

ACCIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE EL GLUTATIÓN INTRACELULAR EN CÉLULAS IRRADIADAS TUMORALES

Ana María Mercado, Amparo Olivares, Jose Antonio García Gamuz y Miguel Alcaraz
Departamento de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia
anamaria.mercado@um.es, amparo.o.r@um.es, gamuz@um.es, mab@um.es.

RESUMEN

La acción del ácido rosmarínico (AR) sobre la producción de glutatión (GSH) intracelular podría explicar el efecto radiosensibilizante sobre determinadas líneas celulares tumorales. Se ha estudiado su efecto sobre células epiteliales de próstata humana (PNT2) y células de melanoma B16F10. En las células PNT2, la administración de AR aumenta el contenido de GSH total durante las 3 primeras horas ($p < 0.01$) así como la ratio GSH/glutatión oxidado (GSSG) ($p < 0.001$), expresando su capacidad radioprotectora. Sin embargo, en las células B16F10, el AR no tuvo efecto en el GSH intracelular, disminuyendo la proporción GSH/GSSG ($p < 0.01$) y siendo significativo, este descenso, en las células irradiadas ($p < 0.001$). La administración de este tipo de sustancias durante la radioterapia podría proteger a las células sanas para las cuales, el AR es un potente radioprotector, y a la misma vez, causar un daño significativo a las células de melanoma para las cuales podría actuar como un agente radiosensibilizante.

INTRODUCCIÓN

El ácido rosmarínico (AR) es un éster común derivado del ácido cafeico y del ácido láctico presente en muchas especies de plantas. El AR muestra numerosas actividades biológicas de interés médico, incluyendo propiedades antivirales, antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes (1-3).

Se ha demostrado que el AR tiene importantes capacidades genoprotectoras y radioprotectoras en diferentes líneas celulares normales y tumorales contra el daño inducido por radiación ionizante (rayos X y gamma) y por la radiación ultravioleta (4-10). Sin embargo, también se ha demostrado que, paradójicamente, aumenta el daño celular radioinducido en células de melanoma metastásico B16F10, y por tanto, actúa como un agente radiosensibilizante (11).

La radiorresistencia celular en numerosas líneas celulares tumorales sanas y tumorales está mediada por un aumento en la síntesis de glutatión (GSH) que conduce a la eliminación

de ERO producidas tanto por la exposición a radiación ionizante como por la quimioterapia (12, 13). El GSH intracelular es el principal componente tiol que actúa para combatir el estrés oxidativo en tejidos normales. En tejidos cancerígenos, diversos estudios sugieren que un aumento en los niveles de GSH está implicado en la resistencia que ofrecen las células a la radioterapia y quimioterapia, mientras que el agotamiento de los niveles de GSH endógeno se cree que aumenta la eficacia de tratamientos con radiación ionizante o agentes quimioterápicos (14-19). Sin embargo, numerosos estudios sugieren que el aumento o la reducción de los niveles de GSH intracelular ya sea activando o bloqueando sus mecanismos sintéticos tanto en células normales como tumorales, hace que estas modalidades de tratamiento sean inefectivas en pacientes con cáncer (20).

En este estudio, analizamos el efecto radioprotector del AR sobre los niveles de GSH intracelular en células tradicionalmente consideradas radiosensibles (células epiteliales de próstata humana) y el efecto producido por el AR en la disponibilidad de GSH en otras células consideradas radiorresistentes (células de melanoma B16F10) que podría justificar este efecto paradójico radiosensible. La administración simultánea de este tipo de sustancias junto con la radiación podría proteger las células sanas, a la vez que permite un daño significativo a las células de melanoma. Estos hallazgos sugieren a posibilidad de incorporar esta estrategia de tratamiento, hasta ahora imposible, en los pacientes sometidos a radioterapia.

CONTENIDO

COMPUESTOS FENÓLICOS

El ácido rosmarínico se obtuvo de la casa comercial Extrasynthese (Genay, Francia).

LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se seleccionaron dos líneas celulares diferentes según su grado de radiosensibilidad: células tradicionalmente consideradas radiosensibles (células epiteliales de próstata humana (PNT-2)); y células B16F10 estudiadas como radiorresistentes. La línea celular de epitelio prostático (PNT2) fue obtenida de La Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC, Salisbury, R.U.). Estas células fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 2mM de glutamina, estreptomicina y penicilina (100µg/ml y 100 UI/ml, respectivamente). La línea celular de melanoma metastásico de ratón (B16F10) fue amablemente proporcionada por el Dr. V. Hearnig (NIH, Bethesda, MA, EE.UU.) y cultivada con medio Eagle modificado de

Dulbecco (DMEM)/F12K (1:1), (Sigma-Aldrich St. Louis; EE.UU.) suplementado con 10% de SBF, 4mM de glutamina, penicilina (100 UI/ml) y estreptomocina (100µg/ml). Ambos cultivos se mantuvieron a 37°C, con una humedad relativa de 90 – 95% y una atmósfera de CO₂ de 5% (PNT-2) y 7,5% (B16F10) en una incubadora Cytoperm. A lo largo del estudio, se realizaron pruebas para confirmar la ausencia de la especie bacteriana Mycoplasma.

Para analizar el efecto del ácido rosmarínico sobre los niveles de glutatión en las líneas celulares PNT-2 y B16F10, los experimentos se realizaron como se describió anteriormente (11). Los cultivos se incubaron durante 24h para permitir la adhesión de las células en ambos tipos de ensayos para conseguir que las células se adaptaran a las condiciones de cultivo y poder adherirse al plástico del frasco de cultivo. Se estableció una densidad celular óptima de 3.200 células/pocillo para las células PNT2 y 2.500 células/pocillo para las B16F10.

Después de 48 horas de incubación, se renovó el medio de cultivo con 200 µL de medio nuevo y se disolvieron 25 µL de ácido rosmarínico en tampón fosfato salino (PBS) a una concentración de 30 µM en el medio de cultivo fresco. Inmediatamente después, las células fueron expuestas a 20 Gy de radiación con rayos X, seguida de la determinación de la concentración de GSH y de la viabilidad celular después de 1 hora según el periodo estudiado (cultivos control irradiados y cultivos tratados con AR e irradiados).

IRRADIACIÓN

Se utilizó la unidad emisora de radiación X Andrex SMART 200E (Yxlon International, Hamburgo, Alemania), con las siguientes características de exposiciones radiológicas: 200 kV, 4.5 mA, tasa de dosis de 1.3 cGy/s a una DFO: 35 cm y dosis total de 20 Gy para el análisis de GSH. La dosis de radiación fue continuamente controlada dentro de la cabina de rayos X mediante un dosímetro universal UNIDOS® con cámara de ionización Farme® TW30010 (PTW-Freiburg, Freiburg, Alemania) y la dosis de radiación final se confirmó usando dosímetros de termoluminiscencia (TLDs) (GR-200; Conqueror Electronics Technology Co Ltd., Shenzhen, China).

ENSAYO GSH/GSSG

Se utilizó el ensayo GSH/glutatión oxidado (GSSG) – Glo™ (Promega, Madison, MI, EE. UU.) para determinar y cuantificar los niveles de GSH en las células PNT2 y B16F10. Estos ensayos se basan en sistema de luminiscencia para detectar y cuantificar las proporciones de glutatión total (GSH + GSSG), GSSG y GSH/GSSG en cultivos celulares. El ensayo proporciona un formato simple de placa multipocillo donde se muestran señales luminiscentes estables que se correlacionan con la concentración de GSH o GSSG de una muestra. La luz de la luciferasa depende de la cantidad de luciferina formada que, a su vez,

depende de la cantidad de GSH presente. Por lo tanto, la señal luminiscente es proporcional a la cantidad de GSH. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se añadió 200 μL de medio de cultivo suplementado con células. Las células que pertenecían a los grupos experimentales fueron tratadas con soluciones de ácido Rosmarínico (25 μL). La densidad celular se determinó y se corrigió mediante el análisis de Bradford (21). El método se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. La luz emitida en la presencia de GSH se cuantificó en unidades relativas de luz (RLU). La intensidad de la luz emitida estaba directamente relacionada con el contenido de GSH en la muestra analizada. Las células fueron tripsinizadas y la intensidad de su fluorescencia fue analizado utilizando FLUOstar® Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Todos los experimentos se repitieron ocho veces.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza complementado con contraste de medias para determinar el grado de dependencia y correlación entre las variables y también se complementó con un análisis de regresión y correlación lineal entre las variables cuantitativas. Valores de p significativos inferiores a 0.01 ($p < 0.01$) fueron considerados significativos.

RESULTADOS

ENSAYO DE GSH

La curva estándar para el ensayo de GSH total muestra una buena correlación lineal hasta una concentración de 8 μM , con cierto grado de saturación a concentraciones elevadas. Debido a que los resultados obtenidos no superan los 500.000 RLU, se encuentran dentro del área lineal de la curva dosis – respuesta, presentando una pendiente y reproductibilidad adecuada para este estudio (Figura 1).

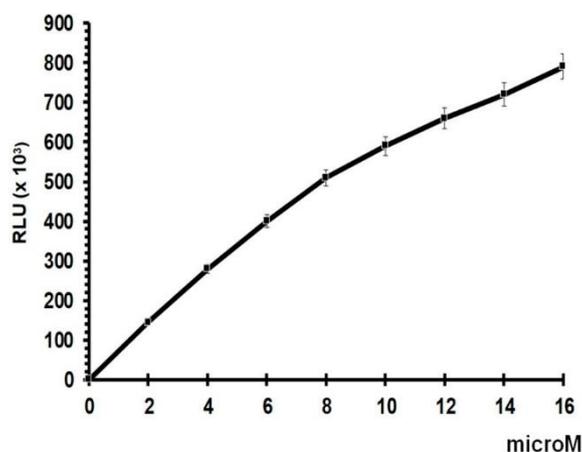


Figura 1. Curva estándar del ensayo GSH

En los cultivos control se observaron diferencias estadísticamente significativas a concentraciones de GSH total determinados en las dos líneas celulares estudiadas ($p < 0.001$); se estableció, durante los dos periodos estudiados posteriores a la irradiación (1h y 3h), una mayor cantidad de GSH total en las células de melanoma B16F10: el doble de la concentración de GSH total determinado en las células PNT2 (Figura 2a).

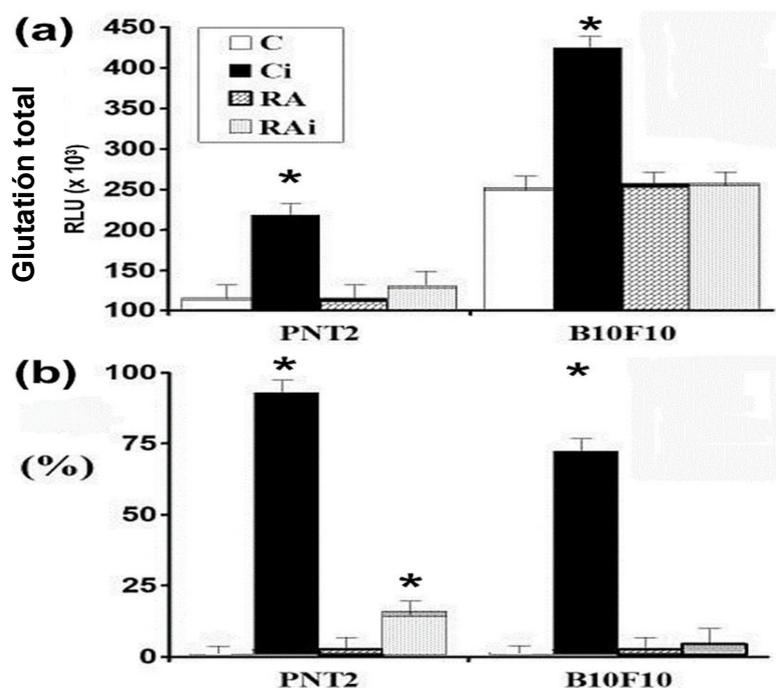


Figura 2. Concentración de glutatión total en células epiteliales de próstata humana y de melanoma B16F10 determinar después de 1h de exposición a 20 Gy de radiación X: (a) cantidad de glutatión total (GSH); (b) porcentaje de aumento con respecto a los cultivos control (C: grupos controles sin irradiar, Ci: grupos controles irradiados, AR: grupos tratados con AR disuelto en PBS, RAi: grupos irradiados y tratados con AR disuelto en PBS, * $p < 0.001$). Los datos son la media \pm la desviación estandar de ocho experimentos independientes).

La exposición a 20 Gy de radiación X (Ci) produjo un aumento significativo de GSH total en los dos periodos de tiempo estudiados y en las dos líneas celulares ($p < 0.001$), lo que se podría interpretar como un mecanismo de defensa celular inmediata contra el daño citotóxico inducido por rayos X (Figura 2a). En términos de porcentaje, el aumento en la concentración de glutatión total fue mayor en las células PNT2 (90%) que en las células de melanoma B16F10 (60%) cuando se compara con los controles respectivos no irradiados ($p < 0.001$) (Figura 2b).

En las células irradiadas, la relación GSH/GSSG aumenta significativamente comparado con la de las células controles no irradiadas ($p < 0.001$) durante los dos periodos posteriores a la irradiación estudiados en ambas líneas celulares, mostrando una tendencia de curva similar ($p < 0.001$) (Figura 3a).

La administración de AR disuelto en PBS en los cultivos celulares no irradiados producen distintos efectos en la proporción GSH/GSSG según la línea celular estudiada (Figura 3b). En las células PNT2, la administración de AR produjo un aumento en la ratio GSH/GSSG durante todos los periodos estudiados (1h y 3h), aunque sólo se obtuvo diferencia estadísticamente significativa después de 3h de su administración ($p < 0.001$). Por el contrario, en las células B16F10, la administración de AR produjo una disminución significativa en la proporción GSH/GSSG después de 1h de su administración ($p < 0.001$), alcanzando valores similares a la ratio determinada en las células controles no irradiadas a las 3h (Figura 3b).

La exposición de las células a 20 Gy de rayos X previamente tratadas con AR disuelto en PBS también muestra una respuesta diferente en cada tipo celular. La Figura 3c muestra la proporción de GSH/GSSG en las células irradiadas tratadas con AR. En las células PNT2, esta ratio GSH/GSSG aumenta significativamente después de la exposición a rayos X ($p < 0.001$), expresando un aumento en la cantidad de glutatión reducido disponible en las células para reducir el daño citotóxico inducido por los rayos X como consecuencia de la presencia de AR administrado antes de la exposición a rayos X. En las células de melanoma B10F16, se obtuvieron niveles significativamente más bajos en términos de proporción GSH/GSSG al relacionar con las células de melanoma tratadas con AR no irradiadas ($p < 0.01$) (Figura 3c). De manera inesperada, las proporciones GSH/GSSG en las células irradiadas tratadas con AR se mantuvieron en el mismo nivel que las células controles B16F10 no irradiadas (Figura 3a). Esto demuestra que el aumento de ratio GSH/GSSG en las células de melanoma tratadas con AR irradiadas no representan un aumento real con respecto a las ratios observados en las células controles (sin tratar y controles sin irradiar).

En la Figura 3d, la administración de AR produjo un aumento significativo sobre la proporción GSH/GSSG ($p < 0.001$) en las células PNT2 que fueron irradiadas; lo que demuestra cierto grado de sinergia del AR con el aumento de la ratio GSH/GSSG. Esto puede ser considerado como una mayor capacidad para eliminar radicales libres inducidos por rayos X. Por el contrario, cuando las células B16F10 fueron expuestas a rayos X, se produjo un aumento significativo de la ratio GSH/GSSG. Sin embargo, tras la administración de AR sucedió una disminución estadísticamente significativa en dicha ratio ($p < 0.001$). Esta observación expresa una disminución en la capacidad protectora de las células previamente tratadas con AR y podría interpretarse como un aumento del estrés oxidativo y, por tanto, explicaría el mayor daño celular radioinducido en estas células.

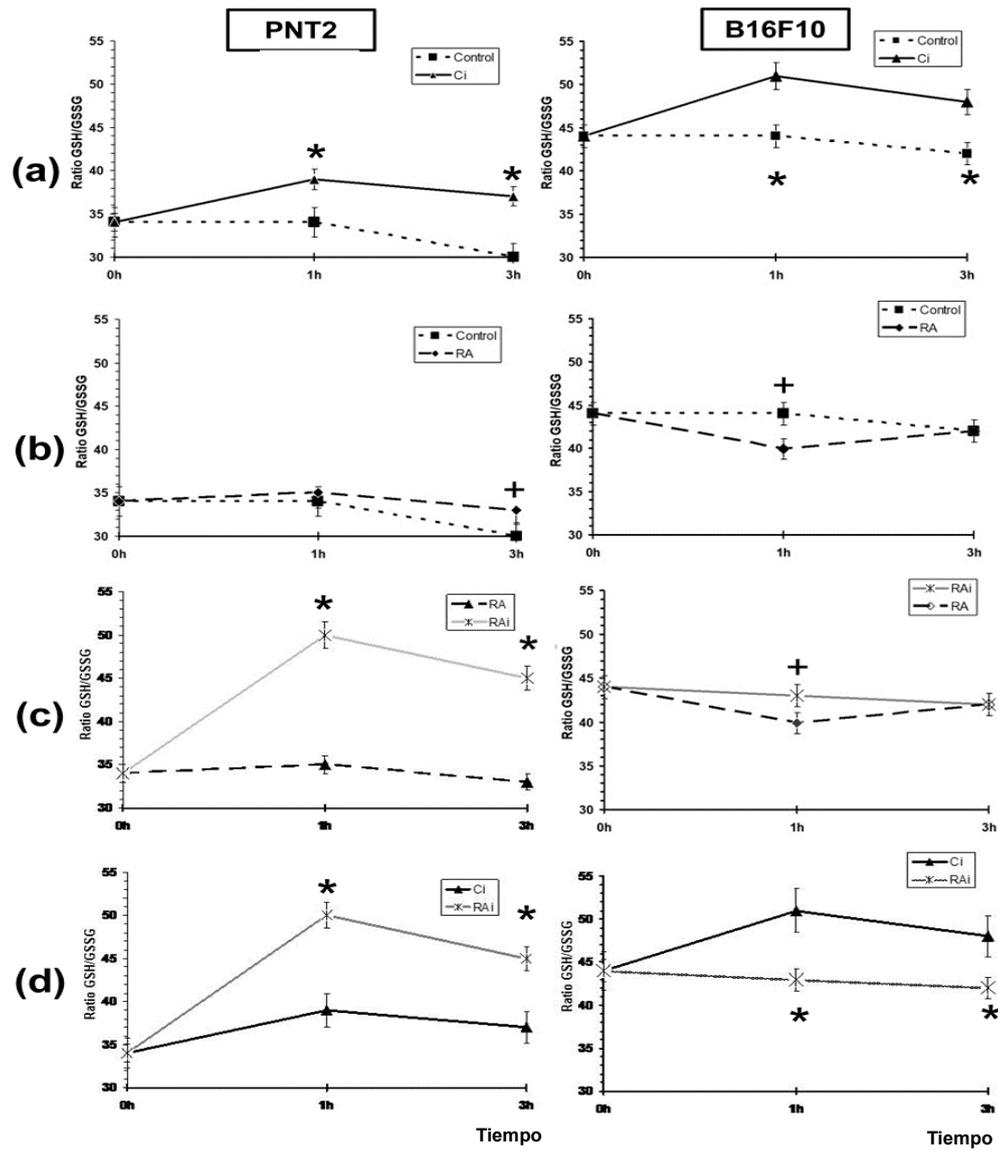


Figura 3. Proporción de glutatión GSH/oxidado (GSSG) en células PNT2 y B16F10 establecida después de 1h y 3h de la exposición a 20 Gy de rayos X: (a) ratio GSH/GSSG en células controles sin irradiar e irradiadas; (b) proporción GSH/GSSG en células controles sin irradiar y células tratadas con AR; (c) ratio GSH/GSSG en células tratadas con AR y células irradiadas tratadas con AR; (d) proporción GSH/GSSG en células controles irradiadas y células irradiadas tratadas con AR (C: grupos controles sin irradiar, Ci: grupos controles irradiados, AR: grupos tratados con AR disuelto en PBS, RAi: grupos irradiados y tratados con AR disuelto en PBS, * $p < 0.001$, + $p < 0.001$). Los datos son la media \pm la desviación estándar de ocho experimentos independientes).

Este hecho podría ser explicado por la capacidad del AR de eliminar los radicales libres producidos por la radiación y, a la misma vez, proteger la oxidación del glutatión celular endógeno, lo que conduciría a un aumento en la proporción GSH/GSSG (Figura 4).

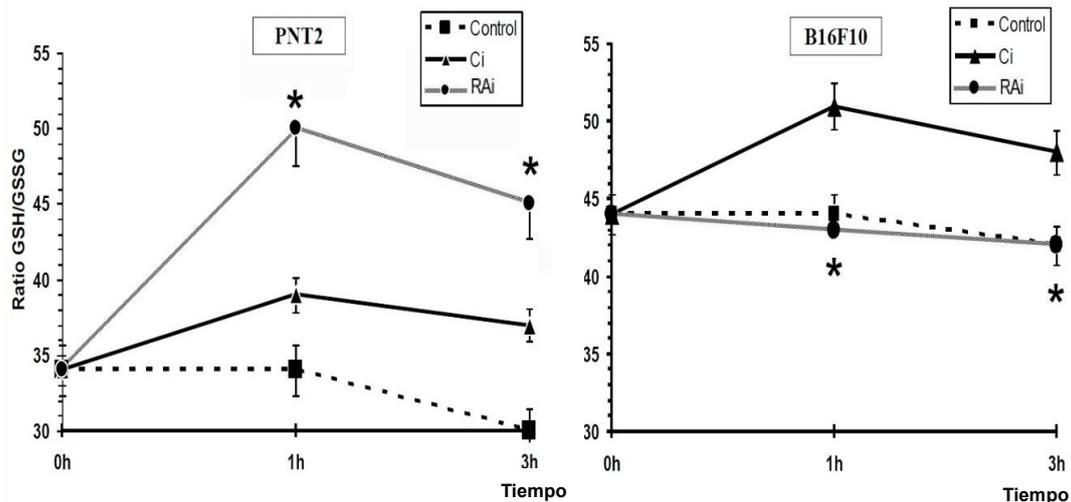


Figura 4. Proporción GSH/GSSG en células PNT2 y B16F10 establecida después de 1h y 3h de la exposición a 20 Gy de rayos X (C: grupos controles sin irradiar, Ci: grupos controles irradiados, RAi: grupos irradiados y tratados con AR disuelto en PBS, * $p < 0.001$). Los datos son la media \pm la desviación estándar de ocho experimentos independientes).

Nuestros resultados, en ambas líneas celulares, son diferentes a otros que también analizaron cómo afecta la radiación ionizante sobre la disponibilidad del GSH intracelular (11, 22) ya que durante las primeras tres horas después de la exposición a la radiación ionizante, observamos un aumento significativo en el GSH total y en la proporción GSH/GSSG muestran un patrón similar, que puede ser interpretado como una respuesta celular al daño inducido por la radiación ionizante.

No se disponen de referencias que describan esta respuesta inicial en las líneas celulares estudiadas. No obstante, algunos autores han descrito, usando dosis más bajas de radiación ionizante, un aumento del GSH total y de la ratio GSH/GSSG en la sangre y en diferentes órganos de ratas en las primeras horas después de la exposición a la radiación. Este resultado ha sido interpretado como una respuesta reactiva intracelular para eliminar radicales libres y considerado como una respuesta celular adaptativa a la exposición a la radiación ionizante en los organismos (23, 24).

Las capacidades radioprotectoras y genoprotectoras de AR sobre las células PNT2 a las concentraciones estudiadas están bien descritas en diferentes tipos celulares *in vitro* o *in vivo* (4-10) e incluso frente al daño inducido por la radiación ultravioleta (6, 25).

Sin embargo, tampoco encontramos referencias en el efecto del AR sobre el GSH intracelular en células PNT2. Sin embargo, en este estudio, después de la exposición a los rayos X, hubo un aumento en la concentración de GSH total junto con la ratio GSH/GSSG que podría ser interpretado como un efecto de eliminación de los radicales libres radioinducidos que podría proteger la oxidación de GSH endógenos y podrían mostrar un efecto aditivo o sinérgico del AR con el GSH intracelular frente al estrés oxidativo inducido

por la radiación ionizante. Estos aumentos del GSH reducido endógeno podría explicar los efectos radioprotectores del AR (4 - 10) de acuerdo con los efectos descritos con otros agentes citoprotectores (4 - 18). Una situación que ha sido también descrita en el uso de otros agentes físicos y químicos diferentes (26, 27).

En las células de melanoma B16F10, la administración de AR a las concentraciones estudiadas se muestra como un agente radiosensibilizante debido al aumento significativo en la muerte celular, hecho que ha sido descrito sólo en las células de melanoma (11) aunque esto también es producido por otros agentes como el carnosol (28).

En nuestro estudio, la administración de AR en las células B16F10 disminuyó la ratio GSH/GSSG con concentraciones normales de GSH total, lo que muestra un aumento significativo en el glutatión oxidado producido por la administración de AR. Además, después de la exposición a los rayos X, el AR no aumenta la relación GSH/GSSG esperado en las células B16F10 irradiado, manteniéndolo niveles significativamente más bajos que el de las células control. Sin embargo, no hemos encontrado referencias previas sobre el efecto que el AR produce en el GSH intracelular en las células de melanoma.

Previamente, atribuimos este efecto radiosensibilizante paradójico del AR, que se observó sólo en células de melanoma, a la melanogénesis, ya que se trata de una actividad específica de este tipo de línea celular que lo diferencia de otras líneas celulares en las que el AR actúa como un potente agente radioprotector (11, 28). De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito, anteriormente, que el AR estimula la melanogénesis mediante el aumento del contenido de melanina y la expresión y la activación de la tirosinasa en las células B16 de melanoma de ratón después de 48h de estimulación (6, 29), probablemente, a través de la activación de la proteína quinasa A (30 - 32). Igualmente, se ha descrito el ácido cafeico (del cual el AR es un dímero) y es considerado como una estructura análoga al AR (33) que activa la melanogénesis y conduce al agotamiento intracelular de GSH con aumento de los niveles de ERO en las células de melanoma B16F10. Estos resultados muestran que la activación de la melanogénesis y la producción de melanina se lleva a cabo a través de la vía de formación de feomelanina.

La activación de la síntesis de feomelanina puede conducir al agotamiento o eliminación de las reservas de GSH intracelular que ya no estarían completamente disponibles para eliminar los radicales libres inducidos por la radiación (34 - 36).

En definitiva, el efecto paradójico radiosensibilizante del AR sobre las células de melanoma B16F10 que se ha observado podría deberse a la suma de diferentes factores. La activación de la melanogénesis a través de la vía de la feomelanina causaría una disminución

en los niveles intracelulares de GSH, impidiendo eliminar las ERO inducidas por la radiación. La síntesis de feomelanina se acompaña de un aumento de niveles de malondialdehído y una disminución en la producción de peroxidación lipídica que se suman a los ROS inducidos por la radiación. Además, parte del AR que se utiliza en la activación de la feomelanina no podría estar disponible como un antioxidante en el medio citoplasmático acuoso para eliminar los radicales libres radioinducidos. Finalmente, la feomelanina que interactúa con la radiación ionizante puede generar ERO que se sumarían a los radicales libres inducidos por la radiación.

Diversas informaciones clínicas y experimentales podrían apoyar estos mecanismos de radiosensibilización demostrados mediante la administración de AR en células de melanoma. El melanoma ha sido considerado un cáncer radorresistente, aunque los múltiples mecanismos subyacentes no están suficientemente aclarados (18). En el melanoma y en otras líneas celulares tumorales, la radorresistencia está mediada por la mayor presencia o capacidad de síntesis de GSH que conduce a la eliminación de ROS producidos por la irradiación. Por otra parte, otros resultados clínicos y experimentales indican que la inhibición de la melanogénesis podría ser usado para la radiosensibilización de las células de melanoma y mejorar la eficacia de la radioterapia en el tratamiento de melanomas (37). Dicho de otro modo, más estudios son necesarios para confirmar nuestros resultados y analizar mejor el efecto antioxidante y sus interacciones con los ROS radioinducidos.

CONCLUSIONES

La modulación selectiva de la síntesis de GSH podría ser un método eficaz para lograr una mayor sensibilidad a la radiación en células tumorales y/o la radioprotección de células sanas frente a agente tóxicos inductores de radicales libres. Un aumento de los niveles de GSH por células normales, podría aumentar su radorresistencia con el consiguiente efecto radioprotector. Por el contrario, una disminución de la disponibilidad de GSH o en la capacidad de síntesis por parte de la célula, podría aumentar los efectos nocivos de la radiación ionizante o de algunas sustancias quimioterapéuticas. Estos hallazgos y la necesidad de una mayor cantidad de estudios que ayuden a esclarecer el mecanismo de protección del ácido rosmarínico sobre células sanas mientras lesiona, exclusivamente, células neoplásicas, hacen que pueda plantearse la administración simultánea de este tipo de sustancias junto con la radiación ionizante. De manera que, se podría proporcionar protección a las células sanas, mientras que se permitiría un daño significativo a las células de melanoma, y así incorporar esta estrategia de tratamiento hasta ahora imposible para los pacientes sometidos a radioterapia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Solomon, K.S.A.; Sandjo, L.P.; Kratz, J.M.; Biavatti, M.W. Rosmarinic Acid—Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Med.* 2016, 82, 388–406.
2. Nunes, S.; Madureira, A.R.; Campos, D.; Sarmiento, B.; Gomes, A.M.; Pintado, M.; Reis, F. Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid-Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. *Rev. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, 57, 1799–1806.
3. Swamy, M.K.; Sinniah, U.R.; Ghasemzadeh, A. Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Rev. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102, 7775–7793.
4. Del Baño, M.J.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Lorente, J.; Martín-Gil, R.; Acevedo, C.; Alcaraz, M. Radioprotective - Antimutagenic Effects of Rosemary Phenolics against Chromosomal Damage Induced in Human Lymphocytes by γ -rays. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 2064–2068.
5. Alcaraz, M.; Acevedo, C.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Armero, D.; Vicente, V.; Canteras, M. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br. J. Radiol.* 2009, 82, 605–609.
6. Sánchez-Campillo, M.; Gabaldon, J.A.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Del Baño, M.J.; Alcaraz, M.; Vicente, V.; Alvarez, N.; Lozano, J.A. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 386–392.
7. Alcaraz, M.; Armero, D.; Martínez-Beneyto, Y.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Fernandez, H.; Alcaraz-Saura, M.; Canteras, M. Chemical genoprotection: Reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2011, 40, 310–314.
8. Alcaraz, M.; Olivares, O.; Achel, D.G.; Alcaraz-Saura, M. Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines. *Anticancer Res.* 2013, 33, 3217–3224.
9. Flanagan, J.; Meyer, M.; Pasamar, M.A.; Ibarra, A.; Roller, M.; Alvarez, N.; Leiva, S.; Gomez-García, F.; Alcaraz, M.; Martínez-Carrasco, A.; et al. Safety evaluation and nutritional composition of a *Fraxinus excelsior* seed extract, FraxiPure.. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 53, 10–17.
10. Achel, D.G.; Alcaraz-Saura, M.; Castillo, J.; Olivares, A.; Alcaraz, M. Radioprotective and Antimutagenic Effects of *Pycnanthus angolensis* Warb Seed Extract against Damage Induced by X rays. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 6.

11. Alcaraz, M.; Alcaraz-Saura, M.; Achel, D.G.; Olivares, A.; López-Morata, J.A.; Castillo, J. Radiosensitizing effect of rosmarinic acid in metastatic melanoma B16F10 cells. *Anticancer Res.* 2014, 34, 1913–1921.
12. Pak, B.J.; Lee, J.; Thai, B.L.; Fuchs, S.Y.; Shaked, Y.; Ronai, Z.; Kerbel, R.S.; Ben-David, Y. Radiation resistance of human melanoma analysed by retroviral insertional mutagenesis reveals a possible role for dopachrome tautomerase. *Oncogene* 2004, 23, 30–38.
13. Hall, E.J. *Radiobiology for the Radiologist*, 2nd ed.; Harper & Row: Philadelphia, PA, USA, 1978; pp. 93–110.
14. Palomares, T.; Alonso-Varona, A.; Alvarez, A.; Castro, B.; Calle, Y.; Bilbao, P. Interleukin-2 increases intracellular glutathione levels and reverses the growth inhibiting effects of cyclophosphamide on B16 melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 1997, 15, 329–337.
15. Clark, E.P.; Epp, E.R.; Biaglow, J.E.; Morse-Gaudio, M.; Zachgo, E. Glutathione depletion, radiosensitization, and misonidazole potentiation in hypoxic Chinese hamster ovary cells by buthionine sulfoximine. *Radiat. Res.* 1984, 98, 370–380.
16. Tagde, A.; Singh, H.; Kang, M.H.; Reynolds, C.P. The glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine synergistically enhanced melphalan activity against preclinical models of multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2014, e229.
17. Rodman, S.N.; Spence, J.M.; Ronnfeldt, T.J.; Zhu, Y.; Solst, S.R.; O'Neill, R.A.; Allen, B.G.; Guan, X.; Spitz, D.R.; Fath, M.A. Enhancement of Radiation Response in Breast Cancer Stem Cells by Inhibition of Thioredoxin and Glutathione-Dependent Metabolism. *Radiat. Res.* 2016, 186, 385–395.
18. Nagane, M.; Kanai, E.; Shibata, Y.; Shimizu, T.; Yoshioka, C.; Maruo, T.; Yamashita, T. Sulfasalazine, an inhibitor of the cystineglutamate antiporter, reduces DNA damage repair and enhances radiosensitivity in murine B16F10 melanoma. *PLoS ONE* 2018, 12, e0195151.
19. Gaucher, C.; Boudier, A.; Bonetti, J.; Clarot, I.; Leroy, P.; Parent, M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants* 2018, 7, 62.
20. Wu, J.H.; Batist, G. Glutathione and glutathione analogues; therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1830, 3350–3353.
21. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.

22. Navarro, J.; Obrador, E.; Pellicer, J.A.; Aseni, M.; Viña, J.; Estrela, J.M. Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 22, 1203–1209.
23. Bravard, A.; Luccioni, C.; Moustacchi, E.; Rigaud, O. Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999, 75, 639–64524.
24. Sharma, S.; Singla, N.; Chadha, V.D.; Dhawan, D.K. A concept of radiation hormesis: Stimulation of antioxidant machinery in rats by low dose ionizing radiation. *Hell. J. Nucl. Med.* 2019, 22, 43–48.
25. Pérez-Sánchez, A.; Barrajión-Catalán, E.; Caturla, N.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Alcaraz, M.; Micol, V. Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J. Photochem. Photobiol. B* 2014, 136, 12–18.
26. Mitchell, J.B.; Russo, A. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br. J. Cancer Suppl.* 1987, 8, 96–104.
27. Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.* 2005, 579, 200–213.
28. Alcaraz, M.; Achel, D.G.; Olivares, A.; Olmos, E.; Alcaraz-Saura, M.; Castillo, J. Carnosol, radiation and melanoma: A translational possibility. *Clin. Transl. Oncol.* 2013, 15, 712–719.
29. Ohguchi, K.; Akao, Y.; Nozawa, Y. Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006, 70, 1499–1501.
30. Lee, J.; Kim, Y.S.; Park, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochem. Pharmacol.* 2007, 74, 960–968.
31. Panich, U.; Onkoksoong, T.; Limsaengurai, S.; Akarasereenont, P.; Wongkajornsilp, A. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid. *J. Photochem. Photobiol. B* 2012, 108, 16–22.
32. Kudugunti, S.K.; Vad, N.M.; Ekogbo, E.; Moridani, M.Y. Efficacy of caffeoyl phenethyl ester (CAPE) in skin B16-F10 melanoma tumor-bearing C57BL/6 mice. *Invest. New Drugs* 2011, 29, 52–62.
33. Psotova, J.; Svobodova, A.; Kolarova, H.; Walterova, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B* 2006, 84, 167–174.

34. Ye, T.; Hong, L.; Garguilo, J.; Pawlak, A.; Edwards, G.S.; Nemanich, R.J.; Sarna, T.; Simon, J.D. Photoionization thresholds of melanins obtained from free electron laser-photoelectron emission microscopy, femtosecond transient absorption spectroscopy and electron paramagnetic resonance measurements of oxygen photoconsumption. *Photochem. Photobiol.* 2006, 82, 733–737.
35. Samokhvalov, A. Heterogeneous photocatalytic reactions of sulfur aromatic compounds. *Chem. Phys. Chem.* 2011, 12, 2870–2885.
36. Morgan, A.M.; Lo, J.; Fisher, D.E. How does pheomelanin synthesis contribute to melanomagenesis? Two distinct mechanisms could explain the carcinogenicity of pheomelanin synthesis. *Bioessays* 2013, 35, 672–676.
37. Śniegocka, M.; Podgórska, E.; Płonka, P.M.; Elas, M.; Dixon, B.R.; Szczygieł, M.; Zimijewski, M.A.; Cichorek, M.; Markiewicz, A.; Brożyna, A.A.; et al. Transplantable Melanomas in Hamsters and Gerbils as Models for Human Melanoma. Sensitization in Melanoma Radiotherapy—From Animal Models to Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1048.