mais sensíveis da pele à radiação são: o epitélio germinal, glândulas sebáceas e folículos pilosos (HYMES, 2006). A dose letal de 7 Gy em roedores induz estresse oxidativo, aumentando a peroxidação lipídica que é resultado da transformação de lipídios multi-insaturados em malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NOx). Enquanto, o nível de GSH, um cofator da enzima GPx significativamente decai na pele, aumentando o desequilíbrio redox (JAGETIA, 2003).

3.4.5- Síndrome cardiovascular

A radiação ionizante aumenta os riscos de doença arterial coronariana, doença cardíaca valvular, insuficiência cardíaca congestiva e infarto agudo do miocárdio (SWERDLOW, 2007). Em um estudo conduzido por Mansour (2012), ratos expostos a 7 Gy de radiação gama tiveram a atividade sérica aumentada das enzimas lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase (CK) e asparato amino transferase (AST) em comparação aos animais controle. A causa do aumento destas enzimas é o dano provocado na membrana celular dos cardiomiócitos pelos RLs produzidos na radiólise da água e por peróxidos derivados de lipídeos, levando ao extravasamento destas enzimas citosólicas para o plasma (CASTEDO, 2005). Após a irradiação, há um aumento na taxa de colesterol total, LDL-C (*low-density protein*) e aumento na taxa de triglicerídeos. Esses parâmetros bioquímicos são conhecidos por aumentarem os riscos de doenças cardiovasculares. Em ratos *Sprague-Dawley* expostos à radiação de corpo inteiro (ICI), a colesterolemia foi quantificada 24 após ICI e observou-se um acréscimo significativo no teor de colesterol sérico em comparação ao grupo “sham”. O colesterol permaneceu aumentado 7 dias após a irradiação. A hipergliceridemia ocorreu 24 após à irradiação e ao 7º dia os níveis eram semelhantes aos do grupo controle (MANSOUR, 2012). A hiperlipidemia é o maior fator causal de estresse oxidativo, sendo pivô na susceptibilidade ao dano cardíaco em animais e humanos. Dados revelam que a

oxidação da LDL-C representa um importante papel na gênese da aterosclerose (MEHTA, 2003).

3.5- Radioterapia

Mais da metade dos pacientes diagnosticados com câncer recebem terapia com radiação. Esta terapia pode ser isolada ou combinada com outros tipos de tratamentos, entre eles a quimioterapia. Em algumas doenças, a radioterapia é usada como método primário, por exemplo, na tentativa de cura do linfoma de Hodgkin e cânceres em estágios iniciais (PORTH, 2010). Quando é escolhida como única forma terapêutica, a duração do tratamento é mais longa e a dose utilizada é usualmente maior que a usada em estratégias paliativas. A radioterapia também é utilizada como adjuvante em alguns casos, sendo administrada no pré e no pós-operatório associada ou não à quimioterapia. A interação da radiação com a célula pode resultar em morte, retardo ou inibição do ciclo celular. E, nas dosagens usadas na clínica, causam danos ao núcleo que culminam em morte celular após o processo de replicação. As células em rápida proliferação e pouco diferenciadas como as tumorais tem sensibilidade aumentada ao efeito nocivo das radiações, e com isso, maior probabilidade de serem destruídas pela irradiação do que as células em estágio normal de proliferação. Células saudáveis que estão sendo constantemente renovadas são as mais afetadas quando um paciente é submetido à terapia com radiação. Por isso, é bastante comum manifestarem alterações na mucosa gástrica e no sistema hematopoiético (HALL, 2006). Devido a estes eventos, o tratamento radioterápico é comumente administrado em doses fracionadas para que as células dos tecidos saudáveis recuperem-se entre uma sessão e outra de radioterapia, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida e aumentar a tolerância ao tratamento (FERNET, 2004). A ação da radiação está fortemente ligada à radiosensibilidade da célula tumoral, que varia de acordo com tipo celular e principalmente com a etapa do crescimento celular que a célula se encontra (BARNETT, 2009). As células de crescimento rápido, normalmente são mais radiosensíveis, principalmente as que se encontram na mitose ou aquelas com a fase S mais estendida. A leucemia linfocítica aguda e os linfomas são os cânceres mais sensíveis à RI, enquanto, os rabdomiossarcomas e os melanomas apresentam baixa sensibilidade (PORTH, 2010). Quando a radioterapia é escolhida para o tratamento, deve-se atentar para algumas características: radiosensibilidade das células tumorais, tamanho do tumor e

principalmente, a tolerância à RI dos tecidos circunvizinhos. Um fator importante para resposta do tumor à radiação é o nível de oxigenação deste (SILVA, 2014). O oxigênio do meio pode potencializar a ação dos radicais livres gerados durante a ionização da molécula de água e, por meio de reações de oxidação destruir as células malignas. Tumores de crescimento acelerado apresentam baixo aporte de oxigênio. As células hipóxicas são mais tolerantes à radiação que as células tumorais bem oxigenadas ou células saudáveis. Nas últimas décadas, investigadores tentam incansavelmente criar um esquema terapêutico capaz de incluir a radiosensibilidade tumoral e a radiosensibilidade de tecidos íntegros, possibilitando um tratamento com menos danos secundários, baseado no estudo da sensibilidade de cada indivíduo ao tratamento. Os efeitos adversos apresentados pelos pacientes durante a radioterapia e a baixa tolerância dos tecidos saudáveis circundantes ao tumor limitam o tratamento (POPANDA, 2008). A taxa de dose (dose absorvida por unidade de tempo), dose administrada por sessão, volume irradiado, dose total absorvida e o tempo da terapia são questões relacionadas à radiação que podem diminuir a qualidade de vida do paciente. Porém, fatores relacionados ao estilo de vida do paciente como: etilismo, tabagismo e estado nutricional agravam os efeitos colaterais da radioterapia. Leva-se em consideração também o uso de quimioterapia e outros tratamentos farmacológicos (TWARDELLA, 2002).

3.5.1-Irradiação cranial e seus potenciais efeitos secundários

A irradiação cranial fracionada é empregada no tratamento de tumores do sistema nervoso central (SNC). Os danos cerebrais induzidos por radiação podem ser categorizados em: agudos, intermediários e tardios (TOFILON, 2000). A reação aguda ocorre durante ou horas após a irradiação. Os efeitos colaterais comumente manifestados pelos pacientes são: náusea, vômito, vertigem e raramente convulsões. Estes efeitos são bastante responsivos a medicações e tendem a ceder em um intervalo curto de tempo (LAWRENCE, 2010). Enquanto, os efeitos intermediários ocorrem entre 1 e 6 meses após a irradiação cranial, podendo a radioterapia causar desmielinização transitória e sonolência. Os efeitos tardios caracterizados pela desmielinização, alterações vasculares e necrose da substância branca são de difícil controle. (SCHULTHESIS, 1992). Estes efeitos surgem em uma janela temporal que

pode variar de 6 meses a alguns anos após a irradiação, sendo considerados irreversíveis e progressivos. Os efeitos colaterais induzidos pela radiação de cérebro inteiro (RCI) afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes (BUTLER, 2006). O tratamento ou a prevenção destes efeitos fomenta diversos estudos. A radiação fracionada é o regime de tratamento corrente na clínica para o tratamento de tumores cerebrais primários. A extensão e o número de sintomas manifestados pelos pacientes com histórico de tumores cerebrais estão intimamente entrelaçados com o regime de tratamento (dose, número de frações, área irradiada e volume irradiado). De acordo com Shaw e colaboradores (2000), a dose máxima tolerada por um paciente dependerá do volume de tecido irradiado. Para volumes menores de 20 mm de diâmetro a dose máxima tolerada é de 24 Gy. No entanto, doses iguais ou maiores que 12 Gy já apresentam uma forte correlação com a incidência de necrose do tecido cerebral e alterações assintomáticas. Sem sombra de dúvidas, a eficácia do tratamento radioterápico para o controle de neoplasias cerebrais é limitada pela dose, pois, os tecidos sadios são extremamente vulneráveis à toxicidade da energia ionizante. A necrose cerebral é uma complicação grave decorrente da radioterapia, podendo acometer os pacientes entre 1 a 3 anos após o término do tratamento. Está relacionada principalmente ao dano no endotélio vascular. O foco da necrose aparece na região do tumor ou em regiões adjacentes, ou seja, nas zonas onde a dose de radiação absorvida é maior. O paciente apresenta risco aumentado para radionecrose quando também faz uso de quimioterápicos. Dentre as consequências da necrose cerebral pode-se destacar déficits neurológicos e aumento da pressão intracraniana. A necrose é consequência do dano causado às células do endotélio vascular. A oclusão dos vasos resulta em necrose coagulativa e desmielinização do parênquima cerebral. Também já é sabido que a radioterapia gera estresse oxidativo crônico, neuroinflamação provocada pela ativação da micróglia e infiltração periférica de monócitos, aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (MADSEN, 2003; RABER, 2004; BALLESTEROS-ZEBADÚA, 2012). Alguns estudos revelam que o estresse oxidativo e a inflamação do tecido cerebral são fatores importantes nas alterações comportamentais e cognitivas (BROWN, 2007) Há forte evidência que as citocinas pró-inflamatórias, entre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem a capacidade de induzir dano celular e morte. A irradiação cerebral administrada em dose fracionada estimula aumentos transitórios na expressão de genes de várias citocinas. As alterações na cognição e comportamento em pacientes expostos à radiação fracionada para o tratamento de metástases cerebrais e gliomas são manifestadas em longo prazo. Dados anteriores relatam categoricamente a fraca relação entre o surgimento de problemas

cognitivos e o câncer cerebral, indicando que o fator causal é a radioterapia (BALLESTEROS-ZEBADÚA, 2012).

Os efeitos sistêmicos da irradiação cranial raramente são investigados devido ao fato de os efeitos mais graves ocorrerem no sistema nervoso central embora já seja conhecida a potencialidade do tratamento radioterápico em causar endocrinopatias (ROBINSON, 2011). Forbes e colegas (2013) investigaram o efeito sistêmico da radiação cranial fracionada em ratos (raça Fisher) adultos jovens (3 semanas de idade) e adultos (18 semanas de idade). Os animais dos diferentes grupos foram irradiados com 8 doses de 5 Gy. Metade da população de cada grupo foi eutanasiada 34 semanas após a irradiação e os ratos remanescentes foram eutanasiados 63 semanas após. O protocolo foi assim desenhado para que se pudessem observar os efeitos em longo prazo da irradiação. A perda de peso foi mais pronunciada em animais adultos e está relacionada principalmente à produção diminuída do hormônio do crescimento. Na clínica, observam-se quadros de hipopituitarismo em crianças e adultos que provocam alterações no metabolismo ósseo, sistema cardiovascular e peso corpóreo, sendo estes os mais comuns efeitos sistêmicos causados pela irradiação cranial de cérebro inteiro (DARZY, 2009).

Outra condição patológica relacionada à terapia com energia ionizante para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço é a osteorradionecrose (ORN). O osso da face mais afetado é a mandíbula embora outros também possam manifestar focos de necrose como a maxila (BONAN, 2006). Ocorre a exposição de osso desvitalizado em uma área previamente irradiada, sem evidências histológicas de reincidência do tumor. Antigamente eram considerados apenas três fatores causais para ORN – a radiação, infecções e traumas. Atualmente é sabido que outros fatores podem desencadeá-la. A teoria mais aceita sobre a etiologia da ORN é a seguinte: a radiação desencadeia uma endoarterite a qual provoca hipóxia tecidual, hipocelularidade e hipovascularização. Estes eventos estariam intrincados em uma cicatrização deficiente que tornaria o tecido ósseo exposto. O metabolismo ósseo também é afetado pela radiação, alterando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos e como consequência, a remodelação óssea não ocorre de modo eficiente (TENG, 2005).

A extensão dos danos causados pela ORN está diretamente relacionada à dose, à região irradiada e ao tempo de tratamento. Os profissionais da área de odontologia não indicam aos pacientes submeterem-se a procedimentos de extração dentária durante e após a radioterapia. A saúde bucal necessita de maior atenção para que se evitem doenças periodontais e processos inflamatórios. Grande parte dos casos surge em pacientes tratados com doses entre 50 e 60 Gy (MANZON, 2015). A forma como a radioterapia é aplicada pode

agravar os sinais e sintomas da ORN. Segundo Notani e colegas (2003), a radioterapia externa é a mais agressiva. Em oposição ao postulado por Notani, Teng e Futran (2005) relataram que a braquiterapia pode ser mais deletéria para os ossos faciais que radioterapia externa. Outros fatores podem estar relacionados com a ORN, como: estágio do tumor e localização. Pacientes com tumores de amígdalas, laringe ou orofaringe são mais suscetíveis à ORN (MANZON, 2015).

3.6- Radiomodificadores

Radiomodificadores são substâncias com a capacidade de prevenir ou atenuar os efeitos deletérios das radiações ionizantes no tecido vivo. O radiomodificador ideal deve apresentar algumas características importantes: 1) ser de fácil administração. A via oral é a via mais indicada, pois, não se necessita de profissionais treinados; 2) conferir efeito mitigador ao maior número de órgãos possíveis; 3) não deve interagir com outros tratamentos; 4) ter rápida ação após absorção e 5) apresentar baixa toxicidade (ANDRADE, 2009). Já é sabido que a maioria dos danos causados pela radiação ionizante é mediada pelos seus efeitos indiretos, através da conversão da molécula de água em RLs. E, conhecendo o tempo curto de meia vida dos radicais livres, a intervenção com o radiomodificador deve ser feita em um pequeno espaço de tempo após a contaminação. Dessa forma, o conjunto de sinais e sintomas que o paciente contaminado poderá apresentar, poderá ser diminuído consideravelmente com o tratamento. O único radioprotetor usado na clínica é amifostina (GU, 2014).

A amifostina é um pró-farmaco que é convertido pela fosfatase alcalina (FA) na molécula ativa WR-1065. O WR-1065 protege as células sadias da oxidação por meio da doação de íons de hidrogênio para os RLs e EROs (CASSATT, 2002). O fármaco é bastante usado em situações clínicas bem específicas como na diminuição da xerostomia, mucosite e deficiência auditiva que acomete pacientes em radioterapia para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço (KOUKOURAKIS, 2002; LESSA, 2009). Mesmo apresentando um efeito um bom citoprotetor, a amifostina pode causar náuseas, vômitos e hipotensão. A hipotensão é um efeito colateral que pode limitar o uso do tratamento e está relacionada a um possível efeito vasodilatador do fármaco. A solução para atenuar este efeito é diminuir a taxa de infusão (GU, 2014). Outro efeito colateral importante é a hipocalcemia transitória causada pela

liberação ineficiente do hormônio da paratióide. O número de trabalhos sobre novos radiomodificadores ou sobre a propriedade radiomodificadora de moléculas já existentes como a sinvastatina é bastante expressivo. No entanto, a amifostina continua sendo o tratamento de escolha (CITRIN, 2010).

3.6.1 – Radiomodificadores de origem natural

Quando analisado detidamente o mecanismo de ação do radiomodificador sintético amifostina, nota-se que este tem ação antioxidante porque quando sofre ação da FA presente na membrana plasmática, transforma-se no WR-1065. Esta molécula possui um grupo tiol livre (MAZUR, 2002). E, é sabido que compostos tiólicos inibem o processo oxidativo. Dessa forma, onexo entre ação da amifostina e radiomodificadores de origem natural é a propriedade antioxidante. Consideramos radiomodificadores de origem natural, compostos isolados de plantas medicinais e frutos. Também pode-se incluir neste grupo extratos vegetais como o de ginko e alimentos funcionais como o suco de uva.

3.6.1.1 Vitaminas e pigmentos

A vitamina E é o antioxidante mais amplamente distribuído nos tecidos e no plasma. O α -tocoferol é o isômero da vitamina E mais conhecido e o que possui atividade biológica mais pronunciada. Participa da estrutura de membranas ricas em lipídeos como as membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático. Interage com lipoperóxidos e radicais alcoxil, protegendo as membranas biológicas do dano oxidativo. Por ter caráter lipofílico é o principal agente de terminação de reações em cadeia na porção lipofílica das lipoproteínas plasmáticas (MORRISSEY, 1994). A vitamina E diminui consideravelmente as alterações histológicas da glândula parótida de ratos Wistar irradiados com uma dose única de 15 Gy em contraste com o grupo controle. Nas glândulas dos animais irradiados, houve redução das células acinares associada à perda do parênquima glandular. Já os animais irradiados e tratados com vitamina E (360 mg/Kg), não apresentaram alterações nas células acinares nem nos dutos estriados (GOMES, 2013). Esta vitamina também tem ação radioprotetora frente a azoospermia causada pela RI. Doses entre 0,1 e 0,2 Gy causam alterações na espermatogênese e que doses

iguais ou maiores que 4 Gy causam azoospermia em homens adultos (SONGTHAVEESIN, 2004).

O termo vitamina A contempla uma variedade de compostos provenientes da dieta, com característica lipofílica e que apresentam estrutura química análoga ao retinol (vitamina A pré-formada) (RAO, 2007). Assim são considerados vitamina A alguns carotenoides como o β -caroteno. Os carotenoides são corantes naturais presentes em frutas e vegetais (cenoura, tomate, espinafre, laranjas, pêsego, entre outros). Apresentam propriedades antioxidantes porque estes compostos sequestram o oxigênio singlete (1O_2) e removem os radicais peróxidos, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre células (junções *gap*), e elevam a resposta imune (OLSON, 1999). O licopeno apresenta a melhor ação antioxidante frente ao 1O_2 , embora todos os outros possuam esta atividade. *In vivo*, também, inibem a LPO induzida pelo sistema xantina oxidase. Os carotenoides pró-oxidantes em pressão parcial de oxigênio elevada (KRINSKY, 1989). O licopeno, um isômero acíclico do caroteno, não formador de vitamina A, possui ação radiomodificadora já estudada. Atenua a toxicidade da radiação no intestino delgado por meio da redução da LPO e aumento das defesas antioxidantes enzimáticas (SAADA, 2010). Em cultura de hepatócitos irradiados por fonte de raios γ , este carotenoide reduz danos ao DNA. Também aumentou atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, bem como, reparou danos aos cromossomos (SRINIVASAN, 2007). Saada e colaboradores (2001) observaram um importante papel do licopeno na recuperação da integridade das membranas celulares.

Já a vitamina C age nos compartimentos aquosos. Por ser altamente hidrofílica, não é capaz de atuar em compartimentos lipofílicos e, desta forma, não previne a oxidação de lipídeos. Neutraliza os radicais $\cdot OH$ e $O_2\cdot$ e regenera a vitamina E, atuando como coadjuvante. Atua também nas reações de dismutação, interrompendo as reações em cadeia (ODIN, 1997). Em 1993, El-Nahas e colegas (1993) investigaram pela primeira vez o efeito radioprotetor da vitamina C para o material genético. Neste experimento, os pesquisadores testaram duas doses de vitamina C em ratos (100 e 300 mg/kg/dia) durante dois meses. Após o término do tratamento, os animais foram irradiados de corpo inteiro e eutanasiados 6 h após a irradiação. A medula óssea de cada animal foi aspirada para a coleta de células e realização dos ensaios citogenéticos. O número de células anômalas nos ratos irradiados e suplementados com a dose mais baixa de vitamina C foi 26% menor que o número de células alteradas nos animais do grupo controle irradiado. O efeito da dose de 300 mg/kg/dia já não foi tão pronunciado. Este fato por ser explicado pelo efeito citotóxico da vitamina C em doses elevadas.

Como as vitaminas e outros antioxidantes apresentam distintos mecanismos de ação, pesquisadores sugerem usar uma mistura de antioxidantes como medida radioprotetora (GUAN, 2004; GUAN, 2006; BROWN, 2010). Brown e colaboradores (2010) propuseram uma suplementação composta por diferentes antioxidantes e avaliaram a taxa de sobrevivência de camundongos C57BL/6 expostos à radiação γ . Os antioxidantes incorporados à dieta foram: selenometionina, ascorbato de sódio, N-acetilcisteína, ácido lipóico, succinato de α -tocoferol e coenzima Q-10. No ensaio que avaliou a taxa de sobrevivência dos camundongos expostos à radiação (8 Gy) e suplementados com a dieta antioxidante 24 horas após a ICI, a taxa de sobrevivência foi de $78\% \pm 10\%$ no 30º dia em comparação à 0% no 16º dia de protocolo experimental. Segundo os autores, a suplementação deve apresentar uma variedade de substâncias bioativas que uma dieta rica em frutas e vegetais possui.

3.6.1.2 – Plantas medicinais e seus metabólitos secundários

Outra fonte inesgotável de antioxidantes são as plantas. Os metabólitos secundários isolados também apresentam efeito protetor contra as radiações ionizantes. Estes metabólitos são de suma importância para as plantas, pois, as protegem de pragas, dos raios ultravioletas e atraem polinizadores. De forma geral, são importantes para adaptação das plantas ao meio ambiente. E, os metabólitos secundários como os ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, antraquinonas, taninos, e saponinas estão intimamente associados à ação terapêutica de plantas (SIMÕES, 2000).

Os flavonoides pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, e mais de 4000 já foram identificados. Estes são pigmentos solúveis em água, de cor amarelada e atuam como potentes antioxidantes, sendo capazes de estabilizar o radical hidroxila, ânions superóxido e radicais derivados de lipídeos (MILLER, 1996). A quercetina é o flavonoide mais abundante da dieta e é encontrada em frutas e vegetais (CAO, 1997). Evidências epidemiológicas mostram que uma dieta rica em quercetina reduz a incidência de doenças neoplásicas e cardiovasculares (HERTOG, 1996). Os flavonoides são compostos por dois anéis benzênicos (A e B) conectados a um anel pirano (C). O número e a posição das hidroxilas (OH) na estrutura básica, distinguem um flavonoide de outro. Usando como exemplo a quercetina, em sua estrutura há uma OH nos seguintes carbonos: 3, 5, 7, 3', 4'. Já a rutina possui substituintes OH nas posições 5, 7, 4' e 5' (FIGURA 8) (SIMÕES, 2000).

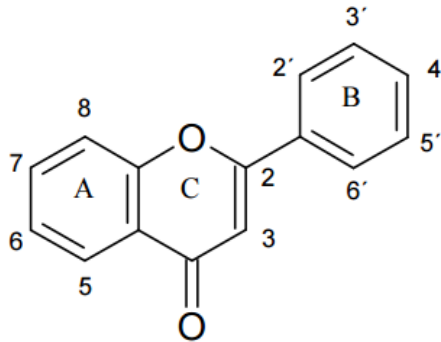


Figura 8 – Estrutura molecular básica dos flavonoides. Figura adaptada de SIMÕES, 2000.

A rutina apresenta potente ação anti-inflamatória. Ela atenua a produção de radicais livres na anemia de Falconi e na artrite reumatóide com a mesma eficiência que fármacos usados nos tratamentos destas doenças, indicando um possível efeito farmacológico (OSTRAKHOVITCH, 2001). Os flavonoides apresentam outra propriedade importante: são capazes de quelar metais, estabilizando-os, e desta forma, impedem a participação de íons ferro em reações oxidativas como a reação de Habber-Weiss (SAIJA, 1995). A quercetina tem sido cada vez mais explorada em modelos de cirrose hepática devido ao seu pronunciado efeito hepatoprotetor (MILTERSTEINER, 2003). Juntamente com esta, este flavonoide apresenta outras, entre elas: a anti-inflamatória, a anticarcinogênica e anti-hipertensiva (CAO, 1997). Além de exercer efeitos diretos sobre os RLs, ela possui a capacidade de estimular genes que estão envolvidos na síntese de enzimas antioxidantes (BARCELOS, 2011). Patil e colaboradores (2013) exploraram os efeitos radioprotetores dos flavonoides rutina e quercetina em camundongos irradiados com uma única dose de radiação gama (4,5 Gy). Um grupo recebeu quercetina na dose 20 mg/ kg de peso corporal via gavagem por 5 dias e outro recebeu 10 mg de rutina no mesmo regime de tratamento que o grupo anterior. Após o pré-tratamento, os animais foram irradiados e uma hora após a irradiação, procedeu-se a eutanásia. Ambos os flavonoides foram hábeis em atenuar a LPO no fígado. Também aumentaram as defesas antioxidantes enzimáticas (GST, SOD e CAT) e não enzimáticas (GSH) no órgão. Os autores acreditam que o efeito protetor destes flavonoides neste modelo deu-se pela capacidade que estes têm de doarem átomos de hidrogênio para as espécies

oxidantes e assim, impedirem a reação de radicais altamente reativos como HO[•] com as biomoléculas.

Os ácidos fenólicos são estratificados em três grupos. O primeiro é composto pelos derivados do ácido benzoico (C6 - C1). Estes são amplamente encontrados tanto em angiospermas como nas gimnospermas (C6 - C3) (SOARES, 2002). O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos. E, por último, as cumarinas que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido cumárico. Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também ligar-se entre si ou com outros compostos. Dentre estas combinações, pode-se citar a que ocorre entre o ácido cafeico e ácido quínico, formando o ácido clorogênico. O ácido cafeico protege o coração da oxidação, aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e previne a dislipidemia em ratos irradiados com dose de 7 Gy de raios gama (MANSOUR, 2011).

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água com massa molecular na faixa de 500 a 3000 Daltons. Formam complexos insolúveis em água com alcalóides e proteínas. Eles conferem adstringência a frutos e outras matérias primas vegetais. São estratificados em dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis e os condensados. Os hidrolisáveis apresentam um poliol geralmente a β -D-glucose, cujas hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico. Os condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe de taninos também é denominada como proantocianidinas porque os taninos condensados produzem pigmentos de tom avermelhado (MONTEIRO, 2005). Na medicina popular, utilizam-se plantas ricas em taninos no tratamento de distúrbios gástricos (gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e processos inflamatórios. A ação farmacológica destes compostos parece estar relacionada principalmente a três características: habilidade de complexarem-se a íons metálicos (ferro, manganês, cobre e cálcio); atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (*scavenger*); ligam-se a macromoléculas (proteínas e polisacarídeos) (SIMÕES, 2000). A (-)-epigallocatequina 3-O-galato dissolvida na água de beber e administrada cronicamente a camundongos preveniu a formação de peróxidos derivados de lipídeos no fígado e por consequência, houve um aumento na taxa de sobrevivência dos animais irradiados com dose letal de raios-X. Os autores indicam o uso do chá verde, fonte do tanino (-)-epigallocatequina 3-O-galato (EGCG) como um radiomodificador de baixa toxicidade. Em culturas de esplenócitos irradiados com 3 Gy, a EGCG aumentou o número de células vivas não só pelo sua capacidade *scavenger* e antioxidante mas, também, por outros mecanismos como a modulação da expressão de enzimas antioxidantes (RICHI, 2012).

Os alcaloides são estruturas heterocíclicas, que possuem um ou mais nitrogênios em seu esqueleto carbônico. Encontram-se principalmente em angiospermas. A maioria apresenta caráter alcalino. Nas plantas, exercem proteção contra os raios UV, pois, seus núcleos aromáticos absorvem grandes quantidades de energia. Na terapêutica, muitos alcaloides são empregados: emetina (emético), atropina, hiosciamina e escopolamina (anticolinérgicos), reserpina (anti-hipertensivo), quinina (antimalárico), morfina (analgésico), cafeína (estimulante do sistema nervoso central), teobromina e teofilina (diuréticos), vincristina (antitumoral) e colchicina (tratamento da gota) (SIMÕES, 2000).

Várias plantas medicinais mundialmente conhecidas já tiveram sua capacidade radiomodificadora investigada, entre elas: *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, *Mentha piperita*, entre outras (JAGETIA, 2007). O extrato de folha de *Ginkgo biloba* foi administrado a pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de tumores cerebrais e, os investigadores observaram uma significativa redução do edema vasogênico (HANNEQUIN, 1986). *G. biloba* também foi usada no tratamento dos sinais e sintomas apresentados pelas vítimas do acidente ocorrido em Chernobyl. Os pacientes receberam 3 doses de 40 mg do extrato padronizado de *G. biloba* por dia, durante dois meses. No plasma destes pacientes, avaliaram a capacidade da planta em diminuir fatores clastogênicos. Um dia após o término do tratamento, a concentração destes fatores estava dentro dos limites aceitáveis (EMERIT, 1995). O efeito profilático do extrato de *G. biloba* reverte significativamente os sinais de radiodermite observados em análises histopatológicas em modelo experimental de síndrome aguda da radiação (YIRMIBESOGLU, 2011).

Panax ginseng é uma planta com propriedade antioxidante, anti-inflamatória, anti-estresse, entre outras. É popularmente conhecida como ginseng coreano ou asiático. A planta apresentou efeito radioprotetor contra o dano pulmonar induzido pelos raios X. Os efeitos secundários ao tratamento radioterápico é a pneumonia que pode evoluir para um quadro de fibrose (FLECKENSTEIN, 2007). Jang e colaboradores (2015) expuseram o tórax de camundongos que foram pré-tratados com o extrato de ginseng a uma dose de 15 Gy de raios-X. Dez dias após a irradiação, observaram uma redução de interleucinas pró-inflamatórias, aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, e diminuição do processo inflamatório. Os autores sugerem o uso farmacológico deste extrato na prevenção de danos pulmonares induzidos pela radioterapia. Esta planta aumenta a contagem de plaquetas e eritrócitos em ratos irradiados, indicando efeito protetor para o sistema hematopoiético (YONEZAWA, 1985). O putativo efeito farmacológico desta planta reside principalmente na presença de saponinas e glicosídeos (ginosídeos) (ZHANG, 1987). A *Mentha piperita* (menta) é uma

planta aromática com ação estimulante, diurética, anestésica local, antisséptica, digestiva, tonificante, carminativa e radiomodificadora. A menta (*Mentha piperita*) foi capaz de diminuir a atividade sérica de fosfatases em camungondos irradiados, além de aumentar o peso do baço, elevar a contagem de células vermelhas e diminuir os danos aos cromossomos (SAMARTH, 2007).

3.6.1.3 – Suco de uva como radiomodificador

A uva e seus derivados vêm sendo intensamente investigados ao longo das últimas décadas. Estudos epidemiológicos mostram que populações de certas regiões da França apresentavam baixo risco de doenças cardiovasculares embora o índice de alcoolismo e tabagismo fosse altíssimo (PROVIDÊNCIA, 2006). Cientistas relacionaram o alto teor de compostos antioxidantes presentes no vinho à capacidade destes em inibir a oxidação da LDL (HALLIWEL, 2007). O fenômeno observado na França ficou conhecido como o paradoxo francês (PROVIDÊNCIA, 2006).

Os compostos de maior teor na uva e nos seus derivados são o resveratrol e a quercetina. O resveratrol é um composto polifenólico pertencente ao grupo das fitoalexinas. Este polifenol é formado pelas plantas em resposta a fatores ambientais como luz ultravioleta e infecções fúngicas (LANGCAKE, 1976). Está presente no amendoim, no eucalipto e em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) (BHAT, 2001). A planta sintetiza duas formas isômeras: o trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e o cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). Porém, a forma trans é pouco estável, sendo transformada em cis na presença de luz visível (FIGURA 9). O resveratrol possui um grande espectro de atividades farmacológicas entre elas a cardiotônica.

A uva e seus derivados apresentam uma série de ações biológicas: anti-inflamatória (PALLARÉS, 2013), cardioprotetora (SATO, 1999), hepatoprotetora (DANI, 2008), anti-tumoral (KAUR, 2009), nefroprotetora (SAJA, 2010). Uma recente propriedade descrita para a uva foi a radiomodificadora (SAADA, 2009; FREITAS, 2014).

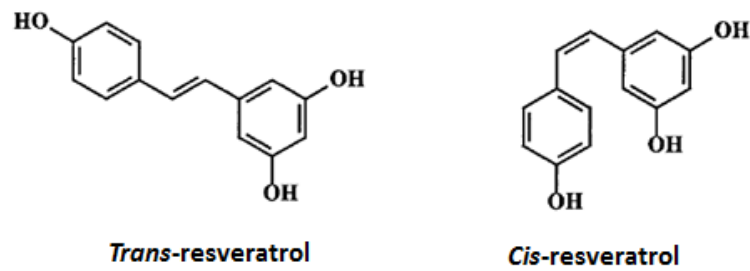


Figura 9 - Formas isoméricas do resveratrol. Figura adaptada de SAUTER, 2005.

Nosso grupo de pesquisa investigou o efeito radiomodificador do suco de uva orgânico em modelo experimental de Síndrome Aguda da Radiação. Produtos orgânicos são alimentos *in natura* ou processados provenientes de um sistema orgânico de produção agropecuário ou industrial. A produção de orgânicos é baseada em técnicas que não fazem o uso de insumos como pesticidas sintéticos, fertilizantes químicos, medicamentos veterinários, organismos geneticamente modificados, conservantes, aditivos e radiação. Estudos apontam que o valor nutricional dos orgânicos é superior aos alimentos não orgânicos. Os resultados encontrados foram: maior conteúdo de matéria seca em tubérculos, raízes e folhas, teor elevado de ferro e magnésio em alguns legumes e verduras, maior concentração de vitamina C em frutas, concentração elevada de licopeno em tomates, maior quantidade de compostos fitoquímicos em frutos e verduras e teor elevado de resveratrol em vinhos produzidos com uvas orgânicas (BOURN, 2002; LAIRON, 2010). Devido ao teor aumentado de compostos fenólicos e flavonoides no suco de uva orgânico em comparação ao convencional, o orgânico foi escolhido para ser usado com medida preventiva aos danos causados pela radiação. Andrade e colaboradores (2011) investigaram este efeito no suco de uva orgânico (SUO) em ratos que o ingeriram espontaneamente. Os animais beberam deste suco 6 dias antes e duas semanas após a irradiação. A irradiação de corpo inteiro foi realizada em máquina de raios-X e os animais receberam uma dose única de corpo inteiro de 6 Gy. O consumo diário do suco aumentou as defesas antioxidantes e não-antioxidantes hepáticas dos ratos tratados com suco de uva em comparação aos animais irradiados e suplementados com solução de glicose e frutose. Houve um aumento na atividade da Cu/Zn-SOD e na atividade da GPx, juntamente com aumento do teor de GSH. Também encontraram aumento na expressão da enzima Cu/Zn-SOD por meio de ensaios de Western blotting. O suco também mostrou-se capaz de inibir a oxidação das

membranas dos hepatócitos (ANDRADE, 2009). Em outro estudo, a análise hematológica mostrou as alterações típicas manifestadas por indivíduos irradiados. Houve uma queda na contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos 24 horas depois da irradiação e os valores para todos os tipos celulares permaneceram baixos até o fim do protocolo (16º dia) para o grupo controle irradiado. O grupo tratado com SUO não apresentou contagem semelhante ao grupo de animais não irradiados, porém todas as contagens foram superiores as encontradas para o grupo controle irradiado, indicando um possível efeito protetor para o sistema hematopoiético (ANDRADE, 2009a). A ação neuroprotetora do suco de uva foi avaliada em camungos expostos a uma única dose de 6 Gy de raios-X (SOARES, 2014). Neste protocolo, o consumo de suco também foi espontâneo, no entanto o suco foi diluído com água (1:3). Dados não publicados mostraram que quando o animal dispõe de dois bebedores, um contendo o suco e outro contendo solução de glicose e frutose, houve maior consumo da solução de açúcares. Assim, concluíram que a diluição poderia aumentar a palatabilidade do suco de uva. Os animais beberam o suco 3 dias antes e 3 dias depois da irradiação de corpo inteiro. O consumo de líquido e comida foi monitorado por computador conectado a gaiolas metabólicas. Um dia antes da irradiação os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (*open field*). O teste *open field* é classicamente usado para avaliar o grau de ansiedade dos animais, porém, também pode ser usado para analisar a atividade locomotora e exploratória (KANARI, 2005). A distância percorrida pelos ratos irradiados (grupo controle) nas regiões próximas às paredes do *open field* foi menor que a distância encontrada para o grupo tratado com o suco. Este achado indica que o suco além de diminuir a LPO no cérebro, ele agiu como ansiolítico nas primeiras 24 horas após a irradiação. Fazendo uma análise detida dos resultados obtidos nos trabalhos supracitados, conclui-se que o suco controla o estresse oxidativo em diversos sistemas por ser fonte de antioxidantes com ação terapêutica bastante conhecida (TABELA 1). O suco utilizado nos experimentos supracitados foi produzido na serra gaúcha no ano de 2007 e análises por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que o composto majoritário presente neste suco é a quercetina, seguida de resveratrol e rutina (ANDRADE, 2009; FREITAS, 2014). Acredita-se que ação radiomodificadora do SUO seja a consequência do efeito sinérgico entre os compostos antioxidantes presentes na composição fitoquímica deste.

Tabela 1 – Resumo das ações radiomodificadoras do suco de uva orgânico.

Espécie	Dose	Resultado	Referência
Rato	6 Gy	↓LPO no fígado, ↑ do peso corporal	ANDRADE, 2009
Rato	6 Gy	Discreta ação hematoprotetora	ANDRADE,2009a
Rato	6 Gy	↓LPO no baço	FREITAS, 2014
Rato	6 Gy	↓LPO no fígado, ↑ atividade da Cu/Zn-SOD e GPx, ↑ [GSH] e ↑ expressão da Cu/Zn-SOD	ANDRADE,2011
Camundongo	6 Gy	↓ LPO no cérebro, ↓ ansiedade, ↑ atividade locomotora, ↑ ingestão de líquidos e sólidos.	SOARES, 2014.

IV- ARTIGO

DE FREITAS, R. B. et al. Effect of black grape juice against heart damage from acute gamma TBI in rats.

Publicado no periódico *Molecules* (ISSN 1420-3049).

Effect of Black Grape Juice against Heart Damage from Acute Gamma TBI in Rats

Robson Borba de Freitas¹, **Aline Augusti Boligon**¹, **Bruno Tomazele Rovani**¹, **Mariana Piana**¹, **Thiele Faccim de Brum**¹, **Roberta da Silva Jesus**¹, **Fagner Chagas Rother**², **Nelson Mendes Alves**³, **João Batista Teixeira da Rocha**⁴, **Margareth Linde Athayde**⁵, **Juan Pablo Barrio**⁶, **Edson Ramos de Andrade**^{2,7} and **Liliane de Freitas Bauerman**^{8,*}

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

² Nuclear Engineering Program, Military Institute of Engineering (IME), Rio de Janeiro, RJ, 22290-270, Brazil

³ Postgraduate Program, Institute of Nuclear and Energy Research of University of São Paulo (IPEN), São Paulo, SP, 05508-000, Brazil

⁴ Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

⁵ Department of Industrial Pharmacy, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

⁶ Department of Biomedical Sciences and Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, León 24071, Spain

⁷ Brazilian Army Technological Center (CTEx), Chemical, Biological and Nuclear Defense Division, Rio de Janeiro, RJ, 23020-470, Brazil

⁸ Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

Abstract: The aim of this study was to evaluate the potential positive effect of black grape juice (BGJ) on lipid peroxidation considering Total Body Irradiation (TBI) in Wistar rats. As a potential feasible means of evaluation *in situ*, blood serum lactate dehydrogenase (LDH) levels were evaluated as a marker for heart damage from acute radiation syndrome (ARS). Twenty rats were divided into four groups, two of them being irradiated by gamma-rays from a Co-60 source. Animals were treated by gavage with 2 mL per day of BGJ or placebo for one week before and 4 days after 6 Gy whole body gamma-irradiation, when they were euthanasiated. LDH on serum and lipid peroxidation on heart tissue were evaluated. High concentration of metabolites from lipid peroxidation in heart, and high LDH level on serum were found only in gamma-irradiated group given placebo, mainly at the first 24 h after radiation. Phytochemical analysis of BGJ was performed by determining total phenolics, flavonoids, and tannins followed by a high-performance liquid chromatography (HPLC/DAD) analysis, which showed resveratrol as the major constituent. Results suggest that BGJ is a good protective candidate compound against heart damage from ARS and its effects suggest its use as a radiomodifier.

Keywords: acute radiation syndrome; black grape juice; heart; oxidative damage; lactate dehydrogenase; phenolics; flavonoids; HPLC-DAD

Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: lfgbauer@smail.ufsm.br;
Tel.: +55-55-3220-938*

*Received: 1 July 2013; in revised form: 18 September 2013 / Accepted: 18 September 2013 /
Published: 30 September 2013*

1. Introduction

Ionizing radiation can be defined as an electromagnetic radiation or a high-energy particle capable of depositing its energy or a fraction when it interacts with atoms leading to ionization [1]. Pathophysiological consequences of the interaction of ionizing radiation with biological systems may come either from direct and indirect modes. The direct mode radiation will directly hit an atom or molecule in the cell probably leading to a collision and producing poisoning fragments. On the other hand, the indirect mode supports the model of radiation energy transfer directly to water molecules producing oxidizing metabolites such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide anion (O_2^\bullet) and hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$). In this case, the result is a possible cell death or malfunction due to the interactions between biomolecules and reactive

oxygen species (ROS) and nitrogen reactive species (NRS) [2]. Free radicals and, ROS are capable of damaging the cell membrane and proteins at the nucleus. This situation may change the functional activity of the cell with a possible further death pathway or undesirable organic states [3].

Acute radiation syndrome (ARS) is a representative set of symptoms and signals that is deterministically related to the acute whole body exposure to ionizing radiation. Radiation damage results from cell sensitivity to radiation exposure [4]. Differences in cell sensitivity to radiation are the basis for the distinction among the three subsyndromes in ARS: hematopoietic, gastrointestinal, and neurovascular [4]. As radiation doses increase subsyndromes become detectable separately from each other. Each subsyndrome can be further divided into four stages: (a) prodromal, (b) latent, (c) manifest illness, and (d) recovery or death. Since prodromal symptoms could be detected from few h to 4 days after exposure, the earlier the evaluation of the absorbed dose, the better the response to medical care will be [5].

The heart is a vital organ and generates intense oxidative imbalances because of its intense activity. Moreover, the heart presents a less potent antioxidant system when compared to other body tissues. As an example, the catalase (CAT) activity in heart tissue is due prioritarly to erythrocyte catalase [6]. Studies have shown that heart tissue exposure to ionizing radiation may induce coronary and valvular heart disease, congestive heart failure and sudden death [7]. This situation can be linked to the broad range of oxygen free radicals produced from interactions with ionizing radiation, since the ROS are the major mediators for radiation-induced damage in living tissues.

During a heart attack caused by stress from ARS, the cardiomyocyte plasmatic membrane lose its fluidity, causing extravasations of cytosolic enzymes (transaminases, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase) to circulating blood, indicating a pathological condition. Serum biochemical analysis, like lactate dehydrogenase (LDH) activity could provide a trustful way to estimate radiation damage to specific organs such as heart [8,9]. LDH converts pyruvate, the final product of glycolysis to lactate when oxygen is absent or in short supply as happens in heart tissue physiology. Because of this, measuring stress from oxygen-poor environments under radiation allow one to infer some conclusions about the major aspects of damage in well oxygenated tissues.

Total body X-irradiation in rats led to a marked increase in total LDH activity in serum and tissues [10]. Thyagarajan and colleagues observed that the maximum effect was recorded at the 8th post-irradiation day. LDH levels in serum are mentioned in the literature as a marker of heart tissue harm from ARS and, such enzyme measurement may be an alternative way to quantify the risk of harm due to ARS in general, and, at heart specifically without intrusive testing [11].

Compounds capable of preventing or mitigating damage as a result of exposure to radiation are called radiomodifiers and have been studied [12–16]. These substances possess the property of reducing the effect of ionizing radiation considered due to damage from free radicals and ROS formed once radiation interacts with water, especially by catalyzing the ROS and, NRS generated in the radiation-tissue interaction. Clinically relevant radiomodifiers usually have low or no toxicity and synergy with other drugs. A good alternative to be available quickly for use as radiomodifier would be the use of food supplements rich in

bioactive compounds with antioxidant action. Foods that contain such compounds are called functional foods or nutraceuticals [17].

Flavonoids and phenolic compounds scavenge oxidizing species produced by radiation and elevate the enzymatic and non-enzymatic defense levels [18]. The radioprotector effect of these compounds appears to be improved when acting synergistically. This evidence was proved by Lee and colleagues who investigated the radioprotector effect of *Camellia sinensis* (green tea) aqueous extract and its isolated polyphenols (epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, gallic acid, gallic acid gallate, catechin gallate) in mice [19]. The results showed a significant increase in endogenous spleen colonies in irradiated mice pre-treated with green tea in comparison to those pre-treated with the isolated compounds [19].

An overall nutrigenomic action of a nutraceutical or a functional food occurs through the interaction of food compounds with the genome as a whole or through its interaction with specific genes [20]. Grape products, especially wine, have been investigated for their functional or nutraceutical properties regarded to radiation damage alleviation with important results, such as mitigation of anorexia [15].

Studies based on epidemiological and experimental evidences showed that the polyphenolic compounds present in grapes-derived products, including juices, and in particular quercetin and resveratrol [21,22], have antioxidant properties [23], antitumor activity [24,25], antiinflammatory [26], antimutagenic [27], hepatoprotective [28], cardioprotective [29], and radioprotective [12] among other interesting activities.

To date, studies regarding compounds and dietary products from black grape and its positive radiomodifying effect are limited to the effect of polyphenols extracted from grape seed extract (GSE) [13]. Results from grape seed extract reported by Saada and colleagues suggest that radioprotective effects or lessened radiotoxicity are possible [13]. These authors found significant increases of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities associated with significant decreases of malondialdehyde (MDA) levels, a product formed during the lipid peroxidation process, in the heart tissue of rats pre-treated with GSE and exposed to 5 Gy of gamma-rays in comparison to irradiated control group [13]. The hypothesis that a moderate intake of black grape juice (BGJ) also has a positive radiomodifier property against heart damage following ARS is an important issue to be investigated.

2. Results

2.1. Phenolics, Flavonoids and, Condensed Tannins Contents and, HPLC-DAD Analysis in Black Grape Juice (BGJ)

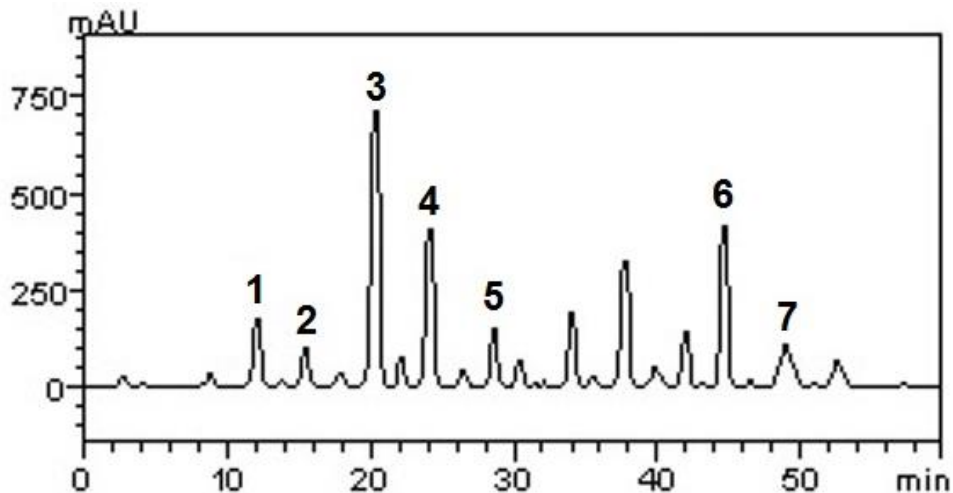
Data on related phenolics, flavonoids and, condensed tannins contents are given in Table 1. HPLC fingerprinting of BGJ revealed the presence of gallic acid ($t_R = 11.87$ min; peak 1), catechin ($t_R = 15.69$ min; peak 2), resveratrol ($t_R = 20.03$ min; peak 3), caffeic acid ($t_R = 24.11$; peak 4), ellagic acid ($t_R = 28.37$ min; peak 5), quercetin ($t_R = 44.81$ min; peak 6) and kaempferol ($t_R = 49.16$ min; peak 7) (Figure 1 and Table 1). The concentration for each substance is given in Table 1. Also, we show the corresponding chromatogram in Figure 1.

Table 1. Content of phenolics, flavonoids and condensed tannins of BGJ. LOD and LOQ variations for antioxidants compounds.

BGJ compounds	Composition mg/L	LOD µg/mL	LOQ µg/mL
Total phenolics (GE)	223.14 ± 0.005	-	-
Total flavonoids (Quer)	180.45 ± 0.011	-	-
Total tannin (Cat)	154.09 ± 0.017	-	-
Gallic acid	8.43 ± 0.06 ^a	0.017	0.056
Catechin	5.17 ± 0.09 ^b	0.032	0.104
Resveratrol	31.28 ± 0.04 ^c	0.009	0.030
Caffeic acid	18.15 ± 0.03 ^d	0.013	0.041
Ellagic acid	8.03 ± 0.05 ^a	0.028	0.093
Quercetin	18.67 ± 0.12 ^d	0.015	0.049
Kaempferol	8.71 ± 0.03 ^a	0.008	0.026

GE: gallic acid equivalent, Quer: quercetin equivalent, Cat: catechin equivalent. LOD: limit of detection (µg/mL), LOQ: limit of quantification (µg/mL). Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$.

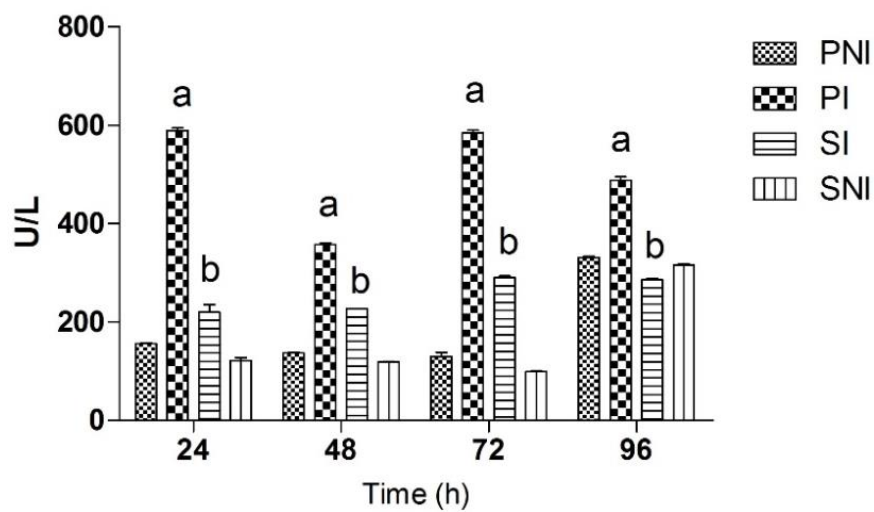
Figure 1. Representative high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) profile of BGJ, detection UV was set at 327 nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), resveratrol (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), quercetin (peak 6) and kaempferol (peak 7).



2.2. LDH Levels

As can be seen in Figure 2, the LDH levels were statistically meaningful for comparison between SI (irradiated animals and supplemented with BGJ) and PI (irradiated animals and supplemented with placebo solution). Control groups PNI (non-irradiated animals and supplemented with placebo) and SNI (non-irradiated animals and supplemented with BGJ) values remained normal and statistically indistinguishable from each other until 72 h, with a slight increase at 96 h. Overall, PI showed higher levels of LDH in comparison with SI.

Figure 2. Serum lactate dehydrogenase (LDH) levels for all groups of male Wistar rats at 24, 48, 72 and 96 h after exposure to radiation.

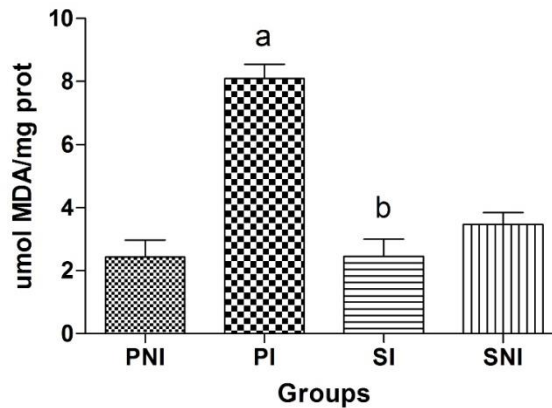


The legends represent the following groups: (SNI) non-irradiated, BGJ supplemented; (PNI) non-irradiated, placebo (isocaloric glucose plus fructose) supplemented; (SI) irradiated, BGJ supplemented, and (PI) irradiated, placebo supplemented. **a** and **b** means significant differences for PI and SI. Values are expressed as means \pm S.E.M. for $n = 5$. Labels **a** and **b** mean significant difference between groups for $p < 0.05$.

2.3. Lipid Peroxidation on Heart

Lipid peroxidation was estimated by measuring the MDA per mg of heart muscle protein for each animal in each group, using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. The greater the damage, the greater the MDA formation. The highest MDA index of heart was found in PI group as expected. Figure 3 shows the estimation of lipid peroxidation in heart tissue for all groups. A significant difference between PI and SI compared each other was found with higher MDA levels for PI. SI was kept at basal levels in comparison to non-irradiated groups (PNI and SNI), possibly due to BGJ intake and its positive radiomodifier effect against oxidative damage.

Figure 3. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels expressed μmol MDA/mg protein.



The legends represent the following groups: (SNI) non-irradiated, BGJ supplemented; (PNI) non-irradiated, placebo (isocaloric glucose plus fructose) supplemented; (SI) irradiated, BGJ supplemented, and (PI) irradiated, placebo supplemented. There is no significance for SI in comparison to PNI and SNI. Values are expressed as means \pm S.E.M for $n = 5$. Labels **a** and **b** mean significant difference between groups for $p < 0.05$.

3. Discussion

Ionizing radiation exposure caused by environmental, industrial, medical and accidental reasons can make the organism susceptible to various harmful conditions [30]. The whole body exposure a high dose of radiation also called the acute radiation syndrome (ARS) or radiation sickness, and might cause alterations in the hematopoietic [16], cardiovascular [31] and digestive systems besides disturbance in biochemical parameters [32]. Various studies were designed to prospect positive radiomodifiers which might reduce the incidence of injuries related to ARS, among them, medicinal plants, vitamins and, minerals. Natural compounds in the human diet could provide functional antioxidants, like vitamin E [33] and grape derived products, such as wine and juices [12]. In grapes, four classes of flavonoids are commonly detected: flavonols, anthocyanins, flavan-3-ols and their polymeric forms, and condensed tannins [34]. Concerning phytochemical analysis, colorimetric assays confirmed the presence of phenolics, flavonoids and condensed tannins in BGJ as previously described by Machado and colleagues [35]. Interestingly, in 2013, we found high concentration of condensed tannins in BGJ, approximately 770 times higher than the quantity found in BGJ in 2007. This fact can be justified by the variations in phytochemical components of grapes which are common when collected in different periods. The major component of BGJ, detected by HPLC-DAD, was found to be resveratrol, followed by quercetin, rutin, caffeic and gallic acids, kaempferol, ellagic acid and, catechin. Resveratrol (3,5,40-trihydroxy-*trans*-

stilbene) is a polyphenolic phytoalexin found in a variety of plant products [36]; it is a potent antioxidant, and has garnered interest because its protective effects in complex conditions such as ARS [16]. Additionally, the literature describes the correlation between phenolic compounds such as caffeic acid and low incidence of heart damage.

LDH dosage in blood serum is currently used to evaluate the risk of diseases such as heart attack and could be used as predictive factor for heart tissue harm due to radiation over exposure [37]. LDH levels were found significantly increased on animal's serum in PI and SI when compared with controls (Figure 2). This behavior agrees with previous studies, which reported that radiation caused significant increases in creatine phosphokinase (CPK) and LDH [31]. Hence, the excessive production of free radicals and lipid peroxides might cause the leakage of cytosolic enzymes including the aminotransferases, creatine kinase and phosphatases enzymes [31].

However, the information that SI group showed significant reduced levels of LDH on 24 h after radiation when compared to PI is suggestive of an immediate action of BGJ intake. This profile remained unchanged on 48, 72 and, 96 h after ARS induction. Various studies relate the low incidence of heart diseases and the intake of food and beverage containing phenolic compounds and, flavonoids [38]. Caffeic acid presents a great radiomodifier effect in rats exposed to 7 Gy gamma whole-body radiation [31]. The putative mechanism of action of this substance and other phenolics resides in its antioxidant capacity, reducing the oxidative damage on heart tissue induced by water radiolysis. Phenolic and flavonoids found in BGJ are great antioxidants because their molecular structures contain hydroxyl groups which provide electrons to stabilize free radicals and ROS, restoring the redox state of cardiomyocytes.

High MDA levels can be indicative of oxidative damage to mitochondria and heart muscle cell membranes. It is possible that oxidative damage caused by irradiation could promote cell death processes due to membrane damage such as radiation-induced apoptosis [39,40].

Significant differences in lipid peroxidation for PI and SI (Figure 3) allow us to infer that the phenolics contents of BGJ, principally resveratrol, and its action as scavenger of hydroxyl radicals, might be the reason for the protection offered to the membrane and reduction of MDA formation in the SI group. Overall, changes in MDA levels can be a signature of changes in membrane physiology, and BGJ seems to protect against this physiological imbalance [16]. Compounds in BGJ, exemplified by quercetin and resveratrol, have been investigated extensively and there is evidence that they can activate transcription factors that regulate the expression of genes encoding for antioxidant enzymes [41]. These enzymes remove peroxides and hydroperoxides formed during radiation intoxication, attenuating oxidative processes in membrane lipids and the proteins of heart cells.

The protection against heart lipid peroxidation offered by BGJ intake might have an effect towards amelioration of serum LDH levels in ARS condition. Although these results are in agreement with recent reports [12,15] which support the idea that phenolics and flavonoids present in BGJ effectively act against ARS effects in rats, they are on an *ad hoc* basis and need further investigation before extrapolating to humans.

4. Experimental

4.1. Black Grape Juice (BGJ) and Placebo Solution

Ecologically-produced (organic) BGJ was obtained from the city of Garibaldi (Rio Grande do Sul, Brazil), in the main grape-growing region of the state. Grapes (*Vitis labrusca*) were cultivated in 2013 and the juice was prepared on the same year. Placebo solution was made using an equimolar mixture of glucose and fructose to be isocaloric with the sugar composition in the BGJ (95 g/L).

4.2. Colorimetric Assays

4.2.1. Determination of Total Phenolics

The determination of total phenolic content was performed by the Folin-Ciocalteu method [42]. Briefly, 2 N Folin-Ciocalteu reagent (0.5 mL) was added to BGJ (1 mL) and this mixture was allowed to stand for 5 min before the addition of 20% Na₂CO₃ (2 mL). The solution was then allowed to stand for 10 min before reading at 730 nm in a Shimadzu-UV-1201 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer. The phenolics content was expressed in milligrams of gallic acid equivalents per liter of BGJ. The equation obtained for the standard curve of gallic acid was $y = 52.167x - 0.0631$ ($r = 0.9999$). The experiments were performed in triplicate.

4.2.2. Determination of Total Flavonoids

The determination of the flavonoids content was performed according to the method described by Woisky and Salatino [43]. To BGJ (2 mL) was added a solution of AlCl₃ (2%, 0.5 mL). After 15 minutes, the absorbance was read at 420 nm. Tests were performed in triplicate and for calculating the dosage of flavonoids used the standard curve of quercetin was: $y = 0.0457x - 0.009$ ($r = 0.9997$). Concentrations of flavonoids were determined in milligrams equivalents of quercetin per liter of BGJ. The experiments were performed in triplicate.

4.2.3. Determination of Condensed Tannins

The tannin content was performed using the method described by Morrison *et al.* with some modifications [44]. BGJ (1 mL), solution A (1 g of vanillin in 100 mL of methanol) and solution B (8 mL of HCl in 100 mL of methanol) were used for assay. Sample was read at 500 nm on a spectrophotometer. The tannin total was expressed as milligram equivalents of catechin per liter of BGJ. The equation obtained for the calibration curve of catechin was $y = 0.0309x - 0.065$ ($r = 0.9989$). The experiments were performed in triplicate.

4.3. High Performance Liquid Chromatography

4.3.1. Chemicals, Apparatus and General Procedures

All chemicals were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, caffeic acid and ellagic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Catechin, resveratrol, quercetin and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and, LC solution 1.22 SP1 software.

4.3.2. Quantification of Compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% (B) for 2 min; 25% (B) until 10 min; 40, 50, 60, 70 and 80% (B) every 10 min; following the method described by Kamdem *et al.* with slight modifications [45]. The BJD was filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. The flow rate was 0.6 mL/min, injection volume 50 µL and the wavelength was 254 for gallic acid and resveratrol, 280 nm for catechin, 327 nm for caffeic and ellagic acids, and 365 nm for quercetin and kaempferol. The samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.010–0.100 mg/mL for resveratrol, catechin, quercetin and kaempferol; and 0.050–0.200 mg/mL for gallic, ellagic and caffeic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curves were for gallic acid: $y = 14036x + 1254.9$ ($r = 0.9991$); catechin: $y = 12,724x + 1,258.0$ ($r = 0.9997$), resveratrol: $y = 11,983x + 1,306.5$ ($r = 0.9993$); caffeic acid: $y = 11,872x + 1,570.3$ ($r = 0.9996$); ellagic acid: $y = 12,728x + 1,367.4$ ($r = 0.9998$); quercetin: $y = 13,149x + 1267.8$ ($r = 0.9999$) and kaempferol: $y = 15,983x + 1,321.5$ ($r = 0.9992$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

4.3.3. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves of phenolics compounds and flavonoids, as defined by Boligon *et al.* [46]. LOD and LOQ were established as $3\sigma/S$ and $10\sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

4.4. Animals and Whole Body Irradiation

Twenty male Wistar rats weighing 200–250 g, housed at the animal house of Nuclear Energy Research Institute (IPEN-Brazil), were included in the study. Animals were divided

into four groups: non-irradiated-BGJ supplemented (SNI, n = 5); non-irradiated–placebo supplemented (PNI, n = 5); irradiated-BGJ supplemented (SI, n = 5) and irradiated–placebo supplemented (PI, n = 5). In order to immobilize the animals, anesthesia was induced by intraperitoneally administration of pentobarbital 0.6% in saline (10 mL/kg body weight), at noon, 15 minutes before irradiation, ensuring the loss of palpebral and plantar reflex activity and checking for spontaneous respiration throughout the procedure. The animals were placed in *decubitus pronus* on a plexiglas board, so that five animals would be irradiated at a time and exposed to a single dose of 6 Gy (0.40 Gy/min) of whole body gamma-irradiation, with a source-skin distance (SSD) of 50 cm. Animals were fed with BGJ or placebo (2 mL/Kg of body weight, by gavage) for one week before and 4 days after 6 Gy whole body gamma-irradiation. The experimental protocol used was approved by the Nuclear Energy Research Institute under the protocol number 048/09–CEPA–IPEN/SP.

4.5. Food and Drink

Animals were fed according to a standard rat chow diet, having free access to *ad libitum* water and food. After one week adaptation to individual cages, they were daily fed with 2 mL of BGJ or placebo, depending on their assigned group. Environmental conditions were controlled (12-hour photoperiod and 20 ± 2 °C) throughout the experimental period.

4.6. Blood Samples Collection and LDH Measurement

The blood samples for LDH measurement from twenty male Wistar rats were obtained at 24, 48, 72 and 96 h following exposure to gamma radiation using heparinized capillaries by puncturing the retro-orbital plexus after prior mild anesthesia with isofluran. After the last blood sample collection, all animals were euthanized and heart was removed for analyses. LDH was assayed in a Cobas MIRA[®] automatic analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with the Bioclin[®] commercial systems.

4.7. Lipid Peroxidation of Heart Tissue

Heart tissue lipid peroxidation estimation was performed using the thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS) as described by Buege [47], which quantifies the colorimetric reaction of the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA). The reaction produces a colored compound which absorbs maximally at 532 nm. One gram of heart tissue in 5 mL of potassium phosphate (0.1 M, pH 7.4) was homogenated using a Polytron mixer (Kinematica AG, Luzern, Switzerland). After heating at 90 °C for reacting with TBA, tubes were cooled and centrifuged at $2,000 \times g$. The organic layer (supernatant) was collected and the absorbance was read at 532 nm using a spectrophotometer.

4.8. Quantification of Heart Protein

The amounts of lipid peroxidation were normalized to the amount of heart protein contained by measuring the MDA per mg of heart protein. The quantification of the protein was performed following the Lowry method, where the maximum absorbance for the Folin Ciocauteau solution due to its interaction to bovine serum albumin protein, occurs at 625 nm [48].

4.9. Statistical Analysis

For lipid peroxidation in heart tissue and LDH, statistical significance was assessed by using the Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test by GraphPad® Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, August 2007). For HPLC-DAD fingerprint of BGJ, statistical comparisons were performed by one-way analysis of variance followed Tukey's *post-hoc* test. Values are expressed as means \pm S.E.M. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

5. Conclusions

Blood biochemical measurement (LDH) and lipoperoxidation index regarding heart tissue (MDA formation) support the idea that BGJ has a positive radiomodifier effect against heart dysfunction due to ARS. The evidence for BGJ this effect against heart tissue damage can be listed as follows: (a) lipid peroxidation on SI group kept at basal levels; (b) dramatic reduction of LDH levels in blood serum for SI groups. This way, we conclude that BGJ as a functional beverage is a good candidate for investigation as a positive radiomodifier agent against heart complications due to ARS because it is rich in resveratrol, quercetin, caffeic acid and others. Further investigation on damage to heart tissue due to oxidative stress caused by exposure to radiation should be performed, including the primary antioxidant system.

Acknowledgments

This work was supported by the Fund for the Encouragement of Research (FIPE) from Federal University of Santa Maria, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and, Econatura Produtos Ecológicos e Naturais LTDA, Rio Grande do Sul, Brazil.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ende, M. Management of the acute radiation syndrome. *Ann. Intern. Med.* **2001**, *141*, 891.
2. Gold, B.; Tadmor, B.; Har-Kedar, I. Biological effects of ionizing radiation and acute radiation syndrome. *Harefuah* **1988**, *115*, 134–138.
3. Mishra, K.P. Cell membrane oxidative damage induced by gamma-radiation and apoptotic sensitivity. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2004**, *23*, 61–66.
4. Jackson, W.L., Jr.; Gallagher, C.; Myhand, R.C.; Waselenko, J.K. Medical management of patients with multiple organ dysfunction arising from acute radiation syndrome. *BJR Suppl.* **2005**, *27*, 161–168.
5. Waselenko, J.K.; MacVittie, T.J.; Blakely, W.F.; Pesik, N.; Wiley, A.L.; Dickerson, W.E.; Tsu, H.; Confer D.L.; Coleman C.N.; Seed T.; *et al.* Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the strategic national stockpile radiation working group. *Ann. Intern. Med.* **2004**, *140*, 1037–1051.
6. Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 527–605.
7. Swerdlow, A.J.; Higgs, C.D.; Smith, P.; Cunningham, D.; Hancock, B.W.; Horwich, A.; Hoskn, P.J.; Lister, A.; Radford, J.A.; Rohatiner, A.Z.; Linch, D.C. Myocardial infarction mortality risk after treatment for Hodgkin disease: a collaborative British cohort study. *Nat. Cancer. Inst.* **2007**, *99*, 206–214.
8. Lifshits, R.I.; Slobodin, V.B.; Iakushev, V.S.; Bochina, T.V.; Popov, G.K. Lactate dehydrogenase isoenzymes in the heart, liver and kidneys in experimental ischemia. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **1972**, *73*, 49–51.
9. Fritz, P.J.; White, E.L.; Pruitt, K.M.; Vesell, E.S. Lactate dehydrogenase isozymes. Turnover in rat heart, skeletal muscle, and liver. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4034–4039.
10. Hori, Y.; Takamori, Y.; Nishio, K. The effects of X-irradiation on lactate dehydrogenase isozymes in plasma and in various organs of mice. *Rad. Res.* **1970**, *43*, 143–151.
11. Thyagarajan, P.; Vakil, U.K.; Sreenivasan, A. Distribution of lactic dehydrogenase in X-irradiated tissues. *Environ. Physiol. Biochem.* **1975**, *5*, 283–292.
12. Andrade, E.R.; Piccoli J.C.E; Cruz, I.B.M.; Rocha, J.B.T.; Garzo, E.; Marina, R.; Mauriz, J.L.; González, P.; Barrio, J.P. Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats. *Nutr. Hosp.* **2009**, *24*, 297–303.

13. Saada H.N.; Said U.Z.; Meky, N.H.; Abd El Azime, A.S. Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats, *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 434–438.
14. Yadav, M.; Jain, S.; Bhardwaj, A.; Nagpal, R.; Puniya, M.; Tomar, R.; Singh, V.; Parkash, O.; Prasad, G.B.; Marotta, F.; Yadav, H. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *J. Med. Food.* **2009**, *12*, 473–484.
15. Andrade, E.R.; Piccoli, J.C.E; Cruz, I.B.M.; Rocha, J.B.T.; Andrade, V.V.R.; González, P.; Bauermann, L.F.; Barrio, J.P. Effect of black grape juice intake on liver lipoperoxidation and body weight loss in whole body X-irradiated rats. *J. Med. CBR Def.* **2009**, *7*, 1–12.
16. Freitas, R.B.; Augusti, P.R.; Andrade, R.A.; Rother, F.C.; Rovani, B.T.; Quatrin, A.; Alves, N.M.; Emanuelli, T.; Bauermann, L.F. Black grape juice protects spleen from lipid oxidation induced by gamma radiation in rats. *J. Food. Bichem.* **2012**, doi:10.1111/j.1745-4514.2012.00651.x.
17. McClements, D.J.; Decker, E.A.; Park, Y.; Weiss, J. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 577–606.
18. González, P.; Andrade, E.R.; Soares, F.A.; Marina, R.; Barrio, J.P. Flavonoids como radioprotectores: evidencias y mecanismos de acción. *Fisiología* **2011**, *13*, 11–17.
19. Lee, H.J.; Kim, J.S.; Moon, C.; Kim, J.C.; Lee, Y.S.; Jang, J.S.; Kee, S.; Kim, S.H. Modification of gamma-radiation response in mice by green tea polyphenols. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 1380–1383.
20. Kaput, J.; Ordovas, J.M.; Ferguson, L.; van Ommen, B.; Rodriguez, R.L.; Allen, L.; Ames, B.N.; Dawson, K.; German, B.; Krauss, R.; *et al.* The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 623–632.
21. Meng, X.; Maliakal, P.; Lu, H.; Lee, M.J.; Yang, C.S. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 935–942.
22. Schlachterman, A.; Valle, F.; Wall, K.M.; Azios, N.G.; Castillo, L.; Morell L.; Washington, A.V.; Cubano, L.A.; Dharmawardhane, S.F. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl. Oncol.* **2008**, *1*, 19–27.
23. Dani, C., Oliboni, L.S.; Vanderlinde, R.; Pra, D.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Henriques, J.A. Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. *J. Med. Food.* **2009**, *12*, 188–192.

24. Kaur, M.; Mandair, R.; Agarwal, R.; Agarwal, C. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutr. Cancer* **2008**, *60*, 2–11.
25. Kaur, M.; Agarwal, C.; Agarwal, R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 1806S–1812S.
26. Udenigwe, C.C.; Ramprasath, V.R.; Aluko, R.E.; Jones, P.J. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, 445–454.
27. Llópiz, N.; Puiggròs, F.; Céspedes, E.; Arola, L.; Ardévol, A.; Bladé, C.; Salvadó, M.J. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 1083–1087.
28. Dani, C.O.L.; Pasquali, M.A.; Oliveira, M.R.; Umezu, F.; Salvador, M.; Moreira, J.C.; Henriques, J.A. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. *J. Med. Food* **2008**, *11*, 127–132.
29. Leifert, W.R.; Abeywardena, M.Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr. Res.* **2008**, *28*, 729–737.
30. Falk, S. Principles of cancer treatment by radiotherapy. *Surgery* **2006**, *24*, 62–65.
31. Mansour, H.H.; Tawfik, S.S. Early treatment of radiation-induced heart damage in rats by caffeic acid phenethyl ester. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *692*, 46–51.
32. Messarah, M.; Saoudi, M.; Boumendjel, A.; Boulakoud, M.S.; Feki, A.E. Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *31*, 33–41.
33. Khalil, A.; Milochevitch, C. Study of the antioxidant effect of a-tocopherol on low-density lipoprotein peroxidation induced at low and high g-radiation dose rates. *Rad. Phys. Chem.* **2005**, *72*, 347–353.
34. Clarke, R.J.; Bakker, J. Basic taste, stimulant and other constituents of wines. In *Wine Favour Chemistry*; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK, 2004; pp. 66–99.
35. Machado, M.M.; Montagner, G.F.F.S.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L.; Rocha, M.I.U.M.; Lera, J.P.B.; Belló, C.; da Cruz, I.B.M. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of non-alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 798–803.
36. Ye, K.; Ji, C.-B.; Lu, X.-W.; Ni, Y.-H.; Gao, C.-L.; Chen, X.-H.; Zhao Y.-P.; Gu, G.-X.; Guo, X.-R. Resveratrol attenuates radiation damage in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *J. Radiat. Res.* **2010**, *51*, 473–479.
37. Chu, W.W.; Dieter, R.S.; Stone, C.K. A review of clinically relevant cardiac biochemical markers. *WMJ* **2002**, *101*, 40–48.

38. Mansour, H.H.; Abo Nour, S. Biochemical and histopathological study of the protective effect of propionyl-L-carnitine against cardiotoxicity in rats. *Egypt. J. Radiat. Sci. Appl.* **2009**, *22*, 99–128.
39. Carini, R.; Parola, M.; Dianzani, M.U.; Albano, E. Lipid peroxidation and hepatocyte death investigation of a possible mechanism of oxidative cell injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1992**, *663*, 444–446.
40. Verheij, M.; Ruiter, G.A.; Zerp, S.F.; van Blitterswijk, W.J.; Fuks, Z.; Haimovitz Friedman, A.; Bartelink, H. The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiother. Oncol.* **1998**, *47*, 225–232.
41. Barcelos, G.R.; Angeli, J.P.; Serpeloni, J.M.; Grotto D.; Rocha, B.A.; Bastos, J.K.; Knasmüller, S.; Júnior, F.B. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. *Mutat. Res.* **2011**, *726*, 109–115.
42. Boligon, A.A.; Pereira, R.P.; Feltrin, A.C.; Machado, M.M.; Janovik, V.; Rocha, J.B.; Athayde, M.L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 6592–6598.
43. Woisky, R.G.; Salatino, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* **1998**, *37*, 99–105.
44. Morrison, M.; Asiedu, E.A.; Stuchbury, T.; Powell, A.A. Determination of lignin and tannin contents of cowpea seeds coats. *Ann. Bot.* **1995**, *76*, 287–290.
45. Kamdem, J.P.; Stefanello, S.T.; Boligon, A.A.; Wagner, C.; Kade, I.J.; Pereira, R.P.; Preste, A.S.; Roos, D.H.; Waczuk, E.P.; Appel, A.S.; Athayde, M.L.; Souza, D.O.; Rocha, J.B.T. *In vitro* antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. *Acta Pharm.* **2012**, *62*, 371–382.
46. Boligon A.A.; Sagrillo M.R.; Machado, L.F.; Filho, O.S.; Machado, M.M.; da Cruz, I.B.M.; Athayde, M.L. Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide. *Molecules* **2012**, *17*, 5757–5769.
47. Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal peroxidation. *Methods Enzymol.* **1987**, *52*, 302–310.
48. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 263–275.

Sample Availability: Samples of the black grape juice are available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

V- MANUSCRITO

DE FREITAS, R. B. et al. Ameliorative effect of black grape juice on systemic alterations and mandibular osteoradionecrosis induced by whole brain irradiation in rats.

Ameliorative effect of black grape juice on systemic alterations and mandibular osteoradionecrosis induced by whole brain irradiation in rats

Run title: Grape juice improves systemic alterations and osteoradionecrosis after brain irradiation

Robson B. Freitas¹, Nara Maria B. Martins², Edson A. Ramos³, Maria Francisca G. Sevilla⁴, Juan Pablo Barrio^{4*}, Margareth L. Athayde⁵, Liliane F. Bauermann⁶

1 Post-graduated program in Pharmaceutical Sciences, University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Department of Pathology, University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Nuclear Engineering Program, Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **4** Department of Biomedical Sciences, University of León, León, Spain, **5** Department of Industrial Pharmacy, University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, **6** Department of Physiology and Pharmacology

*E-mail: jpbarl@unileon.es

Abstract

Radiotherapy (RT) is often employed for brain tumour treatment. Whole brain irradiation (WBI) causes a variety of secondary side effects such as neurocognitive impairments, anorexia, and bone necrosis. We used black grape juice (BGJ) as countermeasure to the side effects of WBI. Forty rats (200-250 g) were exposed to 8 sessions of fractionated cranial X-rays. The total dose absorbed was 32 Gy delivered for 2 weeks. The animals were divided into 4 groups: (NG) non-irradiated, glucose and fructose solution supplemented (GFS); (NJ) non-irradiated, BGJ supplemented; (RG) irradiated, GFS supplemented; (RJ) irradiated, BGJ supplemented. The rats received the BGJ or GFS by gavage (0.5 mL/ 100g BW) 4 days before, during, and 4 days after WBI. Body weight, food and water consumption were recorded during the experimental protocol. The blood was collected via carotid artery 2 months after WBI and the mandibles were collected for morphological and histologic analysis. The RJ rats lost less weight than RG rats in some days of fractioned irradiation session, indicating a protective effect of BGJ. In some days RJ rats ingested more food and water than RG rats. After WBI, all rats grew until day 61. Irradiated animals started losing

weight again compared with controls as a consequence of mandibular osteoradionecrosis (ORN). Morphological measurements performed on dissected mandible showed that RG animals lost weight due to masticatory hypofunction. At microscopic level, osteoclastic activity and inflammation were apparent in mandibles of RG rats. BGJ was able to attenuate the severity of ORN as well as to improve white and red blood cell counts in comparison to RG animals. Nevertheless, although BGJ did not completely restore the alterations induced by WBI, this antioxidant-rich beverage can be used to attenuate systemic side effects of brain irradiation.

Introduction

Radiotherapy (RT) is a strategy for brain tumour management [1]. RT is delivered in fractionated doses and it is responsible for several side effects, including neurological impairments, anorexia, haematological disturbances, and osteoradionecrosis (ORN) [2]. Anorexia occurs in patients who had brain tumour and it can be related to many causes such as pituitary gland dysfunction and mucositis. Mucositis is the most important factor related to appetite loss and malnourishment [3-4].

Facial ORN appears in patients who were treated with RT for head or neck cancer [5]. The mechanism of this pathology is not clear and can be manifested years after RT. Infections, trauma and dental procedures can initiate the necrosis on face bones, being the mandible frequently more affected [3]. Tamplen et al. developed an experimental schedule using rats for better comprehension of mandibular ORN [6]. They induced ORN by mandibular removal of teeth 7 days after a 20 Gy high dose rate of brachytherapy. Histopathological studies revealed the presence of fibrosis and inflammation along a reduction of bone formation in comparison to control rats [6]. All disorders relative to ionizing radiation are ultimately related to oxidative processes. Antioxidants are often explored to mitigate the tissue damage induced by X-rays and gamma rays. Isolated antioxidant compounds, functional foods, or medicinal plants are administered to the animals in experimental models of radiation sickness [7-9]. Regarding mandibular ORN treatments, antibiotic administration, hyperbaric oxygen therapy, and procedures such as surgical debridement are often employed to reduce disease morbidity [5]. This way, a promise strategy is the prevention using non-invasive treatments as antioxidant supplementation for the management of secondary effects of fractionated whole brain irradiation. Grape-derived products such as seeds extract and juice have positive radiomodifying effects on injuries induced by irradiation [8, 10]. Previously studies showed that black grape juice (BGJ) is rich in resveratrol and quercetin [11]. Our team explored the effect of BGJ on haematological parameters, spleen and cardiac damage on experimental models of radiation sickness [9-11].

The present study evaluated the radiomodifying effect of BGJ on side effects induced by WBI on rats through measurement of food and drink intake, body weight, hemogram, and morphological and histological mandibular parameters.

Material and methods

Black grape juice (BGJ)

BGJ was ecologically produced from grapes of *Vitis labrusca* species. Our team previously quantified some compounds present in BGJ by high-performance liquid chromatography (HPLC) [11]. An isocaloric solution (GFS) was prepared using an equimolar mixture of glucose and fructose to have the same sugar composition present in the BGJ (180 g/L).

Animals

Forty male Wistar rats weighting (200-250g) at the beginning of the study were kept on cages containing 2 animals each, on a 12 hours light/dark cycle at room temperature, and were fed *ad libitum* with standard rodent chow and free access to water. All animals were used according to the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from University of León, León, Spain.

Whole brain irradiation and experimental design

Before whole brain irradiation (WBI), all animals were anesthetized with a mixture of xylazine and ketamine (7.5 / 60 mg per kg, I.P.) for immobilization purposes. The animals were placed in *decubitus pronus* on a plexiglas board, so that four animals would be irradiated at a time. The animals were placed with their bodies underneath cerrobend shielding plates (1.5 cm thick, blocking 99.87% of radiation) so that only the heads were exposed to X-rays (with eyes and nose also protected). Eight fractions of 4 Gy with a source-skin distance of 36 cm (0.53 Gy/min) were delivered in 2 weeks (4 fractions for week with an interval of 24 h between 2 fractions). The rats were divided into four groups: (NG) non-irradiated, glucose and fructose solution supplemented (GFS); (NJ) non-irradiated, BGJ supplemented; (RG) irradiated, GFS supplemented; (RJ) irradiated, BGJ supplemented. The BGJ or GFS was administered by gavage (0.5 mL per 100 g BW) 4 days before X-rays exposure, during WBI, and 4 days after WBI procedure (**Figure 1**). The X-ray apparatus was a Maxishot 200 (YXLON International GmbH, Hamburg, Germany) operated by qualified staff (Instrumental Techniques Laboratory, University of León) in accordance with Spanish legislation on radiation equipment. X-ray filtration was accomplished in the Maxishot 200 machine following manufacturer's instructions using 4-mm thick beryllium and 3-mm thick aluminum filters in the X-ray tube. Uniform X-irradiation distribution was confirmed by dosimetry using

isodose curves. A test with a phantom (water layer) was performed in order to check self-shielding without changes in the dose distribution profile for the thickness involved.

Body weight, drink and food intake

Body weight, drink and food intake data were obtained at the beginning of BGJ or GFS supplementation until 2 months after the last brain irradiation session. Food and water intake per cage were estimated by the difference of the weight of the cage lid and the water bottle weight from one day to the next. The quantity of food and water were normalized by rat body weight according the following formula: $(\text{weight of rat 1} / \text{mean of rat 1 and rat 2 weights}) * (\text{total food (g) or water intake (mL) consumed} / 2)$. The graphs about body weight, food and water intake show the data collected between day 1 and day 20. After day 20, figures 1, 2, and 3 show the data every 5 days to complete 2 months after the last brain irradiation session.

Euthanasia and samples collection

After two months the last dose of WBI, the rats are killed by exsanguination under deep anesthesia induced by pentobarbital (60 mg/100 ml saline) at 1 ml solution per 100 g BW). The carotid was punctured and blood samples were collected in tubes containing EDTA. The lower mandible was dissected and preserved in 10% buffered-formalin. One hemi-mandible was used for morphological measurements and the other was reserved for histopathological studies.

Mandibular macroscopic measurements

The mandibles were boiled for 2 minutes for the muscular tissue to be separated. The remaining tissue present on mandibles was removed by scrapping with a brush. After this procedure, the hemi-mandibles were photographed by a digital camera (Lumix DMC-TZ30, Panasonic Corp, Osaka, Japan). Macroscopic measurements were carried out on the pictures using the image analysis package Digimizer® 4.1.1.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

The biometric points used in this study are shown as follows:

- 1) Menton (M) is the lowermost point situated on the mental symphysis border.
- 2) Alveolar point of the mandibular incisor (Iia) is the lowest point situated on the buccal alveolar bone border of the mandibular incisor.

- 3) Mandibular alveolar point (Ma) is the deepest point of the upper part of the alveolar crest between the first molar and mandibular incisors.
- 4) Condylion (Co) is the most superior and posterior point of mandibular head.
- 5) Gonion (Go) is the most posterior point of the mandibular angle contour.
- 6) Gonial tangent (GoT) is the lowest point of the mandibular angle contour.
- 7) Coronoid (Cr) is the most posterior and superior point of coronoid process.
- 8) Ramus depth (Rd) is the deepest point in the concavity of mandibular ramus.
- 9) The point located in the notch between the mandibular head and coronoid process (Ic).
- 10) Mandibular base (Mb) is the deepest point of the mandibular base concavity.

For sagittal measurements, the mandibular length I (ML I) was obtained by the distance between Co and Iia points (Co-Iia). The mandibular body length (MBL) is the distance between points Go and Iia (Go-Iia). The mandibular length II (ML II) is the distance between points Cr and Iia (Cr-Iia). The depth of mandibular curvature (MRCD) is the distance from the Rd point at right angle to the Co-Go line (Rd at right angle to Co-Go). Mandibular head (MH) is the distance from point Co at right angle to the Rd-Ic line.

In the vertical measurements, the mandibular base depth (MBD) was obtained by the distance from point Mb at right angle to the GoT-M line (Mb at right angle to GoT-M). The ramus height (RH) was calculated by measure the distance between Co and GoT (Co-GoT). Finally, the mandibular body height (MBH) was obtained by the distance between M and Ma points. The measurement of the gonial angle (GA) is obtained by the intersection of lines passing through points Co-Go and GoT-M. The present protocol was described by Guerreiro et al. [12]. The points, distances and angles used for analysis are given in Figure 5.

Hematological parameters

The total blood was analyzed for hematological parameters: white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelet count (PLT), plateletcrit (PCT) mean platelet volume (MPV) and, platelet distribution width (PDW). All analysis were performed, by using an automatic counter (Diatron Abacus Junior Vet, Diatron Lab, Austria).

Histologic analysis

The hemi-mandibles were decalcified in 10% EDTA (pH 7.4) for 7 days, fixed in formalin and embedded in paraffin. Sagittal sections of 4 μm were obtained with a standard microtome and were stained with hematoxylin and eosin (H&E). All samples were analysed by a pathologist that did not know about the experimental protocol. The fields under the microscope were captured by WinTV[®] software.

Statistical analysis

Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA; 2 whole brain irradiation (WBI) levels x 2 black grape juice (BGJ) supplementation levels) by Statistica 10.0 software (Statsoft Inc, Tulsa, OK 74104, USA). The Bonferroni *post-hoc* test was used when appropriate. Values are expressed as means \pm S.E.M. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Body weight, drink and food intake

Rats gained weight before irradiation process as expect (day 1-4) (**Figure 2**). A significant change was noted from on day 10 (one day after the 4th session of cranial irradiation) in control irradiated rats (RG group) (**Figure 2**). By day 10 irradiated rats had lost 6.15% body weight in comparison to non-irradiated (NG) rats. There was significance from day 11, 12, 13, 14, 15 and 16 between NG and RG groups (**Figure 2**). When compared with rats supplemented with black grape juice (BGJ) (RJ), there was a decrease by 5.63% for RG rats on day 10 (Figure 2). BGJ supplementation protected the irradiated animals from induced-radiation anorexia from day 10 from day 14 (**Figure 2**) ($p < 0.05$). On day 15 and day 16, RG and RJ lost weight in the same proportion in relation with NG. The whole brain irradiation (WBI) procedure finished on day 16 (8th session of WBI). The supplementation with juice or glucose and fructose solution were maintained for 4 more days (days 17-20) after the last brain irradiation. Irradiated rats lost weight until day 21 when compared to the non-irradiated group (NG) ($p < 0.05$). The growing curve showed that irradiated rats gained weight as the others approximately until day 61. In any case, the growing for RG was apparently less than NG, NJ and RJ groups but it was not significant until day 61 ($p < 0.05$) (**Figure 2**). The weight loss range for RG group in comparison to non-irradiated group (NG)

for 61, 66, 71, 76 and 81 was 7.86%, 13.32%, 21.81%, 28.78 and 34.76%. The body weight for control groups (NG and NJ) increased along the experimental protocol.

There were no statistical differences between RG and RJ. However, the rats supplemented with BGJ visually lost less body weight than the irradiated control group (RG).

Regarding food intake, all animals had similar feeding behavior until day 8 (the 3rd session of WBI) (**Figure 2**). During the WBI irradiation procedure, there was statistical difference between NG and RG groups on day 9 (the 4th session of WBI), day 10, day 13 (the 6th day of WBI), day 14, day 15 (the 7th session of WBI), day 16 (the 6th session of WBI) and day 17. After this end point, RG animals showed a diminished food intake until euthanasia procedure when compared with non-irradiated animals (NG) (**Figure 3**). A drastical decrease on food intake was observed from day 61. The decrease in food intake range for RG group in comparison to non-irradiated group (NG) for day was 32.5%. The RG animals intake less food than control animals until euthanasia (day 81). The feeding behavior for RG and RJ animals is not statistical distinct for most days but we observed a tendency for RJ animals to eat more than RG rats. There was statistical significance in food intake comparing RG and RJ groups on 17, 31, 71, 76, and 81 days. There was not statistical difference between RJ and NG animals for food intake during experimental protocol, except on days 56, 61, 66, 71, 76 and 81 ($p < 0.05$). The amount of food ingested by non-irradiated and juice-supplemented (NJ) rats was not similar to the ingestion by NG group, indicating that BGJ should be affect the feeding *per se* (**Figure 3**). Before the first whole brain irradiation (WBI) session, the hydric intake for all groups was very similar. Until day 7, we did not observe changes on water intake for irradiated rats. On day 8, acute effects of radiation began to appear on hydration. Statistical differences were detected between non-irradiated control group (NG) and irradiated control group (RG) on days 8, 9, 12, and 16 in the WBI period ($p < 0.05$) (**Figure 4**). The water intake for RG rats was less than NG for these days. The irradiated rats (RG) began lost weight again since day 56 until euthanasia procedure. Irradiated and juice-supplemented (RJ) rats drank less water than NG group for 61, 66, 71, 76 and 81 ($p < 0.05$). There was a tendency for irradiated and juice-supplemented (RJ) rats to drink more water than RG until euthanasia (**Figure 4**).

Mandibular measurements

Regarding to mandibular macroscopic measurements, ANOVA revealed a decrease in the 3 sagittal measurements, mandibular length I (ML I), mandibular body length (MBL), and mandibular length II (ML II) for the irradiated control group (RG) as follows: ML I

decreased by 9.97% for RG in comparison to the control group (NG). Black grape juice (BGJ) was able to increase by 5.06% the ML I parameter in relation to RG group. The total whole brain irradiation (WBR) reduced MBL value by 14.13% in comparison to NG group. On the other side, BGJ increased MBL by 4.92% in contrast to RG group. ML II is affected by irradiation, suffering a reduction of 10.60% with respect to controls. In this case, BGJ was not able to increase the parameter value. Neither the remaining sagittal parameters nor gonial angle (GA) became affected by radiation. The only vertical parameter which was modified by irradiation was the ramus height (RH). There was 5.87% decrement in RG group in comparison to NG group. BGJ increased by 6.31% the RH value in relation to RG group. There was no difference in RH between NG and RJ groups, indicative that BJJ completely restored this parameter (**Table 1**).

Histopathology analysis

Cranial irradiation increased the number of osteoclasts in mandible in irradiated control rats (RG) (20.75 ± 0.24) in comparison to non-irradiated, glucose/fructose- supplemented rats (NG) (10.75 ± 0.96) ($p < 0.05$). The number of osteoclasts present in mandibles from irradiated and supplemented with black grape juice (BGJ) was less than the count found in RG group (7.50 ± 0.48) (**Figure 6E**). There were no differences between non-irradiated control (NG) group and non-irradiated, BGJ-supplemented (NJ) group. The NJ group yielded the highest number of osteoblasts in mandible in comparison to the other groups (**Figure 6F**); the values found for NG, NJ, RG, and RJ groups were 218.25 ± 0.59 , 330.25 ± 0.94 , 193.25 ± 0.55 and 230.00 ± 0.41 , respectively. For NG and NJ group necrotic zones were not found in the bone (**Figure 6G**). Irradiated rats (RG) showed 3.43 ± 0.09 mm of necrotic area while irradiated and supplemented rats showed less necrosis (1.08 ± 0.07) ($p < 0.05$) (**Figure 6G**). In the mandibles from both irradiated rat groups inflammatory processes were found, but in RJ animals, the mandible showed a mild inflammatory process in comparison to RG animals.

Hematological parameters

Total white blood cell count (WBC) was reduced by whole brain irradiation (WBI). X-rays decreased WBC by 40.16% in comparison to control group (NG). Black grape juice (BGJ) increased WBC by 118.15% when compared to irradiated control group (RG). Red blood cells (RBC) also suffered insult caused by irradiation. WBI reduced RBC by 10.15% in comparison to NG control group. BGJ increased RBC by 8.33% when compared to irradiated control group (RG). Hemoglobin content (HGB) detected in irradiated control animals (RG)

was 14.51 % less than the content found in non-irradiated animals (NG). Comparison between the irradiated group (RG) and irradiated, BGJ-supplemented group (RJ) showed an increase in HGB by 9.75% from RJ in relation to RG. Hematocrit (HCT) was reduced by irradiation by 14.60% in comparison to NG group. BGJ was able to increase HCT by 9.38% for RJ group when this group was compared with RG. Irradiation reduced the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) by 3.09% in comparison to the concentration found in control animals (NG). BGJ was able to increase MCHC by 2.08% in relation to RG group. The remaining parameters related to red blood cells were not changed by radiation or BGJ supplementation. Platelets count also was not affected by WBC as well as the remaining variables related to blood coagulation. Data related to hematologic parameters are given in **Table 2**.

Discussion

Ionizing radiation (IR) is often employed on cancer treatment and it causes many side effects on the body. The black grape juice (BJG) has a great activity against damage induced by IR such as hematopoietic syndrome [10], cardiac insults [11], spleen dysfunction [9] and cognitive impairments [13]. In the present protocol, we intended to attenuate the secondary effects of whole brain irradiation (WBI) as anorexia, hematological changes and osteoradionecrosis (ORN) in rats supplemented with BGJ.

The first step after the establishment of the radiation exposure design was BGJ supplementation. Many protocols can be found in the literature related to radiomodifier administration, and some researchers have supplemented the animals only before and others only after irradiation. Without a consensus about the more adequate time to supplement the animals with radiomodifying substances, we opted for the following schedule: 4 days before X-rays exposure, during X-rays exposure period, and 4 days after the last X-rays exposure (**Figure 1**). According Brown et al., the better time to initiate the antioxidant diet as countermeasure against to radiation insults is 24 hours after the irradiation, being the rate of rat survival about 80% [14]. In the end, we decided to combine the supplementation procedure that had been previously used by our team with others described in the literature to allow a greater life expectancy to irradiated animals [9-11, 14-15]. Regarding to body weight changes, the anorexia observed in irradiated rats (RG) can be associated to an acute effect of fractionated whole brain irradiation (WBI). The X-rays were delivered in 8 doses, being 4 doses per week with a 24 hours between the 2nd (day 6) and 3rd session (day 8) (**Figure 2**,

Figure 3 and, Figure 4). After the 4th session (day 9) the animals recovered for 2 days and then they received the 5th X-ray session on day 12 on the 2nd week. The last 3 doses of WBI were delivered to rats on day 13, 15 and 16 as shows **Figure 1**. The RG rats have begun to lost weight on the 3rd (day 8) WBI session. The anorexia state persisted for RG during the X-rays exposure until the last one WBI session (**Figure 2**). The anorectic effect of ionizing radiation is more evident in experimental animals or individuals exposed a whole body irradiation. The side effects of acute syndrome radiation occur when populations are exposed a single and lethal dose in a specific cases as occupational accidents and terrorism attacks [16]. Most of the studies about brain irradiation are focused on cognitive impairments; hippocampal neurogenesis and oxidative stress, but there are few data about systemic side effects caused by this modality of irradiation. However, clinical data have shown that some patients treated with radiotherapy for management of brain tumors can manifest anorexia and other systemic side effects although the radiation dose delivered is localized and fractionated [17]. In animal studies conducted by Forbes et al., young adult and aging rats under fractionated WBI gained less weight than sham-irradiated control animals. These data [18] are in agreement with our results. Forbes et al. believe that the weight losses manifested by experimental animals were due to neural and subsequent endocrine disturbances, and not to extra-cranial damage [18]. Hypopituitarism related to cranial irradiation is a putative reason for cardiovascular disorders, body changes, bone density loss manifested for children and adults acutely or many years after WBI [19]. We supposed that the weight loss observed in irradiated rats during the WBI is due to an endocrinopathie although we not quantify the pituitary hormones levels as growing hormone (GH). The decrease on GH extracted from pituitary gland was diminished in irradiated rats along with body weight loss [18]. There are strong reasons to believe that X-rays exposure affects the pituitary gland via oxidative stress, since ionizing radiation causes the radiolysis of water producing free radicals and reactive oxygen species [20]. The positive effect on body weight during the cranial irradiation observed in rats supplemented with juice can be associated the presence of phenolic compounds in this beverage. According previous reports, our team quantified and isolated phenolic compounds of BGJ by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the results showed high levels of resveratrol and quercetin [11]. Grapes, cocoa, blueberries, and peanuts are good natural sources of resveratrol [21], while quercetin is found in many vegetable foods, especially onions, apples, tea, and grapes and its derived products as red wine and grape juice [22]. Comparing to irradiated rats (RG), BGJ supplemented rats lost less weight during the brain irradiation period, specifically on days 10, 11, 12, 13 and 14 (**Figure**

2). The protective effect of BGJ supplementation was intimately related to the antioxidative action of polyphenolic substances. Quercetin, a powerful and most investigated flavonoid, is able to transverse the blood-brain barrier and increases the brain antioxidant status. This way, quercetin, resveratrol, and other phenolics present in BGJ scavenge superoxide anions and other dangerous radicals generated by X-rays in the organ, attenuating the oxidative damage on pituitary gland and other structures [23].

In respect to feeding behavior (**Figure 3, Figure 4**), food and water intake did not follow a standardized profile when compared to growing curves (**Figure 2**). Certainly, some rats may have been more affected by cranial irradiation or sham irradiation due to wide biology variability found in rats from the same group. We noted that irradiated rats (RG) lost appetite during some days in the irradiation process (day 8, 9, 10, 13, 14, 15 and 16). Water intake also was affected. RG rats drank water less than control rats during the 3rd, 4th, 5th and 8th cranial irradiation sessions. In this period, the animals most probably manifested a transitory mucositis. Mucositis induced by radiotherapy normally appears in patients who have head and neck cancer, and food and water intake are found to be severely affected. The pathogenesis of radiation mucositis is a product of mitotic cell death and mucosal inflammation [24]. Other signals and symptoms of this secondary effect of cranial irradiation are pharyngeal irritation, erythema, swelling, and pain [25]. Rats supplemented with juice (BGJ) ingested more food at days 10, 11, 12, 13 and 14 than irradiated (RJ) rats (**Figure 3**). BGJ certainly protects the rats against pituitary and oral mucosa by its antioxidant action. *Calendula officinalis* flower extract has been used in patients that received radiotherapy. The researchers isolated quercetin from *C. officinalis* extract by a chromatographic method and they observed a reduction on mucositis signals. The ameliorative effect is related to the antioxidant properties of quercetin [26]. The molecule of quercetin and other phenolic compounds contain multiple hydroxyl groups which are responsible for radical scavenging and chelating effects [27-28]. Taken together, the results addressed to cumulative acute radiation reactions on irradiated animals and an ameliorative effect in irradiated and BGJ-supplemented rats.

After irradiation or sham irradiation all rats experienced growth. However, approximately on day 61, both irradiated rat groups started losing weight dramatically. We managed to observe the general behavior of irradiated animals more closely. Alterations in ambulation, eyes, skin and inability of the animal to maintain itself in an upright position were monitored. If a rat manifests one more weakness signals or alterations in general appearance, euthanasia would be induced [14]. Although the animals progressively were losing weight, all appeared to be healthy. Once ended the first stage anorexic, we supposed that other factor non-related

to brain or pituitary gland could contribute for alterations in body weight, food and water intake. Our hypothesis was confirmed by morphometric measures realized on dissected mandible followed by histopathologic analysis. All irradiated rats (RG and RJ groups) developed osteoradionecrosis (ORN).

Up to date, there were not investigations carried out about the mitigating effect of BGJ on mandible ORN caused by whole brain radiation (WBI). A diminution in these parameters is related to masticatory hypofunction [12]. Mandibular measurements revealed a positive effect of BGJ on four parameters analyzed: mandibular length I (ML I), mandibular body length (MBL), mandibular length II (ML II) and ramus height (RH) (**Table 1**). Irradiated and juice-supplemented (RJ) rats resulted less affected by WBI than irradiated rats (RG), showing that BGJ supplementation improved the masticatory activity principally in the interval between 71 and 81 days (**Figure 3**).

By histopathology analysis, we observed normal appearance in mandibular bones of control animals (**Figure 6A, Figure 6B**). Osteoblasts are the cells responsible for bone formation, while osteoclasts are related to bone resorption. An unbalance in the function of these cells is associated to bone diseases like osteoporosis and osteopenia [29]. At the microscopic level, the irradiated control group (RG) manifested a severe coagulation necrosis in mandible. There were also found areas of devitalized bone, osteocytes with pyknotic and hyperchromatic nucleus, empty osteocyte lacunae (ghost cells), giant cells, increased osteoclastic activity and decreased osteoblastic activity (**Figure 6C**). These findings are in agreement with previous data [6, 30]. Morphological measurements correlate with histopathological data, both showing a slight positive radiomodifying effect of BJG as irradiated and BJG-supplemented (RJ) rats showed moderate necrosis, increased osteoblastic activity, reduced number of osteoclasts (**Figure 6E, Figure 6F and Figure 5G**) and a mild inflammatory process in mandibles (data not shown).

Flavonoids and other phenolic substances have been found to be bioactive compounds that improve bone mineralization [31]. Caffeic acid, a compound present in BGJ, suppressed osteoclastogenesis on bone marrow in both *in vitro* and *in vivo* studies [11, 32]. *p*-hydroxycinnamic-derived phenolic acids such as cinnamic acid, ferulic acid, and caffeic acid stimulate osteoblastogenesis, which may induce differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, and suppressed osteoclastogenesis [33]. The mechanism by which flavonoids and other phenolic compounds stimulate osteoblastic bone formation and attenuate osteoclastic bone resorption is believed to be mediated by suppression of NF- κ B activation [34]. We can then assume that bioactive compounds in BGJ are able to attenuate the severity of ORN

probably by improving osteoblastic activity and decreasing bone resorption as well as via anti-inflammatory action.

Hematologic syndrome was often investigated on acute irradiation sickness [35-37]. Nonetheless, there is a lack of data related to hematologic parameters on whole brain irradiation (WBI) or hematologic syndrome related to osteoradionecrosis (ORN). This is the first report exploring the behavior of blood cells in a fractionated WBI experimental model. We observed a reduction on white cell count in irradiated (RG) rats in comparison to sham-irradiated (NG) rats (**Table 2**). The global white cell count can indicate a variety of pathological conditions, among them: bacterial and viral infections. ORN starts when the patients who received radiotherapy for neck and head tumor suffer trauma or infections [38]. The decrease on white blood cells can be associated to the infectious process related to ORN.

Red cells count also was affected by secondary effects of cranial irradiation process. Irradiated animals showed a reduction on erythrocytes count (RBC) in comparison to control animals (NG). The BGJ improved the RBC count when compared to irradiated (RG) animals. We believe that the reduction on WBC count and its related parameters (hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT) and mean corpuscular hemoglobin concentration) did not affect directly by secondary side effects of WBI but due to consequence of ORN. There are no data on literature to support our assumptions at the moment. The hematopoietic syndrome is a common effect in acute radiation exposure and in this situation the hematopoiesis is affected by bone marrow damage. This phenomenon was reported by Andrade et al. in a model of acute irradiation sickness [10, 39]. They observed a significant reduction on red blood cells count 16 days after total body irradiation. In our protocol, the decreased on RBC was observed 2 months after the last irradiation. An alteration on masticatory performance led the patient who had received radiotherapy malnourished because there is a reduction on intestinal nutrients absorption from food. [40]. This way, the ORN can be associated a decrease in important nutrients for red blood cell function as iron and folic acid. And thus, we can presume that irradiated animal were anemic due a reduction on total red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) (**Table 2**) [41]. The number of erythrocytes in BGJ supplemented group (RJ) was very similar to the count found in NG, indicating that the BGJ kept the homeostasis. HGB, HCT and MCHC showed a similar value in comparison to non-irradiated probably because these RJ animals were less affected by ORN and ingested more food and water than irradiated control animals after ORN occurrence (**Table 2**). No alterations on platelets count and its related parameters were observed among irradiated and control groups indicate the absence of coagulation cascade disorder (**Table 2**).

All results when analyzed together show a positive radiomodifying effect of black grape juice (BGJ) on systemic effects as alterations in food and water intake in some days of fractionated cranial irradiation. Also we conclude that the BGJ can be used for mitigate a severe complication of brain irradiation like the osteoradionecrosis (ORN) and hematologic syndrome related to ORN. Nevertheless, the BGJ did not completely restore the alterations induced by radiation on rats; the positive results collected will motive more investigations.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and, Econatura Produtos Ecológicos e Naturais LTDA, Rio Grande do Sul, Brazil.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Scoccianti S, Ricardi U. Treatment of brain metastases: review of phase III randomized controlled trials. *Radiother Oncol* 2012;102: 168–179.
- [2] Lee YW, Cho HJ, Lee WH, Sonntag WE. Whole brain radiation-induced cognitive impairment: pathophysiological mechanisms and therapeutic targets. *Biomol Ther* 2012; 20(4): 357-370.
- [3] Robinson ICAF, Fairhall KM, Hendry JH, Shalet SM. Differential radiosensitivity of hypothalamo – pituitary function in the young adult rat. *J Endocrinol* 2001;169: 519–526.
- [4] Jham BC, Regina A. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol* 2006; 72(5):704–8.
- [5] Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58: 1088-1093.
- [6] Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, Armin B, Steinberg M, et al. Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;145(3): 404-410.
- [7] Mansour HH, Tawfik SS. Early treatment of radiation-induced heart damage in rats by caffeic acid phenethyl ester. *Eur J Pharmacol* 2012;692(1-3): 46–51.
- [8] Saada HN, Said UZ, Meky NH, Abd El Azime AS. Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats. *Phytother* 2009;23(3): 434-438.
- [9] Freitas RB, Augusti PR, Andrade ER, Rother FC, Rovani BT, et al. Black grape juice protects spleen from lipid oxidation induced by gamma radiation in rats. *J Food Biochem* 2014;38(1): 119:127
- [10] Ramos De Andrade E, Da Costa Escobar Piccoli J, Mânica Da Cruz IB, Teixeira Rocha JB, Garzo E, Marina R, et al Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats. *Nutr Hosp* 2009;24(3): 297–303.
- [11] Freitas RB, Boligon AA, Rovani BT, Piana M, Brum TF, et al. Effect of black grape juice against heart damage from acute gamma TBI in rats. *Molecules* 2013;18: 12154-12167.
- [12] Guerreiro FS, Diniz P, Carvalho PEG, Ferreira EC, Avancini SRP, et al. Effects of masticatory hypofunction on mandibular morphology, mineral density and basal bone area. *Braz J Oral Sci* 2013;12(3): 205-211.
- [13] Soares F, Dalla Corte CL, Andrade ER, Marina R, González P, Barrio JP. Purple grape juice as a protector against acute x-irradiation induced alterations on mobility, anxiety, and feeding behaviour in mice. *Nutr Hosp* 2014;29(4): 812–821.

- [14] Brown SL, Kolozsvary A, Liu J, Jenrow KA, Ryu S, et al. Antioxidant diet supplementation starting 24 hours after exposure reduces radiation lethality. *Radiat Res* 2010;173(4): 462-468.
- [15] Guan J, Stewart J, Ware JH, Zhou Z, Donahue JJ, Kennedy AR. Effects of dietary supplements on space radiation-induced induction in total antioxidant status in CBA mice. *Radiat Res* 2006;165: 373–378.
- [16] Begum N, Rajendra PN, Thayalan K. Apigenin protects gamma-radiation induced oxidative stress, hematological changes and animal survival in whole body irradiated Swiss albino mice. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* 2012;2: 45–52.
- [17] Darzy KH. Radiation-induced hypopituitarism after cancer therapy : who, how and when to test. *Nature* 2009;5(2): 88–99.
- [18] Forbes ME, Paitsel M, Bourland JD, Riddle DR. Systemic effects of fractionated, whole-brain irradiation in young adult and aging rats. *Radiat Res* 2013;180(3): 326–33.
- [19] Sara M, Claudio F, Marco L, Roberto L, Elena M, Micaela M, et al. Time course of hypothalamic-pituitary deficiency in adults receiving cranial radiotherapy for primary extrasellar brain tumors. *Radiother Oncol* 2011;99(1): 23–28.
- [20] Karbownik M, Reiter, RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Exp Biol Med* 2000;225: 9–22.
- [21] Bhat KPL, Li JWK, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal* 2001;3(6): 1041-1064.
- [22] Olina MFM, Eus SA, Glesias II, Eneidi JB. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 2003;26(10):1398–1402.
- [23] Sanhueza J, Valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A. Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia–reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992; 78: 211–218.
- [24] Specht L. Oral complications in the head and neck radiation patient Introduction and scope of the problem. *Supp Care Dent* 2002;10: 36–39.
- [25] Ghassemi L, Zabihi E, Mahdavi R, Seyedmajidi M, Akram S, Motallebnejad M. The effect of ethanolic extract of propolis on radiation-induced mucositis in rats. *Saudi Med J* 2010;31(6):622–626.
- [26] Babaee N, Moslemi D, Khalilpour M, Vejdani F, Moghadamnia Y, Bijani A, et al. Antioxidant capacity of calendula officinalis flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers : a randomized controlled clinical study. *Daru* 2013;21(1): 1–8.

- [27] Jung L, Kessler M. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol* 2003;55:131–42.
- [28] Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol Vitro* 2001;15: 3–6.
- [29] Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale. *J Clin Invest* 2006;116(5): 1186–1194.
- [30] Cohen M, Nishimura I, Tamplen M, Hokugo A, Beumer J, Steinberg ML, et al. Animal model of radiogenic bone damage to study. *Am J Otolaryngol Neck Med Surg* 2011; 32(4): 291–300.
- [31] Yamaguchi M, Baile CA., Zhu S, Shoji M. Bioactive flavonoid p-hydroxycinnamic acid stimulates osteoblastogenesis and suppresses adipogenesis in bone marrow culture. *Cell Tissue Res* 2013;354(3): 743–750.
- [32] Wu X, Li Z, Yang Z, Zheng C, Jing J, Chen Y, et al. Caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester suppresses receptor activator of NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss through inhibition of mitogen-activated protein kinase/activator protein 1 and Ca²⁺-nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 signaling pathways. *J Bone Miner Res* 2012; 27(6): 1298–1308.
- [33] Yamaguchi, M. The osteogenic effect of bioactive flavonoid p-hydroxycinnamic acid: development in osteoporosis treatment. *OA Biotechnol* 2013;2(2): 1-8.
- [34] Lai YL, Yamaguchi M. Phytocomponent p-hydroxycinnamic acid inhibits osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cultures. *Int J Mol Med* 2007;19(1): 123–128.
- [35] Blakely WF, Ossetrova NI, Manglapus GL, Salter CA., Levine IH, Jackson WE, et al. Amylase and blood cell-count hematological radiation-injury biomarkers in a rhesus monkey radiation model-use of multiparameter and integrated biological dosimetry. *Radiat Meas* 2007;42(6-7): 1164–1170.
- [36] Seed TM, Inal CE, Singh VK. Radioprotection of hematopoietic progenitors by low dose amifostine prophylaxis. *Int J Radiat Biol* 2014;90(7): 594–604.
- [37] Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(9):1447-1467.
- [38] Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64:379-390.
- [39] Andrade ER, Cruz IBM, Andrade VVR, Piccoli JCE, González-Gallego J, et al. Evaluation of the potential protective effects of ad libitum black grape juice against liver oxidative damage in whole-body acute X-irradiated rats. *Food Chem Toxicol* 2011;49: 1026-1032.

[40] Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 200;25: 117–29.

[41] Wallerstein R, Francisco S. Laboratory Evaluation of Anemia. *West J Med* 1987;164(4): 443-451.

Figures and legends

Figure 1 – Experimental design. The supplementation with black grape juice (BJG) or glucose and fructose solution (GFS) occurred between day 1 and day 20 (4 days before X-rays exposure, during WBI, and 4 days after whole brain irradiation (WBI) procedure. Narrows (→) indicate when the animals were exposure to WBI. The animals received 8 doses of 4 Gy, totalizing 32 Gy. The animals were observed two months after the last dose of X-rays for WBI late side effects appeared (period between day 21 and 81).

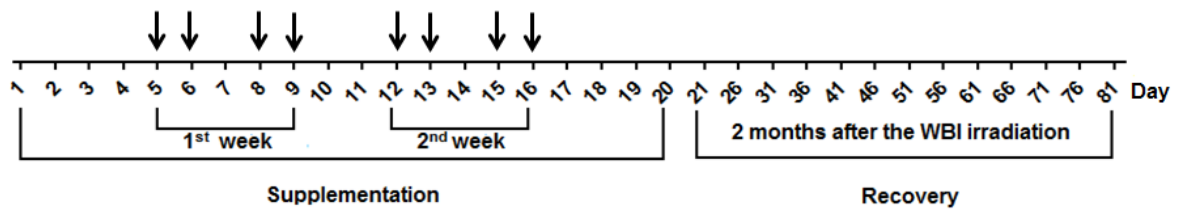


Figure 2

Figure 2. Growing curves. - Body weight (g) from NG (non-irradiated; supplemented with glucose and fructose), NJ (non-irradiated; supplemented with black grape juice), RG (irradiated; supplemented with glucose and fructose) and RJ (irradiated; supplemented with black grape juice) groups. Data are means \pm SEM. # Different from NG. & Different from RG ($p < 0.05$).

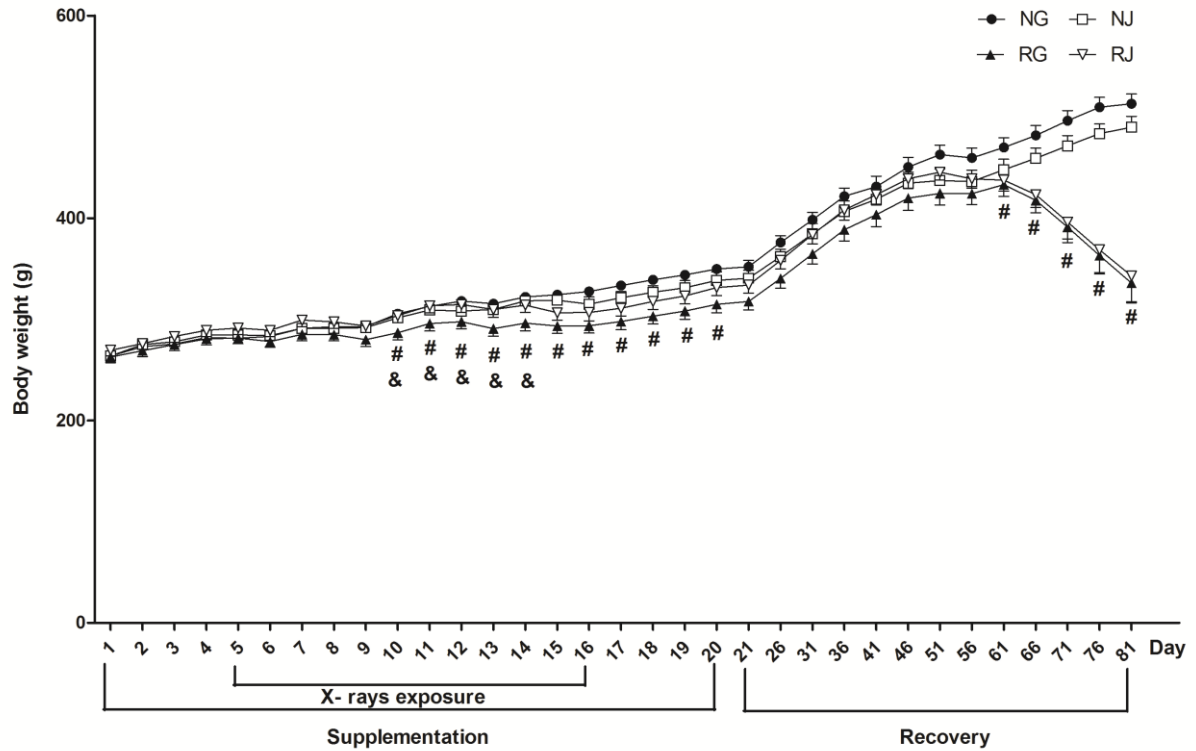


Figure 3

Figure 3. Food intake - Food intake (g) from NG (non-irradiated; supplemented with glucose and fructose), NJ (non-irradiated; supplemented with black grape juice), RG (irradiated; supplemented with glucose and fructose) and RJ (irradiated; supplemented with black grape juice) groups. # Different from NG. & Different from RG ($p < 0.05$).

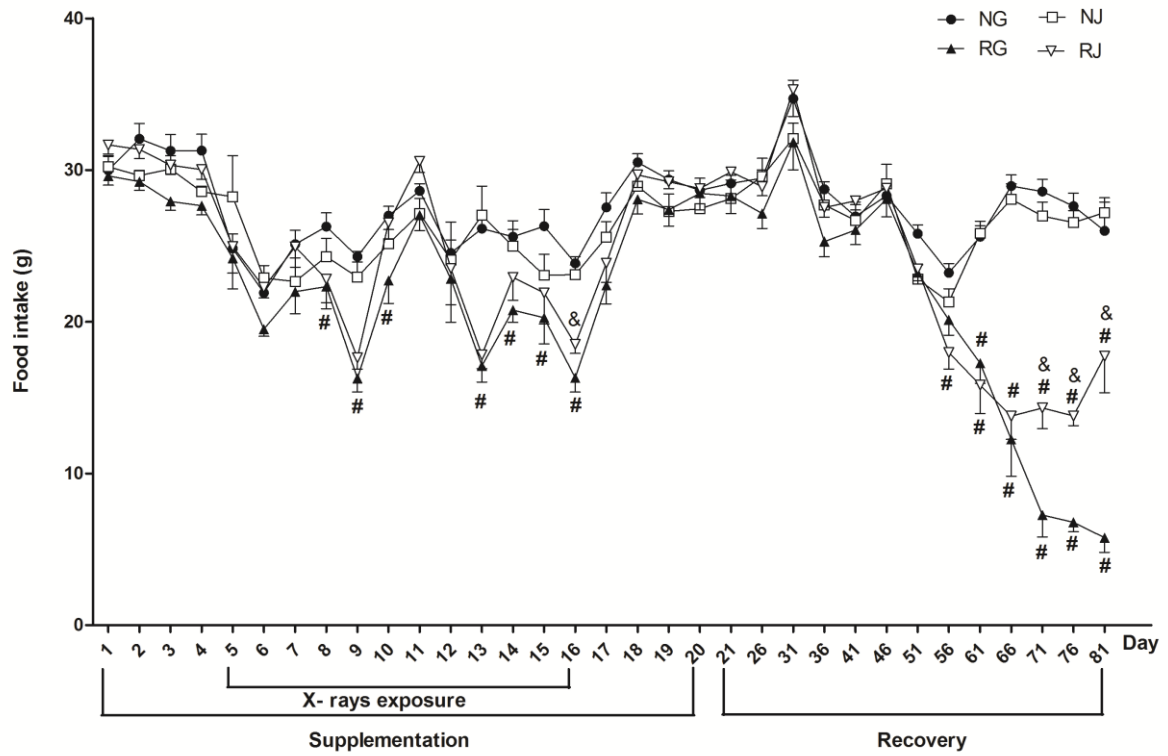


Figure 4

Figure 4. Water intake - Food intake (mL) from NG (non-irradiated; supplemented with glucose and fructose), NJ (non-irradiated; supplemented with black grape juice), RG (irradiated; supplemented with glucose and fructose) and RJ (irradiated; supplemented with black grape juice) groups. # Different from NG. & Different from RG ($p < 0.05$).

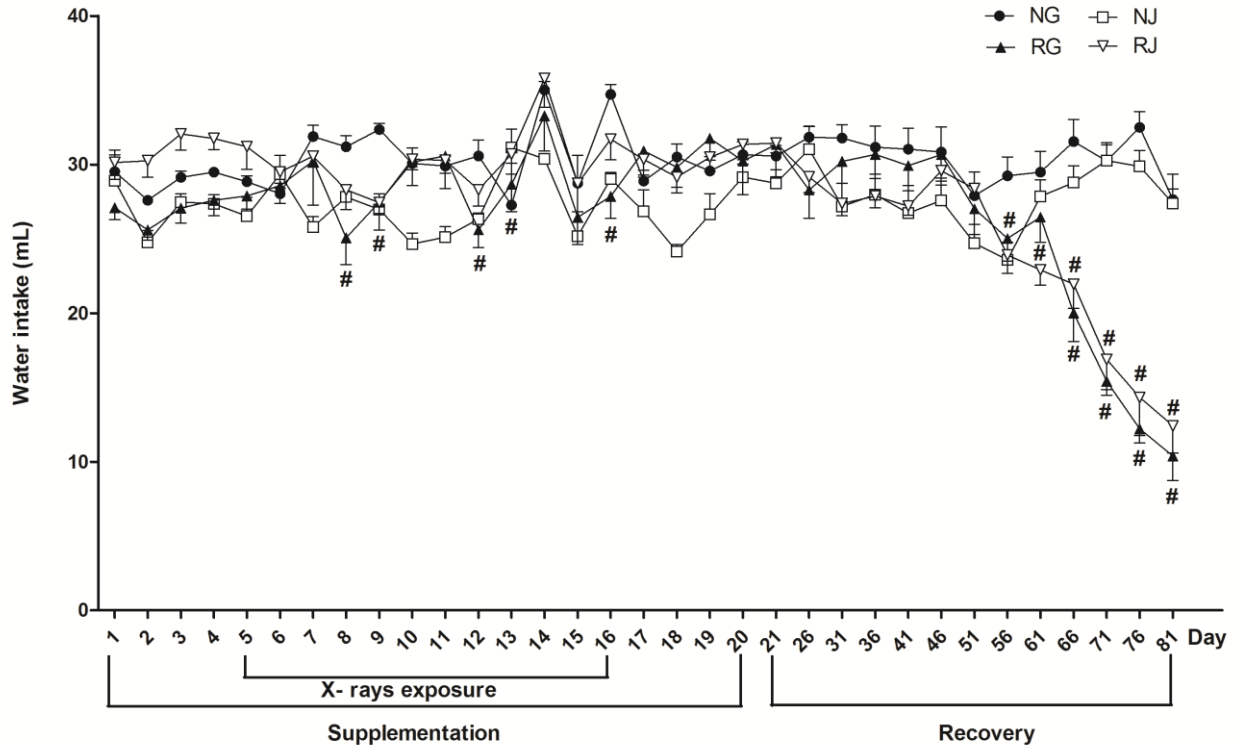


Figure 5

Figure 5 - Mandibular points and measurements - Mandibular length I (Co-Iia); Mandibular body length (Go-Iia); Mandibular length II (Cr-Iia); The depth of mandibular curvature (Rd at right angle to Co-Go); Mandibular head (Co at right angle to Rd-Ic); Mandibular base depth (Mb at right angle to GoT-M); Ramus height (Co-GoT); Mandibular body height (M-Ma); Gonial angle (intersection between Co-Go and GoT-M). The figure was adapted from Guerreiro et al. (2013).

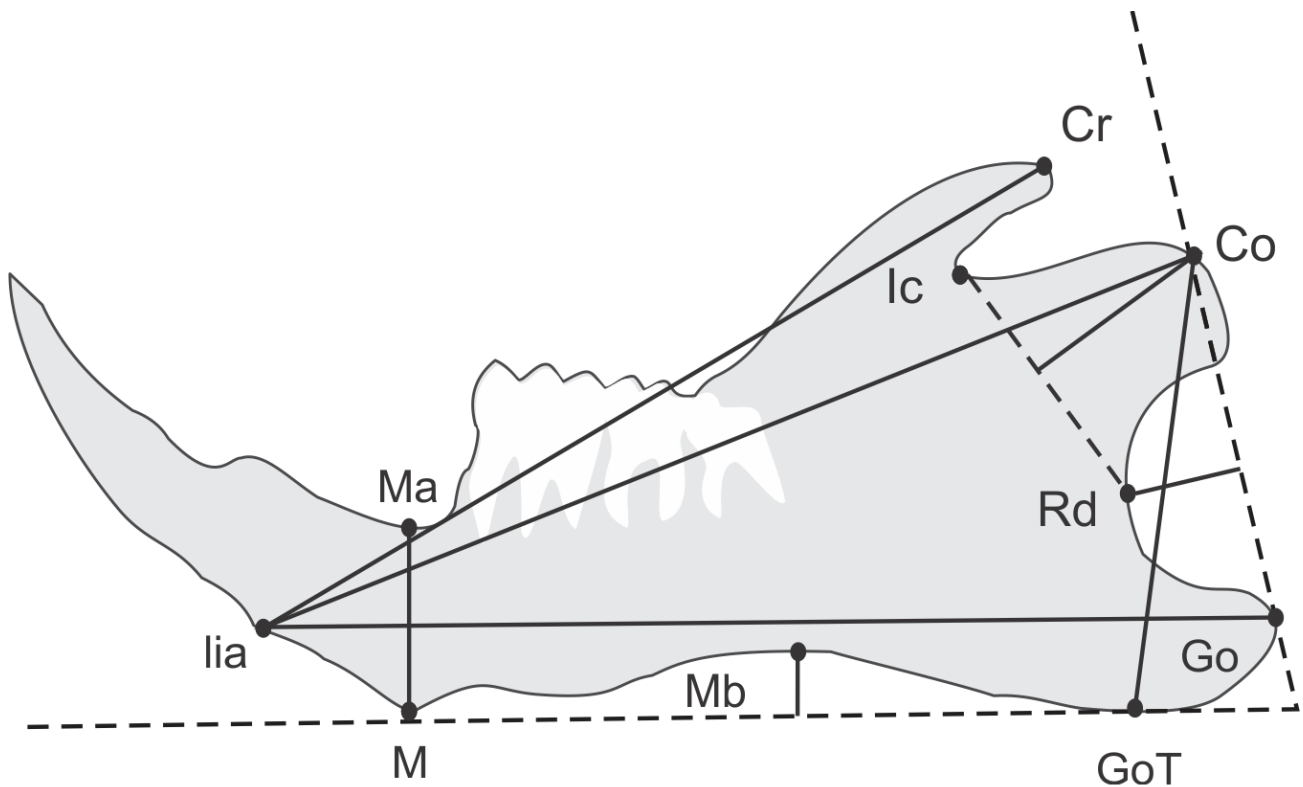
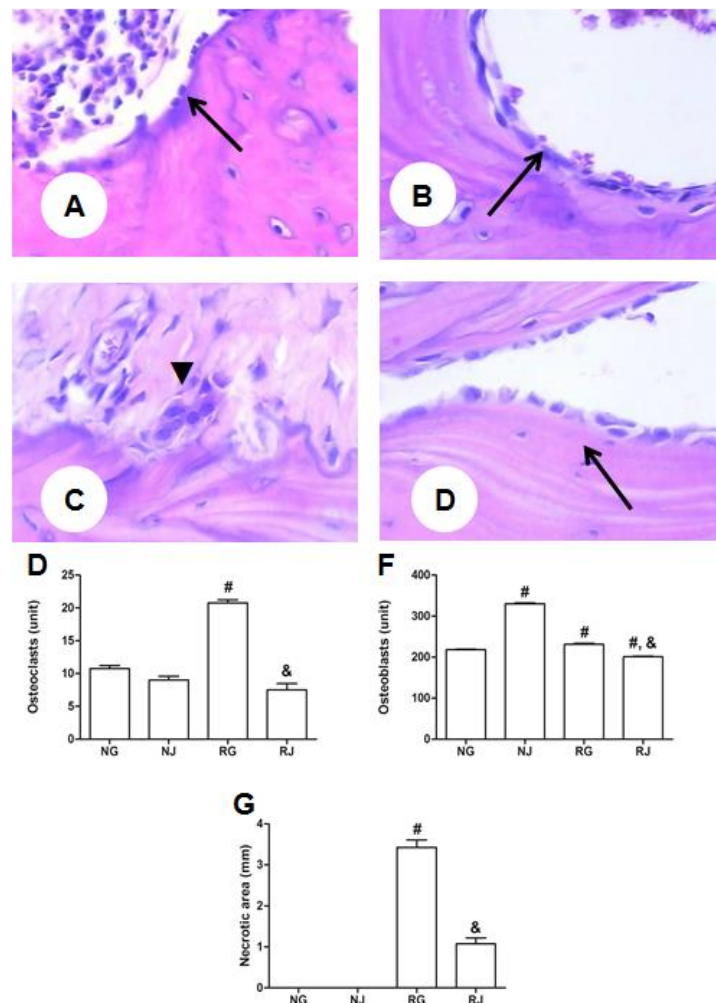


Figure 6

Figure 6 - Hematoxylin and eosin-stained sections of mandible and cells count and necrotic area measurement. (A) NG (non-irradiated; supplemented with glucose and fructose) group at 400 x magnification. Narrow (\rightarrow) indicate osteoblasts. (B) NJ (non-irradiated; supplemented with black grape juice) group at 400 x magnification. \rightarrow Shows lined with osteoblasts. We observed a normal osteoclastic and osteoblastic activity in mandibles of control rats (NG and NJ) (C) RG (irradiated; supplemented with glucose and fructose) group at 400 x magnification. The triangle (\blacktriangledown) indicate osteoclasts. There was a significant increase in osteoclastic activity in mandibles of irradiated control rats (RG). (D) RJ (irradiated; supplemented with black grape juice) group at 400 x of magnification. Narrow (\rightarrow) indicated osteoblasts.. (E) Osteoclast count. (F) Osteoblast count. (G) Necrotic area measurement. Data are means \pm SEM. # Different from NG. & Different from RG ($p < 0.05$).



Tables and legends

Table 1

Table 1- Biometric points and measurements. Mandibular length I (ML I); Mandibular body length (MBL); Mandibular length II (ML II); Mandibular ramus curvature depth (MRCD); Mandibular head (MH); Mandibular base depth (MBD); Ramus height (RH); Mandibular base height (MBH), Gonial angle (GA). Data are expressed in mean \pm SE. *Different from NG. #Different from RG ($p < 0.05$).

Measurement	Groups			
	NG	NJ	RG	RJ
ML I (mm)	27.79 \pm 0.44	26.94 \pm 0.24	25.27 \pm 0.25*	26.55 \pm 0.40#
MBL (mm)	28.51 \pm 0.49	27.11 \pm 0.68	24.98 \pm 0.21*	26.21 \pm 0.48#
ML II (mm)	24.82 \pm 0.59	24.30 \pm 0,71	22.44 \pm 0.27*	23.47 \pm 0.40
MRCD (mm)	4.08 \pm 0.18	3.64 \pm 0.40	3.58 \pm 0.33	3.48 \pm 0.11
MH (mm)	4.81 \pm 0.02	5.02 \pm 0.22	4.82 \pm 0.13	5.19 \pm 0.16
MBD (mm)	2.25 \pm 0.32	1,99 \pm 0.21	1.95 \pm 0.12	1.86 \pm 0.07
RH (mm)	12.08 \pm 0.21	12.07 \pm 0.30	11.41 \pm 0.21*	12.13 \pm 0.21#
MBH (mm)	5.24 \pm 0.03	5.29 \pm 0.04	5.22 \pm 0.17	5.41 \pm 0.09
GA (θ)	75.17 \pm 1.57	76,73 \pm 3.27	78,85 \pm 0.90	79.18 \pm 1.18

Table 2

Table 2- Hematological parameters. *Different from NG. #Different from RG. Data are expressed as mean \pm ESM ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE.

Parameter	Groups			
	NG	NJ	RG	RJ
WBC (10^9 g/L)	7.13 \pm 0.47	8.32 \pm 0.73	3.80 \pm 0.40*	8.29 \pm 0.69#
RBC (10^{12} g/L)	8.46 \pm 0.19	8.48 \pm 0.08	7.68 \pm 0.26 *	8.32 \pm 0.16#
HGB (g/dL)	17,26 \pm 0.35	16.78 \pm 0.32	14.67 \pm 0.30*	16.10 \pm 0.37#
HCT (%)	45.20 \pm 0.74	43.92 \pm 0.81	38.60 \pm 0.81*	42.22 \pm 0.81#
MCV (fL)	52.20 \pm 0.58	52.33 \pm 0.74	50.88 \pm 0.43	51.00 \pm 0.58
MCH (g)	19.84 \pm 3.32	19.58 \pm 0.31	19.40 \pm 0.12	19.40 \pm 0.19
MCHC (pg)	38.76 \pm 0.25	38.20 \pm 0.19	37.56 \pm 0.15*	38.34 \pm 0.14#
RDW (%)	16.66 \pm 1.08	16.54 \pm 1.19	17.37 \pm 0.80	16.91 \pm 0.65
PLT (10^9 g/L)	558.50 \pm 26.48	544.60 \pm 34.49	480.55 \pm 19.00	484.00 \pm 44.36
PCT (%)	0.39 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	0.36 \pm 0.01	0.39 \pm 0.15
MPV (fL)	7.48 \pm 0.31	7.18 \pm 0.22	6.99 \pm 0.34	7.16 \pm 0.44
PDW (%)	28.35 \pm 0.51	27.58 \pm 0.39	27.21 \pm 0.59	28.77 \pm 0.95

VI- DISCUSSÃO GERAL DOS DADOS

A radiação ionizante é bastante empregada nos mais variados campos da sociedade contemporânea. A área da saúde se beneficia sobremaneira deste tipo de tecnologia porque é ferramenta para diagnóstico de doenças e, também é um dos recursos para o tratamento do câncer (HALL, 2006). Porém, a radiação ionizante apresenta dualidade capaz de fomentar um número significativo de investigações tanto na clínica quanto em questões políticas e sociais, uma vez que pode aumentar a expectativa de vida de pacientes ou ceifar vidas quando usada em ações terroristas ou em acidentes ocupacionais. Em relação ao emprego de raios-X e raios gama (γ) no tratamento de tumores, observa-se que a tecnologia empregada hoje gera menos danos aos tecidos saudáveis do que os primeiros aparelhos. No entanto, ainda não se tem uma ação direcionada apenas para células malignas e, invariavelmente, as células saudáveis são facilmente acometidas pela radiação. Devido a este fato, os pacientes submetidos ao tratamento com radiação apresentam inúmeros efeitos colaterais tais como anorexia, imunodepressão, e alterações no sistema nervoso central.

Quando populações são expostas a altas doses de radiação, estas podem manifestar efeitos relacionados à síndrome aguda da radiação (SAR). A forma de tratar pacientes expostos à radiação ionizante de forma aguda deve ocorrer de forma rápida e precisa, por isso, há a necessidade de equipes altamente treinadas para empregar um protocolo de tratamento dos sintomas da SAR, com o intuito de diminuir a morbidade e a mortalidade (CHRISTENSEN, 2014). Porém, alguns dos recursos empregados na atualidade são apenas paliativos e nem sempre são efetivos como anti-inflamatórios e antibióticos. Dessa forma há uma busca incessante por novas alternativas capazes de conferir proteção contra os efeitos deletérios da energia ionizante. Algumas das alternativas são o desenvolvimento de fármacos que confirmam proteção ao organismo de pessoas irradiadas ou emprego de alimentos ricos em compostos antioxidantes como vitaminas e flavonoides (ANDRADE, 2010).

Devido ao número significativo de propriedades medicinais descritas para a uva e seus derivados, o suco de uva orgânico (SUO) foi escolhido para ser usado nos modelos experimentais de Radiobiologia empregados neste estudo. No primeiro artigo apresentado nesta tese, o cerne da investigação foi os efeitos cardioprotetores do suco de uva frente ao dano oxidativo em modelo experimental de SAR. Com a finalidade de se conhecer os compostos polifenólicos presentes no SUO foram realizados ensaios cromatográficos.

Os resultados mostraram que o resveratrol foi o composto majoritário (31.28 ± 0.04 mg/L), seguido da quercetina ($18,67 \pm 0,12$ mg/L), ácido cafeico ($18,15 \pm 0,03$ mg/L), canferol ($8,71 \pm 0,03$ mg/L), ácido gálico ($8,43 \pm 0,06$ mg/L), ácido elágico ($8,03 \pm 0,05$ mg/L) e catequina ($5,57 \pm 0,09$). Com uma caracterização química mais detalhada do suco de uva é possível relacionar os seus compostos com as atividades biológicas que a bebida apresenta.

Neste protocolo os animais foram divididos em quatro grupos, sendo dois não irradiados e dois irradiados (6 Gy). (TABELA 2)

Tabela 2 – Grupos experimentais dos artigos científicos.

	Grupo	Irradiação	Suplementação
1)	SNI/NG	Não	Suco
2)	PNI/ NJ	Não	Glicose + frutose
3)	SI/ RJ	Sim	Suco
4)	PI/ RG	Sim	Glicose + frutose

De acordo com o grupo experimental, os animais receberam o SUO ou a solução de glicose e frutose por via intragástrica uma semana antes da irradiação e 4 dias após à irradiação. A irradiação foi de corpo inteiro e a dose total absorvida foi de 6 Gy. Neste protocolo o objetivo principal foi analisar o efeito cardioprotetor do SUO em ratos Wistar expostos agudamente aos raios gama (γ). A fim de acompanhar o grau de comprometimento da função cardíaca, lançou-se mão da dosagem sérica da enzima lactato desidrogenase (LDH). A dosagem foi realizada 24, 48, 72 e 96 horas depois da irradiação de corpo inteiro. A LDH é uma enzima que catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, em presença da coenzima NAD^+ que atua como doador ou receptor de hidrogênio (MOTTA, 2009). Esta enzima está presente no citoplasma de todas as células, porém, as células cardíacas, renais, vermelhas do sangue e do músculo esquelético são as mais ricas em LDH. Desta forma, um aumento da atividade sérica da LDH não é específico. No entanto, neste protocolo, também foi avaliada a oxidação do tecido cardíaco por meio do ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Assim, foi possível relacionar um resultado com outro e inferir que a

elevação da LDH sérica nos animais irradiados e suplementados com solução de glicose e frutose era predominantemente de origem cardíaca. A atividade da LDH manteve-se elevada 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação de corpo inteiro. Tal fato pode ser relacionado ao dano oxidativo causado pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio à membrana plasmática. A oxidação altera a integridade da membrana, comprometendo a função do órgão. Estudos já comprovaram que a radiação aumenta o nível de várias enzimas relacionadas ao dano cardíaco e relacionam a exposição à radiação ao risco aumentado para infarto agudo do miocárdio e outras doenças cardiovasculares (MANSOUR, 2011; YUSUF, 2011). Os resultados apresentados sugerem fortemente a eficiência do suco de uva em evitar ou atenuar a interação das espécies oxidantes com a membrana plasmática, reduzindo a formação de radicais derivados de lipídeos. Como consequência do efeito radiomodificador positivo do suco, foi observada uma redução significativa no nível sérico da LDH e conteúdo de malondialdeído (MDA) no tecido cardíaco dos ratos lotados no grupo SI. Acredita-se que o efeito antioxidante do SUO deva-se a um sinergismo entre os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos), pois, sabe-se que ação antioxidante de um composto antioxidante pode ser maior que a de outro. E, quanto mais rica em hidroxilas for a substância, maior será sua atividade antioxidante (CAO, 1997). Agregando resultados de estudos prévios com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que além de oferecer proteção ao coração, o suco de uva orgânico confere proteção aos demais órgãos. Este fato ratifica as várias propriedades medicinais dos compostos fenólicos presentes na uva e seus derivados, entre elas: ação hepatoprotetora, neuroprotetora, antimutagênica dentre outras (LLÓPIZ, 2004; DANI, 2008; RODRIGUES, 2012). Assim, conclui-se que por oferecer uma proteção sistêmica contra os danos causados pela radiação nos tecidos vivos, o suco de uva pode ser usado para prevenir e mitigar os sintomas da SAR.

No segundo experimento, foram explorados os efeitos colaterais da irradiação cranial fracionada em ratos. Esta modalidade de irradiação é bastante empregada no tratamento de tumores cerebrais (SCOCCIANI, 2012). Embora seja bastante eficaz, a radioterapia gera uma série de consequências, afetando principalmente a memória e cognição de pacientes. No entanto, os efeitos sistêmicos da irradiação cranial não são menos importantes e podem afetar significativamente a qualidade de vida de pacientes durante e após o tratamento (DARZY, 2009a).

Os animais foram divididos em 4 grupos como mostra a tabela 2 e suplementados 4 dias antes da irradiação, durante, e 4 dias após a irradiação. Foram confeccionadas duas placas de Cerrobend[®] (liga metálica composta por bismuto, chumbo, estanho e cádmio), as quais foram dispostas paralelamente com espaço entre elas de 2,8 cm. Os animais foram colocados abaixo das placas de tal maneira que apenas o crânio fosse exposto aos raios-X (FIGURA 10).

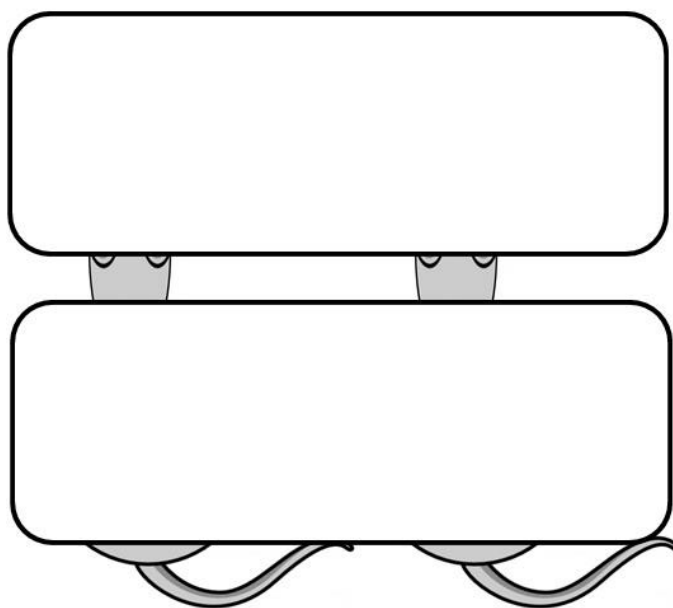


Figura 10 - Placas de Cerrobend[®] usadas para blindar o corpo dos animais.

Os crânios foram irradiados 8 vezes ao longo de duas semanas (8 x 4 Gy), sendo que cada dose era de 4 Gy. O grupo controle irradiado (RG) começou a perder peso no 10º dia de experimento (após a 4ª sessão de irradiação). A perda de peso foi observada até o 20º dia em comparação ao grupo controle não irradiado (NG). Acredita-se que tenha ocorrido uma disfunção na glândula pineal e como consequência houve uma menor liberação do hormônio do crescimento. Esta alteração, também causou mudanças no comportamento ingestivo dos animais. No entanto, durante alguns dias do processo de irradiação, os animais irradiados e tratados com o suco de uva orgânico perderam menos peso. Tal fato pode ser explicado, pela presença de resveratrol e outros compostos antioxidantes que atenuaram a severidade do estresse oxidativo ocorrido no cérebro. Passado o protocolo de irradiação, houve uma recuperação e todos os grupos ganharam peso de forma semelhante. No entanto, após o 61º dia, os animais irradiados

(RG e RJ) começaram a perder peso. Neste momento levantamos a hipótese de que a anorexia não estava relacionada a uma diminuição nos níveis de hormônio do crescimento, mas sim a outro fator ainda desconhecido. A hipótese somente foi confirmada após a eutanásia: todos os animais desenvolveram necrose de mandíbula. Os estudos morfométricos e histológicos da mandíbula mostraram que a necrose foi mais branda nos animais que receberam o suco de uva. Em humanos, a osteorradiocrecrose de mandíbula acomete principalmente pacientes dentados e que trataram cânceres de cabeça e pescoço. Má higiene bucal, traumas, extrações dentárias e infecções são os principais fatores relacionados à manifestação deste tipo de necrose (SPETCH, 2002).

Todos os animais irradiados apresentaram cáries e crescimento anormal do incisivo superior devido à hipofunção mastigatória (dados não apresentados no manuscrito). Os animais suplementados com o suco de uva apresentaram medidas morfométricas maiores do que as observadas nos animais irradiados, indicando que o suco atenuou a extensão do processo necrótico e perda de massa óssea após a irradiação. A análise histológica está em concordância com as medidas morfométricas, a área de necrose na mandíbula foi maior no grupo dos animais irradiados (RG) em comparação aos animais suplementados com suco (RJ) bem como a redução da atividade osteoclástica. Estudos comprovam que polifenóis são capazes de reduzir a reabsorção óssea (YAMAGUCHI, 2013).

Desta forma, acredita-se que os metabólitos secundários presentes no suco tenham aumentado a ação dos osteoblastos, diminuído a área necrótica e os processos inflamatórios. Em relação à diminuição na contagem total de glóbulos brancos e vermelhos, acredita-se não haver relação direta com a irradiação, pois a síndrome hematopoiética acomete principalmente indivíduos expostos agudamente à radiação. Neste caso, a diminuição nas contagens das células sanguíneas está diretamente relacionada à osteorradiocrecrose. A leucopenia provavelmente tenha sido causada por infecções virais e bacterianas. Na maioria dos casos a infecção bacteriana causa leucocitose. No entanto, algumas bactérias e o grau do processo infeccioso podem diminuir a contagem de leucócitos (HOFFBRAND, 2013). Já alteração na contagem de glóbulos vermelhos e de outros parâmetros relacionados a estas células tenha ocorrido devido à má nutrição.

Embora, o suco não tenha sido totalmente efetivo contra os efeitos colaterais da irradiação cranial, ele atenuou a gravidade dos efeitos sistêmicos da irradiação cranial. Desta forma, conclui-se que a ingestão de alimentos e bebidas ricas em antioxidantes

naturais mitiga significativamente a extensão dos danos extracraniais em ratos causados pela exposição aos raios-X.

VII - CONCLUSÕES

Com o presente estudo, pode-se concluir que por meio de métodos colorimétricos e cromatográficos que o suco de uva pode ser utilizado como radiomodificador, pois, apresenta uma série de compostos naturais com ação antioxidante. Os ensaios colorimétricos foram usados para quantificar o teor total de polifenólicos, flavonoides e taninos condensados. O teor encontrado para estes grupos de metabólitos secundários foram, respectivamente: $223,14 \pm 0,005$, $180,45 \pm 0,011$, $154,09 \pm 0,017$. Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram isolados e quantificados os seguintes compostos bioativos: ácido gálico, catequina, resveratrol, ácido cafeico, ácido elágico, quercetina e canferol. O composto majoritário no suco de uva orgânico avaliado é o resveratrol com concentração de $31,28 \pm 0,04$ mg/ L. No modelo experimental de síndrome aguda da radiação em ratos Wistar, o suco de uva atenuou a severidade do dano oxidativo cardíaco induzido pela radiação, pois, diminui o nível de malondialdeído no tecido cardíaco e reduziu a atividade sérica da enzima lacatato desidrogenase. No modelo experimental de irradiação cranial fracionada, o suco de uva orgânico atenuou a anorexia em alguns dias do processo de irradiação. Porém, após o 61º de protocolo experimental todos os animais irradiados com dose total absorvida de 32 Gy (RG e RJ) começaram a perder peso em consequência a osteorradiocrecrose. Nas mandíbulas dos ratos irradiados e suplementados com suco de uva observou-se uma menor atividade osteoclástica, maior osteoblástica, bem como aumento das medidas morfométricas. Assim, o suco de uva é um promissor radiomodificador, pois, estes estudos e estudos prévios mostram que seus compostos naturais como os flavonoides mitigam os efeitos deletérios da radiação ionizante no tecido vivo.

VIII - REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. R., et al. Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats. **Nutricion Hospitalaria**. v. 24, p. 297–303, 2009a.

ANDRADE, E. R. et al. Effect of black grape juice intake on liver lipoperoxidation and body weight loss in whole body X-irradiated rats. **Journal of Medical, Chemical, Biological and Radiological Defense**. v.7, p-1-7, 2009.

ANDRADE, E. R. et al. Evaluation of the potencial protective effects of ad libitum black grape juice against liver oxidative damage in whole-body acute X-irradiated rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p. 1026-1032, 2011.

ANDRADE, E. R., BAUERMANN, L. F. **Introdução à Radiobiologia – Conexões Bioquímicas e Biomoleculares**. 1 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010.

BALLESTEROS-ZEBADÚA, P. et al. Radiation-induced neuroinflammation and radiation somnolence syndrome. **CNS & neurological disorders drug targets**. v. 1(7), p. 937-949, 2012.

BARCELOS, G. R. M. et al. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. **Mutation Research**. v.726, p. 109–115, 2011.

BARNETT, G. C. et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nature**, v.9, p.134-142, 2009.

BEDWELL, P. et al. An assessment of the doses received by members of the public in Japan following the nuclear accident at Fukushima Daiichi nuclear power plant. **Journal of Radiological Protection**. v. 35(4), p. 869-890, 2015.

BHAT, K. P. L., KOSMEDER II, J. W., PEZZUTO, J. M. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.3(6), p.1041-1064, 2001.

BIRAL, A. R. **Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Insular, 2002.

BONAN P. R. et al. Dental management of low socioeconomic level patients before radiotherapy of the head and neck with special emphasis on the prevention of osteoradionecrosis. **Brazilian Dental Journal**. v.17(4), p.336-42, 2006.

BOURN D., PRESCOTT J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.42(1), p.1–34, 2002.

BROWN, S. L. et al. Antioxidant diet supplementation starting 24 hours after exposure reduces radiation lethality. *Radiation Research*. v. 173(4), p. 462-468, 2010.

BROWN, W. R. et al. Capillary loss precedes the cognitive impairment induced by fractionated whole-brain irradiation : A potential rat model of vascular dementia. **Journal of the neurological sciences**. v. 257, p. 67–71, 2007.

BUTLER, J. M.; RAPP, S. R.; SHAW, E. G. Managing the cognitive effects of brain tumor radiation therapy. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 7, p. 517–523, 2006.

CAO, G., SOFIC, E., PRYOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 22(5), 749-760, 1997.

CARDOSO, E. M. **A energia nuclear**. 3 ed. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear : 2010.

CASSATT, D. R., et al. Preclinical modeling of improved amifostine (Ethyol) use in radiation therapy. **Seminars in radiation oncology**. v. 12, 97-102,2002.

CASTEDO, E. et al. Ischemia-reperfusion injury during experimental heart transplantation. Evaluation of trimetazidine's cytoprotective effect. **Revista Española de Cardiología**. v.58, p. 941–950, 2005.

CHRISTENSEN, D. M. et al. Management of ionizing radiation injuries and illnesses, part 4: acute radiation syndrome. **The Journal of the American Osteopathic Association**. v. 114(n), p. 702-711, 2014.

CITRIN, D. et al. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. **The Oncologist**. v.15, p. 360-371, 2010.

CRUZ A .D. Monitoring the Genetic Health of Humans Accidentally Exposed to Ionizing Radiation of Cesium-137 in Goiânia (Brasil), 1997.

DANI, C. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in wistar rats. **Journal of Medicinal Food**. v.11(1), 127-132, 2008.

DANI, C. O. L, et al. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. **Journal of Medicinal Food**. v.11(1), p. 127-32, 2008.

DARZY K. H., SHALET S. M. Hypopituitarism following radiotherapy revisited. **Endocrine development**. v.15, p. 1-24, 2009a.

DARZY, K. H. Radiation-induced hypopituitarism after cancer therapy: who, how and when to test. **Nature**. v. 5, p. 88-99, 2009.

- DICKINSON D. A.; FORMAN H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**. v. 64, p. 1019–1026, 2002.
- DUBOIS, A., WALKER, R. I. Prospects for management of gastrointestinal injury associated with the acute radiation syndrome. **Gastroenterology**. v. 95(5), p. 500-507, 1988.
- EL-NAHAS S.M., MATTAR F.E., MOHAMED A.A. Radioprotective effect of vitamins C and E. **Mutation Research**, v. 301, p. 143-147, 1993.
- EMERIT, I. et al, Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. **Radiation Research**. v. 144, p. 198-205, 1995.
- FERNET, M., HALL, J. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. **DNA Repair**. v.3, p.1237-1243, 2004.
- FLECKENSTEIN, K. et al. Using biological markers to predict risk of radiation injury. **Seminars in Radiation Oncology**. v.17, p.89–98, 2007.
- FLOHE, L., GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 114-21, 1984.
- FORBES, A. M. E. et al. Systemic effects of fractionated , whole-brain irradiation in young adult and aging. **Radiation Research**. v. 180, p. 326–333, 2013.
- FREITAS, R. B et al. Black grape juice protects spleen from lipid oxidation induced by gamma radiation in rats. **Journal of Food Biochemistry**. v. 38, p. 119-127; 2014.
- GOANS, R.E. et al. Early dose assessment following severe radiation accidents. **Health Physics**.v. 72 (4), p. 513–518, 1997.
- GOMES, C. C., et al. Radioprotective effect of vitamin E in parotid glands: a morphometric analysis in rats. **Brazilian Dental Journal**. v. 24(3), p. 183-187, 2013.
- GROTTO, D., et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo – Malondialdeído. **Química Nova**, v. 31, p; 275-279, 2008.
- GU, J. et al Effect of Amifostine in Head and Neck Cancer Patients Treated with Radiotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on Randomized Controlled Trials. **PlosOne**. v. 9(5), p. 1-9, 2014.
- GU, J. et al. Effect of Amifostine in Head and Neck Cancer Patients Treated with Radiotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on Randomized Controlled Trials. **Plos One**, v. 5(9), p. 1-9, 2014.
- GUAN, J. Effects of dietary supplements on space radiation-induced induction in total antioxidant status in CBA mice. **Radiation Research**. v.165, p.373-378, 2006.
- GUAN, J. et al. Effects of dietary supplements on space radiation-induced oxidative stress in Sprague-Dawley rats. **Radiation Research**. v.162(5), p. 572-579, 2004.

GUSEV, I. A., GUSKOVA, A. K., METTLER, F. A. **Medical Management of Radiation Accidents**. 2nd edition. New York: CRC Press, 2001.

GUSKOVA, A.K., BARANOV, A.E., GUSEV, I. Acute radiation sickness: underlying principles and assessment. In: GUSEV, A.E., GUSKOVA, A.K., METTLER JR.,F.A. **Medical Management of Radiation Accidents**. p. 33-51, 2nd ed., Washington: CRC Press, 2001.

HALL, E. J., GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

HALLIDAY, D., RESNICK, R., WALKER, J. **Fundamentos de Física: ótica e física moderna**. 9 ed. São Paulo: LTC, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HANNEQUIN, D., THIBERT, A. VASHALDE, Y. Development of a model to study the anti-oedema properties of Gingko biloba extract. **Presse Médicale**. v.15(31), p. 1575-1586, 1986.

HERTOG, M. G., HOLLMAN, P. C. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 50, p. 63-71, 1996.

HOFFBRAND, A.V, MOSS P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. v.31, p. 1170-1179, 2008.

HYMES, S. R., STROM, E. A., FIFE, C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment. **Journal of American Academic of Dermatology**. v. 54, p. 28-46, 2006.

ISAACS, A. **Oxford Dictionary of Physics**. 6th ed. Oxford: Oxford University Press, 2009.

JAGETIA G. C. Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v.40, p. 74-81, 2007.

JAGETIA G.C. et al. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. **Clinica Chimica Acta**. v.332, p. 111-121, 2003.

JANG, S.S. et al. Modulation of radiation-induced alterations in oxidative stress and cytokine expression in lung tissue by Panax ginseng extract. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 201–209, 2015.

KANARI, K. et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural Brain Research**. v. 156(1), p. 45-52, 2005.

- KAPLAN, I. **Física Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.
- KARBOWNIK, M., REITER, R.J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. Proceedings of the Society for **Experimental Biology Medicine**. v. 225, p. 9–22, 2000.
- KAUR, M., AGARWAL, C., AGARWAL, R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. **The Journal of Nutrition**. v. 139, p. 1806S – 1812S, 2009.
- KOUKOURAKIS M. I. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications. **Anticancer Drugs**. v. 13(3), p.181–209, 2002.
- KRINSKY, N. I. **Antioxidant functions of carotenoids**. Free Radical Biology & Medicine, v. 7, p. 617-635,1989.
- LAIRON, D. Nutritional quality and safety of organic food. A review. **Agronomy for sustainable Development**, v. 3, p. 33-41, 2010
- LANGCAKE, P., PRYCE R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a reponse to infection or injury. **Physiological Plant Pathology**. v.9, p.77–86, 1976.
- LAWRENCE, Y. R. et al. Radiation Dose–Volume Effects in the Brain. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**. v. 76, p. S20–S27, 2010.
- LEHNERT, B. E., GOODWIN, E. H. A New Mechanism for DNA Alterations Induced by Alpha Particles Such as Those Emitted by Radon and Radon Progeny. **Environmental Health Perspectives**. v.105(5), p. 1006-1101, 1997.
- LEHNERT, S. **Biomolecular Action of Ionizing Radiation**. 1st ed. New York: Taylor & Francis, 2007
- LESSA, R. M. et al. Analysis of the cytoprotective effect of amifostine on the irradiated inner ear of guinea pigs: an experimental study. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. v. 75(5), p. 694-700, 2009.
- LLÓPIZ, N. et al. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 52(5), p. 1083-1087, 2004.
- MADSEN, T. M., KRISTJANSEN, P. E. G., BOLWIG, T. G. WORTWEIN, G. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. **Neuroscience**. v. 119, p. 635–642, 2003.
- MANSOUR, H.H., TAWFIK, S.S. Early treatment of radiation-induced heart damage in rats by caffeic acid phenethyl ester. **European Journal of Pharmacology**. v. 692, p. 46-51, 2011.

MANZON, L.; ROSSI, E.; FRATTO, G. Management of osteonecrosis of the jaws induced by radiotherapy in oncological patients. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. p. 194–200, 2015.

MAZUR, L. Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray induction of micronuclei in erythroblasts. **Mutation Research**. v.468(1), p. 27-33, 2000.

MEHTA, J., HU, B., CHEN, J., LI, D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. v.23, p. 2203–2208, 2003.

METTLER, F. A., UPTON, A. C. **Medical effects of ionizing radiation**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995.

MILLER, L. G. Antioxidant flavonoids structure, function and clinical usage. **Alternative Medicine Review**, v. 1, p. 103-111, 1996.

MILTERSTEINER, A. et al. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18(3), p. 322-327, 2003.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, V. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**. v.28, p. 892-896, 2005.

MORRISSEY, P. A., SHEEHY, P. J. A., GAYNOR, P. Vitamin E. **American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda**. v.62, p.260-264, 1994.

MOTTA, V. T. **Bioquímica para o laboratório**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009.

NOTANI, K. et al. Management of mandibular osteoradionecrosis corresponding to the severity of osteoradionecrosis and the method of radiotherapy. **Head & Neck**. v. 125, p. 181–186, 2003.

NOUAILHETAS, Y. **Radiações ionizantes e a vida**. 1 ed. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear: 2005.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Research**. v. 386, p. 39-67, 1997.

OLSON J. A. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, p. 7S-11S, 1999.

OSTRAKHOVITCH E, A., AFANAS'EV I, B. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: Suppression by rutin and other antioxidants and chelators. **Biochemical Pharmacology**.v.62, p.743–746, 2001.

OTTERSON, M. F. Effects of radiation upon gastrointestinal motility. **World Journal of Gastroenterology**. n 13(19), 2684-2692, 2007.

- PALLARÈS, V. Grape seed procyanidin extract reduces the endotoxic effects induced by lipopolysaccharide in rats. **Free Radical Biology and Medicine**. 2013.
- PATIL, S. L., MALLAIAH S. H., PATIL, R. K. Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. **Journal of Medical Physics**. v.38, p. 87-92, 2013.
- PLATERO, J. C. et al. Radiobiología Clínica. 1 ed. Madrid: **Sociedad Española de Física Médica**, 2010.
- POPANDA, O. et al. Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.667, p.58-69, 2008.
- PORTH, C. M. **Fisiopatologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- PRASAD, K. N. **Handbook of Radiobiology**. 2nd ed. Florida: CRC Press, 1995.
- PROVIDÊNCIA, R. Proteção cardiovascular por bebidas alcoólicas: bases científicas do paradoxo francês. **Revista Portuguesa de Cardiologia**. v.25 (11), p. 1043-1058, 2006.
- RABER, J. et al. Radiation-Induced Cognitive Impairments are Associated with Changes in Indicators of Hippocampal Neurogenesis. **Radiation Research**. v. 47, p. 39–47, 2004.
- RAO, A. V., RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**. v.55(3), p.207-16, 2007.
- RIBEIRO, J. OS “FILHOS DA BOMBA”: memória e história entre os relatos de sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki e a “Campanha pela Proibição das Bombas Atômicas” no Brasil (1950). **Revista Outros Tempos – Dossiê História e Memória**. v.6, p. 147-197, 2009.
- RICHI, B.; KALE, R. K.; TIKU, A. B. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Radio-modulatory effects of Green Tea Catechin EGCG on pBR322 plasmid DNA and murine splenocytes against gamma-radiation induced damage. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 747, p. 62–70, 2012.
- ROBINSON, I. C. A. F. et al. Differential radiosensitivity of hypothalamo – pituitary function in the young adult rat. **Journal of endocrinology**. v. 169(3) p. 519–526, 2001.
- RODRIGUES, A. D. et al. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylene-tetrazole. **Neurochemistry International**. v. 60, p. 799–805, 2012.
- SAADA, H. N. et al. Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats. **Phytotherapy Research**, v. 23(3), p. 434-438, 2009.

SAADA, H. N., AZAB, K. S.: Role of lycopene in recovery of radiation induced injury to mammalian cellular organelles. **Die Pharmazie**. v.56, p. 239-41, 2001.

SAADA, H. N., REZK, R. G., ELTAHAWY, N. A.: Lycopene protects the structure of the small intestine against gamma-radiation-induced oxidative stress. **Phytotherapy Research**. v.24(2):, 204-208, 2010.

SAIJA, A., et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**. v.19(4), p. 481-487, 1995.

SAJA, J. et al. Protective effect of grape seed extract on gentamicin-induced acute kidney injury. **Iranian Journal of Kidney Diseases**. v. 4(4), 285-291, 2010.

SAMARTH, R. M., GOVA, P. V. KUMAR, A. Modulatory effect of *Mentha piperita* (Linn.) on serum phosphatases activity in Swiss albino mice against gamma irradiation. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 39(5), p. 479-488, 2001.

SAMARTH, R.M. Protection against radiation induced hematopoietic damage in bone marrow of Swiss albino mice by *Mentha piperita* (Linn). **Journal of Radiation Research**. v. 48, p.523–528, 2007.

SATO, M. et al. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v.31, p.1289–1297, 1999.

SAUTER, C.K. et al. Determination of resveratrol in grape juice produced in Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, p. 437-442, 2005.

SCHULTHESIS T., STEPHENS L. Invited review: permanent radiation myelopathy. **The British Journal of Radiology**. v. 65, p. 737-753, 1992.

SCOCCIANI S, RICARDI U. Treatment of brain metastases: review of phase III randomized controlled trials. **Radiotherapy and Oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**. v.102, p.168–179, 2012.

SCOTT M.D.; LUBIN B.H.; ZUO L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**. v. 118, p.7-16, 1991.

SEVCOVA, M., SEVC, J., THOMAS, J. Alpha radiation of the skin and the possibility of late effects. **Health Physics**. v.35, p. 803-806, 1978.

SHAW, E. et al. Single dose radiosurgical treatment of recurrent previously irradiated primary brain tumors and brain metastases: Final report of RTOG protocol 90- 05. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. v. 47, n. 2, p. 291–298, 2000.

SHAW, E. M. D. et al. Single dose radiosurgical treatment of recurrent previously irradiated primary brain tumors and brain metastases: final report of RTOG protocol 90-05. **International journal of radiation oncology, biology and physics**. V. 47, p. 291-298, 2000.

SILVA, E. C. S. S., CARNEIRO, P. F. P., CAVALCANTI. Radioterapia versus radiosensibilidade individual. **Cadernos de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde**. v.1(3), p. 111-117, 2014.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianopolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000.

SOARES, F. A. A. et al. Purple grape juice as a protector against acute x-irradiation induced alterations on mobility, anxiety, and feeding behaviour in mice. **Nutrición Hospitalaria**. V. 29(4), p. 812-821.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15(1), p. 71-81, 2002.

SONGTHAVEESIN, C. et al. Radio-protective effect of vitamin E on spermatogenesis in mice exposed to g-irradiation: a flow cytometric study. **Asian Journal of Andrology**. v. 6(4), p. 331-336, 2004.

SPETCH, L. Oral complications in the head and neck irradiated patient. Introduction and scope of the problem. **Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**. v.10, 36-39, 2002.

SRINIVASAN, M. et al: Lycopene as a natural protector against γ - radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1770, p.659-665, 2007.

STEWART, C. B. **Radiologic Science for Technologists: Physics, Biology, and Protection**. 10th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012.

SWERDLOW, A.J. et al. Myocardial infarction mortality risk after treatment for Hodgkin disease: a collaborative British cohort study. **Journal of Natural Cancer Institute**. v. 99, p. 206–214, 2007.

TENG, M. S., FUTRAN, N. D. Osteoradionecrosis of the mandible. **Current Opinion Otolaryngology Head & Neck Surgery**. v. 13(4), p.217-21, 2005.

TENG, M.S.; FUTRAN, N. D. Osteoradionecrosis of the mandible. **Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery**. v. 13(4), p. 217-21, 2005.

TOFILON, P. FIKE, J. The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. **Radiation Research**. v. 153, p. 357-370, 2000.

TWARDELLA, D.; CLAUDE, J. C. Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view – overview of methods and results. **Radiotherapy and Oncology**. V. 62, p. 249-260, 2002.

VARTANIAN, L. S. et al. Age-related peculiarities of effect of low dose ionizing radiation on blood antioxidant enzyme system status in Chernobyl's accident liquidation participant. **Advances in Gerontology**. v.14, p.48-54, 2004.

WALKER, R. I., PORVAZNIK, M. Association of leukopenia and intestinal permeability with radiation-induced sensitivity to endotoxin. **Life Sciences**. v.23, p. 2315-2322, 1978.

YAMAGUCHI, M. et al. Bioactive flavonoid p-hydroxycinnamic acid stimulates osteoblastogenesis and suppresses adipogenesis in bone marrow culture. **Cell and Tissue Research**, v. 354, n. 3, p. 743–750, 2013.

YIRMIBESOGLU, E. The protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb-761) on radiation-induced dermatitis: an experimental study. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 37, p. 387-394, 2011.

YONEZAWA, M., KATON, N., TAKEDA, A. Restoration of radiation injury by ginseng. IV. Stimulation of recoveries in CFUs and megakaryocyte counts related to the prevention of occult blood appearance in X-irradiated mice. **Journal of Radiation Research**. v.26, p. 436-442, 1985.

YUSUF, S. W.; SAMI, S.; DAHER, I. N. Radiation-induced heart disease: a clinical update. **Cardiology research and practice**. v.2011, p. 317659, 2011.

ZHANG, J. S. et al. Modification of radiation response in mice by fractionated extracts of Panax ginseng. **Radiation Research**. v.112, p. 156-163, 1987.

ZIMMERMANN, K. C. et al. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology Therapy**. v. 92, p.57-70, 2001.