

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Engenharia
Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares

Matheus Figueiredo Soares Mingote

**LIPIDOMA REGIONAL DA ESTRUTURA ENCEFÁLICA E MODULAÇÕES DA
EXPRESSÃO LIPÍDICA RADIOINDUZIDAS NO ENCÉFALO EM MODELO
ANIMAL WISTAR**

Belo Horizonte
2022

Matheus Figueiredo Soares Mingote

**LIPIDOMA REGIONAL DA ESTRUTURA ENCEFÁLICA E MODULAÇÕES DA
EXPRESSÃO LIPÍDICA RADIOINDUZIDAS NO ENCÉFALO EM MODELO
ANIMAL WISTAR**

Versão final

Tese apresentada ao Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à do título de Doutor em Ciências e Técnicas Nucleares.

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio P. R. Campos

Coorientador: Prof. Dr. Rodinei Augusti

Belo Horizonte
2022

Mingote, Matheus Figueiredo Soares.

M664I Lipidoma regional da estrutura encefálica e modulações da expressão lipídica radioinduzidas no encéfalo em modelo animal wistar [recurso eletrônico] / Matheus Figueiredo Soares Mingote. - 2022.
1 recurso online (155 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Tarcísio Passos Ribeiro de Campos.
Coorientador: Rodinei Augusti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Engenharia.

Anexos: f. 138-155.

Inclui bibliografia.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia nuclear - Teses. 2. Espectrometria de massa - Teses.
3. Efeito da radiação - Teses. 4. Lipídios - Teses. 5. Radiação ionizante -
Teses. 6. Metabolômica - Teses. I. Campos, Tarcísio Passos Ribeiro de. II.
Augusti, Rodinei. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Engenharia. IV. Título.

CDU: 621.039(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES



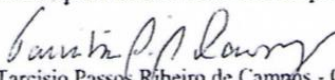
FOLHA DE APROVAÇÃO


LIPIDOMA REGIONAL DA ESTRUTURA ENCEFÁLICA E MODULAÇÕES DA EXPRESSÃO LIPÍDICA RADIOINDUZIDAS EM MODELO ANIMAL

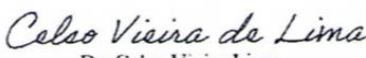
MATHEUS FIGUEIREDO SOARES MINGOTE


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, área de concentração CIÊNCIAS DAS RADIAÇÕES.


Aprovada em 24 de junho de 2022, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Tarcísio Passos Ribeiro de Campos - Orientador
Departamento de Engenharia Nuclear - UFMG



Prof. Rodinei Augusti - Coorientador
Departamento de Química - UFMG



Dr. Celso Vieira Lima
Departamento de Engenharia Nuclear - UFMG


Prof. Alexei Manso Correa Machado
Departamento de Anatomia e Imagem - UFMG


Dr. Bruno Melo Mendes
CDTN/CNEN

Assinado de forma digital por Bruno M. Mendes:02755828684
Dados: 2022.07.08 09:10:44 -03'00'


Prof. Savio Lana Siqueira
UFOP


Prof. Francisco Antonio Brandão Junior
CEFET

Belo Horizonte, 24 de junho de 2022.

Dedico esse trabalho a minha eterna vovó Carmem (in memoriam), ao Pedro, materialização do amor e estímulo eterno de superação, a minha Mãe por todo apoio e amor incondicional, a minha esposa, eterna companheira nessa tresloucada jornada pela vida.

Junho, 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força e por ser sempre o eterno guia.

Ao professor Tarcísio Passos Ribeiro Campos, pela orientação, pelo aprendizado, conhecimento, confiança e total apoio na busca das respostas essenciais nessa insólita busca pelo conhecimento.

Ao professor Rodinei Augusti, pela orientação, conhecimento, pela contribuição decisiva experimental e por todo apoio e confiança de um ser humano inigualável de vasto conhecimento comparável ao seu caráter e coração.

Agradeço especialmente ao Daniel Moreira Coelho e Carlos Júlio Montañó pela ajuda e suporte decisivos para realização dos trabalhos.

Agradeço especialmente ao Paulo Celso e Stênio, amigos eternos, mesmo distantes, parceiros e especiais sempre.

Agradeço ao Prof. Brandão, eterno amigo e companheiro que foi decisivo me incentivando a pesquisa e ao conhecimento, fonte eterna de inspiração e realização, a você o meu eterno agradecimento.

Agradeço ao Prof. Celso Lima pela disponibilidade e companheirismo.

Agradeço ao Prof. Boniek e a Gessica Vasconcelos pelo apoio fundamental na execução dos experimentos.

Agradeço à Camila Cristina Almeida de Paula pela enorme paciência e disponibilidade na análise dos resultados, muito obrigado.

Agradeço aos eternos amigos Carlos e Gonçalo, a vocês minha eterna gratidão e o meu muito obrigado por tudo, na construção contínua do conhecimento e assistência humanizada ao próximo.

Agradeço à Dra. Pauline, Dr. José Carlos Zaparoli, Dr. Marcos, Dr Alexandre, Dr Diogo, Dr. Rodrigo Gadia, Dr. Danilo, Dr. Diego e Dra Laura, profissionais inspiradores e estimuladores do conhecimento e da busca pela excelência em prol da cura.

Agradeço à minha Mãe, fonte de amor incondicional, inspiração e exemplo de vida, o meu amor e carinho por todo apoio fundamental neste novo desafio. Aos meus irmãos Lucas e Philippe o meu muito obrigado pelo apoio e conselhos.

Agradeço ao meu Pai, *in memoriam*, incentivador e valorizador da educação e da excelência. Seu vazio jamais será superado e fica aqui uma saudade eterna e a lembrança das suas sábias palavras.

Agradeço à Patrícia pelo companheirismo, apoio e toda compreensão nos momentos de ausência no árduo exercício solitário e intelectual diante do computador e por todo amor, cuidado e dedicação comigo.

Agradeço ao Pedro Mingote, materialização de um amor imenso, obrigado por estar aqui e ser a força do papai de superação e crescimento.

Agradeço ao Dino, *in memoriam*, eterno companheiro nas intermináveis horas de leitura e escrita, sempre ao meu lado pacientemente.

*“Cada sonho que você deixa para trás, é um
pedaço do seu futuro que deixa de existir.”*
(STEVE JOBS)

RESUMO

O presente trabalho aborda a análise de achados científicos no estudo de lipidoma encefálico, e modulações radioinduzidas dos lipídios encefálicos, através de técnica DESI-MSI (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*). A espectrometria de massas (MS), através da ionização branda a pressão atmosférica ambiente, promove a dessorção de lipídios permitindo a realização qualitativa e quantitativa das inúmeras classes de lipídios. O Objetivo principal foi a análise lipidômica de dados produzidos em DESI-MSI em tecido cerebral em condições normais e expostos a radiação, em modelo animal. A metodologia envolveu um modelo animal constituído de 40 ratos Wistar isogênicos hígidos masculinos que foram divididos em dois grupos: um controle (n = 7), denominado GC e outro submetido à irradiação corporal total (TBI), chamado GIR (n = 33) subdividido em 04 subgrupos correspondentes a cinética de tempo 24, 48, 96 h e 01 semanas. Os animais (grupo GIR) sofreram irradiação de corpo inteiro através da exposição a uma fonte Co-60, submetidos às mesmas condições de tempo e dose (5 Gy). Após a eutanásia, considerando as diversas cinéticas de tempo à serem analisadas, os órgãos foram coletados e armazenados em freezer -80°C para que posteriormente fossem realizados os procedimentos para obtenção dos cortes em criostato. As lâminas foram submetidas a uma metodologia conhecida como DESI-MSI que permite o imageamento ponto a ponto em 2D. Foi realizado uma varredura completa na faixa de 200 a 1000 Da obtendo-se espectros de massas em modo negativo. Os arquivos de dados de lipídeos produzidos por DESI-MSI foram analisados empregando os softwares BioMap, XCalibur no espectro de baixo e alto peso molecular, explorando a regionalização cerebral da expressão de lipídeos e a modulação lipidômica radioinduzida. Foi realizado uma identificação dos principais lipídios expressos em condições fisiológicas e em expostos a radiação. Os principais achados procederam da análise lipidômica. As análises permitiram a identificação principalmente de glicerofosfolipídios, devido a diversidade de funções celulares que exercem e a possibilidade de serem biomarcadores de possíveis alterações radioinduzidas. A maioria dos íons observados nos espectros de massa correspondem à ácidos graxos livres desprotonados, fosfatidilserinas (PS), fosfatidilinositóis (PI) e sulfatidas (ST). Vários íons sofrem alterações na intensidade e na região de origem demonstrando o efeito da radiação no metaboloma do tecido cerebral. O íon m/z 868,529, por exemplo, apresentava distribuição espacial presente principalmente em nos lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula) e após a irradiação verificou-se uma diminuição progressiva da intensidade desse lipídio em todas as regiões em todas as cinéticas de tempo. Os achados dos dados analíticos e de imageamento por DESI-MSI permitem afirmar que a radiação induz alterações metabólicas no perfil lipídico cerebral, em regiões específicas do encéfalo. Inúmeras possibilidades de investigação no campo da metabólica foram abertas como por exemplo a radiolipidômica do encéfalo. Os biomarcadores de toxicidade poderão ser utilizados no tratamento radioterápico para melhor controle terapêutico das toxicidades.

Palavras-chave: Dessorção por ionização (DESI). Espectrometria de massas. Efeitos das radiações. Lipídios. Radiação- γ . Radiação ionizante. Metabolômica. Lipidômica.

ABSTRACT

The present work addresses the analysis of scientific findings in the study of brain lipidoma, and radioinduced modulations of brain lipids, using the DESI-MSI (Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging) technique. Mass spectrometry (MS), through mild ionization at ambient atmospheric pressure, promotes the desorption of lipids allowing the qualitative and quantitative realization of numerous classes of lipids. The main objective was the lipidomic analysis of data produced in DESI-MSI in brain tissue under normal conditions and exposed to radiation, in an animal model. The methodology involved an animal model consisting of 40 healthy male isogenic Wistar rats that were divided into two groups: a control (n = 7), called GC and another submitted to total body irradiation (TBI), called GIR (n = 33) subdivided in 04 subgroups corresponding to time kinetics 24, 48, 96 h and 01 weeks. The animals (GIR group) underwent whole-body irradiation through exposure to a Co-60 source, submitted to the same conditions of time and dose (5 Gy). After euthanasia, considering the different kinetics of time to be analyzed, the organs were collected and stored in a freezer at -80°C so that later the procedures to obtain the cuts in cryostat could be carried out. The slides were subjected to a methodology known as DESI-MSI that allows point-to-point 2D imaging. A full scan was performed in the range from 200 to 1000 Da, obtaining mass spectra in negative mode. The lipid data files produced by DESI-MSI were analyzed using BioMap and XCalibur software in the low and high molecular weight spectrum, exploring brain regionalization of lipid expression and radioinduced lipidomic modulation. An identification of the main lipids expressed under physiological conditions and exposed to radiation was carried out. The main findings came from the lipidomic analysis. The analyzes allowed the identification mainly of glycerophospholipids, due to the diversity of cellular functions they exert and the possibility of being biomarkers of possible radio-induced alterations. Most of the ions observed in the mass spectra correspond to deprotonated free fatty acids, phosphatidylserines (PS), phosphatidylinositols (PI) and sulfatides (ST). Several ions undergo changes in intensity and region of origin demonstrating the effect of radiation on brain tissue metabolome. The ion m/z 868.529, for example, had a spatial distribution present mainly in the cerebellar lobes (culmina, central lobe, slope, pyramid and uvula) and after irradiation there was a progressive decrease in the intensity of this lipid in all regions in all time kinetics. The findings of analytical data and imaging by DESI-MSI allow us to state that radiation induces metabolomic alterations in the brain lipid profile, in specific regions of the brain. Countless research possibilities in the field of metabolomics were opened, such as radiolipidomics of the brain. Toxicity biomarkers may be used in radiotherapy for better therapeutic control of toxicities.

Key words: Ionization desorption (DESI). Mass spectrometry. Radiation effects. Lipids, γ -radiation. Ionizing radiation. Metabolic. Lipidic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Resposta a quebra de fita dupla de DNA (DSBS)	26
Figura 2: Esquema de decaimento do radionuclideo CO-60.....	27
Figura 3: Radiólise da água e formação de radicais livres	28
Figura 4: Representação esquemática de um espectrômetro de massas.....	31
Figura 5: Fonte de ionização do tipo DESI	32
Figura 6: DESI-MS	32
Figura 7: Obtenção de imagem por MS em sementes de soja.....	33
Figura 8: Espectro com os valores m/z mais abundantes (a) imagem total dos ions (b) adquirido por DESI-MSI em modo positivo	33
Figura 9: Lipídios quantificados e analisados por fragmentação MS/MS para formação e alimentação de um banco de dados	35
Figura 10: Corte sagital cerebral	38
Figure 11: Representation of the stages to obtain the images of the ions generated by DESI67	
Figure 12: Representation of the stages to obtain the images of the ions generated by MALDI67	
Figure 13: Image of a sagittal brain section from an irradiated animal, recorded on a MALDI-TOF instrument and the superposition of the high metabolic areas with sagittal brain section	68
Figure 14: Schematic representation of the DESI-MSI apparatus used to obtain each tissue image	76
Figure 15: brain, lung, kidney, liver and heart 400x slides	77
Figure 16: ÍON A) m/z 794.622 and B) ÍON m/z 914.693. The Images represent the intensities of the lipid's ions, in color levels, taken in a distinct animal brain section, whose pixels representing a specific area of the rat's brain, taken at the after-radiation times of 24,48,96 h and 01 week.	78
Figure 17: Graphical representation of the experimental flowchart up to the attainment of the DESI-MS images.....	113
Figure 18: Scheme of regions in the rat brain identified by colors and numbers. Adapted from Allen Brain Reference Atlases	114
Figure 19: Modulation of types of lipids according to topography and time kinetics.....	116
Figura 20: Concentração de Fe nos tecidos	139
Figura 21: Concentração de Cu nos tecidos	139
Figura 22: Concentração de Ca nos tecidos	140

Figura 23: Concentração de Zn nos tecidos	140
Figura 24: Perfil de massa dos lipídios séricos antes (A) e após a radioterapia (B)	147
Tabela 1: Categorias de lipídios e exemplos	34
Tabela 2: classes moleculares de lipídios presentes em tecido cerebral – alta resolução	36
Tabela 3: Classes moleculares de lipídios presentes em tecido cerebral – baixa resolução.	37
Table 4: Main molecular mechanisms promoting TMZ chemo-resistence.....	49
Tabela 5: Seleção de lipídeos que apresentaram modulação no tempo pós-irradiação, presentes no controle	87
Tabela 6: Regiões cerebrais de ratos Wistar identificadas didaticamente por números.....	89
Tabela 7: Distribuição do lipídio M/Z 726,544 e M/Z 774,544	90
Tabela 8: Painel com lipídios conforme distribuição espacial e estrutura no encéfalo	90
Tabela 9: Temperaturas ideais para cada tipo de órgão no criostato.....	102
Table 10: Ion images and the distinct brain regions of healthy Wistar rats control group.	114
Table 11: Ion Fórmula, experimental mass and category of lipids detected in negative mode	128
Tabela 12: Concentração de Fe, Cu e Zn nos órgãos	141
Tabela 13: Quantitativo e qualitativo de ácidos graxos, colesterol e fosfolipídios em timo após irradiação RT, em ratos a uma dose de 6 GY (2 GY, 3 frações por semana).....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
3D-CRT	Radioterapia tridimensional conformacional
A	Adenina
ACN	Acetonitrila
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AP	Pressão atmosférica
API	Ionização em pressão atmosférica
ATP	Adenosina trifosfato
ATM	Mutação para ataxia e teleangectasia
C	Citosina
C-onc	oncogenes celulares
Ca	Cálcio
CB	Canabinoide
Cd	Cádmio
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDTN	Centro de desenvolvimento da tecnologia nuclear
CEBIO	Centro de Bioterismo
Cer	Ceramida
CETEA	Comite de ética e experimentação animal
CEUA	Comissão de ética e no uso de animais
CI	Índice de conformidade
CK	Radiocirurgia Cyber Knife
CKI	Inibidores de ciclina quinase
Co	Cobalto
CRM	Modelo da partícula residual
CSI	Irradiação cranial-espinhal
CTV	Volume clínico todo alvo
Cu	Cobre
DESI	Ionização por <i>dessorção</i> de <i>spray</i> de <i>elétrons</i>
DI	Ionização por <i>dessorção</i>

DMF	Dimetilformaldeído
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	Quebras em dupla cadeia de DNA
DDR	Resposta de dano ao DNA
DP	Desvio Padrão
EAA	Espectrometria de absorção atômica
EI	Ionização por elétrons
ESI	Ionização por electrospray
FA	Ácido graxo
Fe	Ferro
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSIQ	Escala completa do coeficiente de inteligência
FSRT	Radioterapia estereotáxica fracionada
G	Guanina
G1	Primeiro gap
G2	Segundo gap
GK	Radiocirurgia Gamma Knife
GO	Oxoguanina
GHD	Deficiência do hormônio de crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GP	Glicerofosfolipidio
GL	Glicerolipidio
GTP	Trifosfato de guanosina
GTV	Volume de tumor visível
Gy	Gray
H	Hidrogênio
HGG	Gliomas de alto grau
IDM	Modelo da dessorção de íon
IGRT	Radioterapia guiada por imagem
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK	Inibidores dependentes de ciclina quinase
IM	Índice mitótico
IMRT	Radioterapia com modulação da intensidade do feixe

IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LET	Transferência linear de energia
LGG	Gliomas de baixo grau
LH	Hormônio luteinizante
Li	Lítio
LIG	Laboratório de irradiação gama
LINAC	Acelerador linear
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
M	Mitose
MALDI	<i>Ionização e desorção a laser</i> assistida por matriz
MeV	Megaelétron-volt
Mg	Magnésio
MS	Microcirurgia
MS	Espectrometria de massas
N	Nitrogênio
Na	Sódio
NHL	Linfoma não Hodgkin
NRI	Núcleo das Radiações Ionizantes
O	Oxigênio
P	Fósforo
PP	Puberdade precoce
P53	Proteína 53
PC	Fosfatidilcolina
PCNSL	Linfoma primário do sistema nervoso central
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PNET	Tumores primitivos neuroectodérmicos
PS	Fosfatidilserina
PS	Status de performance

QoL	Qualidade de vida
Rad.γ	Radiação gama
Rx	Raios x
RAS	Gene relacionado ao câncer
RNA	Ácido ribonucleico
RNAM	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas em oxigênio
ROTG:	Radiation therapy group
RT	Radioterapia
S	Síntese
S	Enxofre
Se	Selênio
SBRT	Radioterapia estereotática corporal.
SM	Esfingomielina
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Esfingolipídios
SRS	Radioterapia estereotática
SSBs	Quebras em cadeia simples de DNA
ST	Sulfatida
UV	Ultravioleta
T	Timina
TBI	Irradiação de corpo inteiro
TC	Tomografia computadorizada
TRH	Hormônio tireotrófico
RNM	Ressonância magnética
U	Uracila
VS	Schwannoma vestibular
WBRT	Radioterapia total de crânio
WHO	Organização mundial de saúde
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Apresentação do tema	21
1.2 Motivação e ineditismo	22
1.3 Objetivos	22
<i>1.3.1 Objetivos gerais</i>	<i>22</i>
1.4 Justificativa	23
1.5 Organização da Tese	23
2 ESTADO DA ARTE	25
2.1 Epidemiologia do câncer	25
<i>2.1.1 Principais dados estatísticos sobre os tumores cerebrais e sistema nervoso central (SNC)</i>	<i>25</i>
<i>2.1.2 Alterações Radioinduzidas no metabolismo celular</i>	<i>26</i>
2.2 Radiação gama e mutações por oxidação	27
2.3 Considerações sobre a radioterapia	29
<i>2.3.1 Toxicidades da radioterapia</i>	<i>29</i>
2.4 Espectrometria de massas (MS)	30
<i>2.4.1 Instrumentação</i>	<i>30</i>
<i>2.4.2 Fontes de Ionização</i>	<i>31</i>
<i>2.4.3 Lipídios cerebrais e lipidômica</i>	<i>34</i>
3 THERAPIES AND PERSPECTIVES IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME	43
ABSTRACT	43
3.1 Introduction	43
<i>3.1.1 Risk factors</i>	<i>44</i>
<i>3.1.2 Clinical presentation, diagnosis and survival</i>	<i>45</i>
3.2 Methodology	46
3.3 Revisional approach in the therapies	46
<i>3.3.1 Surgery</i>	<i>46</i>
<i>3.3.2 Chemotherapy</i>	<i>47</i>
<i>3.3.2.1 Temozolomide (TMZ)</i>	<i>47</i>
<i>3.3.2.2 Nitrosureas</i>	<i>50</i>

3.3.2.2.1 BiCNU: Carmustine	50
3.3.2.2.2 CCNU: Lomustine	50
3.3.2.2.3 PCV: Proccarbazine Hydrochloride, Lomustine (CCNU) and Vincristine Sulfate	50
3.3.3 Radiotherapy	51
3.3.4 TTF (Tumor Treatment Fields)	52
3.3.5. Immunotherapy	53
3.3.5.1. Nivolumab and Ipilimumab	54
3.3.5.2. Pembrolizumab	55
3.3.6 Combined therapies	56
3.3.6.1 Surgery associated with chemotherapy	56
3.3.6.2 QT associated with RT	56
3.3.6.3 TFF associated with QT	56
3.3.6.4 Associated immunotherapy	57
3.4 Complications and prognostics	57
3.5 Conclusion	58
References	58

4 METODOLOGICAL ISSUES IN PROTEIN AND LIPIDIC EXPRESSIONS IN BRAIN TISSUE EXPOSED TO CO⁶⁰ BASED ON DESI/MALDI-MSI	64
4.1 Introduction	64
4.2 Materials; Methods	65
4.2.1 Group selection	65
4.2.2 Irradiation protocol	66
4.2.3 Cryostat	66
4.2.4 DESI	66
4.2.5 MALDI	67
4.3 Issues addressed on methodology	68
4.4 Discussions	70
4.5 Conclusions	71
Acknowledgments	71
References	72

5 ANALYTICAL METHODS FOR ASSESSING CHANGES INDUCED BY GAMMA EXPOSURE IN ANIMAL MODEL	74
5.1 Introduction	74
5.2 Materials and methods.....	75
5.2.1 Group selection and Irradiation Protocol.....	75
5.2.2 Histological methods	75
5.2.3 DESI-MSI.....	75
5.3 Results.....	76
5.3.1 Histopathological analyses of organs	76
5.3.2 DESI images	77
5.4 Discussion	79
5.5 Conclusions	79
Acknowledgments.....	80
Authors' contributions	80
References.....	80

6 PAINEIS DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS ENCEFALO-REGIONAIS PARA MONITORAMENTO DE DISFUNÇÕES COGNITIVAS, SENSORIAIS E MOTORAS RADIOINDUZIDAS	83
6.1 Introdução	83
6.2 Materias e métodos.....	85
6.2.1 Animais	85
6.2.2 Protocolo de irradiação	85
6.2.3 Preparação do tecido	85
6.2.4 Espectrometria de massa de eletrospray de desorção (DESI).....	86
6.2.5 Identificação de íons.....	86
6.3 Resultados	87
6.4 Discussão	92
6.5 Conclusão	93
Agradecimentos	94
Contribuições dos autores.....	94
Referências	94

7 METODOLOGIA DO TRABALHO DE TESE	99
7.1 Agrupamento	99
7.2 Protocolo de Irradiação.....	99
7.3 Procedimento de eutanásia	99
7.3.1 <i>Via de Administração: Via parenteral, IP (Intraperitoneal) ou IM (Intramuscular)</i>	100
7.4 Confeção das lâminas (Criomicrotomia)	101
7.5 Protocolos DESI.....	104
7.5.1 <i>Imagem Tecidual</i>	105
7.6 Análise dos resultados obtidos.....	105
8 RADIOINDUCED MODULATORY RESPONSE OF LIPID PROFILES OF WISTAR RATS BRAIN MONITORED BY DESI-MS IMAGING.....	107
8.1 Introduction	107
8.2 Materials and Methods	110
8.2.1 <i>Animals</i>	110
8.2.2 <i>Irradiation protocol</i>	110
8.2.3 <i>Preparation of tissue</i>	111
8.2.4 <i>Desorption electrospray mass spectrometry (DESI)</i>	111
8.2.5 <i>Ion identification</i>	112
8.3 Results.....	113
8.4 Discussion	118
8.5 Conclusions	120
References.....	121
Annexes.....	128
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
REFERÊNCIAS	130
ANEXO A – Avaliações em alterações na concentração de metais em tecidos irradiados in vivo	137
1 Introdução	137
2 Metodologia.....	138

3 Análise dos resultados	138
3.1 Exposição crônica.....	138
3.2 Exposição aguda.....	141
4 Conclusão	142
Agradecimentos	142
Referências	143
ANEXO B – Análise lipídica através de DESI-MS – uma revisão dos efeitos da radiação gama no perfil lipídico em tecidos biológicos.....	144
1 Introdução	144
2 Metodologia.....	145
3 Resultados	145
3.1 Efeitos das Radiações Ionizantes no Tecido Biológico.....	145
3.2 A técnica de espectrometria de massas - DESI-MS	148
4 Conclusão	148
Agradecimentos	149
Referências	149
ANEXO C – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	151
ANEXO D – Solicitação à Comissão de Ética no Uso de Animais	152
ANEXO E – Resposta da Comissão de Ética no Uso de Animais	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do tema

A metabolômica (lipidômica e proteômica) permite o estudo das principais alterações moleculares a fim de se compreender e evitar os efeitos biológicos danosos envolvidos nos tecidos irradiados.

Segundo COOKS, 2006, a utilização de técnicas analíticas como a espectrometria de massas (Mass Spectrometry - MS) permite a determinação de composições elementares, estruturas moleculares e análises quantitativas e qualitativas de misturas complexas. A ionização ambiente ocorre por dessorção por ionização, denominada DESI (Desorption ElectroSpray Ionization) e MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). Assim compostos orgânicos presentes em tecidos orgânicos podem ser analisados qualitativamente e quantitativamente (lipídios e proteínas).

A radioterapia é uma das especialidades oncológicas que utiliza a radiação ionizante com objetivo de cura e/ou controle de neoplasias. Contudo, a radiação atua indiscriminadamente tanto sobre as células tumorais como nas células sadias adjacentes, podendo desencadear uma consequente neurotoxicidade aguda e/ou crônica (DEB, FIELDING, 2009; RUDÀ, et al., 2013).

A radiação gama é uma radiação ionizante que proporciona danos diretos e/ou indiretos ao DNA alterando os processos traducionais e transcripcionais levando à importantes alterações morfofuncionais. A ruptura de ligações estruturais das bases nitrogenadas bem como a formação das espécies reativas ao oxigênio (ROS) são a chave para a interrupção da alta clonogenicidade tumoral bem como pela indução do processo apoptótico (OKUNO, et al., 2010; MINGOTE, 2018).

A ferramenta DESI-MSI poderá ser empregada como importante técnica de instrumentação, capaz de analisar as principais alterações na expressão lipídica cerebral proveniente do tratamento radioterápico. A compreensão dos principais fenômenos de resposta molecular do tecido cerebral frente à exposição da radiação permitirá uma revisão nos protocolos de planimetria e de dosagem, a fim de minimizar os indesejáveis efeitos adversos neurocognitivos que ocorrem a longo prazo e curto prazo.

1.2 Motivação / ineditismo

O tratamento radioterápico acarreta injúrias radioinduzidas metabólicas responsáveis por culminar na ativação de processos apoptóticos. Os benefícios da radioterapia devem estar associados a uma baixa toxicidade tecidual alto reparo e máximo processo de regeneração celular. A ausência de estudos das alterações metabólicas radioinduzidas ainda se encontra incipiente, tanto no imageamento molecular como pela identificação molecular de possíveis radiomarcadores de injúria celular. Assim, a utilização de espectrometria de massa por imageamento por DESI-MSI no estudo da metabólica é inédito e amplia a possibilidade de elucidar ainda mais as principais alterações lipídicas provenientes dos efeitos lesivos da radiação ionizante no DNA.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivos gerais

São objetivos gerais:

- Analisar a expressão lipídica, em condições fisiológicas bem como as principais alterações radioinduzidas em tecido cerebral por meio de espectrometria de massas. Os lipídios serão identificados pela sua m/z e localizados nas diversas regiões topográficas cerebrais.

1.3.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos:

- Analisar as alterações significativas presentes nos animais irradiados;
- Investigar e avaliar as possíveis alterações no lipidoma induzido por radiação;

1.4 Justificativa

Mesmo com toda preocupação em delinear o volume tumoral através de técnicas conformacionais respeitando a adoção de protocolos de irradiação para minimização dos danos, torna-se necessário uma avaliação mais criteriosa do metaboloma lipídico para a mensuração da toxicidade do tratamento radioterápico. DESI-MS é uma metodologia essencial para auxiliar a investigação dos efeitos da radiação no DNA e, conseqüentemente alteração, no metaboloma celular. A análise das modificações radioinduzidas dos lipídios cerebrais permite que protocolos de planejamento e segurança sejam revistos e modificados a fim de se evitar uma conseqüente toxicidade tecidual. A possibilidade de descobertas de novos marcadores de injúria celular e tecidual provenientes do tratamento radioterápico pode contribuir ainda mais para que novas técnicas de planejamento e tratamento sejam otimizadas e/ou desenvolvidas.

1.5 Organização da Tese

Este trabalho será apresentado sob propostas que procuram desenvolver o pensamento teórico-científico. Primeiramente será apresentado o estado da arte, uma revisão científica dos princípios teóricos que fundamentam as bases do presente trabalho como a radiobiologia, radioterapia, lipidômica e a espectrometria de massas. Os capítulos subsequentes serão apresentados na forma de um conjunto de artigos científicos.

O capítulo 3 possui como referência um artigo de revisão dos principais tratamentos nos glioblastomas recorrentes e as principais estratégias abordadas para aumentar a sobrevida dos pacientes. Este artigo complementa a revisão da tese.

O capítulo 4 refere-se ao artigo aceito para publicação que aborda algumas metodologias analíticas empregadas no estudo da lipidômica. Este capítulo detalha e ilustra a metodologia associada a DESI-MSI bem como os os principais achados científicos prévios.

O capítulo 5 refere-se ao artigo aceito para publicação que aborda as técnicas utilizadas para demonstrar as alterações metabólicas de resposta aguda conseqüentes à radiação ionizante no metaboloma celular.

O capítulo 6 refere-se ao artigo que demonstra a possível correlação de painéis de possíveis biomarcadores locorregionais associados as alterações neurológicas correspondentes.

O capítulo 7 refere-se a metodologia científica empregada para desenvolvimento do trabalho.

O capítulo 8 refere-se ao artigo submetido demonstrando todos os achados analíticos após a conclusão do imageamento molecular utilizando DESI-MSI.

O capítulo 9 refere-se as conclusões do trabalho desenvolvido e as perspectivas decorrentes de seus resultados.

Os anexos referem-se aos outros artigos realizados durante a elaboração e execução do tema proposto.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Epidemiologia do câncer

O câncer representa a segunda causa de mortalidade mundial (WHO,2017) e futuramente responderá por mais de 20 milhões de casos novos; dados estimados para 2025 (World Cancer Report, 2018).

A predisposição genética associada a exposição e a fatores externos notoriamente carcinogênicos, desencadeia alterações importantes nos mecanismos de reparação celular propiciando assim o surgimento de linhagens celulares com alta clonogenicidade (WHO, 2017) e conseqüentemente o surgimento de doenças.

Segundo estimativas do INCA e Ministério da Saúde (MS), estão previstos a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer no Brasil em 2018-2019. Precisamente, os números serão de de 582.590 casos novos de câncer: 282.450 em mulheres e 300.140 em homens. Entre os tipos de neoplasias mais incidentes, destacam-se para ambos os sexos o de pele não melanoma com 165.580 casos novos, próstata (68.220 casos novos por ano), mama feminina (59.700), cólon e reto (câncer de intestino) (36.360), pulmão (31.270), estômago (21.290), colo do útero (16.370), cavidade oral (14.700), sistema nervoso central (11.320), leucemias (10.800) e esôfago (10.790) (INCA, 2018). As mulheres serão mais acometidas pelos cânceres de mama (59.700), intestino (18.980), colo do útero (16.370), pulmão (12.530), glândula tireoide (8.040), estômago (7.740), corpo do útero (6.600), ovário (6.150), sistema nervoso central (5.510) e leucemias (4.860). Já entre os homens, os cânceres mais incidentes serão próstata (68.220), pulmão (18.740), intestino (17.380), estômago (13.540), cavidade oral (11.200), esôfago (8.240), bexiga (6.690), laringe (6.390), leucemias (5.940) e sistema nervoso central (5.810) (INCA, 2018).

2.1.1 Principais dados estatísticos sobre os tumores cerebrais de sistema nervoso central (SNC)

O relatório “Estimativas de Incidência de Câncer, para o biênio 2018-2019 - INCA”, estima que no Brasil, sejam diagnosticados 11.320 novos casos de tumores no sistema nervoso central (SNC), sendo 5.810 em homens e 5.510 em mulheres.

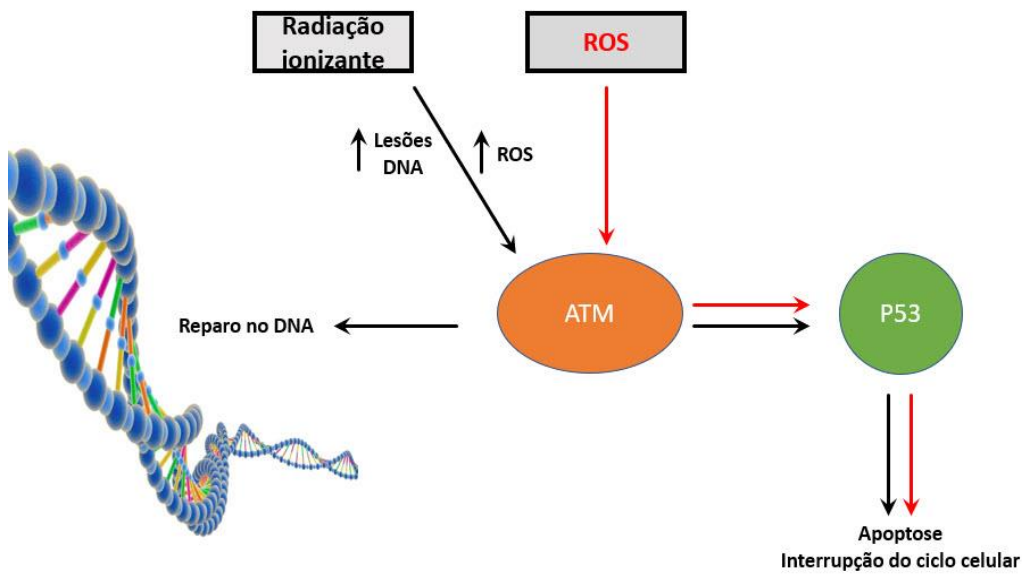
Em geral, a probabilidade de desenvolvimento de neoplasias maligna de SNC é inferior a 1%. O risco para homens (aproximadamente 1:143) é ligeiramente maior que o das mulheres (aproximadamente 1:185), embora certos tipos de tumores sejam mais comuns nas mulheres.

A maioria dos tumores do SNC origina-se do cérebro, nervos cranianos e meninges. Os gliomas são o tipo histológico mais frequente e representam cerca de 40 a 60% de todos os tumores primários do SNC, sendo mais comum na faixa etária adulta. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

2.1.2 Alterações Radioinduzidas no metabolismo celular

As rupturas de dupla cadeia de DNA (Double Strand Breaks - DSBs) induzidas por radiação ionizante (IR) podem acarretar em falhas na regulação/reparo da supressão tumoral, contribuindo sensivelmente para o aumento da clonogenicidade. Segundo UHRHAMMER et al., 2002 as sinalizações para reparo do DNA (DNA Damage Response -DDR), parada do ciclo celular para interrupção da apoptose e controle de produtos provenientes do estresse oxidativo, são realizadas por proteínas serina-treonina quinase chamadas ATM (“ataxia telangectasia mutated”), conforme Fig. 1. Foi verificado que uma alta incidência de tumores malignos está relacionada as quebras diretas/indiretas do DNA pela radiação ionizante determinando a perda de reparo do DNA e de sinalização para o controle do ciclo celular e apoptose.

Figura 1: Resposta a quebra de fita dupla de DNA (DSBS)

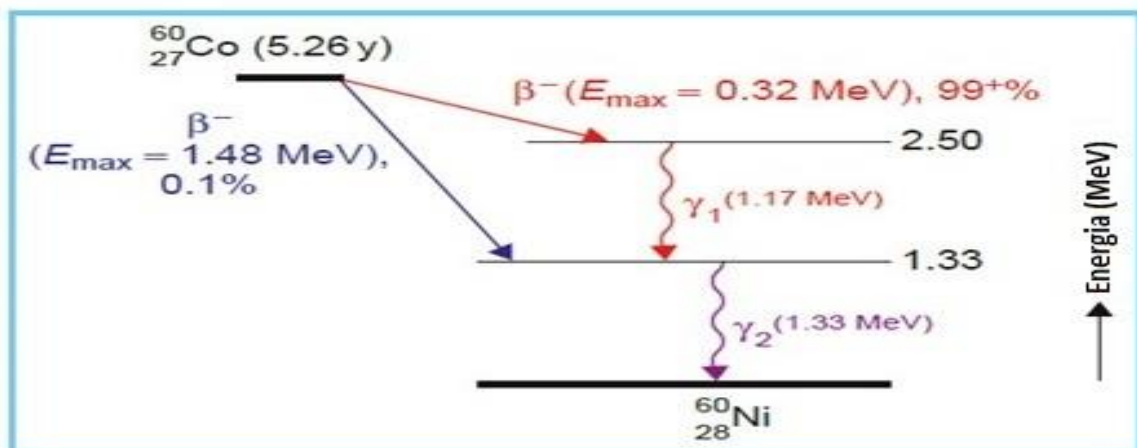


Fonte: Adaptado de MINGOTE, 2018.

2.2 Radiação gama e mutações por oxidação

Radiação gama ou raio gama (γ) é um tipo de radiação eletromagnética (fótons) de alta frequência e com espectro de energia entre 10 keV a 10 MeV emitidas pelo núcleo durante o decaimento radioativo (ANKER; SHRIEVE, 2009). O cobalto 60 (Co-60) decai em emissão beta (β^-) em Ni-60, com uma meia-vida de 5,2714 anos, emitindo raios gama (γ) com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV (KHAN et al., 2014), conforme Fig. 2.

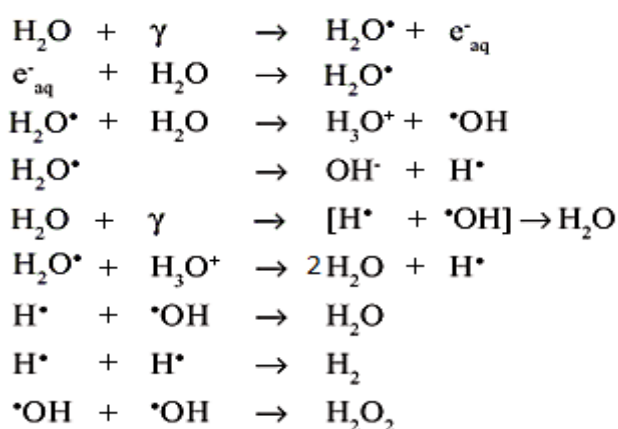
Figura 2: Esquema de decaimento do radionuclídeo CO-60-



Fonte: Adaptado de KHAN et al., 2014.

Radiação gama é uma radiação ionizante de baixa LET (Linear Energy Transfer) caracterizada pela baixa densidade de ionizações em um tecido, devido à reduzida relação carga/massa das partículas beta (β) o que diminui a probabilidade de colisões efetivas ionizantes (MINGOTE,2018). Assim, o menor número de ionizações favorece a ação dos mecanismos de reparo do DNA, conferindo a clonogenicidade necessária para o reparo tecidual. Já radiações de alta LET aumentam exponencialmente o número de ionização causando conseqüentemente dano biológico considerável. (HALL, 2012). Raios gama (γ) propiciam a formação de ROS (Reactive Oxygen Species) proveniente principalmente pela radiólise da água. Assim, são formados radicais livres ($H\cdot$ e $OH\cdot$) altamente reativos, causando o rompimento de interações intermoleculares do tipo ponte de hidrogênio e alterações morfofuncionais das estruturas de componentes celulares (OKUNO, et al., 2010), conforme Fig.3. O dano ao DNA, causado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), tem sido implicado no envelhecimento precoce, na carcinogênese e nos transtornos neurológicos. (ALSHYKHLA et al., 2015).

Figura 3: Radiólise da água e formação de radicais livres



Fonte: Adaptado de CAMPOS et al., 2004.

As ionizações causam diretamente no DNA mudanças e deleções de bases, rompimento de ligações de hidrogênio, fragmentação de fita simples (SSBs - single strand breaks) ou fita dupla do DNA (DSBs - double strand breaks), e induzem também a formação de ligações cruzadas internas ou externas com moléculas de DNA e/ou proteínas. (OKUNO, et al., 2010; ALSHYKHLA et al., 2015).

Assim, os danos irreversíveis ao DNA associado ainda a inativação dos mecanismos de reparo na fita fragmentada, podem favorecer a produção das ROS. Estima-se que em torno de

100.000 danos decorrentes da presença de ROS ocorram diariamente nas células (FRAGA et al., 1990). Aproximadamente 33% das quebras de fitas é devido a ação direta no DNA e o restante devido a ação de radicais livres (hidroxilas OH•) provenientes da radiólise da água. Cerca de 1 a 2 Gy de dose absorvida de radiação ionizante produz cerca de 500 a 1000 quebras em uma fita, de 1000 a 2000 alterações de bases e 40 quebras de duas fitas em apenas uma única célula de mamíferos (OKUNO et al., 2010).

A ação das ROS desencadeia o processo de lipoperoxidação em ácido graxos polinsaturados gerando subprodutos altamente reativos, tais como: aldeídos, cetonas, epóxidos e hidrocarbonetos, podendo inclusive acarretar em mutações e danos genéticos (OKUNO et al., 2010; DAVID et al., 2007; DUXIN; WATER, 2015).

2.3 Considerações sobre a radioterapia

O tratamento radioterápico consiste no uso de radiação ionizante para controle e diminuição clonogênica de neoplasias (malignas e benignas) tendo como base uma planimetria adequada associada a prescrições de doses terapêuticas efetivas (GOLDWEIN et al., 1990; MIRALBELL et al., 1997). A cinética de reparo tecidual adequada, garante uma minimização de vários efeitos colaterais desencadeados pelos processos apoptóticos e necróticos radioinduzidos (GUNDERSON et al., 2015; PEREZ et al., 2013; SALVAJOLI et al., 2013).

2.3.1 Toxicidades da radioterapia

As toxicidades radioinduzidas desencadeiam uma neurotoxicidade que está associado a lesão de substância branca, devido a radionecrose induzida o que acarreta um declínio neurocognitivo e conseqüente queda na qualidade de vida (*Quality of Life – QOL*) (BROWN et al., 2003; GUNDERSON, 2015).

Doses elevadas estão associadas a uma intensa morte celular, o que gera uma resposta aguda precoce além de sintomas como: fadiga, eritema, alopecia, dor de cabeça e náusea associada a vômitos ou não. Pode-se citar ainda as xerostomias, conjutivites, neuropatias e neurites (ototoxicidade, retinopatias, cegueiras, cataratas), disfunções hipotalâmico-hipofisárias e leucoencefalopatias (lesões em substância branca extensas com vários infartos lacunares). Assim, déficits cognitivos podem existir e acarretar um comprometimento

significativo no desenvolvimento intelectual (*Full-Scale Intelligence Quotient - FSIQ*) (MULHERN et al., 2005; MERCHANT et al., 2009; RIS et al., 2013; NABORS et al., 2013).

2.4 Espectrometria de massas (MS)

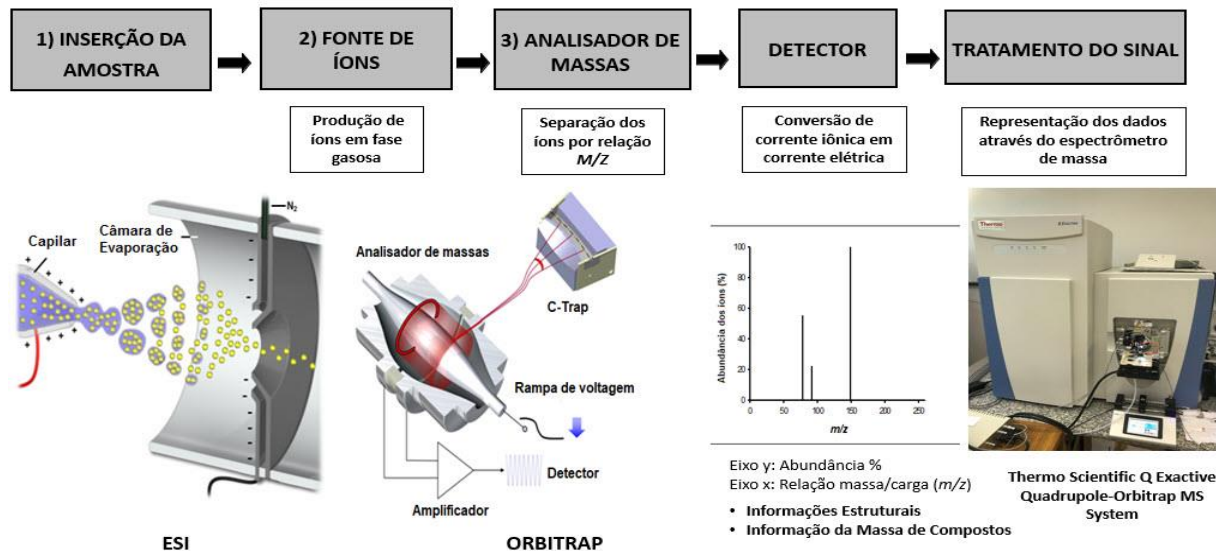
A espectrometria de massas (MS) é empregada para análises quali/quantitativas de substâncias além de possibilitar a identificação de diversas moléculas orgânicas. Apresenta enormes vantagens tais como: alta sensibilidade e exatidão, baixos limites de detecção e curto tempo de análises. Espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que permite a identificação, quantificação e elucidação de propriedades estruturais de uma molécula ou composto (eletricamente carregados) através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmento. O princípio fundamental da espectrometria de massas consiste na formação de íons a partir de compostos, orgânicos ou inorgânicos, utilizando-se um método de ionização adequado para posteriormente separá-los através de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas. Assim, no detector, torna-se possível a identificação e mensuração qualitativa/quantitativa dos compostos a partir da relação massa-carga dos íons (m/z). A caracterização dos analitos pela sua razão massa /carga (m/z) e abundância relativa é obtida através de um gráfico de abundância de íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida gerando o espectro de massas correspondente (SKOOG, 2014).

2.4.1 Instrumentação

Segundo FREITAS, 2018, cita que:

“ O espectrômetro de massas possui cinco componentes principais: (1) unidade de inserção de amostra; (2) fonte de ionização, onde as moléculas da amostra são convertidas em íons na fase gasosa; os íons são acelerados por um campo eletromagnético e alcançam o (3) analisador de massas, onde há separação dos íons de acordo com as respectivas m/z ; os íons são contados no (4) detector e o (5) sistema de dados registra o sinal.” A FIG. 4 ilustra as partes de um MS.

Figura 4: Representação esquemática de um espectrômetro de massas (MS)



Fonte: Arquivo pessoal.

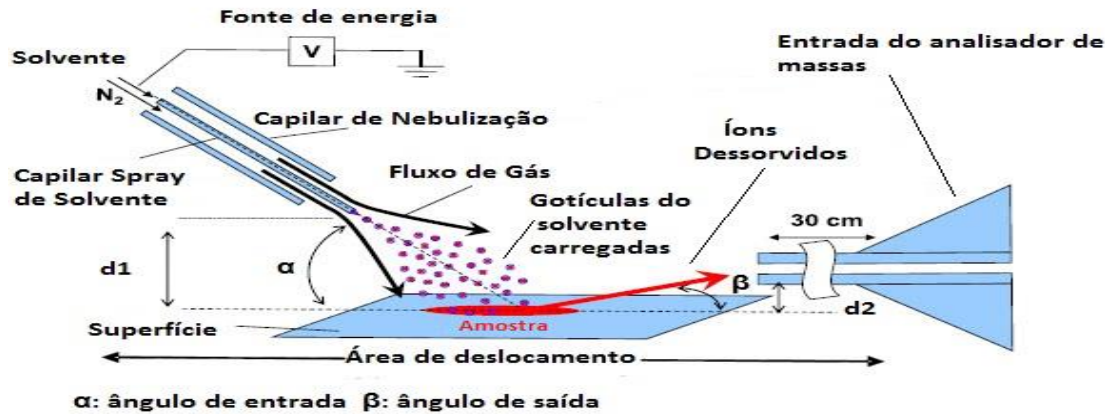
2.4.2 Fontes de Ionização

Segundo Mingote, 2018, cita:

“A fonte de íons ou câmara de ionização é onde ocorre a formação de íons em fase gasosa, a partir de amostras sólidas, líquidas ou gasosas, dependendo da forma de inserção de amostra. A Ionização por Elétrons (EI) (EI-MS - Eléctron Ionization - Mass Spectrometry) é o método caracterizado pela ionização e a fragmentação de moléculas permitindo a identificação estrutural, qualitativa e quantitativa de moléculas a partir de análises da intensidade do espectro obtido pela relação m/z . No entanto, EI necessita de volatilização em alto vácuo na fonte de ionização impossibilitando realizar análises de biomoléculas de baixa massa ($< 5 \times 10^2$ Da) como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos. Tais compostos, não possuem estabilidade térmica suficiente para serem volatilizados e, assim, não podem ser analisadas por EI. ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) é uma técnica de ionização suave em pressão atmosférica (API- atmospheric pressure ionization) utilizada para a determinação estrutural de lipídios, proteínas e metabolitos, permitindo a formação de íons a partir de macromoléculas. A partir dessas fontes, em especial ionização por Electrospray (ESI), foram desenvolvidas as técnicas de ionização ambiente, como a DESI. DESI-MS (Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry) é uma importante ferramenta que possibilita a ionização ambiente de biomoléculas intactas como lipídios, proteínas e peptídeos possibilitando a sua análise quali/quantitativa bem como sua distribuição espacial nas amostras”.

Assim um spray de nebulização, promove a dessorção e ionização dos analitos da amostra para fase gasosa (Fig. 5 e 6) além de sua conseqüente transferência até o capilar de entrada do analisador de massas (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Figura 5: Fonte de ionização do tipo DESI



FONTE: Adaptado COOKS et al., 2006

Figura 6: DESI-MS



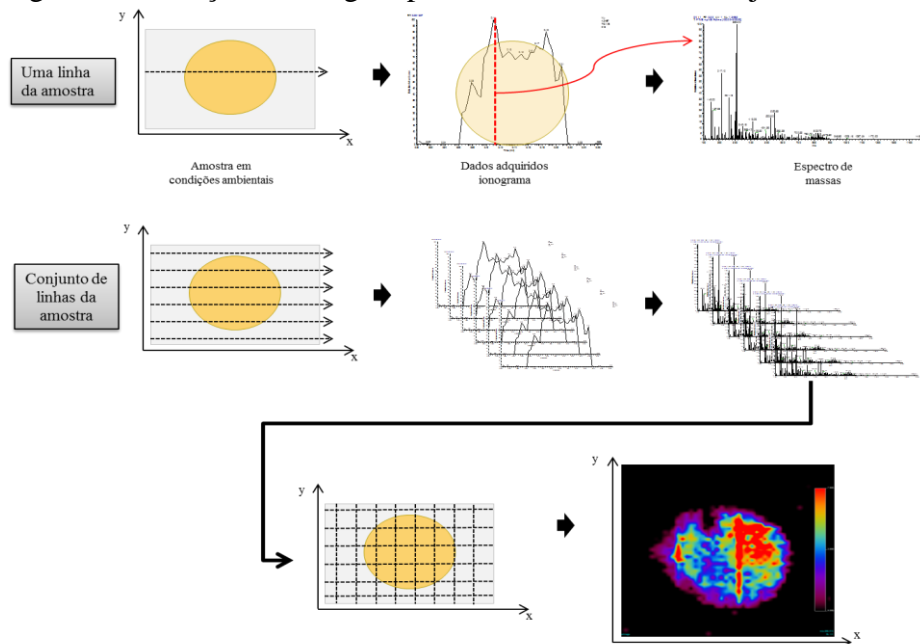
Fonte: Arquivo pessoal

DESI-MS realiza o fingerprint de tecidos biológicos com base na relação m/z das moléculas constituintes. Ainda assim é possível utilizar a mesma metodologia para o emprego de obtenção dos perfis lipídicos de tecidos normais e neoplásicos, identificação de metabólitos em microbiologia, falsificação de dinheiro, estudo de neurotransmissores cerebrais e metabolômica (ANGOLINI et al., 2015; CORREA et al., 2016; FERNANDES et al., 2016).

DESI-MSI permite que seja realizado um imageamento (MSI - mass spectrometry imaging) químico da superfície de uma amostra através da varredura realizada por coordenadas

cartesianas X e Y permitindo avaliar a distribuição espacial e temporal de suas moléculas. (FIG 7) (FREITAS,2018).

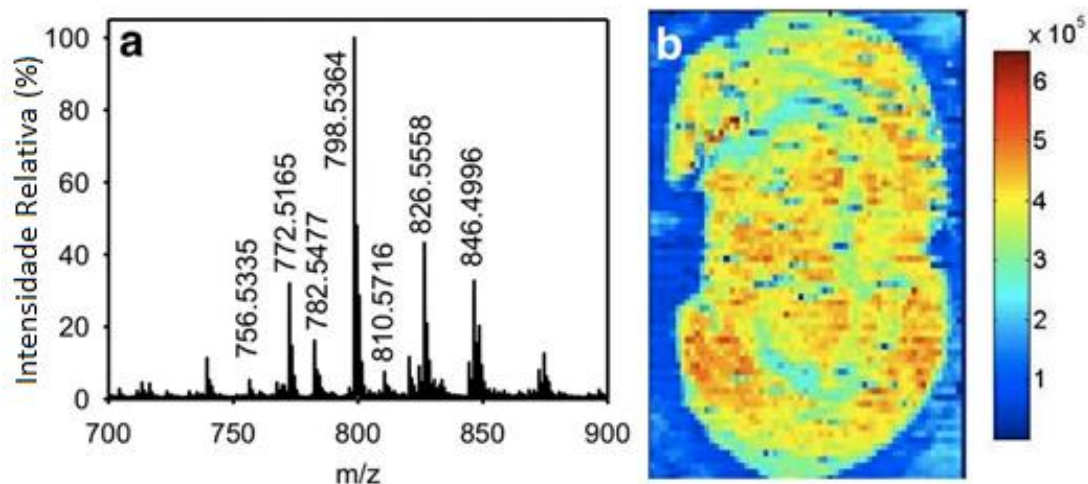
Figura 7: Obtenção de imagem por MS em sementes de soja



Fonte: FREITAS, 2018.

O conjunto de pontos obtidos em cada linha produz um espectro de massas. Assim, ao final do processo, o conjunto de espectro de massas proporciona uma série de dados de toda a superfície da amostra, podendo ser exportados para um programa capaz de converter os dados em imagens bidimensionais de acordo com a distribuição espacial e a intensidade relativa de cada íon nas amostras, conforme a FIG. 8 (FREITAS, 2018).

Figura 8: Espectro com os valores m/z mais abundantes (a) imagem total dos íons (b) adquirido por DESI-MSI em modo positivo



Fonte: MINGOTE, 2018.

2.4.3 Lipídios cerebrais e lipidômica

Lipídios são moléculas presentes nos organismos e apresentam as mais diversas funções como: armazenamento de energia, atuam como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, atuam como pigmentos fotossensíveis, âncoras hidrofóbicas para proteínas, chaperonas para auxiliar no enovelamento de proteínas de membrana, são agentes emulsificantes no trato digestivo, e atuam como hormônios e mensageiros intracelulares. Os lipídios podem ser divididos em oito categorias: ácidos graxos, glicerolípídios, glicerosfolípídios, esfingolípídios, policetidos, sacarolípídios, lípidos esteróis (colesterol e derivados) e lípidos prenois, conforme a TABELA 1 (FAHY et al., 2005).

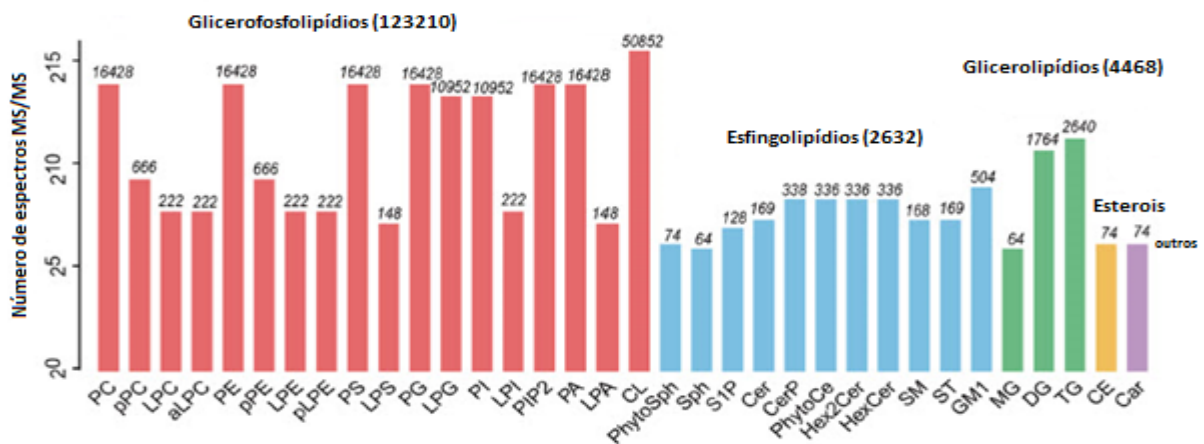
Tabela 1: Categorias de lipídios e exemplos

Categoria	Abreviação	Exemplo
Ácidos Graxos	FA	Ácido Dodecanóico
Glicerolípídios	GL	1-hexadecanil-2-(9Z-octadecenoil)-sn-glicerol
Glicerosfolípídios	GP	1-hexadecanil-2-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfocolina
Esfingolípídios	SP	N-(tetradecanoil)-esfingo-4-enina
Esteróis	ST	colest-5-en-3 β -ol
Prenóis	PR	2E,6E-farnesol
Sacarolípídios	SL	UDP-3-O-(3R-hidroxi-tetradecanoil)-d-N-acetilglicosamina
Policetídeo	PK	Aflatoxina B ₁

Fonte: Adaptado de FAHY, 2005.

A análise lipidômica do cérebro revela 100 espécies distintas de lipídios. (TAJIMA et al, 2013; WOODS et al, 2006; ADIBHATLA et al, 2006). O padrão de expressão lipídica foi significativamente modificado por experimentos traumáticos com injúrias cerebrais (ABDULLAH et al, 2014); idade, envelhecimento, comorbidades também participam de mudanças na expressão lipídica cerebral (ADIBHATLA et al, 2006; RAPPLEY et al, 2009). A espectrometria de massas mostrou-se essencial na identificação e quantificação molecular lipídica para a formação de um banco de dados, sendo capaz de identificar os principais grupos de lipídios que sofreram alterações metabólicas relacionadas a idade, conforme FIG 9 (TU et al, 2017).

Figura 9: Lipídios quantificados e analisados por fragmentação MS/MS para formação e alimentação de um banco de dados



Fonte: Adaptado de TU, 2017.

Recentemente, têm-se demonstrado que a exposição à radiação ionizante pode induzir a lesões diretas no DNA e indiretas pela formação das ROS causando alterações importantes na lipidômica cerebral.

Lipidômica permite analisar dinamicamente as alterações envolvidas referentes aos lipídios e os efeitos biológicos nos tecidos irradiados. Em células, a integridade da membrana é imprescindível para garantir a sinalização do metaboloma protéico e lipídico. As espécies reativas do oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS) causam a peroxidação lipídica determinando a oxidação extensa de ácidos graxos insaturados de membranas culminando na alteração no fluxo de substrato iônico e molecular, desencadeando diversos processos tais como inibição da mitose e indução de apoptose (ACKERSTAFF et al., 2003; WANG et al., 2009).

DESI-MS permitiu a identificação de lipídios constituintes cerebrais (fosfolipídios, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e sulfatida (ST)) envolvidos em diversos processos patológicos (MINGOTE, 2018).

As diversas classes de lipídios tais como: ácidos graxos (FA- fatty acids), glicerofosfolípidos (GP), glicerolipídios (GL), esfingolipídios (SP), lípidios esterois (ST), lipídios de membrana tais como: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomiéline (SM), ceramida (Cer), fosfatidilserina (PS) fosfatidilinositol (PI) e sulfatida (ST) foram identificados e permitem diferenciar a composição da substância branca (ST 24:1) e da substância cinzenta (PS 18:0/22:6). A imagem obtida por DESI-MSI permite localizar cada íon pela sua m/z correspondente a uma determinada distribuição espacial (JARMUSCH et al., 2016).

As TABELAS 2 e 3 identificam os principais picos detectados no cérebro do camundongo no modo íon negativo.

Tabela 2: classes moleculares de lipídios presentes em tecido cerebral – alta resolução

Massa-Carga (m/z) medido	Calculado	Classe de Fosfolipídios	Fragmentação dos Íons (m/z)
599.3	599.3197	PI (18:0/OH)	283
716.5	716.5228	PE (16:0/18:1)	281, 255
722.5	722.5125	PE(16:0p/20:4)	303
726.5	726.5438	PE(18:1p/18:1)	281
728.6	728.5594	PE(18:0p/18:1)	281
742.5	742.5386	PE (18:1/18:1)	281
		PE (18:0/18:2)	279, 283
744.6	744.5543	PE (18:0/18:1)	283, 281
746.5	746.5119	PE (16:0p/22:6)	327
747.5	747.5161	PG (16:0/18:1)	255, 281
			255, 281
750.5	750.5438	PE (18:0p/20:4)	303
		PE (16:0p/22:4)	331
762.5	762.5286	PS (18:0/16:0)	255, 283
	762.5068	PE (16:0/22:6)	327,255
764.5	764.5229	PE (18:1/20:4)	303, 281
766.5	766.5387	PE (18:0/20:4)	303, 283
			303, 283
770.5	770.5699	PE (20:0/18:2)	279, 508
		PE (18:0/20:2)	283, 307
		PE (18:1/20:1)	281
774.5	774.5432	PE(18:0p/22:6)	327
778.5	778.5138	ST (d18:1/16:0)	
786.5	786.5286	PS (18:1/18:1)	281

		PS (18:0/18:2)	279, 283
788.5	788.5442	PS (18:0/18:1)	281, 283
790.5	790.5381	PE (18:0/22:6)	327, 283
794.5	794.5699	PE (18:0/22:4)	331, 283
806.6	806.5451	ST (18:0)	
810.5	810.5286	PS (18:0/20:4)	283, 303
816.6	816.5755	PS (18:0/20:1)	283, 309
833.5	833.5181	PI (16:0/18:2)	255, 279
834.5	834.5286	PS (18:0/22:6)	283, 327
837.5	837.5494	PI (18:0/16:0)	283
857.5	857.5181	PI (16:0/20:4)	255, 303
			255, 303
861.5	861.5494	PI (18:0/18:2)	279, 283
862.6	862.6077	ST (22:0)	
878.6	878.6078	ST (d18:1/h22:0)	
883.5	883.5337	PI (18:1/20:4)	281, 303
885.5	885.5494	PI (18:0/20:4)	283, 303
			283, 303
			283, 303
			283, 303
			283, 303
			283, 303
888.6	888.639	ST(24:1)	
890.6	890.6395	ST(24:0)	
904.6	904.6188	ST(d18:1/h24:1)	
906.6	906.6345	ST(d18:1/h24:0)	283, 327

Fonte: Adaptado
BERRY et al.,
2011

Tabela 3:
Classes
moleculares de
lipídios
presentes em
tecido cerebral
– baixa
resolução

Massa-Carga (m/z)	Classes Moleculares de Lipídios	Fragmentação de íons (m/z)
746,5	PE 16:0/22:6	255,3 327,2 418,2 436,3
747,6	PG 16:0/18:1	255,3 281,3 391,2 483,3
760,5	PS 16:0/18:1	255,3 281,3 391,2 673,5
774,5	Plasmenil - PE (18:0/22:6)	283,3 327,2 464,2 757,3
788,5	PS 18:0/18:1	281,3 283,3 419,4 701,4
790,5	PE 18:0/22:6	283,4 327,3 480,3 524,3
806,4	PS 16:0/20:4	255,3 391,3 409,2 436,3 719,4
806,7	ST (h18:0)	309,4 331,4 522,3 788,7
834,4	PS 18:0/22:6	283,2 327,3 419,3 747,4
857,5	PI 16:0/20:4	255,3 303,3 391,2 553,3
863,0	ST (22:0)	522,2 844,8
878,8	ST (h22:0)	522,3 568,3 860,3
881,5	PI 16:0/22:6	255,2 327,2 391,3 553,2
885,6	PI 18:0/20:4	283,2 303,2 419,2 581,2
888,8	ST (24:1)	390,2 522,3 650,2 870,8
906,8	ST (h24:0)	522,3 540,2 568,2 888,8
909,5	PI 18:0/22:6)	283,2 327,2 419,2 581,2

PE: fofatidiletanolamina X1:Y1/X2:Y2 indica o número de cadeias de ácidos graxos e o número

PG: fosfatidilglicerol de insaturações
PS: fosfatidilserina (hX:Y) representa sulfatida hidroxiladas
ST: sulfatida
PI: fosfatidilinositol

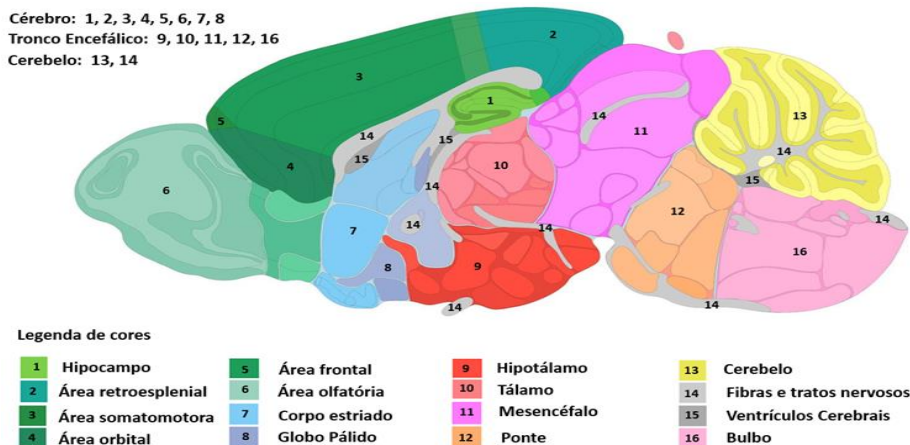
Fonte: Adaptado EBERLIN, 2012.

Estudos já sugerem que lipídios podem ser biomarcadores tumorais (ácidos graxos (FA)) se destacarem na regulação do gradiente eletroquímico, sinalização intracelular, transporte de proteínas, ancoramento de membrana, reserva energética, cofatores enzimáticos e ainda participem como precursores de hormônios estereoides e sais biliares (BARTLKE; HANNUN, 2009; MIRANDA; OLIVEIRA, 2015; WRIGHT et al., 2004;). São constituintes ainda das membranas celulares (principalmente glicerofosfolípidos) envolvidos na sinalização, regulação, proliferação e apoptose celular (FAROOQUI; HORROCKS, 2007). Os lipídios cerebrais, além de estarem envolvidos na neurotransmissão (neurolipídios como novos neurotransmissores) e sinalização intracelular, participam também da proliferação celular, crescimento e neuroproteção (OSBORNE; MEUNIER, 2001). Os receptores neurolipídicos podem ser classificados em canabinóides (CB), receptores para ácido lisofosfatídico (LPA) ou esfingomielina (SM) e receptores da proteína G (GPCR) (CHAN et al., 2012; GUAN et al., 2006; LAM et al., 2014; LEE et al., 2009).

A distribuição das diferentes espécies de lipídios nas diversas regiões cerebrais (neurônios, glia, oligodendrócitos, tratos nervosos, vasculares pericitos dentre outras) aponta para uma especialização dessas células em áreas discretas e núcleos no cérebro (CHAN et al., 2012; GUAN et al., 2006; LAM et al., 2014; LEE et al., 2009). DAG (diacilglicerol) são ácidos gordurosos tais como 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:4, 22:5 e 22:6 mais abundantes no SNC humano sem que um motivo fisiológico tenha sido atribuído (WILSON; BELL, 1993).

Essa distribuição topográfica permite o mapeamento molecular das diversas regiões neuroanatômicas nos dando uma maior compreensão da metabolômica cerebral. As regiões topográficas neuroanatômicas foram ilustradas conforme FIG 10.

Figura 10: Corte sagital cerebral



Fonte: Allen Brain Reference Atlases

A peroxidação de lipídios acarreta inúmeras disfunções celulares e a intensidade da oxidação pode ser mensurada através do monitoramento do malondialdeído (MDA) (NAIR et al., 1986; DRAPER e HADLEY, 1990; GULER et al., 2015). Os lipídios da membrana sofrem oxidação principalmente nas moléculas de colesterol e nos grupamentos cadeias alquílicas poliinsaturadas (grupo $\omega 3$ do ácido linolênico e grupos $\omega 6$ do ácido linoleico) hidrofóbicas dos fosfolipídios, acarretando alterações importantes das propriedades físico-químicas da membrana como a sua fluidez, por exemplo. (NIKI, et al., 2005; CATALA, 2006)

A oxidação dos lipídios da membrana ocorre com o envelhecimento e em doenças neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer (DA). (SAYRE, et al., 1997; MARKESBERY, 1998; MONTINE, et al., 2002). O stress oxidativo é importante no desenvolvimento inicial da DA evidenciando um aumento expressivo da peroxidação lipídica (FENG et al., 2006; CHANG et al., 2008; CHANG et al., 2014; SNALINA et al., 2014). Estudos recentes sobre diagnósticos e uso de biomarcadores da doença de Alzheimer (DA) demonstram que além dos testes neuropsiquiátricos para avaliação da cognição, ressonância magnética (RM) para imagens estruturais e tomografia por emissão de pósitrons (PET) para neuroimagem funcional (MORETTI, 2015) a fim de evidenciar alterações estruturais e neurofisiológicas, a análise do líquido cefalorraquidiano também permite a análise de biomarcadores o que aumenta a especificidade do possível diagnóstico. (ALBERT et al., 2011; BERTENS et al., 2015).

A avaliação por biomarcadores moleculares permite uma avaliação precoce possibilitando antecipar até mesmo um possível diagnóstico (CUMMINGS, 2010). Já existem evidências de biomarcadores que podem ser utilizados a partir de biofluidos periféricos (sangue, plasma, urina) com possibilidade de serem incorporados no uso clínico de rotina para o diagnóstico precoce da DA. Pode-se citar, a proteína β amiloide que foi encontrada em amostras

de urina (TAKATA et al., 2008) e em amostras de sangue foram detectados inúmeros e altamente promissores biomarcadores da DA tais como microRNAs, apolipoproteína E, microglobulina B2, angiopoietina, ceramida-esfingomielina, alelos APOE ϵ 4, anticorpos β amilóides, proteína β amilóide, proteínas tau e biomarcadores de estresse oxidativo. (GARCÍA-BLANCO et al., 2017). Amostras de córtex cerebral e hipocampo já demonstraram altas concentrações de MDA e de proteína carbonila (PC) demonstrando a importância da formação da peroxidação lipídica no desenvolvimento DA. (NIEDZIELSKA et al., 2015).

O aumento das ROS e RNS (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente) acarretam danos oxidativos moleculares e estruturais intracelulares (ácidos nucleicos, proteínas e enzimas, lipídios) (ZABEL et al., 2013). A oxidação da catalase, uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio formado no metabolismo de aminas, acarreta perda de proteção do metabolismo cerebral pelo aumento da concentração de peróxidos intraneuronais. (BAGCHI et al., 1995) A peroxidação lipídica é um dos principais efeitos induzidos pelo estresse oxidativo e pode ocorrer rapidamente no cérebro devido à presença de membranas ricas em ácidos graxos poliinsaturados altamente peroxidáveis. (BAGCHI et al., 1995). A peroxidação do ácido araquidônico esterificado, constituinte da membrana celular, favorece principalmente a formação dos isoprostanos (compostos formados durante a peroxidação do ácido araquidônico e de outros ácidos graxos poliinsaturados, como o linolênico, o eicosapentaenóico (EPA) e o doco-sahexaenóico (DHA), acarretando em alterações físico-químicas importantes na alteração da fluidez e inativação dos receptores transmembrana enzimáticos responsáveis pela sinalização intracelular e nuclear. (PEÑA-BAUTISTA et al., 2019)

Alguns trabalhos demonstram que um subproduto da peroxidação lipídica foi identificado como a-cetoaldeído isocetais, provenientes do ácido araquidônico (AA) e neurocetais provenientes do DHA. O cetoaldeído apresenta alta capacidade reativa, sendo capazes de modificar as demais biomoléculas (proteínas e ácidos nucleicos) e sua quantificação pode ser utilizado para mensurar o dano oxidativo. (DAVIES et al., 2002). Os subprodutos oxidados lipídicos bem como DNA/RNA, podem ser mensurados nos fluidos periféricos por níveis aumentados de malondialdeído (MDA) e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG)/8-hidroxiguanosina (8OHD) respectivamente (BLANCO et al., 2017). Os níveis aumentados de malondialdeído (MDA) e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) também foram mensurados na urina, LCR e sangue em outras doenças neurodegenerativas como Esclerose Lateral

Amiotrófica (ELA), Doença de Parkinson (DP) e doença de Huntington (DH). (CHANGA et al., 2018).

Na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), a peroxidação lipídica apresenta um componente importante no desenvolvimento da doença e foi detectado um aumento importante de MDA, isoprostanóides (IsoPs) e 8-OHdG s e 8-OHdG nos tecidos cerebrais e no LCR (BLASCO et al., 2016; SHARVARI LOTANKAR et al., 2016). Na doença de Parkinson verificou-se a presença de MDA, e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) no LCR e nos líquidos periféricos e a proteína carbonila (PC) presente em regiões específicas cerebrais (putamen e núcleo caudado) (SHARVARI LOTANKAR et al., 2016).

Na doença de Huntington, a peroxidação lipídica apresenta um componente importante no desenvolvimento da doença, principalmente presente pela alta concentração de MDA no plasma e a presença de isoprostanos no corpo estriado. (BROCARDO et al., 2015; CHANGA et al., 2018; HATAMI et al., 2018)

Ataxia de Friedreich (FRDA) é um distúrbio neurodegenerativo autossômico recessivo, afetando os gânglios da raiz dorsal (DRG), núcleos dentados cerebelares e coração e é causado por uma mutação no gene da frataxina (FXN) acarretando diminuição progressiva da transcrição da proteína mitocondrial frataxina. A frataxina e o stress oxidativo pelas ROS/RNS impactam na sobrevivência das dos neurônios do grânulo cerebelar (CGNs) e induzem a comprometimentos mitocondriais. (ABETI et al., 2018)

Estudos apontam o importante papel que o estresse oxidativo/peroxidação lipídica exerce na fisiopatologia tanto da DA com na DP. Na DA foi evidenciado uma associação direta de PUFAs ômega-3, principalmente DHA, com a diminuição da formação peptídeos β -amiloide. A diminuição de DHA foi associado a uma maior agregação de peptídeos β -amiloide principalmente identificado na região do hipocampo. (LUKIW et al., 2005). Na DP, foi apontado forte correlação entre a taxa de oxidação de neurônios dopaminérgicos associado ao aumento de ferro, níveis diminuídos de glutatona total e produção de ROS/RNS induzindo a apoptose celular na região com alta concetração de neurônios dopaminérgicos. (CHINTA et al., 2008).

A peroxidação lipídica é extremamente danosa ao SNC. A homocisteína (Hcy) pode contribuir para a neurodegeneração através da promoção do estresse oxidativo induzindo a apoptose dos neurônios cerebelares de Purkinje. Estudos apontam que a hiper-homocisteinemia (hHcy) acarreta anormalidades neurológicas, como retardo mental, atrofia, demência e convulsões. A Hcy foi induzida em cérebros de ratos acarretando diminuição da enzima

antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) no córtex motor e aumento dos níveis de malondialdeído (MDA, biomarcador de peroxidação lipídica). O aumento de MDA foi associado a indução do aumento da apoptose das células de Purkinje cerebelares. (KOOHPEYMA et al., 2018).

Os marcadores de peroxidação lipídica foram implicados em estudos referentes ao início do declínio cognitivo em processos neurodegenerativos demenciais. Alterações físico-químicas na membrana acarretam modificações na fluidez e no potencial de membrana determinando disfunções na neurofisiologia das sinapses. As concentrações séricas de marcadores de peroxidação lipídica (LPH - hidroperóxidos lipídicos, 8-isoprastano, 8-ISO; 4-hidroxi-2-nonenal, 4-HNE) foram mensurados e foi verificado que 8-ISO se associa a uma melhora no desempenho da memória e da função executiva e já o aumento de outras relações tais como 8-ISO / LPH e (8-ISO + 4-HNE)/LPH foram associadas com uma piora no desempenho na execução de determinadas funções. (SURIDJANA et al., 2017)

3 THERAPIES AND PERSPECTIVES IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME¹

ABSTRACT

Glioblastoma multiformes (GBM) are tumors derived from glial cells that correspond to about 54% of all malignant intracranial tumors, configuring the most aggressive type in the group of gliomas. A systematic review was carried out on databases in the period from 2008 to 2020 about the relevant treatment modalities for GBM, recalling the recent advances that have been occurring in oncology. The management of the GBM patients is multidisciplinary, and a suitable treatment varies according to the patient's clinical condition, most cases opting for partial or total surgical resection followed by adjuvant chemotherapy and / or radiotherapy. Despite efforts, most patients persist with unfavorable evolution and local recurrence in about 7 months later due to the infiltrative-diffuse growth pattern of the lesion. At the time of recurrence, the surgical approach should always be considered and discussed together with chemotherapy treatment with temozolomide associated with re-radiation. Despite adequate treatment, the median survival of patients with GBM varies from 12 to 15 months. The management of the patient with GBM presents a challenge when considering the aggressiveness of the treatments and the considerable low survival. It is observed that there are still therapeutic possibilities that demand more scientific research and, therefore, are paths of hope for patients.

Keywords: Glioblastoma Multiforme (GBM), radiotherapy, radiosurgery, temozolomide, TTF, immunotherapy.

3.1 Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is a diffuse tumor derived from glial cells including astrocytes, oligodendrocytes and ependymal cells. These lesions, classified as grade IV gliomas by the World Health Organization (WHO), correspond to the most common brain tumor in adults, being one of the most lethal human cancers.^{1,2} The grade IV gliomas distinguish from low grade by the presence of a necrotic foci, typically surrounded by "pseudopalisading" cells - a cell configuration and microvascular hyperplasia, by the conditions of migration at a distance from primary tumor and of its high invasive potential.³ The prevalence in the general population

¹ Artigo aceito e apresentado em novembro de 2018, na IV Semana de Engenharia Nuclear e Ciências das Radiações (SENCIR IV). Autores: Matheus F. Soares Mingote (UFMG), Daniel Moore Freitas Palhares (Hospital Sírio-Libanês), Tarcísio P. R. Campos (UFMG), Warne Pedro de Andrade (Unesp), Fernanda de Catella Marcello (Uni-BH), Niara Rodrigues Torquato (Uni-BH).

is 3.19 cases for each 100,000 inhabitants per year, affecting about 1.57 times more men than women and presenting a peak incidence between 45 and 70 years, with an average age of 65 years.^{4,5}

3.1.1 Risk factors

Some risk factors have an association with the probability of developing GBM. The environmental exposure of ionizing radiation definitely increases the risk of glioma development, which can be observed mainly after radiotherapy treatment of other tumors in children⁶. A large risk can also be observed in some hereditary syndromes such as Cowden, Turcot, Li-raumeni, neurofibromatosis type 1 and type 2, tuberous sclerosis and familial schwannomatosis⁶. Genetic mutations can lead to GBM, related to the activation of the three main signaling pathways, as described: the tumor protein p53 pathway; tyrosine kinase/Ras/phosphoinositide 3-kinase signaling pathway, and the retinoblastoma protein pathway.

The Tumor Protein 53 (TP53) is a protein responsible for regulating the cell cycle, that is, acting as a tumor suppressor stimulating DNA repair and apoptosis. Through checks for mutations during cell division, p53 activates repairing proteins or blocking proteins to block gene alteration. If repair is not possible, the p53 protein prevents mitosis by inducing the apoptosis process or definitively prevents new cell replication by inducing cell senescence⁷.

The receptor tyrosine kinase/Ras/phosphoinositide 3-kinase signaling pathway, called Protein tyrosine kinases (PTK), are responsible for protein phosphorylation. They are classified into two families: Receptor Tyrosine Kinases (RTKs) and Non-receptor Tyrosine Kinases (NRTKs). Ras protein, encoded by ras proto-oncogenes, is an extracellular signal transducer, being an important route in the transmission of information from the cell membrane to the nucleus and shares structural and functional characteristics with the cell membrane G protein. The phosphoinositide 3-kinase or phosphatidylinositol 3-kinases (PI 3-kinases or PI3Ks) are a family of enzymes involved in the activation of the intracellular signaling cascade of Akt, a specific serine / threonine protein kinase. The three proteins are involved in the processes that will act in gene expression in the processes of proliferation, growth, differentiation, mobility, intracellular transport and regulation of cell longevity / apoptosis⁸.

The retinoblastoma protein pathway addresses the retinoblastoma protein (protein name abbreviated pRb; gene name abbreviated RB or RB1) that is a tumor suppressor

protein. The Rb Protein (pRb) is a molecule encoded by the Rb gene that works as a universal regulator of the cell division cycle, performing the control so that the cells may or may not start the cell cycle and replicate their DNA. The RB protein controls passage from G1 into S phase of the cell cycle. The PRb is an inhibitory protein of the regulatory proteins of genes of the E2F family (activators of the S phase) that prevents the cell from starting to replicate DNA. Inhibition is carried out by phosphorylation of pRb by several Cyclin Dependent Kinases (Cdks), which cause pRb to release its inhibitory domain in the E2F protein⁹.

3.1.2 Clinical presentation, diagnosis and survival

GBM is most commonly located in the subcortical white matter, in the supratentorial region, which comprises the frontal (23%), temporal (31%), parietal (24%) and occipital lobes (16%). The main symptoms evidenced in these patients are headache and/or seizure (30.1%), weakness (20.3%), memory impairment (15%), visual impairment (7.5%), speech impairment (6%) and loss of consciousness (3.8%). Others can be enumerated as papilledema, cognitive difficulties, personality changes, gait imbalance, incontinence and focal signs such as hemiparesis, sensory loss and seizures^{6,10,12}.

In view of the clinical suspicion of GBM, the propaedeutic imaging is of great value. Magnetic resonance imaging (MRI) with gadolinium or computed tomography (CT) can be used to provide the initial diagnosis before surgical resection. Histopathological analysis of the tissue is necessary to confirm the diagnosis and is usually obtained by surgical resection or stereotactic biopsy, when the resection is not viable. MRI is most commonly used to detect brain tumors and define the desired volume for surgical resection. Meanwhile, CT may allow GBM to be distinguish from other tumors.¹³

GBM is associated with survival of about 12 to 15 months, and the prognosis is even more reserved for elderly patients.² This unfavorable picture of the disease is associated with issues such as cell diversity present in the tumor, potential brain damage during treatment, the limited brain capacity to self-repair and the difficulty of various chemotherapeutic substances in penetrating the blood-brain barrier (BBB) to act in the tumor focus, leading to an increase in the complexity of the treatment.^{3,14} These factors are associated with the high recurrence rate tumors, which occurs on average at 6.9 months. These patients will need a new individualized approach to assess the eligibility and feasibility criteria for new surgical resections, new irradiations and new chemotherapy cycles.¹⁵

In view of this situation, therapeutic plan capable of providing the best tumor response for control, holding a lower rate of toxicity and side effects, becomes relevant. The treatment initially consists of safe surgical resection, followed by chemotherapy (QT) and radiotherapy (RT) concomitant and / or adjuvant to Temozolomide (TMZ).¹⁶ The multimodal treatments of GBM have important healing limitations; however, promising responses that lead to improved quality of life, decreased disease progression and increased survival. Thus, the present review aims to address the clinical-surgical approaches that may improve the patients' survival.

3.2 Methodology

For data collection, articles were consulted from 1995 to 2020, in the databases CAPES, PUBMED (National Library of Medicine and The National Institute of Health), MEDLINE (US National Library of Medicine), SciELO (Scientific Electronic Library Online), Science Direct, Trip Database, Accessss, DynaMED, UpToDate e Cochrane. In the search strategy, the keywords used were glioblastoma multiforme (GBM), radiotherapy, radiosurgery, temozolomide, immunotherapy used in each database.

3.3 Revisional approach in the therapies

3.3.1 Surgery

Surgical resection of GBM in different age groups is generally necessary, bringing benefits as the reduction of the intensity of symptoms and survival improvement. Its performance, however, has limitations due to the infiltrate tumor property and its presence near important anatomic structures, making impossible to perform wide surgical margins. Besides, a radical approach can generate new neurological deficits and contribute to greater morbidity and worsening of the patient's quality of life.^{15,13,16} Elderly patients have a worse prognosis due to less tolerance to surgery, with high peri and postoperative morbidity and mortality, and deterioration of the neurological condition (KPS <70 - Karnofsky Performance Scale).²¹

Complete macroscopic excision of the lesion is possible when the tumor visibility is good; however, some viable glioma cells often remain as residues at the tumor site and resume clonogenicity. Considering this risk, it is understandable that isolated surgery, in general, is inadequate as a definitive therapy in the treatment of gliomas. Its importance, however, cannot

be underestimated if performed in conjunction with other modalities for complete eradication of tumor cells.^{13,16}

The surgery goal is to perform the largest possible resection preserving the neurological function, in order to reduce symptoms, the expansive and compressive effects on healthy brain tissue, and the dependence on corticosteroids. Subtotal resection can be a reasonable approach in many cases, further contributing to diagnostic confirmation through histological and molecular examinations.^{13,16} In the impossibility of performing a significant resection due to its anatomical condition, a stereotactic biopsy must be performed to establish the diagnosis. In this case, the limited amount of tissue extracted may not allow molecular characterization.¹⁸

GBM resection is necessary to reduce the tumor mass and, therefore, the compressive effect and its associated symptoms. In addition, it is important in defining the histopathological diagnosis and therapeutic protocols, since RT and QT are guided by tissue biopsy.¹⁹ Resections above 98% increase the effectiveness of the adjuvant therapies, whereas partial resections can exacerbate tissue edema and increase the risk of bleeding in the postoperative period.¹⁵ Therefore, the determination of the extent of resection is an important fact in the treatment approach, since the performance in its entirety is not a reality in glioblastomas.

Imaging techniques such as intraoperative ultrasound and fluorescence-guided surgery coupled with a surgical microscope have been used to enlarge the surgical margins and with a better post-surgical evolution. Neuronavigation, a technique using preoperative radiological images associated with intraoperative MRI, can provide reliable images during tumor resection, increasing the resection area by up to 28%.⁶

3.3.2 Chemotherapy

Due to the infiltrative nature of glial neoplasms, microscopic cancer cells extend beyond the area of abnormality shown on MRI. Local treatment with surgery and RT is often not sufficient to prevent tumor recurrence, and, in general, systemic therapy is required. However, a limited number of drugs have demonstrated effectiveness in the management of these tumors. Alkylating agents, such as nitrosureas and temozolomide, have been the most successful in this area and continue to be the basis of current therapy.²²

3.3.2.1 Temozolomide (TMZ)

Temozolomide (TMZ) is an imidazotetracenic oral alkylating agent with antitumor activity that undergoes rapid chemical transformation at physiological pH, resulting in the active compound monomethyl-tria-ceno-imidazole-carboxamide (MTIC).¹⁹ It has good penetration into the central nervous system (CNS) due to its lipophilic property, providing great diffusion capacity in the BBB and optimization of antitumor activity. Holding well-known good results, it has been considered the drug of choice in the chemotherapy of GBM patients. Although, the drug has toxic effects, such as myelosuppression, nausea, hematological complications, fatigue and infections.¹⁹ Compared to isolated radiotherapy, the use of TMZ increased patients' survival in 2 years, with considerable improvement in quality of life; however, it is still palliative.²⁰

The cytotoxicity presented by TMZ is related to the transport of the methyl group located at the O7 and N7 positions of guanine and N3 of adenine during DNA replication, forming O6-methylguanine (O6-MG) and N3-methyladenine (N3-MA). The consequence of this is the breakdown of DNA, with the arrest of the cell cycle and eventual cell apoptosis.²⁰ Despite its wide clinical use, an increasing number of cases resistant to this mechanism of action are described in the literature, contributing to the therapeutic failure in about 55% of patients.²¹ In these cases, it is difficult to reduce progression or prevent recurrence, generating a worse prognosis.²⁰

The most accepted justification for this chemoresistance is the action of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), which repairs cytotoxic base pairs. Other mechanisms are also being studied, highlighting the evidence of a population of cancer stem cells that have a high capacity for differentiation and would be responsible for the initiation and progression of the cancer process, as well as for resistance to therapy.^{20,21} The main mechanisms proposed are described in Table 1.

The definition of the origin of chemo-resistance to TMZ is still a controversial topic and may even be induced by the use of TMZ. The elucidation of the questions related to this topic is extremely important to increase the rate of response to treatment, reaching the proposal of inhibiting MGMT, regulating MMR, multicatalysis and autophagy. The reprogramming of stem cells is a great goal, but not yet palpable.²⁰

The use of TMZ combined with RT is associated with increased survival compared to the use of radiotherapy alone.^{22,23} TMZ is administered at a dose of 75 mg.m⁻² daily during regional RT, followed by six adjuvant cycles at the dose of maintenance of 150 mg.m⁻² daily

for 5 days. Depending on the tolerance presented by the patient, the dose is increased to mg.m^{-2} administered for 5 days every 28 days.^{21,22} Patients favorably to treatment with RT associated with TMZ have a median survival of 23 months and a survival rate of 5 years of 14% when compared to RT alone, whose numbers are 15 months and 5%, respectively.⁴ Elderly patients may be candidates for this treatment modality in a palliative way, with a decrease in the dose of corticosteroids and improvement in KPS.¹⁵

Table 4: Main molecular mechanisms promoting TMZ chemo-resistance.

Possible resistance mechanism	Description
O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)	MGMT is a DNA repair enzyme that acts directly on the methyl group of O6-MG, canceling the action of TMZ.
Mismatch Repairs - MMR	The O6-MG is incompatible with a thiamine in a DNA replication that signalizes to the repair mechanism which corrects the “daughter” sequence. The “mother” sequence, however, remains incompatible, generating a futile cycle that eventually drives the cell to apoptosis. A mutation in the genes responsible for this mechanism may be induced by the TMZ itself, generating path interruption and reducing the action of the drug. It is a rare condition.
Base withdrawal repair	These are multi-analytical reactions generated by DNA glycosylase, endonuclease, polymerase and DNA ligase, which repair the changes made by TMZ. Its regulation can contribute to the treatment of TMZ-resistant patients, despite having a less important role than MGMT and MMR.
Autophagy	Cell protection mechanism stimulated by DNA damage, among other reasons. The change generated by TMZ would be considered a signal for the occurrence of autophagy, and may be related to drug resistance. The studies are still preliminary and their relationship remains controversial.
Glioma cell stem (GCS)	GCS are cells capable of self-regulation and differentiation, generating resistance to chemo and radiotherapy. They are able to reprogram the tumor microenvironment and regain malignancy. It may be the reason for the occurrence of cases of recurrent GBM.

Source: Modified from Jiaper S, 2018.²⁰

3.3.2.2 Nitrosureas

Cytotoxic therapy against GBM also includes drugs such as Carmustine (BCNU), Lomustine (CCNU) and PCV, used in combination with TMZ and / or other treatment modalities. Nitrosureas have been shown to increase patient survival at 43 weeks in those under 60 years old and 24 weeks in those over 60 years old, despite myelosuppressive complications in 35% of older patients.¹⁵

3.3.2.2.1 BiCNU: Carmustine

The 1,3-bis (2-chloroethyl) -1-nitrosurea (BCNU; carmustine) acts by forming DNA bonds in the cell, preventing its replication or transcription.²² The use of this drug has not yet been adopted worldwide, despite be included as a 2B referral level on the *National Comprehensive Cancer Network guideline*. The studies show an increase in the mean survival, but they also showed adverse events with seizures, intracranial hypertension and neurological decline in the postoperative period, which reduces the safety of use.²⁴ There is evidence that these serious side effects were not associated with GBM. Recurrent cases also give favorable results.²² New studies are under development to elucidate the safety of the use of this drug, as well as to develop association measures to reduce side effects.²⁴

3.3.2.2.2 CCNU: Lomustine

The 1- (2-chloroethyl) -3-cyclohexyl-1-nitrosurea (CCNU) is a drug that generates methylation in the “mother” DNA strand, which prevents its proper transcription and cell division. It stands out for its liposolubility, which allows it to easily overcome BBB, being suitable for the treatment of malignant brain lesions.²² Wick et al., 2017 conducted a randomized study with 437 patients to compare the use of isolated Lomustine and the drug associated with bevacizumab, with only a slight extension of progression-free survival in the second group. This study also showed survival of 9.1 months in patients with primary glioblastoma and 7.5 months in those with recurrence, treated with Lomustine.²⁵

3.3.2.2.3 PCV: Proccarbazine Hydrochloride, Lomustine (CCNU) and Vincristine Sulfate

PVC is a multidrug QT based on nitrosureas, indicated as a treatment option for cases of GBM recurrence, with survival, time to progression and side effects similar to TMZ. Researchers advise caution in its use, given the limited amount of research on PVC.²⁶ Lassman (2015) points out an important association of toxicity of the standard PCV dose with a higher rate of treatment interruption when compared with TMZ. Despite this fact, there were evidences of lack of data analysis of these studies due to differences in response criteria and histopathological diagnosis. Thus, the author supports the idea of a better efficacy in the GBM treatment with PCV.²⁷

3.3.3 Radiotherapy

RT provides ionizing radiation to produce free radicals, generating changes in the DNA double helix, single and double strand DNA breaks (SS- or DS-breaks), that leads to apoptosis or stop cell clonogenicity. In general, RT is administered in fractional doses, allowing a suitable time to repair sublethal lesions in healthy tissue cells. The tolerance of the CNS to radiation is mainly given by the value of the dose fraction and the total dose applied. Late radiation side effects in the CNS tend to appear months or years after the end of RT.¹⁸

The histological diversity of GBM directly implies malignancy and clinical-therapeutic prognosis. Surgical and radiotherapy re-approaches are still restricted to selected groups of patients due to the risks of the radiotoxicity, with cerebral necrosis and cognitive decline.^{15,19} Improvements in patient positioning associated with the development of image processing allowed a more precise definition of the target volumes and a greater dose versus volume conformation in RT, limiting toxicity due to the reduction of volumes of adjacent health tissues.

The following modalities of RT can be cited: external beam radiotherapy (External Beam Radiotherapy - EBRT), radiosurgery (Stereotactic Radiosurgery - SRS), fractionated stereotactic radiotherapy (Fractionated Stereotactic Radiotherapy - FSRT) and interstitial brachytherapy.²³

Intensity Modulated Radiation Therapy (IMRT) is a modality of EBRT that offers less adverse effects and preserves organs at risk. IMRT applies a limited number of modulated portals with distinct intensities in angular orientations, incorporating more conformationality in the therapy.²⁸

SRS uses 3D planning techniques with narrow and collimated beams, known as “pencil beam”. They produce a high dose gradient bypassing the clinical target volume (CTV)

employing multiple converging arc fields, typically 9-12, using a stereotaxic frame. SRS allows to apply an intense prescribed dose in a reduced target volume preserving the adjacent critical structures.^{30,31,32}

In turn, FSRT is similar to radiosurgery, the dose-effect relationship has shown that the prescribed dose of 60 Gy administered in 30 fractions over 6 weeks provides greater survival when compared to the lower prescribed dose with a higher fractional dose in the low-fractionated planning, resulting in short duration of treatment.^{15,29,32} In elderly or debilitated patients, accelerated low-dose therapy can be recommended, being administered in 3-4 weeks and reaching the target volume of 40-50 Gy. This modality acts as a palliative treatment for patients with good neurological performance (KPS greater than 70) and small recurrent tumors.^{15,32}

In brachytherapy, radioactive sources are placed in direct contact with the tumor areas by means of implants of needles, seeds or threads. It has been used mainly in cases of recurrence of the primary brain tumors, also acting on tumor infiltrations and sparing part of the normal tissue that surrounds the tumor.^{33,34} In this field of action, brachytherapy with a Californium needle associated with boron neutron capture therapy (BNCT) shows superior results due to the ability of boron to react with neutrons producing high cell in situ dose and the greater capacity of cancerous cells to absorb borate compounds than normal cells, allowing for selective cell selection and irradiation.³⁴ Studies show increased 8 to 15 month survival without evident changes in KPS and quality of life, but they also describe radionecrosis as a risk that should be considered.³⁵

3.3.4 TTF (Tumor Treatment Fields)

Tumor field treatment (TTF) is a newly approved propaedeutic for the treatment of newly diagnosed supratentorial GBMs and / or for recurrent ones. TTF therapy involves a device consisting of transducer arrays capable of generating and providing alternating low intensity electric fields with intermediate frequency, acting directly on the cytoskeletal deregulation, decreasing depolymerization / repolymerization of mitotic microtubules resulting in aneuploid divisions and cell death, with decreased tumor clonogenicity.^{36,37}

Stupp et al. (2015) report a randomized control study in which they evaluated the efficacy and safety of TTF fields used in combination with maintenance treatment with temozolomide after chemoradiation therapy in patients with glioblastoma. The study was

carried out with 695 patients. In the study analysis, the addition of TFF significantly improved the overall progression-free survival of 315 patients who had completed chemoradiation.³⁸ Another study that corroborates with Stupp and collaborators (2015) was the summary presented at the American Society of Oncology conference Radiology (ASTRO) 2018. A phase three study showed that the use of the TFF device and the TMZ improved overall survival by up to five years in the three classes of recursive partitioning analysis (RPA).³⁹

For treatments of recurrent GBM, TTF fields provided efficacy comparable to systemic therapy, with better rates of quality of life without serious adverse events. The primary toxicity associated with TTFs is skin irritation, which can be managed by relocating matrices and topical treatments with antibiotics and steroids, if necessary. In addition to the absence of systemic side effects, TFF is a minimally invasive therapy that has a promising role in the management of GBM, considering that the patient is subjected to strenuous treatments, such as surgery, QT and RT. As it is a relatively new treatment, further research is still needed.^{38,39,40}

3.3.5. Immunotherapy

Immunotherapy, in general, is used as a complementary therapy to conventional treatments (surgery, QT and RT) of glioblastoma multiforme. It is a procedure that, in addition to protecting the patient from metastasis or disease recurrence, can generate a specific response and long-term immune vigilance, that is, the immune system is able to identify a tumor antigen or alteration in the tissue and invest in neoplastic cells.^{41,42}

It must be considered that the tumor itself can cause immunological suppression in the organism.⁴³ In this sense, multiple clinical studies have studied the innumerable possibilities of immunotherapy in this pathology, since the tumor has a great resilience in treatment. One of these studies consists of evaluating the efficacy and safety of dendritic cell-based (DC) vaccination in glioblastoma, based on a meta-analysis of randomized clinical trials.⁴⁴ In this study, six phase II randomized controlled trials includes 347 patients with recently glioblastoma diagnosis or recurrences, undergoing conventional treatments. Such group was compared to the control group provided by placebo or blank treatment. The findings were that the vaccine was associated with significantly improved overall survival in patients with glioblastoma.

The combination of the blockade of the antiphagocytosis molecule CD47 with temozolomide has a significant result in immunotherapy.⁴⁵ It is known that phagocytosis performed by antigen presenting cells (APCs) can be suppressed by the tumor cell through

positive regulation, by the antiphagocytosis molecule CD47.⁴⁶ The study demonstrated that blocking the molecule with the drug has a significant effect of phagocytosis as well as improving the cross presentation of antigens, which leads to more efficient adaptive antimural responses.

Another strategy is RNA therapy. The growth factor beta 2 (TGF β 2) is ceaselessly studied as an alternative for the treatment of GBM, since it has already been demonstrated that the amplification of the TGF β -SMAD signaling pathway contributes to the malignant phenotype and poor prognosis of GBM.^{47,48,49} OT101 is a first-class therapeutic RNA developed to cancel the immunosuppressive actions of the transformation of growth factor beta 2 (TGF β 2).⁵⁰

Uckun et al. (2019) conducted a Phase 2 clinical trial in which OT101 was administered intratumorally to 89 patients with high-grade glioma (HGG), 62 of them with glioblastoma multiforme. The study demonstrated that OT101 RNA therapy was clinically significant when used alone, without other anticancer drugs. RNA provided robust reductions in tumor size; early transient increase in tumor edema and pseudo-progression that preceded tumor reduction.⁵⁰

A new group of drugs has been gaining ground in studies in patients with glioblastoma, although little is known about the associated adverse effects: they are immunological checkpoint inhibitors (ICPIs).⁵¹ The main inhibitors are linked to antibodies related to interaction of programmed death 1 (PD-1) and its programmed ligand, PD-L1, which is expressed by glioblastoma. When triggered, this process intensifies the inhibition of T lymphocyte by tumor cells and, therefore, its presence identifies tumors with a worse prognosis.⁵² When considering the mortality associated with the tumor, the researchers emphasize the need for further studies to assess the toxicity of drugs and the effects of use associated with other treatment modalities.⁵³ The biggest challenge is in identifying the threshold between the intensity of the immune response required for treatment and the adverse inflammatory and autoimmune effects.⁵⁵

3.3.5.1. Nivolumab and Ipilimumab

The Checkmate 143 study evaluated, in its first phase, the efficacy of anti-PD-1 (Nivolumab) with and without association with anti-CTLA-4 (Ipilimumab) in 40 patients diagnosed with GBM. It presents as outcomes the partial response in three patients and lesion stabilization in eight patients for more than 12 weeks. Treatment with Nivolumab alone appears

to be better tolerated compared to its association with Ipilimumab,^{51, 52, 53} with the dose of this drug being the most related to treatment tolerability. The researchers emphasize that the safety of the treatment is promising, but still premature, requiring further research.⁵⁴

The adverse effects associated with ICPIs are still worth investigating. The importance of inflammatory and autoimmune events is evidenced, mainly related to the use of Ipilimumab, with description of severe cases of colitis, pneumonitis and hypophysitis. The association with Nivalumab was related to a considerable number of treatment discontinuations due to serious adverse effects (29.4%).⁵⁵ The Checkmate 143 study presents fatigue and diarrhea as the most described side effects, being more frequent in the groups in which it was performed association of drugs.⁵⁴

3.3.5.2. *Pembrolizumab*

Pembrolizumab acts by blocking the PD-1 checkpoint and is already approved as the first option for the management of patients with advanced non-small cell lung cancer expressing PD-L1.⁵¹ The non-randomized study Keynote-028 evaluated the effect of pembrolizumab in patients with positive PD-L1 solid tumors in 475 patients, including 25 with glioblastoma. Of these, 12 achieved disease stability and, like Nivolumab, Pembrolizumab appears to have an acceptable safety profile.^{52, 56}

The expression of PD-L1 in cells acts as a determinant of the response to the use of this drug, being better in tumors with higher levels of inflammatory and mutation biomarkers. The authors argue that the search for these markers may help to identify patients with better response to treatment within the spectrum of solid tumors.⁵⁶

Cloughesy et al. (2019) conducted a randomized study with 35 patients with recurrent GBM, with 16 assigned to the group to receive Pembrolizumab and 19 directed to adjuvant treatment, only. Five patients were excluded over the course of the study. At the time of publication of this study, nine patients in the first group had death as an outcome, compared with 12 in the second group. It was evidenced, with statistical relevance, an increase in overall survival in the first group, but the disease-free survival was not precisely identified, since it can be influenced by the occurrence of pseudoprogression. The authors classify the results as satisfactory, emphasizing the need for more clinical studies to prove the effectiveness and safety of the treatment.⁵⁷

3.3.6 Combined therapies

Several studies present the possibility of associating the various therapies currently proposed for GBM. As already described in subtitles above, there are protocols that already use these methods in an attempt to improve survival and quality of life. In this topic, associations that are still the target of research will be presented, but which aim to facilitate the clinical management of patients.

3.3.6.1 Surgery associated with chemotherapy

It is proposed to use an implantable chemotherapy device, Gliadel® (Carmustine) as a local therapy. Its implant is designed in the tumor resection bed and provides a controlled release of 7mg of carmustine for about 5 days. In theory, this would reduce systemic toxicity and allow the delivery of a higher dose of the drug. Implantation of the device at the time of surgery would also simplify subsequent management, logistics, compared to systemic QT, which is usually administered over a period of about six months. Gliadel® resulted in an increase in survival compared to placebo in primary disease (HR 0.65, CI 0.48 to 0.86, P = 0.003). It did not show a significant increase in survival for recurrent disease (HR 0.83, 95% CI 0.62 to 1.10, P = 0.2).⁵⁹

3.3.6.2 QT associated with RT

Perry et al. (2017) conducted a randomized study with GBM patients aged between 65 and 90 years, dividing them into groups to be treated with RT and RT associated with TMZ concomitantly with adjuvant. The median overall survival was higher in the second group (9.3 months vs. 7.6 months), being even higher in those with MGMT (13.5 months vs. 7.7 months). The quality of life was similar in the two study groups, but in elderly people with GBM, the addition of TMZ to the treatment resulted in longer survival compared to RT alone.⁶⁰

3.3.6.3 TFF associated with QT

Stupp and collaborators (2017) conducted a randomized study to assess the effectiveness of using TMZ alone or the association of TMZ and TTF. Progression-free survival of the disease was 6.7 months in the TTF-TMZ group compared to 4.0 months in the TMZ group. Overall survival was 20.9 months in the TTF-TMZ group and 16.0 months in the TMZ group. The frequency of systemic adverse events was 48% in the TTF-TMZ group and 44% in the TMZ group. Mild to moderate skin toxicity occurred in 52% of patients who received TTF-TMZ, an event not identified in the TMZ group. They therefore concluded that the management of TTF-TMZ shows a statistically significant improvement in the treatment of GBM, despite the side effect.³⁶

3.3.6.4 Associated immunotherapy

A limited study evaluated the effectiveness of using Nivolumab or Pembrolizumab in combination or not with Bevacizumab as a rescue therapy in patients with recurrent GBM. The authors highlight that the results are not statistically significant, they identify that the survival in the group that received Nivolumab seems to be greater than in the group of Pembrolizumab. The result of the entire study was not satisfactory, with an average survival of 6.6 months after the first dose of anti-PD-1. Despite the result in agreement with previous studies, they show that there are groups of patients with GBM who would benefit from the proposed treatment, requiring studies with a statistically significant sample.⁵⁸

When considering the association of ICPIs with therapeutic methods already adopted as a standard for GBM, little is known. Synergism in association with RT for melanoma has been described, but studies with GBM patients need to be performed. The association with TMZ is theoretically beneficial, considering its induction of myelosuppression, but there is no evidence to support this reasoning. It is also possible that the use of corticosteroids has a positive effect on reversing the toxicity of the adverse effects of therapy without visible impairment of antitumor activity, but with careful use.⁵⁵

3.4 Complications and prognostics

The prognosis associated with GBM is not good, with low survival and high recurrence capacity, despite the treatment ideally employed for the patient. Intradural extramedullary

spinal metastases (1%) and meningeal infiltration (leptomeningeal gliomatosis) are cited as known complications of GBM, with a reported presentation of chronic meningitis and multifocal neurological signs. In surviving patients, cognitive deficits are usually found, such as memory loss and concentration difficulties, focal neurological deficits, apathy and personality changes. In addition, adverse effects of treatments are also expected, as already described.⁶⁰

3.5 Conclusion

The management of patients with GBM presents a challenge when considering the aggressiveness of the treatments and the considerable low survival after them. The already known modalities allow patients to add a few months of life, always considering the quality of life and the limits of each case. It is observed that there are still therapeutic possibilities that demand more scientific research and, therefore, are paths of hope for patients.

REFERENCES

- [1] Agnihotri, S., Burrell, K.E., Wolf, A. et al. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61, 25–41 (2013).
- [2] Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K., & Mischel, P. S. (2014). Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9(1), 1–25. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130324
- [3] Justin S. Michael, Bong-Seop Lee, Miqin Zhang, et al.. Nanotechnology for treatment of glioblastoma multiforme. *JOURNAL OF TRANSLATIONAL INTERNAL MEDICINE / JUL-SEP 2018 / VOL 6 | ISSUE 3*
- [4] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the U.S 2007-2011. *Neurooncology*. 2014;16(suppl 4):iv1- iv63.
- [5] Batash, R., Asna, N., Schaffer, P., et al. (2017). Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*, 24(27). doi:10.2174/0929867324666170516123206
- [6] Omuro, A; DeAngelis, LM; Glioblastoma and Other Malignant Gliomas A Clinical Review, *JAMA* November 6, 2013 Volume 310, Number 17

- [7] Zhang, Y; Dube, C; Jr, MG; Cruickshanks, N ; et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers* 2018, 10, 297; doi:10.3390/cancers10090297
- [8] Leite, CAVG; Costa, JVG; Callado, RB; et al. Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in cancer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, Vol. 8, nº 29, Julho, 2012
- [9] Mendoza, PR; Grossniklaus; *The Biology of Retinoblastoma. Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Volume 134, 2015, Pages 503-51
- [10] Badke, GL; Panagopoulos, AT; Aguiar, GB; et al. Glioblastoma multiforme em idosos: uma revisão sobre seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. *Arq Bras Neurocir* 33(1): 45-51, 2014
- [11] Nabors LB, Portnow J, Ammirati, M, et al. Central Nervous System Cancers. Version 1.2017. In: National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). NCCN 2017 Aug from NCCN website
- [12] Koul R, Dubey A, Torri V, Kakumanu A, et al. Glioblastoma multiforme in elderly population. *J Neurosurg.* 2012;8(1):DOI:10.5580/2b2b.
- [13] Ewelt C, Goepfert M, Rapp M, Steiger HJ, et al. Glioblastoma multiforme of the elderly: the prognostic effect of resection on survival. *J Neurooncol.* 2011;103(3):611-8.
- [14] Asinercept (Apocept) for glioblastoma multiforme for first or second line. NIHR Innovation Observatory Evidence Briefing: June 2017
- [15] Wen PY and Kesari, S. "Malignant gliomas in adults.", *N Engl J Med.* 2008 Oct 23;359(17)
- [16] Sloan AE. Surgery for glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 2011;114(3):585-6.
- [17] Chaichana KL, Chaichana KK, Olivi A, et al. Surgical outcomes for older patients with glioblastoma multiforme: preoperative factors associated with decreased survival. *Clinical article. J Neurosurg.* 2011;114(3):587-94.
- [18] LOUIS, Elan D.; MAYER, Stephan A.; ROWLAND, Lewis P. - Merritt - *Tratado de Neurologia*, 13ª edição - Guanabara Koogan
- [19] Lanzetta G, Minniti G. Treatment of glioblastoma in elderly patients: an overview of current treatments and future perspective. *Tumori.* 2010;96(5):650-8.
- [20] JIAPAER, S., FURUTA, T., TANAKA, S., et al. (2018). Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia Medico-Chirurgica.* doi:10.2176/nmc.ra.2018-0141
- [21] Karachi, A., Dastmalchi, F., Mitchell, D. A., et al. (2018). Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncology.* doi:10.1093/neuonc/noy072

- [22] Zhang H, Wang R, Yu Y, et al. Glioblastoma Treatment Modalities besides Surgery. *J Cancer*. 2019 Aug 27;10(20):4793-4806. doi: 10.7150/jca.32475. PMID: 31598150; PMCID: PMC6775524.
- [23] Nabors LB, Portnow J, Ammirati, M, et al. Central Nervous System Cancers. Version 1.2017. In: National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). NCCN 2017 Aug from NCCN website
- [24] Nagpal, S. (2012). The Role of BCNU Polymer Wafers (Gliadel) in the Treatment of Malignant Glioma. *Neurosurgery Clinics of North America*, 23(2), 289–295. doi:10.1016/j.nec.2012.01.004
- [25] Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., et al.(2017). Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *New England Journal of medicine*, 377(20), 1954–1963. doi:10.1056/nejmoa1707358
- [26] Parasramka S, Talari G, Rosenfeld M, et al. Procarbazine, lomustine and vincristine for recurrent high-grade glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017, Issue 7. Art. No.: CD011773. DOI: 10.1002/14651858.CD011773.pub2
- [27] Lassman AB. Procarbazine, lomustine and vincristine or temozolomide: which is the better regimen? *CNS Oncol*. 2015;4(5):341-6. doi: 10.2217/cns.15.36. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26544062; PMCID: PMC6082332.
- [28] Narayana, A et al. “Intensity-modulated radiotherapy in high-grade gliomas: clinical and dosimetric results”. *Int J. Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 64(3): 2006. p. 892-7
- [29] Batash, R; Asna, N; Schaffer, P; et al. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Curr Med Chem*. 2017;24(27):3002-3009. doi: 10.2174/0929867324666170516123206.
- [30] Gunderson, Leonard L; Tepper, et al.. *Clinical radiation Oncology*. Elsevier, Central Nervous System Tumors, 2015, Cap 23. p.419-425
- [31] Halperin, EC et al. *Perez and Brandy’s Principles and Practice of Radiation Oncology*. LWW. Sixth Edition. Cap.35, p.649-676.
- [32] Mann, J; Ramakrishna, R; Magge, R. “Advances in Radiotherapy for Glioblastoma”, *Frontiers of Neurology*. 2018; (8):748 doi: 10.3389/fneur.2017.00748
- [33] Brandão, SF; Campos, TPR. Dosimetria comparativa da braquiterapia por balão de I-125 e por Cf-252 associada à BNCT para tumores cerebrais. *Radiol Bras*. 2013 Jul/Ago;46(4):221–226. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-39842013000400008>
- [34] Brandao, S. F.; Campos, T. P. R. . Intracavitary Moderator Balloon Combined With ²⁵²Cf Brachytherapy and Boron Neutron Capture Therapy, Improving Dosimetry in Brain Tumor and Infiltrations. *British Journal of Radiology JCR*, v. 88, p. 20140829, 2015. <https://doi.org/10.1259/bjr.20140829>

- [35] Cabrera, A. R.; Kirkpatrick, J. P.; Fiveash, J. B.; et al. Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Practical Radiation Oncology*, 6(4),2016, 217–225. doi:10.1016/j.prro.2016.03.007
- [36] Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., et al.(2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318(23), 2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
- [37] Burri, S.H; Gondi,V; Brown, P.D et al. “The Evolving Role of Tumor Treating Fields in Managing Glioblastoma” *American Journal of Clinical Oncology* 2018, 41(2):191-196
- [38] Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(23):2535–2543. doi:10.1001/jama.2015.16669
- [39] Choe K. Analysis of RTOG-RPA Scores in the Phase 3 EF-14 Trial of Tumor Treating Fields with Temozolomide (TTFields/TMZ) versus TMZ Alone in Newly Diagnosed Glioblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2018;102:S48. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.06.095.
- [40] Nabors LB, Portnow J, Ammirati, M, et al. Central Nervous System Cancers. Version 1.2017. In: National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). NCCN 2017 Aug from NCCN website
- [41] Eschenburg, G., Stermann, A., Preissner, et al. (2010). DNA vaccination: using the patient's immune system to overcome cancer. *Clinical & developmental immunology*, 2010, 169484. <https://doi.org/10.1155/2010/169484>
- [42] Jackson, C., Ruzevick, J., Phallen, J., et al. (2011). Challenges in immunotherapy presented by the glioblastoma multiforme microenvironment. *Clinical & developmental immunology*, 2011, 732413. <https://doi.org/10.1155/2011/732413>
- [43] Strepkos, D., Markouli, M., Klonou, A., et al. (2019). Insights in the immunobiology of glioblastoma. *Journal of Molecular Medicine*. doi:10.1007/s00109-019-01835-4
- [44] Li Lv, Jiangchao Huang, Haipeng Xi, et al. (2020).Efficacy and safety of dendritic cell vaccines for patients with glioblastoma: A meta-analysis of randomized controlled trials.*International Immunopharmacology*, Volume 83, 2020, 106336, ISSN 1567-5769, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106336>.
- [45] von Roemeling, C. A., Wang, Y., Qie, Y., et al. (2020). Therapeutic modulation of phagocytosis in glioblastoma can activate both innate and adaptive antitumour immunity. *Nature communications*, 11(1), 1508. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15129-8>
- [46] Majeti R, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 2009; 138:286–299. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.045.

- [47] Kjellman, C., Olofsson, S.P., Hansson, O., et al. (2000), Expression of TGF- β isoforms, TGF- β receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int. J. Cancer*, 89: 251-258. doi:10.1002/1097-0215(20000520)89:3<251:AID-IJC7>3.0.CO;2-5
- [48] Frei, K., Gramatzki, D., Tritschler, I., et al. (2015). Transforming growth factor- β pathway activity in glioblastoma. *Oncotarget*, 6(8), 5963–5977. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3467>
- [49] Han, J., Alvarez-Breckenridge, C. A., Wang, Q. E., et al. (2015). TGF- β signaling and its targeting for glioma treatment. *American journal of cancer research*, 5(3), 945–955.
- [50] Uckun, F. M., Qazi, S., Hwang, L., et al. (2019). Recurrent or Refractory High-Grade Gliomas Treated by Convection-Enhanced Delivery of a TGF β 2-Targeting RNA Therapeutic: A Post-Hoc Analysis with Long-Term Follow-Up. *Cancers*, 11(12), 1892. doi:10.3390/cancers1112189
- [51] Ranjan, S., Quezado, M., Garren, N., et al. Clinical decision making in the era of immunotherapy for high grade-glioma: report of four cases. *BMC Cancer* (2018) 18:239. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4131-1>
- [52] Baldini C, Romano PM, Varga A, et al. Immunothérapie des glioblastomes. *Bull Cancer*. 2018;105 Suppl 1:S59-S67. doi:10.1016/S0007-4551(18)30391-6
- [53] Lakin, N., Rulach, R., Nowicki, S., et al. Current Advances in Checkpoint Inhibitors: Lessons from Non-Central Nervous System Cancers and Potential for Glioblastoma. *Front. Oncol.*, 06 July 2017 | <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00141>
- [54] Omuro, A., Vlahovic, G., Lim, M., et al. Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: results from exploratory phase I cohorts of CheckMate 143. *Neuro-Oncology* 20(5), 674–686, 2018 | doi:10.1093/neuonc/nox208
- [55] Preusser, M., Lim, M., Hafler, D.A., et al. Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. *Nat Rev Neurol*. 2015 September ; 11(9): 504–514. doi:10.1038/nrneurol.2015.139.
- [56] Ott, P.A., Bang, Y.J., Piha-Poul, S.A., et al. T-Cell-Inflamed Gene-Expression Profile, Programmed Death Ligand 1 Expression, and Tumor Mutational Burden Predict Efficacy in Patients Treated With Pembrolizumab Across 20 Cancers: KEYNOTE-028. *Journal of Clinical Oncology*. Volume 37, Issue 4. 2018: DOI <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.2276>
- [57] Cloughesy, T.F., Mochizuki, A.Y., Orpilla, J.R., et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med*. 2019 March ; 25(3): 477–486. doi:10.1038/s41591-018-0337-7.
- [58] Kurz, S.C., Cabrera, L.P., Hastie, D., et al. PD-1 inhibition has only limited clinical benefit in patients with recurrent high-grade glioma. *Neurology®* 2018;00:1-5. doi:10.1212/WNL.0000000000006283

[59] Hart, MG; Grant, R; Garside, R; et al. Chemotherapy wafers for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Mar 16;(3):CD007294. doi: 10.1002/14651858.CD007294.pub2.

[60] *Lancet Oncol* 2009 May;10(5),459; Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.

4 METODOLOGICAL ISSUES IN PROTEIN AND LIPIDIC EXPRESSIONS IN BRAIN TISSUE EXPOSED TO CO⁶⁰ BASED ON DESI/MALDI-MSI²

4.1 Introduction

The World Health Organization's International Agency for Research on Cancer (IARC/WHO) has shown that cancer is a major cause of morbidity and mortality worldwide, with about 14 million new cases and 8.2 million deaths directly related to neoplasias since 2012 [1]. It is estimated that the number of annual cases will increase approximately 57.14%, reaching 22 million new cases in the next two decades [1]. Neoplastic malignant lesions are characterized by intense disordered cell proliferation associated with mechanism failures in cell repair, apoptosis's and clonogenic control, which may lead to clinical physiological abnormal alterations, affecting the organs, tissues and cells which hold the ability of infiltrations and metastases [2].

The association of an early diagnosis and the prescription of efficient treatments, including surgery, chemotherapy and radiation therapy (RT) becomes essential. Thus, if the harmful deterministic effects of ionizing radiation (IR) provide the neoplastic clonogenic control with acceptable deleterious effects in the adjacent healthy tissues, the RT holds a good indication and is supported [3]. It is known that IR causes non-selective damage to healthy and neoplastic tissues and the intensity of its effects are manifested according to the inherent cell radiosensitivity, tissue kinetics and the way of the cellular organization of the tissues [4]. However, even with the adoption of strict protocols to minimize deleterious effects in organs of risk, ensuring adequate kinetics of repair in healthy tissues, effects induced by IR, even in low doses, have already been identified through changes mainly in the protein metabolite and intracellular lipids [11,12,13].

The metabolomics allows the analytical study of biomolecules as well as their final products and the cellular processes involved in their synthesis. Lipidomic analysis allows dynamically identification of the changes involved in lipid expression induced by tissue's irradiation [4]. The most abundant lipids are glycerophospholipids (PLs) present in biological membranes and involved in signaling, regulation, proliferation and apoptosis [5,6]. The use of analytical techniques such as Mass Spectrometry (MS) allows the determination of elemental

² Artigo aceito no *Brazilian Journal of Radiation Science*, 05 jan. 19, e apresentando no *International Nuclear Atlantic Conference*. Autores: Matheus F. S. Mingote, Tarcísio P. R. Campos, Rodinei Augusti, Marcos N. Eberlin.

compositions, molecular structures and quantitative and qualitative analyzes of complex molecular mixtures. Through DESI (Desorption Electro Spray Ionization) and MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) two ambient ionization techniques, organic tissues can be subjected to the analysis of their structural components such as lipids (phospholipids) [7] and proteins, respectively. The characterization of phospholipid is of extreme importance due to the diversity of cellular functions besides the possibility of being used as a biomarker in neoplasms [7]. The use of the DESI-MSI system in the full scan mode in both healthy and tumor tissues showed a great variation in the content of phospholipids between the tissues, allowing also decision making for surgical margins enlargement based on molecular information from the quantitative analysis and qualitative analysis of lipids in the organs affected by neoplasias, decreasing the chance of relapses and new surgeries to remove lesions [14]. MALDI-MSI is being used to identify phospholipids, toxins from microorganisms, identification of microorganism species and proteins in various tissues as transmembrane proteins [15, 16, 17, 18]. DESI-MSI presents numerous applications besides the obtaining of the lipid profiles of normal and neoplastic tissues such as identification of metabolites in microbiology, falsification of money and study of cerebral neurotransmitters [19, 20, 21].

Recently, numerous evidences of alterations in the metabolome were verified mainly by the lipid alterations in the tissues. It seems evident that RT can induce changes in the human metabolome. To improve this knowledge, the present paper addresses some methodological issues in brain protein and lipid's expressions, due to Co⁶⁰ exposition, based on DESI/MALDI-MSI, lighting on the visibility of quantifying such molecular changes induced by IR.

4.2 Materials; Methods

4.2.1 Group selection

An amount of 15 healthy Wistar rats was selected, with an age of 11 weeks and body weight between 300 ± 15 g. The animals were divided in two groups: one control (n = 3), denominated GC, and another one submitted to total body irradiation (TBI), called GIR (n = 12) subdivided into 04 sub-groups containing 03 animals. The animals were submitted to the same photo period of 12h day/night with free access to food and water. Animals of the same lineage, family, with the same weight and age, were used to linearize the experiment, provided by the laboratory of the Federal University of Minas Gerais, Central Bioterium. All experiments

were previously submitted and approved to CEUA-UFMG, protocol 339/2014, following standardization for animal care and euthanasia.

4.2.2 Irradiation protocol

The animals of the GIR group (n=12) had their total body irradiated through the exposition to a Co-60 source, all together placed in 6 boxes, with a 5 Gy absorbed dose, in the Laboratory of Irradiation Gamma-LIG of the Center of Development of the Nuclear Technology - CDTN. They were irradiated following a distinct time kinetics. The following data were set: date of calibration of the Co-60 source on Oct.14th, 2013; activity at the date of calibration of 43749.21 Ci; activity at the animal irradiation date of 26940.00 Ci; distance from the chimney of 1.6 m; current dose rate of 87.91 Gy.h⁻¹; applied dose of 5 Gy; exposure time of (hr:mm: ss) 0:03:25.

4.2.3 Cryostat

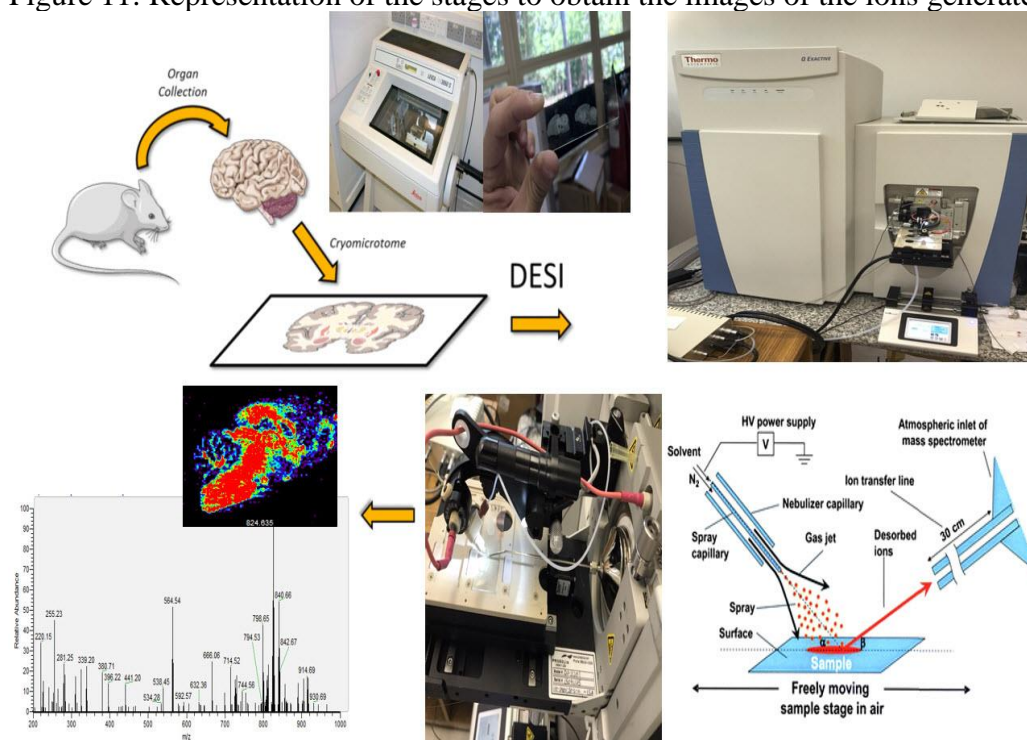
The organs were transported on dry ice to avoid denaturation and losses of the tissue components. The cuts were performed on the Leica CM1850 cryostat. Sagittal sections were preserved preserving a cerebral hemisphere. The chosen hemisphere was sectioned at 12 µm thick and placed on the common foils for analysis by DESI. For MALDI, the cuts were with the same thickness; however, they were deposited in special blades that conduct electricity, being necessary the aid of a multimeter to identify the correct surface of analysis. After the cuts, the slides were stored in the ultra-freezer at -80 ° C.

4.2.4 DESI

Immediately prior to analysis, plates with slide samples were transferred to a vacuum desiccator until thawed. It was run for 15-20 min with care not to dehydrate excessively so as not to reduce the effectiveness of the DESI. The best solvents were acetonitrile and N,N-dimethylformaldehyde ACN:DMF (1:1) since they do not cause morphological changes. The infusion pump was adjusted with a flow rate of 3.5 µL.min⁻¹. The nitrogen nebulizer gas was turned on at 160 psi pressure. The high voltage source was connected to the ion source and a voltage of 5 kV applied. The mass spectra were acquired in the 200-1000 mass range., with an

incidence angle of $\sim 54^\circ$ between the source and the sample surface. The analysis was made by ThermoFisher Scientific Q exactive Orbitrap MS. All process was represented on a picture below (FIG. 11).

Figure 11: Representation of the stages to obtain the images of the ions generated by DESI

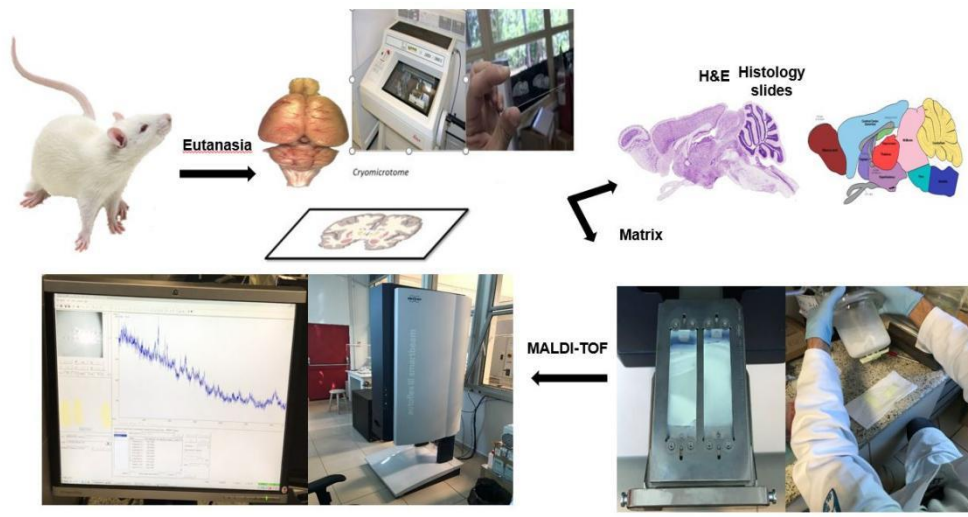


Source: Prepared by the authors.

4.2.5 MALDI

The matrix was dissolved in 60% can and 40% H₂O with 0.2% Trifluoroacetic acid (TFA). The matrix was sublimated and the slides were placed in the adapter. In order to optimize the analyzes in the Maldy-TOF instrument from Autoflex III Smartbeam Bruker, the slides were scanned to determine the scanning area limits. Laser shots (500) were applied (resolution of 150 μm) and the mass spectra acquired in a 1000-15000 mass range. The analysis was performed using the FlexImaging 3.0 software (FIG. 12).

Figure 12: Representation of the stages to obtain the images of the ions generated by MALDI

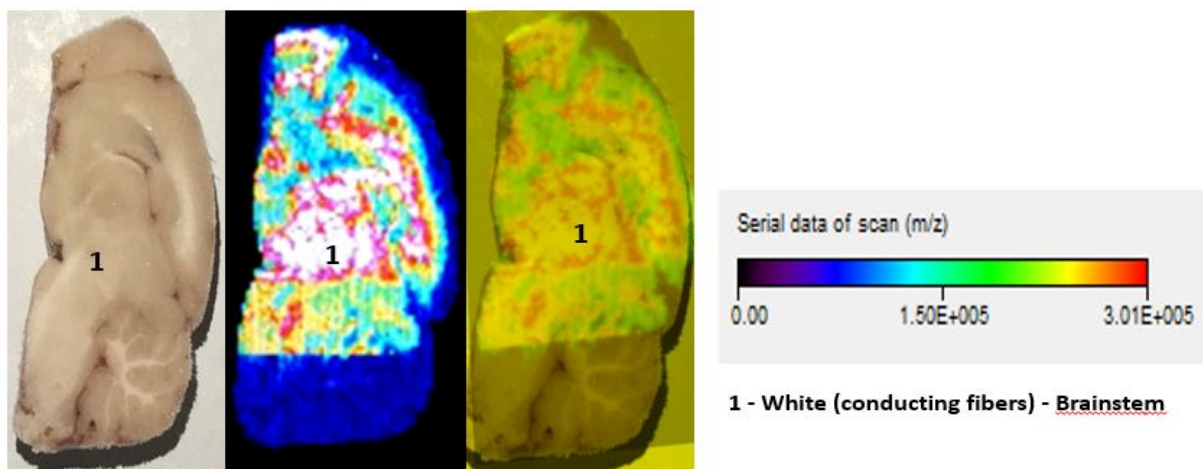


Source: Prepared by the authors.

4.3 Issues addressed on methodology

The protocols for matrix formation required for ionization in MALDI should be reviewed and adjusted according to the type of sample. As illustration, the first MALDI processing is presented in Fig. 1. It is a partial analysis of the images of a brain slice. The analysis was not completed due to the following reasons: i) long analysis time; ii) the needs for calibration; and iii) interruption of the cleaning process in order to guarantee the reception of the signal at an adequate intensity. Preliminary analyzes already showed characteristic spots of proteins in the spectra that need proteomic protocols to be identified (FIG. 13).

Figure 13: Image of a sagittal brain section from an irradiated animal, recorded on a MALDI-TOF instrument and the superposition of the high metabolic areas with sagittal brain section



Source: Prepared by the authors.

The images' production was directly dependent on the rigorous execution of the methodological procedures. Innumerable interferences could impair the image's generations and protein and lipid analysis.

The main interferences in our MS methodology can be addressed, as follows:

I. Sterile material should be used in the organ's extraction, without being washed directly with detergent. Organs and instruments should be always watered with deionized water (Milli-Q water) avoiding direct contact with the hands in order to avoid contamination with fatty acids of the skin. The organs should be removed and frozen in the shortest possible time in order to preserve the morphology and prevent enzymatic degradation. The brain must be withdrawn with extremely careful by removing the temporal bone part and the meninges. Appropriate instruments must be used to avoid fractures in the brain tissue, impairing the generation of full cutting sections.

II. During the preparation of the foils, the direct contact with the skin should be avoided so that no contamination of fatty acids with the sample occurs. An ideal cutting temperature for each type of organ's tissue must be checked. A negative temperature range from 15-25 °C should be applied to the brain, heart and lungs; 10-15°C to gonads; 25-50 °C to kidney and liver (Leica CM1850 technical reference). The Tissue-Tek OCT should not be overused to avoid contaminating the tissues and making the samples unfeasible. The cuts should be adjusted to 12µm thickness and the glass plate was not used to capture the cut as it creates micro grooves that damage the cut.

III. Immediately before carrying out the analyzes, the slides should be transferred to a vacuum desiccator for 15-20 min until thawed. It is necessary no excessive dehydration so as not to reduce the effectiveness of the DESI. The defrost period can be used to start the machine.

IV. The following variables should be optimized, such as solvent type (DMF: ACN as 1:1), solvent volume, solvent flow rates, gas pressure rate, nebulizing gas voltage, distance and angles of the probe and the MS input capillary. The probe should be at a distance of 3 mm from the sample surface and 5 mm input from the MS inlet capillary. The probe should be at an angle of 54° to the surface of the sample and ~15° to the sample surface for optimal transfer of ions. The speed of the infusion pump should be adjusted to obtain the optimum pixel for optimization and image.

V. The solvent with DMF (DMF: ACN) provided an increase in ion signal strength with a well-defined spray area being ideal for imaging applications. Besides DMF is histologically compatible with medical procedures allowing H & E histochemistry after DESI-MSI.

VI. A heating element that surrounds the MS inlet capillary may improve the sensitivity by desolvation of the charged analyt micro droplets, produced during ionization. A rope warmer wrapped around the transfer capillary assembly should be maintained at 100 °C.

VII. It should be brought in mind that two factors influence the quality of the MALDI spectra: the matrix and the technique used for matrix deposition. The choice of the stratigraphic matrix is related to the analysis of a certain type of protein (intact, crosslinked, soluble, cleaved by proteolysis). A mixture of two matrices is required to guarantee the good data acquisition with better resolution (protein peaks more evident). We should also mention an important factor that should be considered in MALDI that is the matrix deposition. Such matrix must be made with thin layers without contaminants. The cleaning of the blade compartment must be carried out carefully. A high-resolution optical image should be generated to determine scanning locations for analysis and to verify alignment and positioning with the sample.

4.4 Discussions

The IR provides interactions to the organic molecules that present sufficient energy capable of provoking electronic excitation and ionization, causing in the breakdown of chemical bonds in the biological molecules of the tissues [8]. Gamma rays ($R\gamma$) are emitted radiations of radioactive nuclides, through nuclear disintegrations, or of positron annihilation processes in matter [9]. Gamma rays are low LET (Linear Energy Transfer) radiations usually employed in RT that produce ionization and consequently free radicals damaging biological tissues. Dose and dose rate are essential in the analysis of energy absorbed in RT patients. The clinical response to a deterministic effect is directly related to the frequency and dose rate absorbed when exceeding a dose threshold relative to the sensitivity of the tissue exposed to its effect [10].

From literature, data from brain tissue of guinea pigs suggest a cellular response to oxidative stress. Polyunsaturated fatty acids and cell membrane structural lipids are widely

susceptible to gamma irradiation damage causing alteration of permeability, cell signaling, and apoptosis [10,12,13].

In cells, membrane integrity is imperative to ensure signaling of the protein and lipid metabolome. However, IR induces the oxidation of lipids and proteins by Reactive Oxygen Species (ROS).

Lipid peroxidation is a cytotoxic event defined by successive biochemical events triggered by free radicals determining the extensive oxidation of unsaturated fatty acids and membranes. The by-products formed generate structural and functional alterations in the cell membrane causing alteration in the ionic and molecular substrate flow, triggering several processes [11]. Metabolism and serum phospholipid levels (PLs) were altered following exposure to ionizing radiation [12].

4.5 Conclusions

DESI can generate lipid spectra and MALDI protein spectra in brain tissues. Near future, it will be possible to detect a change in the distribution and types of lipids and proteins between the white and gray matter regions.

Thus, lipid-induced changes, especially in phospholipids, and in cortical and spinal proteins deserve greater detail and deepening in the attempt to elucidate the metabolic pathways that suggest such expressions. With the possibility of identifying other lipids and proteins and the metabolic pathways involved, we can contribute in the future to the use of metabolic markers of cellular injury and to contribute to the review of certain radiotherapeutic protocols.

The experiments are still being adjusted to confer reliability on the large volume of data generated. The high efficacy and qualitative and quantitative precision will allow a careful analysis of the possible alterations found in irradiated tissues. To validate the experimental data will be used statistical methods allowing the fingerprint of lipids and proteins obtained by DESI and MALDI respectively, are duly compared and discussed with absolute safety and reliability.

Acknowledgments

We are thankful to the Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, in special to Dr. Luis Ladeira, Laboratório de Irradiação Gama – LIG, due to the animal

irradiations. Thanks to the CAPES due to the máster scholarship. Also, thanks to Fernanda Negrão Silva from Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas of UNICAMP due to the support to implement the MALDI methodology. Also, thanks to Gessica Vasconcelos from Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas of UFG due to the support to implement the DESI methodology. We are thankful to CNPq due to the REBRAT/SUS, 2013, project. We are thankful to the institutional support from CAPES, CNPq e FAPEMIG. This author changed his name from Matheus Soares to Matheus Mingote due to the existence of homonyms.

REFERENCES

- [1] FORMAN, D.; FERLAY, J. World Cancer Report 2014. **The global and regional burden of cancer**, pp. 16-53, Lyon (2014).
- [2] HALL, E.J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist**, 7thed. , Philadelphia, Ed. Lippincott Williams & Wilkins(2012).
- [3] DEB, P.; FIELDING, A. Radiobiological model comparison of 3D conformal radiotherapy and IMRT plans for the treatment of prostate cancer. **Australasian Physical and Engineering Sciences in Medicine**, Vol. 32 (2), pp. 51-61 (2009).
- [4] JELONEK, K. et al. Radiation-Induced Changes in Serum Lipidome of Head and Neck Cancer Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 15, pp. 6609-6624, Switzerland (2014).
- [5] WRIGHT, M. M. et al. Cell membranes and apoptosis: Role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. **Biochemistry Cell Biology**, Vol. 84, pp. 18-26, Canada (2004).
- [6] BARTKE, N.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. **Journal of Lipid Research**, Vol. 50(suppl.), pp. 91- 96, United States (2009).
- [7] COOKS, R. G. et al., Ambient Mass Spectrometry. **Science**, Vol. 311, Issue 5767, pp. 1566–1570, United States (2006).
- [8] YOSHIMURA, E. M. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, São Paulo (2009).
- [9] MAIA, G. A. S. et al., The effect of gamma radiation on the lipid profile of irradiated red blood cells. **Ann.Hematol.**, Vol. 93, pp. 753-760, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg (2013).

- [10] KOLOMIYTSEVA, I. K. et al. Nuclear and chromatin lipids: metabolism in normal and γ -irradiated rats. **Bioelectrochemistry**, Vol. 58, pp. 31-39, Elsevier, Moscow (2012).
- [11] E. ACKERSTAFF, E. et al. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells? **Journal of Cellular Biochemistry**, Vol. 90, pp. 525-533, United States (2003).
- [12] WANG, C. et al. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of rats following radiation exposure based on liquid chromatography-mass spectrometry technique. **Biomedical Chromatography**, Vol. 23, pp. 1079-1085, United States (2009).
- [13] GABER, M. H. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol. 100(2), pp. 203-206, United States (2005).
- [14] EBERLIN, L. S. et al. Molecular assessment of surgical-resection margins of gastric cancer by mass-spectrometric imaging. **Proceedings of National Academy Science of U.S.A (PNAS)**, Vol. 111(7), pp. 2437–2441, USA (2014).
- [15] CLARK, A. E. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 26(3), pp.547-606, USA (2013)
- [16] NICKLAY, J. J. et al. MALDI imaging and *in situ* identification of integral membrane proteins from rat brain tissue sections. **Analytical Chemistry**, Vol. 85(13), pp.7191-7196, USA (2013)
- [17] EBERLIN, L. S. et al. DESI then MALDI mass spectrometric imaging of lipid and protein distributions in single tissue sections. **Analytical Chemistry**, Vol. 83(22), pp.8366-8371, USA (2011)
- [18] CHAURAND, P.; CORNETT, D.S.; ANGEL, P.M.; CAPRIOLI, R. M. From whole-body sections down to cellular level, multiscale imaging of phospholipids by MALDI mass spectrometry. **Mol Cell Proteomics** 2011; 10. doi: 10.1074/mcp.O110.004259
- [19] ANGOLINI, C. F. F. et al., Direct Protocol for Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture. **Analytical Chemistry**, Vol. 87, pp.6925- 6930, USA (2015)
- [20] CORREA, D. N. et al. Anti-theft device staining on banknotes detected by mass spectrometry imaging. **Forensic Science International**, Vol. 260, pp.22- 26, USA (2016)
- [21] FERNANDES, A. M. A. P. et al., Direct Visualization of Neurotransmitters in Rat Brain Slices by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI - MS). **J. Am. Soc. Mass Spectrometry**, DOI: 10.1007/s13361-016-1475-0, USA (2016)

5 ANALYTICAL METHODS FOR ASSESSING CHANGES INDUCED BY GAMMA EXPOSURE IN ANIMAL MODEL³

5.1 Introduction

The International Cancer Research Agency of the World Health Organization (IARC / WHO) has shown that cancer is the leading cause of morbidity and mortality worldwide¹.

The absence of repair mechanisms and control of the cell cycle allows the emergence of neoplastic lesions that characterize cancer². One of the therapeutic modalities in cancer is radiotherapy in which a large portion or the whole organ infiltrated by the tumor is exposed to radiation. Gamma radiation is a type of ionizing radiation (IR) that can cause various cellular damages due to direct and / or indirect structural changes resulting from the rupture of molecular bonds in the DNA of the neoplastic cells, resulting in losing their clonogenicity³.

In addition, healthy tissues are also affected by radiation exposure, resulting in several adverse effects of the radiation therapy, such as cerebral edema, radiation necrosis; cerebral atrophy, neurocognitive deficits⁴, thickened bronchial wall; dilated alveolar space⁵, pneumonitis; pulmonary fibrosis⁶, cardiomyopathy, reduction of myofibrils with fibrosis⁷, hepatocytes with focal necrosis; nephritis with glomerular capillary necrosis; or degeneration of the proximal cell lineage.

DESI-MSI is an analytical and imaging method used to obtain lipid profiles of normal and neoplastic tissues, identification of metabolites in microbiology and the study of brain neurotransmitters^{8,9,10,11}. The radio induced brain changes can cause several adverse effects such as cognitive losses and radionecrosis¹². DESI-MSI allows assessing changes in the tissue metabolic profile so that it can be used in a review of radiation therapy protocols to minimize the deleterious effects of the ionizing radiation.

The goal of the present research was finding the early tissue response to the radiation exposure of total-body-irradiation (TBI) at 5 Gy supported by distinct analytical methods.

³ Artigo publicado na *Revista da Associação Médica Brasileira* em 16 dez. 20 (<https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.12.1651>). Autores: Matheus F. Soares Mingote (UFMG), Tarcísio P. R. Campos (UFMG), Rodinei Augusti (UFMG), Geovanni D. Cassali (UFMG).

5.2 Materials and methods

5.2.1 Group selection and Irradiation Protocol

Statistical analyzes were performed with the body and organ mass weights of 40 male albino rats, 90 days old, from the *Rattus norvegicus*, Wistar line, weighing approximately 300 ± 15 g. The animals were euthanized, the organs removed, weighed, and stored. The tissues were prepared and histological and molecular analyzes were performed. The research goals and protocols were previously submitted; approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-UFGM), protocol 339/2014, after standardization for animal care; euthanasia. The animals of the IR group had their total body irradiated in the Co-60 Gamma-LIG/CDTN radiator, all together in 4 boxes, receiving 5 Gy absorbed dose, at the Laboratory of Irradiation Gamma-LIG of the Center of Development of the Nuclear Technology (CDTN). The irradiated animals were sacrificed according to a time kinetics corresponding to 12 h, 48 h, 96 h and 01 week after-exposure.

5.2.2 Histological methods

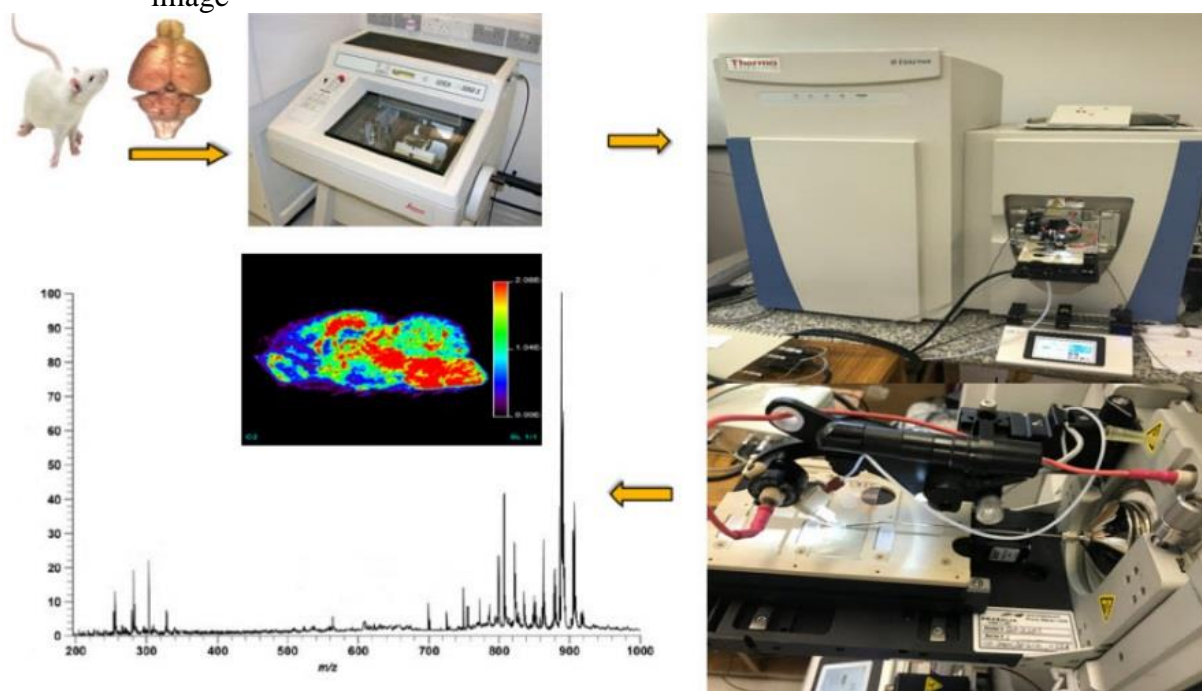
The organs were fixed at 10% buffered formalin and included in paraffin blocks. The 4 μ m sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were evaluated by a pathologist and the images were captured by a camera connected to an optical microscope (Olympus BX-40; Olympus, Tokyo, Japan). The histological analysis was performed on the tissue's images.

5.2.3 DESI-MSI

The solvents were acetonitrile and N, N-dimethylformaldehyde ACN:DMF (1:1) since these chemical products do not cause morphological changes. The infusion pump was adjusted with a flow rate of $3.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The nitrogen nebulizer gas was turned on at 160 psi pressure. The high voltage source was connected to the ion source and a voltage of 5 kV applied. The mass spectra were acquired in the 200-1000 mass range, with an incidence angle of $\sim 54^\circ$

between the source and the sample surface. The analyses were made on a ThermoFisher Scientific Q exective Orbitrap MS instrument. All process was represented in Figure 14.

Figure 14: Schematic representation of the DESI-MSI apparatus used to obtain each tissue image



Source: MINGOTE, 2019

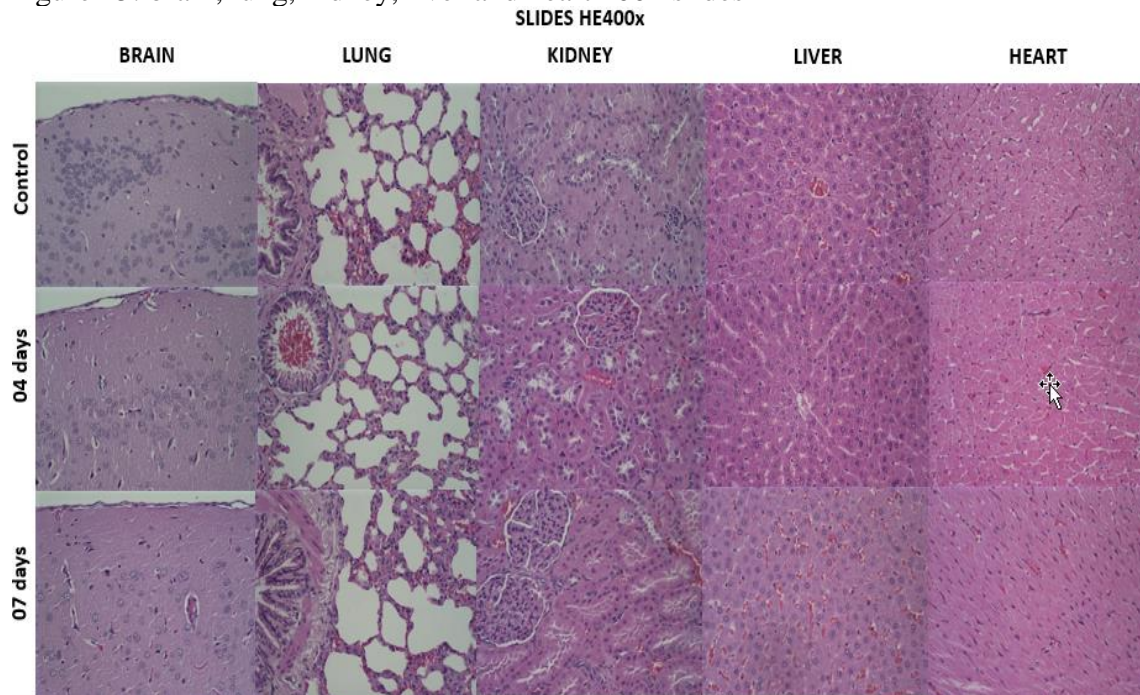
The ions were selected based on the changes in intensity of the ions in the acquired images. In order to compare the control and experimental brain tissue with tissue responses in the respective time kinetics (24 h, 48 h, 96 h and 1 week), the ion intensities were properly equalized for comparison purposes.

5.3 Results

5.3.1 Histopathological analyses of organs

Histological slides stained with HE was analyzed in magnification (40x) and observed the major histological characteristics finding in the control group and the irradiated group.

Figure 15: brain, lung, kidney, liver and heart 400x slides



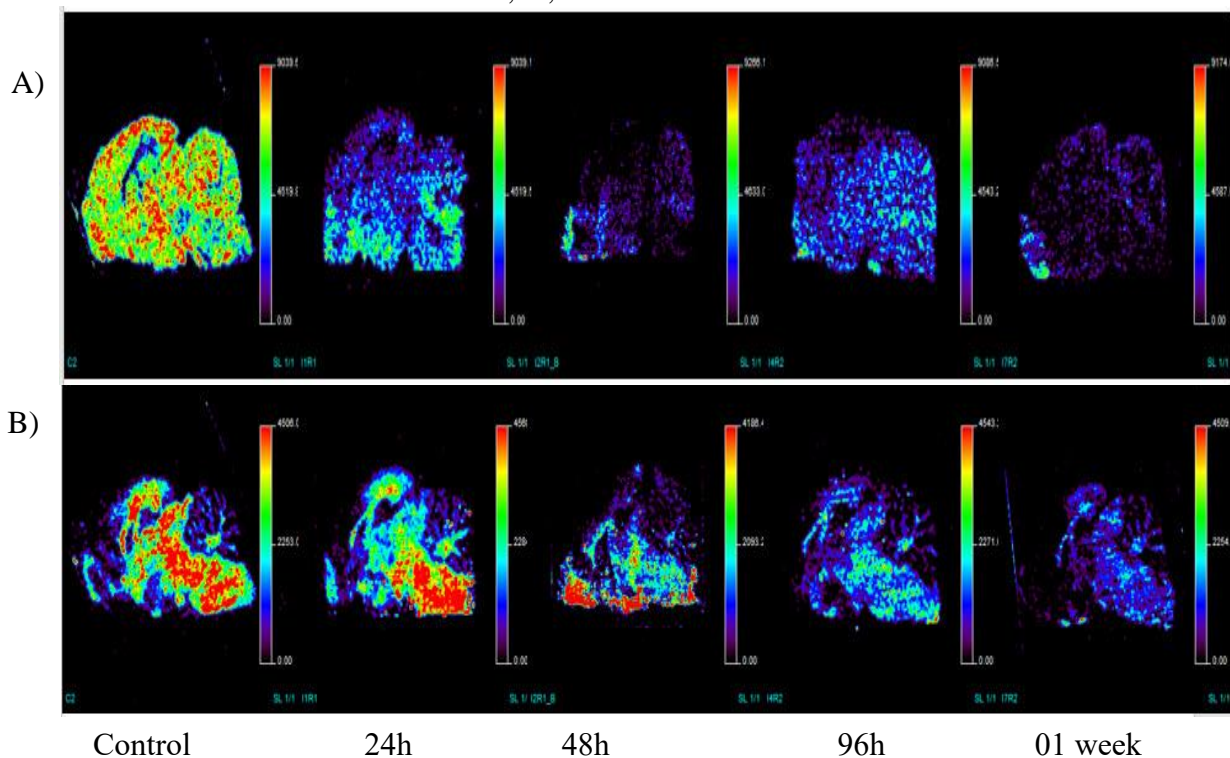
Source: MINGOTE, 2019

The histological brain slides from the irradiated group did not present changes such as inflammatory lymphomononuclear infiltrates, edemas, vascular degenerations and areas of necrosis, as depicted in Figure 2. The Lung plaques of the irradiated group do not present changes such as inflammatory lymphomononuclear infiltrates, exudates, edema and thickening of the bronchial wall, as shown in Figure 2. The irradiated kidney slides showed no signs of focal or diffuse glomerulonephritis and no changes were observed such as inflammatory lymphomononuclear infiltrate, capillary necrosis and cell degeneration in the proximal and distal tubules. The liver slides of the irradiated group with preserved architecture formed by hepatocyte cords, sinusoid capillaries, and centrilobular vein. No dilatation of sinusoidal capillaries, areas of focal necrosis, and cellular degeneration with vacuolated hepatocytes were observed. Figure 2 also depicted the heart laminations of the irradiated group, demonstrating the preservation of skeletal striated muscle structure without the presence of myofibrillar degeneration, without areas of myofibrils necrosis and areas of fibrosis.

5.3.2 DESI images

Pertinent changes were noticed in Ion images of the brain tissue of Wistar rats from samples of the control group and the irradiated group analyzed in DESI. The generated images referred to only one ion and were determined by its m/z ratio. Thus, the scan reading of each pixel allowed the ions present at each point of the sample to be quantified and evaluated by their tissue distribution. Some ions were selected, which showed substantial differences in intensity and expressed in each organ area. The Figure 16 depicted the images of two ions obtained and their profile in the different regions of the Central Nervous System (CNS). The main changes observed were an abrupt modulation in lipid intensity in various regions for both samples.

Figure 16: ÍON A) m/z 794.622 and B) ÍON m/z 914.693. The Images represent the intensities of the lipid's ions, in color levels, taken in a distinct animal brain section, whose pixels representing a specific area of the rat's brain, taken at the after-radiation times of 24,48,96 h and 01 week.



Source: MINGOTE, 2019

5.4 Discussion

Our findings showed that the histological method did not show relevant changes in the levels of microscopic tissue.

Ionizing radiation has enough energy to cause electronic excitation; ionization, producing the breakdown of chemical bonds in biological molecules (DNA, lipids, proteins) of tissues^{13, 14}. Lipid peroxidation is a cytotoxic process defined by successive biochemical events triggered by free radicals that determine the extensive oxidation of unsaturated fatty acids and membranes. The by-products of those processes induce structural and functional changes in the cell membrane, causing changes in the flow of the ionic and molecular substrate, triggering several biochemical changes. As an example, Metabolism and serum phospholipid levels (PLs) were altered after exposure to ionizing radiation.

DESI, however, proved to be extremely effective in detecting important radio induced molecular changes.¹⁵ Polyunsaturated fatty acids, as well as structural lipids of the cell membrane, are largely susceptible to damage caused by gamma irradiation. The results showed that the two selected lipids showed significant changes in the CNS. The lipid distribution of m/z 794,622 and m/z 914,693 from the control group to the irradiated groups was completely altered. The kinetics of time shows a change in lipid expression spatially in the brain, as well as an attempt to respond to minimize the damaging effects of radiation on tissues. After irradiation, an abrupt modulation in the intensity of this lipid was observed in all brain regions in the 24-h samples, and in the 48-h samples especially. The 96-h sample showed a slight diffuse increase; however, in the 01-week sample, there was a decrease in lipid intensity in all areas.

Changes in lipid expression lead to changes in signaling mechanisms for cellular and molecular repair. Molecular changes may be associated with the alteration and degeneration of the myelin, present in numerous neurodegenerative diseases. It is still necessary to assess whether oxidative damage can lead to cell membrane dysfunction, causing changes in metabolism, selective change in cell permeability and signaling, which can lead to apoptosis.^{16, 17, 18, 19}

Molecular analyzes in the other organs are still being developed since all research is maintained through inter-institutional cooperation to obtain data and images.

5.5 Conclusions

The effects of ionizing radiation shall be better identified and understood in molecular level. Although macroscopic and microscopic changes in tissue are not yet evident, it is necessary a further deepening of the techniques applied to the metabolic molecular analysis to achieve better understanding of the mechanisms that can alter cell structures and function. DESI-MSI proved to be efficient and relevant, allowing regional molecular analysis of the entire CNS, expanding a new field of study that is still incipient: radiometaboloma. Our studies may contribute further to the review of the protocols in dose planimetry to minimize deleterious effects of ionizing radiation.

Acknowledgments

We thank the Nuclear Technology Development Center (CDTN), especially Dr. Luis Ladeira, Gamma Irradiation Laboratory (LIG), due to the animal irradiations. Thanks to CAPES for the master's scholarship. We thank CNPq for the REBRAT / SUS project, 2013. We thank the institutional support of CAPES, CNPq and FAPEMIG.

Authors' contributions

Conception and study design: MFSM, TPRC, RA; data acquisition: MFSM; data analysis/ interpretation: MFSM, RA, GDC; supervision or mentorship: TPRC, RA, GDC. Each author contributed with important intellectual content during the manuscript drafting or revision and accepted accountability for the overall work of ensuring that questions pertaining to the accuracy or integrity of any portion of the work are appropriately investigated and resolved. MFSM takes responsibility that this study has been reported honestly, accurately, and transparently and that no important aspects of the study have been omitted.

REFERENCES

- Forman D; Ferlay J. In: Stewart BW; Wild CP, editors. The global; regional burden of cancer. World Cancer Report: Lyon, 2014. p.16-53.
2. Hall EJ; Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist. 7th ed. Philadelphia, Ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2012.

3. Maia GAS.; RENO, CO.; Medina JM; Silveira AB; Mignaco JA; Atella GC; et al. The effect of gamma radiation on the lipid profile of irradiated red blood cells. *Ann Hematol.* Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg, 2013. Vol. 93, p.753-760.
4. Lee AW; Cheng LO; Ng SH; Tse VK; O SK; Au GK; et al. Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of late temporal lobe necrosis following radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Radiol.* 1990 Jul;42(1):24-31.
5. Fajardo LF. In: Perez CA; Brady LW, editors. *Morphology of radiation effects on normal tissues. Principles and Practices of Radiation Oncology.* 2nd Ed. New York: Lippincott, 1992. p.114-123.
6. Gunderson LL; Tepper J. *Clinical radiation Oncology.* 4nd ed. Elsevier, 2015.
7. Jafar, B.. Investigation of Cobalt radiation on the Heart of Rat. *J. Basic. Appl. Sci. Res.*, 1(12) 2011. p.2932-2934.
8. Eberlin LS; Tibshirani RJ; Zhang J; Longacre TA; Berry GJ; Bingham DB; et al. Molecular assessment of surgical-resection margins of gastric cancer by mass-spectrometric imaging. *Proceedings of National Academy Science of U.S.A. USA*, 2014. Vol. 111(7), pp. 2437–2441.
9. Angolini CF; Vendramini PH; Araújo FD; Araújo WL; Augusti R; Eberlin MN; et al. Direct Protocol for Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture. *Analytical Chemistry.* USA, 2015. Vol. 87, pp.6925- 6930.
10. Correa DN; Zacca JJ; Rocha WFC; Borges R; Souza W; Augusti R.; et al. Anti-theft device staining on banknotes detected by mass spectrometry imaging. *Forensic Science International.* USA, 2016. Vol. 260, pp.22- 26.
11. Fernandes AM; Vendramini PH; Galaverna R; Schwab NV; Alberici LC; Augusti R; et al. Direct Visualization of Neurotransmitters in Rat Brain Slices by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI - MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrometry.* USA, 2016. DOI: 10.1007/s13361-016-1475-0.
12. Mingote, MFS. *Análise lipídica de tecido cerebral expostos à radiação por DESI-MS [dissertação de mestrado].* DEN-UFMG, 2018.
13. Yoshimura, EM. *Física das Radiações: interação da radiação com a matéria.* Revista Brasileira de Física Médica. São Paulo, 2009.
14. Kolomiytseva IK; Kulagina TP; Markevich LN; Archipov VI; Slozhenikina LV; Fialkovskaya LA; et al. Nuclear and chromatin lipids: metabolism in normal; γ -irradiated rats. *Bioelectrochemistry*, Vol. 58. Elsevier. Moscow, 2012. p.31-39.
15. Mingote MFS; Campos TPR; Augusti R; Eberlin MN. Methodological issues in protein and lipidic expressions in brain tissue exposed to Co^{60} based on DESI/MALDI-MSI. *Brazilian Journal of Radiation Science*, Vol 7, No 2A (2019). DOI: <https://doi.org/10.15392/bjrs.v7i2A>

16. Ackerstaff E; Glunde K; Bhujwala ZM. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells?. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 90. United States, 2003. p.525-533.
17. Wang, C.; Yang J.; Nie J. Plasma phospholipid metabolic profiling; biomarkers of rats following radiation exposure based on liquid chromatography-mass spectrometry technique. *Biomedical Chromatography*, Vol. 23. United States, 2009. p.1079-1085.
18. Kolomiytseva IK; Kulagina TP; Markevich LN; Archipov VI; Slozhenikina LV; Fialkovskaya LA; et al. Nuclear and chromatin lipids: metabolism in normal; γ -irradiated rats. *Bioelectrochemistry*, Vol. 58. Elsevier, Moscow, 2012. p.31-39.
19. Gaber MH. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. *Journal of Bioscience; Bioengineering*, Vol. 100(2). United States, 2005. p.203-206.

6 PAINEIS DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS ENCEFALO-REGIONAIS PARA MONITORAMENTO DE DISFUNÇÕES COGNITIVAS, SENSORIAIS E MOTORAS RADIOINDUZIDAS⁴

6.1 Introdução

A radioterapia oncológica é utilizada para controle neoplásico local utilizando-se da radiação ionizante para interromper o crescimento tumoral. No entanto, a radiação ionizante atua indiscriminadamente tanto nas células tumorais quanto nas células saudáveis adjacentes, muitas vezes levando a neurotoxicidade e grandes distúrbios neurocognitivos [1, 2]. O tratamento radioterápico consiste na utilização de radiações ionizantes para o controle e redução clonogênica de neoplasias (malignas e benignas) a partir de uma adequada planimetria associada a prescrições de doses terapêuticas efetivas [3, 4]. As toxicidades radioinduzidas desencadeiam leucoencefalopatas (extensas lesões da substância branca com vários infartos lacunares), resultando em declínio neurocognitivo e diminuição da qualidade de vida [5, 6]. Doses mais altas levam a efeitos exacerbados como fadiga, eritema, alopecia, cefaleia e náuseas, vômitos, boca seca, conjuntivite, neuropatias e neurites (ototoxicidade, retinopatas, cegueira, catarata) e disfunções hipotalâmico-hipofisárias. Déficits cognitivos levam a um prejuízo significativo no desenvolvimento intelectual (Quociente de Inteligência em Escala Total - FSIQ) [7-10]. A radiação ionizante causa danos diretos ao DNA e danos indiretos ao favorecer e formar espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). ROS/RNS representa uma das principais ameaças que causam danos ao genoma. As ionizações causam diretamente alterações de bases e deleções no DNA, ruptura de ligações de hidrogênio, fragmentação de quebras de fita simples (SSBs) ou DNA de fita dupla (DSBs - quebras de fita dupla) e induzem a formação de ligações cruzadas internas ou externas de moléculas com DNA e proteínas [11, 12]. A ação das ROS desencadeia o processo de lipoperoxidação em ácidos graxos poliinsaturados, gerando subprodutos altamente reativos, como aldeídos, cetonas, epóxidos e hidrocarbonetos, podendo inclusive levar a mutações e danos genéticos. [11, 13-16]. A peroxidação lipídica é um evento citotóxico definido por sucessivos eventos bioquímicos ativados por radicais livres determinando a extensa oxidação de ácidos graxos insaturados e membranas. Os subprodutos formados geram alterações estruturais e funcionais na membrana

⁴ Autores: Matheus Mingote (UFMG), Tarcisio P. R. Campos (UFMG), Rodney Augusti (UFMG).

celular, causando alterações no fluxo do substrato iônico e molecular, iniciando diversos processos [17]. A peroxidação do ácido araquidônico esterificado, constituinte da membrana celular, favorece principalmente a formação de isoprostanos (compostos formados durante a peroxidação do ácido araquidônico), resultando em importantes alterações físico-químicas que provocam alterações na fluidez e inativação da enzima receptores transmembrana responsáveis pela sinalização intracelular e nuclear [18].

A oxidação dos lipídios da membrana também ocorre com o envelhecimento e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) [19-21]. O estresse oxidativo é essencial no desenvolvimento inicial da DA, apresentando um aumento expressivo e significativo na peroxidação lipídica [22-25]. Amostras do córtex cerebral e hipocampo já demonstraram altas concentrações de malondialdeído (MDA) e proteína carbonil (CP), demonstrando a importância da peroxidação lipídica no desenvolvimento da DA [26]. Os subprodutos lipídicos oxidados, assim como o DNA/RNA, podem ser medidos em fluidos periféricos pelo aumento dos níveis de MDA e 8-hidroxi-2-desoxianosina (8OHdG) / 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHD), respectivamente [27]. Níveis aumentados de MDA e 8OHdG também foram medidos na urina, líquido cefalorraquidiano (LCR) e sangue para outras doenças neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Parkinson (DP), doença de Huntington (DH) e ataxia de Friedreich (FRDA) [28-33]. Em outros estudos, distúrbios na sinalização lipídica com níveis reduzidos de endocanabinóides foram relatados em pacientes com esquizofrenia e depressão. Alterações nos níveis de ácidos graxos não esterificados (NEFA) e fosfatidilcolinas (PC) na substância cinzenta/branca e um aumento nos níveis de ceramida na substância branca também foram encontrados em pacientes com esquizofrenia. Em pacientes com depressão, observou-se um aumento de certas espécies de PCs contendo ácido araquidônico. O uso de medicação antipsicótica levou a alterações nos perfis lipídicos séricos mostrando uma forte associação com a expressão gênica alterada do metabolismo lipídico [34-40].

Assim, a identificação dos lipídios e sua associação Locorregional poderá ajudar a monitorar as futuras alterações radioinduzidas bem com possíveis alterações de doenças neurodegenerativa ainda incipientes.

6.2 Materias e métodos

6.2.1 Animais

Foram selecionados 15 ratos Wistar saudáveis, com 11 semanas de idade e peso corporal entre 300 ± 15 g. Os animais foram divididos em dois grupos: um controle (n=3), denominado GC, e outro submetido à irradiação corporal total (TBI), denominado GIR (n=12) subdividido em 04 subgrupos contendo 03 animais cada. Os animais foram submetidos ao mesmo período fotográfico de 12h dia/noite com livre acesso a ração e água. Animais da mesma linhagem, família, com o mesmo peso e idade, foram utilizados para linearizar o experimento, cedido pelo Laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais, Biotério Central. Os experimentos com animais ocorreram com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA - UFMG).

6.2.2 Protocolo de irradiação

Cada subgrupo de animais GIR foi colocado em caixas apropriadas e submetido à irradiação corporal total por exposição à fonte de Co-60 (dose absorvida de 5 Gy) no Laboratório de Irradiação Gamma-LIG do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear da Universidade Federal de Minas Gerais - CDTN - UFMG. Os seguintes parâmetros de irradiação foram seguidos: a atividade dos animais na data da irradiação foi de 26.940,00 Ci; distância da chaminé de 1,6 m; taxa de dose atual de 87,91 Gy.h⁻¹; dose aplicada de 5 Gy; tempo de exposição de (h:min:s) 0:03:25.

6.2.3 Preparação do tecido

Os animais pertencentes a cada subgrupo foram sacrificados na mesma data para a retirada dos cérebros. Portanto, cada subgrupo foi exposto às mesmas condições de radiação em momentos diferentes antes da data do sacrifício para realizar o estudo cinético pós-irradiação. Assim, cada subgrupo foi submetido ao protocolo de radiação 7 dias, 96 h, 48 h e 24 h antes do sacrifício, respectivamente, totalizando 4 subgrupos.

Para retirada dos órgãos, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular com uma combinação de cetamina 5% (0,2 mL para cada 100 g de peso corporal) e xilazina 2% (0,1 mL para cada 100 g de peso corporal).

Após sacrifício e retirada do cérebro, os órgãos foram pesados, armazenados em sacos plásticos devidamente identificados e congelados instantaneamente em mistura de gelo seco e n-heptano a aproximadamente -78°C para evitar a desnaturação. Em seguida, os órgãos foram armazenados em freezer (-80°C) até que as lâminas fossem preparadas no criostato.

Para a preparação das lâminas, o micrótomo Leica CM3050-S foi ajustado para a temperatura de -30°C , e a espessura da lâmina foi ajustada para 14 μm . Os órgãos foram previamente retirados do freezer para atingir a temperatura do criostato antes do corte. As lâminas foram então devolvidas ao freezer a -80°C para posterior análise pelo DESI.+

6.2.4 Espectrometria de massa de eletrospray de dessecção (DESI)

Antes da análise, as placas com as amostras das lâminas foram transferidas para um dessecador a vácuo por 15-20 min até o descongelamento. Os solventes escolhidos foram acetonitrila e N,N-dimetilformaldeído ACN:DMF (1:1) para evitar alterações morfológicas. A bomba de infusão foi ajustada com vazão de 3,5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A pressão do gás do nebulizador de nitrogênio era de 160 psi. A alta voltagem aplicada à fonte de ionização foi de 5 kV. O ângulo de incidência entre a fonte e a superfície da amostra foi de aproximadamente 54° . Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de 200-1000 massas. A análise foi realizada por um Thermo Fisher Scientific Q Exactive Orbitrap MS (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) operando em modo de íons negativos. Para tradução de dados para o formato aceitável para análise gráfica: FireFly, veja 2.0.1 (Prosofia, Indianapolis, EUA) e para visualização e interpretação de dados: BioMap veja. 3x (Instituto Novartis de Pesquisa Biomédica, Basileia, Suíça). Todas as análises foram realizadas no mesmo dia para evitar inconsistência nas datas.

6.2.5 Identificação de íons

Todos os íons atribuídos a possíveis lipídios observados nos espectros de massa foram identificados nas bases de dados METLINTM (Metabolite and Chemical Entity Database) e LIPID MAPS® (Lipid Metabolites and Pathways Strategy).

Na base de dados do METLINTM, apenas as espécies com erro máximo de 1 ppm entre as massas teóricas e experimentais dos íons observados nas imagens foram consideradas na atribuição de categorias aos lipídios. Este parâmetro foi atribuído para dar confiabilidade aos resultados, uma vez que não foram utilizados padrões analíticos para confirmar as espécies propostas. Além disso, isotopólogos mais pesados (contendo ^{13}C) com erro máximo de 5 ppm entre as massas teóricas e experimentais e com imagens bastante semelhantes às dos isotopólogos mais leves não foram considerados. Todos os lipídios propostos foram classificados de acordo com sua categoria, utilizando a nomenclatura e abreviaturas estabelecidas pelo LIPID MAPS®.

6.3 Resultados

Os resultados apresentados referem-se aos lipídios observados no modo de íons negativos. Devido ao elevado número de isômeros, cada sinal observado nos espectros refere-se a vários lipídios. Assim, os sinais que geraram a imagem foram associados à seguinte classe de lipídios - ácidos graxos (FA), glicerofosfatos (PA), glicerofosfoetanolaminas (PE), glicerofosfogliceróis (PG), glicerofosfoserinas (PS), esfingolipídios (SP) e glicerofosfoinositóis (PI). Cada classe de lipídio é caracterizada por sua estrutura molecular e espacial e após o imageamento de cada lípide, foi identificado e associado a região locorregional correspondente. A tabela 5 demonstra os lipídios identificados que sofreram radiomodulação e a tabela 6 já demonstra as diferentes regiões espaciais presentes no encéfalo.

Tabela 5: Seleção de lipídeos que apresentaram modulação no tempo pós-irradiação, presentes no controle

Ion Formula	[M-H] ⁻ (m/z)	Category
C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281,2484	FA (C18:1)
C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283,26397	FA (C18:0)
C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303,23277	FA (C20:4)
C ₂₀ H ₃₇ O ₂	309,27966	FA (C20:1)
C ₂₂ H ₃₅ O ₂	331,26404	FA (C22:4)
C ₃₇ H ₇₀ O ₈ P	673,48111	PA (C37:1)
C ₃₈ H ₇₂ O ₈ P	687,49661	PA (C38:1)
C ₃₉ H ₇₅ NO ₇ P	700,52836	PE (C39:1)
C ₃₉ H ₇₅ NO ₈ P	716,52395	PE (C39:1)
C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722,51278	PE (C41:5)
C ₄₁ H ₇₇ NO ₇ P	726,54427	PE (C41:3)
C ₄₁ H ₇₉ NO ₇ P	728,55951	PE (C41:2)
C ₄₁ H ₇₃ NO ₈ P	738,50775	PE (C41:4)
C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744,55444	PE (C41:1)
C ₄₃ H ₇₃ NO ₇ P	746,51323	PE (C43:6)
C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750,54393	PE (C43:4)
C ₄₃ H ₈₁ NO ₇ P	754,5752	PE (C43:2)
C ₄₃ H ₇₃ NO ₈ P	762,5077	PE (C43:6)
C ₄₃ H ₇₅ NO ₈ P	764,52263	PE (C43:5)
C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766,5392	PE (C43:4)
C ₄₅ H ₇₅ NO ₇ P	772,52774	PE (C45:7)
C ₄₅ H ₇₇ NO ₇ P	774,54419	PE (C45:6)
C ₄₅ H ₈₁ NO ₇ P	778,575	PE (C45:5)
C ₄₂ H ₇₇ NO ₁₀ P	786,5291	PS (C42:2)
C ₄₅ H ₇₇ NO ₈ P	790,53924	PE (C45:6)
C ₄₅ H ₈₁ NO ₈ P	794,57206	PE (C45:4)
C ₄₄ H ₇₈ O ₁₀ P	797,5333	PG (C44:4)
C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₀ P	834,52938	PS (C46:6)
C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P	857,5175	PI (C45:4)
C ₄₆ H ₈₈ NO ₁₁ S	862,60691	SF (C46:1)
C ₄₇ H ₈₀ O ₁₃ P	883,53376	PI (C47:5)
C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885,54956	PI (C47:4)
C ₄₈ H ₉₀ NO ₁₁ S	888,62368	SF (C48:2)
C ₄₉ H ₈₂ O ₁₃ P	909,5496	PI (C49:6)

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 6: Regiões cerebrais de ratos Wistar identificadas didaticamente por números.

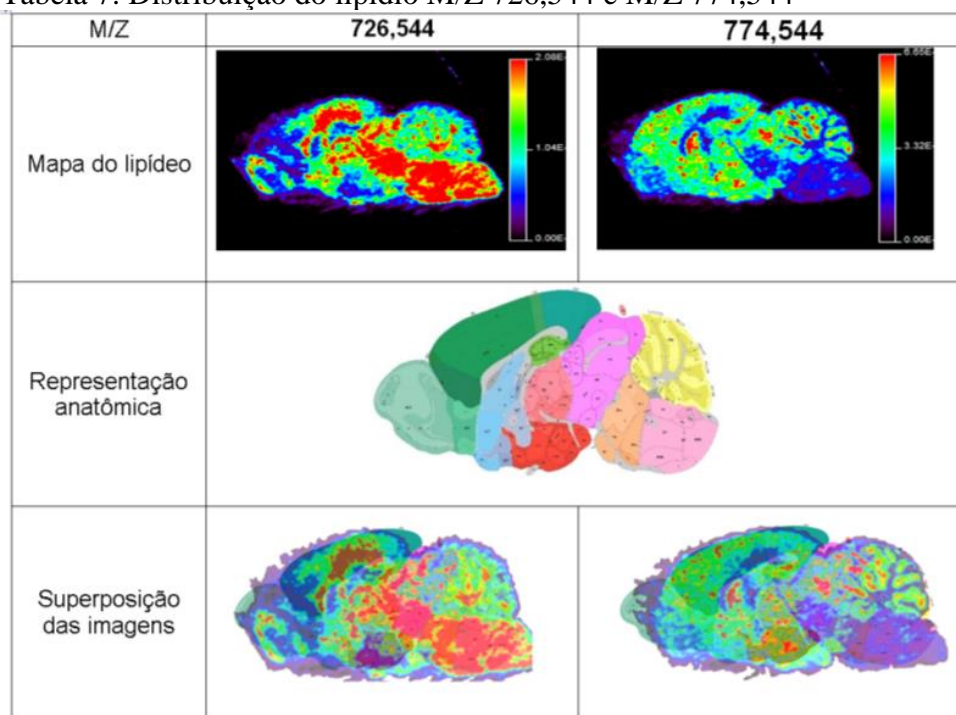
Legenda de cores	Imagem do encéfalo – corte sagital																																																																																																																																											
<table border="0"> <tr> <td>1</td><td>3</td><td>5</td><td rowspan="2">Córtex Cerebral</td><td rowspan="2">} Cérebro</td></tr> <tr> <td>2</td><td>4</td><td>6</td></tr> <tr> <td>7</td><td>8</td><td></td><td>Núcleos da Base</td><td></td></tr> <tr> <td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>→ Tronco Encefálico</td></tr> <tr> <td>14</td><td>15</td><td></td><td></td><td></td><td>→ Cerebelo</td></tr> <tr> <td>1</td><td colspan="5">Hipocampo</td></tr> <tr> <td>2</td><td colspan="5">Área retroesplénica</td></tr> <tr> <td>3</td><td colspan="5">Área somatomotora (3m)</td></tr> <tr> <td>3</td><td colspan="5">Área somatossensorial (3s)</td></tr> <tr> <td>4</td><td colspan="5">Área orbital</td></tr> <tr> <td>5</td><td colspan="5">Área frontal</td></tr> <tr> <td>6</td><td colspan="5">Área olfatória</td></tr> <tr> <td>7</td><td colspan="5">Corpo estriado</td></tr> <tr> <td>8</td><td colspan="5">Globo Pálido</td></tr> <tr> <td>9</td><td colspan="5">Hipotálamo</td></tr> <tr> <td>10</td><td colspan="5">Tálamo</td></tr> <tr> <td>11</td><td colspan="5">Mesencéfalo</td></tr> <tr> <td>12</td><td colspan="5">Ponte</td></tr> <tr> <td></td><td>13</td><td colspan="4">Bulbo</td></tr> <tr> <td></td><td>14</td><td colspan="4">Fibras nervosas</td></tr> <tr> <td></td><td>15</td><td colspan="4">Cerebelo</td></tr> <tr> <td></td><td>16</td><td colspan="4">IV Ventriculo</td></tr> <tr> <td></td><td>17</td><td colspan="4">III Ventriculo</td></tr> <tr> <td></td><td>18</td><td colspan="4">Ventriculo Lateral</td></tr> </table>	1	3	5	Córtex Cerebral	} Cérebro	2	4	6	7	8		Núcleos da Base		9	10	11	12	13	→ Tronco Encefálico	14	15				→ Cerebelo	1	Hipocampo					2	Área retroesplénica					3	Área somatomotora (3m)					3	Área somatossensorial (3s)					4	Área orbital					5	Área frontal					6	Área olfatória					7	Corpo estriado					8	Globo Pálido					9	Hipotálamo					10	Tálamo					11	Mesencéfalo					12	Ponte						13	Bulbo					14	Fibras nervosas					15	Cerebelo					16	IV Ventriculo					17	III Ventriculo					18	Ventriculo Lateral				
1	3	5	Córtex Cerebral			} Cérebro																																																																																																																																						
2	4	6																																																																																																																																										
7	8		Núcleos da Base																																																																																																																																									
9	10	11	12	13	→ Tronco Encefálico																																																																																																																																							
14	15				→ Cerebelo																																																																																																																																							
1	Hipocampo																																																																																																																																											
2	Área retroesplénica																																																																																																																																											
3	Área somatomotora (3m)																																																																																																																																											
3	Área somatossensorial (3s)																																																																																																																																											
4	Área orbital																																																																																																																																											
5	Área frontal																																																																																																																																											
6	Área olfatória																																																																																																																																											
7	Corpo estriado																																																																																																																																											
8	Globo Pálido																																																																																																																																											
9	Hipotálamo																																																																																																																																											
10	Tálamo																																																																																																																																											
11	Mesencéfalo																																																																																																																																											
12	Ponte																																																																																																																																											
	13	Bulbo																																																																																																																																										
	14	Fibras nervosas																																																																																																																																										
	15	Cerebelo																																																																																																																																										
	16	IV Ventriculo																																																																																																																																										
	17	III Ventriculo																																																																																																																																										
	18	Ventriculo Lateral																																																																																																																																										

Fonte: Elaborada pelos autores.

A obtenção das imagens por espectroscopia de massas permitiu observar a distribuição espacial de determinados lipídios em algumas regiões cerebrais especializadas e responsáveis por determinadas funções. A tabela 7 demonstra a distribuição espacial dos íons m/z 726,544 e m/z 774,544 e a superposição das imagens adquiridas do controle e redimensionadas para a mesma escala de tamanho das imagens neuroanatômicas. Por sua vez, o lipídio m/z 726,544 identificado como fosfatidiletanoamina PE (18:1p/18:1), encontra-se distribuído espacialmente nas regiões de bulbo, ponte, área motora do mesencéfalo, tálamo, isocórtex nas áreas somatomotor e sensorial, dispersos na área central do bulbo olfatório e no núcleo do cerebelo e nas fibras cerebelares. Software utilizado: GIMP, domínio público.

O lipídio m/z 774,544 identificado como fosfatidiletanoamina PE (18:0p/22:6), encontra-se distribuído espacialmente na área motora do mesencéfalo, difusamente no isocórtex preponderante na área somatomotora, corpo estriado (núcleo da base), área retro-hipocampal, tálamo e hipotálamo e também presente no parênquima cerebelares. As imagens demonstram que ocorre uma alteração na expressão de lipídios regionalmente e em sua intensidade.

Tabela 7: Distribuição do lipídio M/Z 726,544 e M/Z 774,544



Fonte: Elaborada pelos autores.

Assim foi possível criar painéis de biomarcadores lipídicos locorregionais: Hipocampo (1); Retroesplênica (2); Somatossensorial (3s) e (3m) (3); Somatomotora (4); Orbital (5); Frontal (6); Corpo estriado (7); Globo pálido (8); Hipotálamo (9); Tálamo (10); Mesencéfalo (11); Ponte (12); Bulbo (13); Fibras Nervosas (14); e Cerebelo (15), cujos nomes conservaram a região do encéfalo correspondente. A tabela 8 abaixo ilustra os lipídios identificados de acordo com sua distribuição locorregional.

Tabela 8: Painel com lipídios conforme distribuição espacial e estrutura no encéfalo

Painéis	ÍONS M/Z
Hipocampo (1)	281,24840 (FA);283,26397 (FA);303,23277 (FA); 687,49661 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395 (PE); 722,51278 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 834,52938 (PS); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI);
Retroesplênica (2)	281,24840 (FA);283,26397 (FA);303,23277 (FA); 309,27966 (FA); 687,49661 (PA); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);

Painéis	ÍONS M/Z
Somatos Sensorial (3s)	281,24840 (FA);283,26397 (FA);303,23277 (FA); 309.27966 (FA); 331,26404 (FA); 687,49661 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 786,5291 (PS); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);
Somato-Motora (3m)	281,24840 (FA);283,26397 (FA);303,23277 (FA); 309.27966 (FA); 331,26404 (FA); 687,49661 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 786,5291 (PS); 834,52938 (PS); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI);
Orbital(4)	283,26397 (FA);303,23277 (FA); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 834,52938 (PS); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI);
Frontal(5)	283,26397 (FA);303,23277 (FA); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 834,52938 (PS); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI);
Olfatória(6)	283,26397 (FA);303,23277 (FA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 834,52938 (PS); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);
Corpo estriado (7)	283,26397 (FA);303,23277 (FA); 331,26404 (FA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 834,52938 (PS); 797,5333 (PG); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 888,62368 (SF);
Globo pálido (8)	283,26397 (FA);303,23277 (FA); 331,26404 (FA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 834,52938 (PS); 797,5333 (PG); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI);
Hipo-Tálamo (9)	281,24840 (FA);283,26397 (FA);303,23277 (FA); 309.27966 (FA); 331,26404 (FA); 687,49661 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 786,5291 (PS); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 909,5496 (PI);

Painéis	ÍONS M/Z
Tálamo (10)	281,24840 (FA);283,26397 (FA); 303,23277 (FA); 309.27966 (FA); 331,26404 (FA); 687,49661 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 909,5496 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);
Me-Sencéfalo (11)	281,24840 (FA); 283,26397 (FA); 303,23277 (FA); 309.27966 (FA); 331,26404 (FA); 673,48111 (PA); 687,49661 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 738,50775 (PE); 738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 750,54393 (PE); 754,5752(PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 778,575 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 786,5291 (PS); 834,52938 (PS); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 909,5496 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);
Ponte(12)	281,24840 (FA); 309.27966 (FA); 673,48111 (PA); 687,49661 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 750,54393 (PE); 754,5752(PE); 778,575 (PE); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 909,5496 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);
Bulbo(13)	281,24840 (FA); 309.27966 (FA); 673,48111 (PA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 750,54393 (PE); 754,5752(PE); 778,575 (PE); 786,5291 (PS); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 909,5496 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);
Fibras nervosas (14)	309.27966 (FA); 673,48111 (PA); 700,52836 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE); 754,5752(PE); 778,575 (PE); 885,54956 (PI); 862,60691 (SF); 888,62368 (SF);
Cerebelo (15)	283,26397 (FA); 309.27966 (FA); 331,26404 (FA); 700,52836 (PE); 716,52395(PE); 722,51278 (PE); 726,54427 (PE); 728,55951 (PE);738,50775 (PE); 744,55444 (PE); 746,51323 (PE);750,54393 (PE); 762,5077 (PE); 764,52263 (PE); 766,5392 (PE); 772,52774 (PE); 774,54419 (PE); 790,53924 (PE); 794,57206 (PE); 786,5291 (PS); 834,52938 (PS); 797,5333 (PG); 857,5175 (PI); 883,53376 (PI); 885,54956 (PI); 909,5496 (PI);

Fonte: Elaborada pelos autores.

6.4 Discussão

Ao se realizar a identificação dos lipídios com as áreas de distribuição permite a produção de um atlas neuroanatomico por espectrometria de massas facilitando o estudo e a compreensão de possíveis doenças neurodegenerativas. Os déficits neurocognitivos poderão ser melhor compreendidos e avaliados associando o imageamento molecular (DESI-MS) com a obtenção de imagens neurofisiológicas (PET-RN). A PET/RM multimodal pode fornecer informação funcional de interesse, facilitando a identificação de padrões degenerativos específicos de doença de Parkinson, atrofia multissistêmica, paralisia supranuclearprogressiva e degeneração corticobasal [41].

A distribuição das diferentes espécies de lipídios nas diversas regiões cerebrais (neurônios, glia, oligodendrócitos, tratos nervosos, vasculares pericitos dentre outras) apontam para uma especialização da expressão, excreção, captação e metabolização lipídica das células em áreas discretas do encéfalo e cérebro.

As disfunções neurológicas listadas estão relacionadas a cada painel locorregional: painel hipocampo (1) - alterações relacionadas a memórias e emoções; painel retrosplenial (2) - alterações relacionadas à memória proprioceptiva espacial; painel somatossensorial (3s) - alterações relacionadas à informação tátil do corpo (tato, vibração, temperatura, dor) e integração com outras percepções sensoriais; painel somatomotora (3m) - alterações relacionadas à produção de movimentos voluntários e movimentos complexos; painel orbital (4) - alterações relacionadas à desinibição e ao comportamento social; painel frontal (5) - alterações relacionadas à fala e execução de tarefas cognitivas; painel olfatório (6) – alterações no olfato; painel corpo estriado (7) - alterações relacionadas a movimentos; painel globo pálido (8) - alterações relacionadas ao controle e inibição de movimentos; painel hipotálamo (9) - alterações relacionadas à manutenção da homeostase e da regulação entre sistema nervoso e endócrino; painel tálamo (10) - alterações sensitivas e da consciência, sono e vigília; painel mesencéfalo (11): alterações relacionadas à motricidade oculares e alterações somestésicas contra-laterais; painel ponte (12) - alterações relacionadas à paralisia facial, xerostomia, perda da sensibilidade térmica e dolorosa na face e dificuldade de mastigação; painel bulbo (13) - alterações relacionadas a alterações das funções autonômicas básicas tais como respiração, pressão sanguínea e frequência cardíaca; painel fibras nervosas (14) - alterações relacionadas à percepção sensorial e coordenação de movimentos; painel cerebelo (15) - alterações relacionadas à manutenção do equilíbrio, tônus muscular, movimentos involuntários e aprendizagem motora.

A utilização dos painéis também poderia contribuir na antecipação do diagnóstico de doenças neurodegenerativas incipientes com baixo nível de manifestações clínicas neurológicas, sensoriais, motoras e neurocognitivas.

6.5 Conclusão

Após a investigação experimental, a obtenção dos resultados analíticos e de imageamento por DESI-MSI, é possível afirmar que a radiação induz alterações metabolômicas no perfil lipídico cerebral, em regiões específicas do encéfalo.

As modificações metabólicas e moleculares podem estar correlacionadas aos principais efeitos adversos acarretados pela radioterapia no encéfalo. A radioindução pode acarretar alterações da expressão lipídica desencadeando as possíveis alterações e distúrbios neurológicos.

O uso de moléculas lipídicas como potenciais biomarcadores de resposta terapêutica e toxicidade pode estimular o uso de radioprotetores de exposição à radiação como antioxidantes para neuroproteção tanto em tratamentos oncológicos como em acidentes radiológicos e nucleares.

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico Nuclear (CDTN), em especial ao Dr. Luis Ladeira, Laboratório de Irradiação Gama (LIG), pelas irradiações animais. Agradecemos à CAPES pela bolsa de mestrado. Agradecemos ao CNPq pelo projeto REBRAT/SUS, 2013. Agradecemos o apoio institucional da CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Contribuições dos autores

Concepção e desenho do estudo: MFSM, TPRC, RA; aquisição de dados: MFSM; análise/interpretação dos dados: MFSM, RA, GDC; supervisão ou orientação: TPRC, RA, GDC. Cada autor contribuiu com conteúdo intelectual importante durante a redação ou revisão do manuscrito e assumiu a responsabilidade pelo trabalho geral de garantir que as questões relativas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e resolvidas. A MFSM assume a responsabilidade de que este estudo tenha sido relatado de forma honesta, precisa e transparente e que nenhum aspecto importante do estudo tenha sido omitido.

REFERÊNCIAS

- [1] P. Deb, A. Fielding, Radiobiological model comparison of 3D conformal radiotherapy and IMRT plans for the treatment of prostate cancer, *Australas Phys Eng Sci Med*, 32 (2009) 51-61.

- [2] M. Mingote, Análise lipídica de tecido cerebral expostos à radiação por DESI-MS., Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, (2017) 158.
- [3] J.W. Goldwein, J.M. Leahy, R.J. Packer, L.N. Sutton, W.J. Curran, L.B. Rorke, ... , G.J. D'Angio, Intracranial Ependymomas in children. , *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.*, 19 (1990) p.1497-1502.
- [4] R. MIRALBELL, A. BLEHER, P. HUGUENIN, G. RIES, e. al., Pediatric medulloblastoma: Radiation treatment Tecchnique and patterns of failure., *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.*, 37 (1997) p.523-529
- [5] P.D. BROWN, J.C. BUCKNER, U.J. H, e. al., The neurocognitive effects of radiation in adult low-grade glioma patients., *Neuro-Oncology*, 5 (2003) p.161–167.
- [6] L.L. GUNDERSON, J.E. TEPPER, *Clinical Radiation Oncology*. Elsevier, (2015).
- [7] N.L. Burt, e. al., Central Nervous System Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology. , *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.*, 11 (2013) p.1114–1151.
- [8] T.E. MERCHANT, H.M. CONKLIN, S. WU, e. al., Phase II trial of conformal Radiation therapy for pediatric low-grade glioma., *Journal of Clinical Oncology*, 27 (2009) p. 3598–3604.
- [9] R.K. MULHERN, S.L. PALMER, T.E. MERCHANT, e. al., Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma. , *Journal of Clinical Oncology*, 23 (2005) p.5511–5519.
- [10] M. RIS, K. WALSH, D. WALLACE, e. al., Intellectual and academic outcome following two chemotherapy regimens and radiotherapy for average-risk medulloblastoma: COG A9961. , *Pediatric Blood and Cancer*, 60 p. 1350–1357.
- [11] E. Okuno, E. Yoshimura, *Física das Radiações*, (2010) 296.
- [12] Omar R. Alshykhly, Aaron M. Fleming, C.J. Burrows, Guanine Oxidation Product 5-Carboxamido-5-formamido-2-iminohydantoin Induces Mutations When Bypassed by DNA Polymerases and Is a Substrate for Base Excision Repair., *Chemical Research in Toxicology.*, 28 (2015) p. 1861–1871.
- [13] Butterfield DA, Swomley AM, S. R., Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression., *Antioxidants & Redox Signaling.*, 19 (2013) p. 823-835.
- [14] S.S. DAVID, V.L. O'SHEA, S. KUNDU, Base-excision repair of oxidative DNA damage., *Nature*, 447 (2007) p.941-950.
- [15] J.P. DUXIN, J.C. WALTER, What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia?, *Current Opinion in Cell Biology.*, 37 (2015) p.49–60.

- [16] M. ZABEL, A. Nackenoff, W.M. Kirsch, F.E. Harrison, G. Perry, M. & Schrag, Markers of oxidative damage to lipids, nucleic acids and proteins and antioxidant enzymes activities in Alzheimer's disease brain: A meta-analysis in human pathological specimens., *Free Radical Biology and Medicine.*, 115 (2018) p. 351-360.
- [17] E. ACKERSTAFF, e. al., Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells?, *Journal of Cellular Biochemistry.*, 90 (2003) p.525-533.
- [18] C. Peña-Bautista, C. Vigor, J. Galano, e. al., New screening approach for Alzheimer's disease risk assessment from urine lipid peroxidation compounds., *Scientific Reports*, 9 (2019) 14244.
- [19] MARKESBERY WR, L. MA., Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. , *Neurobiology of Aging*, 19 (1998) p. 33-36.
- [20] MONTINE TJ, Neely MD, Quinn JF, e. al., Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. , *Free Radical Biology and Medicine.*, 33 (2002) p. 620–626.
- [21] SAYRE LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, S. MA., 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1997;68(5):2092–209, *Journal of Neurochemistry.*, 68 (1997) p. 2092–2209.
- [22] SNALINA N, Alessenko A, Gavrilova S, Gurianova S, Prochorov A, Kononova E, F. Y, Memantine changes lipids spectrum and lipid peroxidation in animal brain and plasma of patients with Alzheimer's disease., *FEBS Journal*, (2014) p.281-286.
- [23] CHANG Y, Kong Q, Shan X, Tian G, Ilieva H, Cleveland DW, Rothstein JD, Borchelt DR, Wong PC, L. C-G, Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. , *PLoS ONE* 3, 3 (2008).
- [24] CHANG Y.T., Chang W.N., Tsai N.W., Huang C.C., Kung C.T., Su Y.J., Lin W.C., Cheng B.C., Su C.M., Chiang Y.F., L. C.H., The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review., *Biomed Research International.*, (2014) p. 1-14.
- [25] FENG Z, Qin C, Chang Y, Z. J, Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease., *Free Radical Biology and Medicine* 40 (2006) p. 101-109.
- [26] E. NIEDZIELSKA, I. Smaga, M. Gawlik, A. Moniczewski, P. Stankowicz, J. Pera, M. & Filip, Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases., *Molecular Neurobiology*, 53 (2016) p. 4094–4125.
- [27] A. BLANCO, M. Baquero, M. Vento, e. al., Potential oxidative stress biomarkers of Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer Disease. , *Journal of the Neurological Sciences.*, 373 (2017) p. 295-302.

- [28] R. ABETI, A. BACCARO, e. al., Novel Nrf2-Inducer Prevents Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia Models. , *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12 (2018).
- [29] H. BLASCO, G. GARCON, F. PATIN, e. al., Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study., *Canadian Journal of Neurological Sciences.*, 00 (2016) p. 1-6.
- [30] P. BROCARD, E. MCGINNIS, B.R. CHRISTIE, e. al., Time-course analysis of protein and lipid oxidation in the brains of yac128 huntington's disease transgenic mice., *Rejuvenation Research*, 19 (2015) p. 140-148.
- [31] K. CHANGA, M. CHENG, M. CHIANGD, C. CHENA, Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases, *Clinica Chimica Acta*, 485 (2018) p. 79-87.
- [32] A. HATAMI, C. ZHU, e. al., Deuterium-reinforced linoleic acid lowers lipid peroxidation and mitigates cognitive impairment in the Q140 knock in mouse model of Huntington's disease., *The FEBS Journal.*, 285 (2018) p. 3002-3301.
- [33] Medi Kori, Busra Aydın, Semra Unal, K.Y. Arga, D. Kazan, Metabolic Biomarkers and Neurodegeneration:A Pathway Enrichment Analysis of Alzheimer's Disease,Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis., *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 20 (2016) p. 645-661.
- [34] Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, e. al., Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial., *Archives Of General Psychiatry.* , 67 (2010) p. 146-154.
- [35] De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, D.M. V., Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia., *Lipids in Health and Disease.*, 2 (2003).
- [36] P. GREEN, N. Anyakoha, G. Yadid, I. Gispán-Herman, A. Nicolaou, Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine species are increased in selected brain regions of a depressive animal model: Implications for pathophysiology., *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* , 80 (2009) p. 213-220. .
- [37] Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, H. CJ., Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress., *Psychoneuroendocrinology.*, 34 (2009) p. 1257-1262.
- [38] Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie RA, e. al., Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia., *Molecular Psychiatry.*, 12 (2007) p. 934-945.
- [39] Orešič M, Tang J, Seppänen-Laakso T, e. al., Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders: a general population-based study., *Genome Med.*, 3 (2011) 19.

[40] Polymeropoulos MH, Licamele L, Volpi S, e. al., Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia., *Schizophrenia Research.*, 108 (2009) p. 134-142.

[41] Afaq A, Syed R, e. al., PET-MRI: A new technology in the filed of molecular imaging., *British Medical Bulletin*; 108 (2013) p. 159-171.

7 METODOLOGIA DO TRABALHO DE TESE

7.1 Agrupamento

Foram utilizados 40 ratos Wistar saudáveis, com faixa etária de 11 semanas e peso corporal entre 300 ± 15 g, com livre acesso a água e a alimento com fotoperíodo de 12 h. Os animais foram divididos em dois grupos: um controle (n=7), denominado GC, e outro submetido à irradiação de corpo inteiro, denominado GIR (n=33). Para linearizar as variáveis foram utilizados animais da mesma linhagem, família, com mesmo peso e idade, providos pelo biotério da Universidade Federal de Minas Gerais.

7.2 Protocolo de Irradiação

Os animais do grupo GIR (n = 33) foram submetidos a TBI (Total Body Irradiation – TBI) através da exposição a uma fonte Co-60, todos juntos colocados em 6 caixas, com uma dose absorvida de 5 Gy, no Laboratório de Irradiação Gamma-LIG da Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN. Eles foram irradiados após uma cinética de tempo distinta. Os seguintes dados foram definidos: data de calibração da fonte Co-60 em 14 de outubro de 2013; Atividade na data de calibração de 43749,21 Ci; Atividade na data de irradiação do animal de 26940,00 Ci; Distância da chaminé de 1,6 m; Taxa de dose atual de 87,91 Gy.h⁻¹; Dose aplicada de 5 Gy; Tempo de exposição de (hr: mm: ss) 0:03:25.

7.3 Procedimento de eutanásia

Alguns cuidados foram tomados durante todo o processo. Os animais foram mantidos em jejum sem privação de água nas caixas. Toda a bancada foi limpa previamente colocando-se apenas as balanças, caixa de polipropileno para pesagem, os instrumentais cirúrgicos, a cuba de polipropileno para cirurgia e a guilhotina. Todo o material foi lavado em água Milli-Q a fim de se retirar resíduos de detergente. A caixa de isopor tinha gelo seco (~2kg) juntamente com 02 beckeres com n-heptano (-78°C) para congelamento instantâneo e preservação da anatomia dos órgãos. Os zip-locks foram previamente identificados para cada tipo de órgão. Foi necessário calibrar e tarar duas balanças diferentes. Para a pesagem dos órgãos, foi utilizada uma balança analítica (calibrada) e a segunda com maior capacidade, foi separada para registrar

o peso dos animais. Os cálculos de preparação das soluções anestésicas de Cetamina e Xilazina foram realizados cuidadosamente tendo por base o peso do animal aferido: foi utilizado uma dose de 80mg de cetamina + 15mg de xilazina, ambas /kg de animal

7.3.1 Via de Administração: Via parenteral, IP (Intraperitoneal) ou IM (Intramuscular)

A cetamina é comercializada a 5% e a 10% e a xilazina a 2% e a 10%. Para efeito de cálculo da dose foi ministrada foi calculada em mg/ml. A dose de cetamina a 5%; (50mg/ml) utilizada 0,2mL (10mg) para cada 100g de peso corporal e a dose de xilazina a 2% (20mg/ml) foi de 0,075mL ~0,1mL (2,0mg) para cada 100g de peso corporal. (Ambas em seringas de 1ml). Foi estabelecido a relação em V/V Cetamina/Xilazina: 2:1

Os anestésicos foram retirados do refrigerador 30 min antes do início dos experimentos. Foram utilizadas luvas de proteção para realização do procedimento anestésico via IP com a dose já calculada previamente. Após a completa hipnose do animal, confirmado através de estímulos, a cabeça foi posicionada na guilhotina e seccionada com um único movimento. A cabeça foi transferida rapidamente para uma cuba onde se iniciaram as manobras de trepanação da caixa craniana. O processo deverá ser realizado com o máximo de cuidado e evitou-se as fraturas no tecido cerebral o que inviabilizaria os cortes no criostato para a confecção de lâminas. Foi retirado a pele da cabeça com a tesoura de ponta fina, retirado o excesso da coluna cervical e iniciado a abertura pela parte posterior e pelas laterais correspondentes a região temporal humana. Com um alicate foi retirado a calota superior para expor o encéfalo e assim foi retirado a dura-máter e pia-máter para evitar possíveis fratura no tecido cerebral. Com uma pinça foi seccionado os nervos da base e retirado delicadamente todo o encéfalo diretamente sobre a placa de petri. O encéfalo foi colocado em cima do papel alumínio já com a balança previamente ligada, calibrada e tarada, pesado e registrado o peso do órgão na planilha, colocado imediatamente no becker com n-heptano para realizar o congelamento imediato, aguardado uns 10s e retirado o órgão para o zip-lock correspondente e deixado dentro do próprio isopor para manutenção até o armazenamento definitivo em freezer -80°C.

O procedimento para os demais órgãos, foi realizado da mesma forma: a pesagem e congelamento imediatos, registro na planilha e armazenamento no zip-lock para estocagem provisória no isopor contendo gelo seco e posterior transferência para o armazenamento definitivo em freezer -80°C.

Foi evitado o contato direto com as amostras pois inúmeros contaminantes como ácidos graxos da pele e detergentes usados para lavar os materiais são potentes agentes de interferência durante as análises. Foi utilizado luvas para manuseio de todo o material que foi previamente lavado e abundantemente imerso e enxaguado em água Milli-Q

7.4 Confeção das lâminas (Criomicrotomia)

Lâminas:

- a) 2 pinceis extrafino longo (1 sintético e 1 natural) e 1 pincel grosso
- b) Laminas para criostato descartável para corte histológico perfil alto 818 Leica
- c) 1 Tubo Tissue-Tek O.C.T
- d) Luvas de procedimento
- e) Laminas para histologia
- f) Sacos plásticos para descarte de material descartável e biológico
- g) Caixa de isopor com gelo seco (~5kg)
- h) Porta Lâminas 02 caixas de 50 lâminas J-Prolab
- i) Placas Poliméricas FlexiMass DST para MALDI

As seguintes etapas foram seguidas:

- a) Foi congelado rapidamente todo o tecido em um freezer (-80°C) até a confecção das lâminas no criostato. Foi ajustado o micrótopo Leica CM3050-S para a temperatura de (-30°C) e a espessura desejada para a lâmina entre 12-18 μm (14 μm em média). Foi observado a necessidade de colocação do tecido no pedestal 30 min antes de se iniciar os cortes para que o tecido atingisse a temperatura local (OT: temperatura do cabeçote da amostra; CT: temperatura da câmara do criostato). Foi ligado o aparelho e verificado a temperatura da câmara criostática para que o ajuste da temperatura fosse realizado conforme o tipo de tecido, de acordo com a Tab. 9 abaixo. Teve-se o cuidado de não se tocar diretamente na superfície dos órgãos e das lâminas a fim de evitar contaminações com ácidos graxos da pele na composição e distribuição química tecidual. Todos os órgãos a serem utilizados foram mantidos no isopor com gelo seco e deve ser retirado e colocado na câmara fria do criostato para que atinja a temperatura estabelecida. As

lâminas prontas devem ficar na câmara fria até sua transferência definitiva para o porta laminas e o seu retorno para o freezer -80°C.

As laminas foram montadas de modo que os órgãos não ficassem paralelos já que o DESI deve ser otimizado. Durante a otimização um dos cortes seria afetado pelo solvente e o gás de arraste sendo que o ideal seria colocar cada corte em posições opostas na lâmina

Tabela 9: Temperaturas ideais para cada tipo de órgão no criostato

Tecido	10 – 15(°C negativos)	15 – 25(°C negativos)	25 – 50(°C negativos)
Cérebro		✱	
Coração		✱	
Pulmão		✱	
Fígado			✱
Rins			✱
Gônadas	✱	✱	

Fonte: Elaborada pelo autor.

b) Foi aplicado aproximadamente 0,5 mL Tissue-Tek O.C.T na base do pedestal circular em que será fixado o tecido para realização das secções. Teve-se o cuidado de não utilizar Tissue-Tek OCT em excesso pois a contaminação da amostra interfere na formação dos íons nas análises para obtenção das imagens.

c) Foi calçado luvas de procedimento e separado 02 navalhas: a primeira foi separada e utilizada para separação dos hemisférios cerebrais e a segunda foi colocada no cabeçote lembrando sempre de ter o cuidado para não bater o pincel na navalha. As navalhas foram separadas e identificadas para uso posterior.

d) Os zip-lock com os órgãos a serem utilizados foram deixados dentro da câmara criostática e o restante foi mantido em isopor com gelo seco

e) Foi colocado algumas lâminas que seriam utilizadas dentro da câmara criostática já devidamente higienizadas para que estabeleçam um equilíbrio térmico com a câmara criostática.

f) Foi colocado o hemisfério cerebral seccionado desejado em cima do Tissue-Tek OCT até a sua completa solidificação

- g) Foi colocado o disco da amostra no cabeçote e iniciado o shaving até se obter cortes uniforme e sem ranhuras.
- h) Não foi utilizado a placa de vidro para captura do corte pois as irregularidades nas bordas poderiam produzir ranhuras danificando a superfície do corte para ionização.
- i) A otimização do corte em relação a inclinação frontal e lateral do cabeçote, lâminas novas, velocidade do corte e temperatura do cabeçote e da amostra foi fundamental o que determinou uma ótima qualidade do corte. A manivela foi girada continuamente para que não houvesse microfraturas ou perda do corte (corte esfarelado).
- j) No início, foi desenrolado a ponta cuidadosamente, e deixado que se prendesse no pincel para que a manivela pudesse ser girada manualmente em uma velocidade constante para se obter um corte uniforme. Não foi pressionado o corte com o pincel, ocorreu uma aderência e o corte foi desenrolado suavemente.
- k) Quando ocorria fraturas, foi colocado o dedo com a luva levemente em cima da amostra sem pressionar, aumentando um pouco a temperatura e minimizando a ocorrência de fraturas
- l) O corte foi aberto e deixado em cima da superfície próximo a navalha e virado de ambos os lados para que congele e adquira consistência aberta, sendo colocado posteriormente com extremo cuidado sob a lâmina.
- m) Assim que o corte foi posicionado sob a lâmina, colocou-se a lâmina no pulso para que ocorresse a adesão com o choque térmico e em seguida a lâmina foi retornada para a câmara criostática para reestabelecimento da temperatura de congelamento
- n) Identificou-se a lâmina e foi retornada para a caixa de lâminas
- o) Cuidado, com a contaminação do material, os ácidos graxos da pele poderiam ter contaminado as amostras. Foi evitado qualquer tipo de toque direto nas lâminas, para que os ácidos graxos não ficassem nas pontas das luvas e fossem transferidos para as amostras. Caso haja suspeita de contaminação trocar luvas e lâmina. As lâminas do criostato foram trocadas todas as vezes que as amostras de animais controlem/experimentais, do mesmo órgão eram trocadas. As lâminas foram limpas com papel toalha.

7.5 Protocolos DESI

Imediatamente antes de proceder as análises, as lâminas foram transferidas para um dessecador a vácuo por 15-20 min até descongelar com o cuidado de não desidratar excessivamente para não reduzir a eficácia do DESI. O período de descongelamento pode ser utilizado para iniciar o equipamento. A otimização do aparelho foi fundamental para se obter imagens com ótima qualidade e resolução preservando-se as estruturas anatômicas. Testes foram realizados para se analisar inúmeras variáveis como solvente ideal (DMF:ACN), fluxo da bomba de infusão (fluxo contínuo garante um bom impacto e um tamanho efetivo do pixel), volume de solvente na bomba para realização de toda a varredura, pressão do gás nebulizador de nitrogênio, voltagem aplicada a fonte de íons, ângulos de incidência/saída. A sonda do analisador de massas estava a uma distância de 3mm da superfície da amostra e 5 mm de entrada do capilar de entrada do MS e também manter um ângulo de entrada de 55° em relação a superfície da amostra. Os íons dessorvidos estavam a um ângulo de saída de aproximadamente 15° em relação a superfície da amostra para transferência ótima de íons. O solvente com DMF:ACN proporcionou um aumento na intensidade do sinal dos íons com uma área de spray bem definida sendo ideal para aplicações de imagem além de ser histologicamente compatível com procedimentos médicos permitindo a histoquímica H&E após DESI-MS Imaging. Foi calculado as posições “X” e “Y” e com a fonte nebulizador e a bomba de solventes desligados, observou-se se durante a varredura, se a área medida e selecionada estava compatível sem que nenhuma região fosse cortada.

Parâmetros de otimização DESI final:

- a) Solvente: DMF:ACN (1:1)
- b) Tensão aplicada no spray de 5kV
- c) Taxa de fluxo de solvente de 3,5µl/min
- d) Fluxo: (ul/s): 458,93
- e) Resolução de 70.000
- f) AGC Target: 5e⁶
- g) Tempo máximo de injeção: 200 ms
- h) Temperatura do capilar: 300°C
- i) Pressão de 175 psi de gás nebulizador N₂
- j) Full MS, modo íon negativo [M-H-]

- k) Massas na faixa de m/z 200 – 1000
- l) Ângulo incidência de 54° entre a fonte e a superfície do analito
- m) S-Lens RF level: 100

7.5.1 Imagem Tecidual

Foi instalado os programas nas seguintes ordens:

- a) BIOMAP: o IDL foi instalado primeiro para depois ser instalado o Biomap
- b) Xcalibur: foi instalado o Foundation 3.0 primeiro para depois ser instalado o Xcalibur (o antivírus foi desabilitado para se evitar o travamento da instalação)
- c) Prosolia FireFly: foi realizado a instalação direta.

Todo o trabalho foi desenvolvido com os softwares de domínio público. Os softwares registrados foram obtidos juntamente com a aquisição do espectrômetro de massas.

7.6 Análise dos resultados obtidos

As análises dos resultados consistem em algumas etapas a serem especificadas:

- a) Os espectros gerados (em média de 80 por lâmina) serão utilizados para gerar as imagens contendo todos os íons gerados e analisados ponto a ponto da amostra. A fusão dos espectros e a criação de um arquivo imagem e realizada pelo software Prosolia FireFly;
- b) Análises de todos os espectros obtidos dos grupos controles e formação de um banco de dados procurando identificar os principais lípides por seu m/z utilizando o banco de dados proveniente do LIPID MAPS (LMSD: LIPID MAPS structure database);
- c) Análises de todos os espectros obtidos dos grupos experimentais nas cinéticas de tempo de 24h, 48h, 96h e 01 semana procurando identificar os principais lípides por seu m/z utilizando o banco de dados proveniente do METLINTM (Metabolites and Pathways Strategy) e LIPID MAPS ® (Lipid Metabolites and Pathways Strategy). Na base de dados do METLINTM, apenas as espécies com erro máximo de 1 ppm entre as massas teóricas e experimentais dos íons observados nas imagens foram consideradas

na atribuição de categorias aos lipídios. Este parâmetro foi atribuído para dar confiabilidade aos resultados, uma vez que não foram utilizados padrões analíticos para confirmar as espécies propostas. Além disso, isotopólogos mais pesados (contendo ^{13}C) com erro máximo de 5 ppm entre as massas teóricas e experimentais e com imagens bastante semelhantes às dos isotopólogos mais leves não foram considerados. Todos os lipídios propostos foram classificados de acordo com sua categoria, utilizando a nomenclatura e abreviaturas estabelecidas pelo LIPID MAPS®.

d) Comparar os dados obtidos e selecionar os principais íons que tiveram a sua expressão alterada quali/quantitativamente;

e) Relacionar os principais lipídios biomarcadores e identificar as principais regiões de ocorrência fisiológica e principais modificações locorregionais radioinduzidas.

8 RADIOINDUCED MODULATORY RESPONSE OF LIPID PROFILES OF WISTAR RATS BRAIN MONITORED BY DESI-MS IMAGING⁵

Abstract

Radiotherapy is one of the possible treatments against brain gliomas. However, numerous side effects from exposure to ionizing radiation already have been observed and reported in literature. Ionizing radiation employed in radiotherapy treatment can break down bonds in DNA molecules and promote the formation of ROS/ RNS, i. e. Reactive Oxygen (Nitrogen) Species. Lipid profile analysis (Lipidomics) through desorption electrospray ionization mass spectrometry by image (DESI -MSI) of individuals that were submitted to radiotherapy allows qualitatively evaluation of classes of lipids distributed topographically in the brain. In the present work, two groups of Wistar rats - a control one and another subjected to total body irradiation (TBI) - were exposed to a Co-60 radiation source and sacrificed at different times. To evaluate the effects and response of radiotherapy treatment, some classes of lipids distributed in their brains were identified and correlated to some neurophysiological functions.

Keywords: Desorption Electrospray Ionization (DESI), Mass Spectrometry Imaging, Lipids, Radiation Effects, Radio-Induced Modulatory Response.

8.1 Introduction

Tumors of the central nervous system (CNS) have a high malignancy with a high capacity for progression, causing harmful effects that can trigger important neurological changes. Oncological radiotherapy is a specialty that uses ionizing radiation in order to cure or control the growth of these neoplasms. However, ionizing radiation acts indiscriminately both on tumor cells and on adjacent healthy cells, often leading to neurotoxicity and major neurocognitive disorders [1, 2]. The radiotherapy treatment consists of the use of ionizing radiation for the control and clonogenic reduction of neoplasms (malignant and benign) based on an adequate planimetry associated with prescriptions of effective therapeutic doses [3, 4]. Radio-induced toxicities trigger leukoencephalopathies (extensive white matter lesions with several lacunar infarcts), resulting in a neurocognitive decline and a decrease in life quality [5, 6].

⁵ Artigo submetido à *Revista Analytical and Bioanalytical Chemistry*, manuscript no. ABC-00841-2022, 17/05/22). Autores: Matheus Figueiredo Soares Mingote (UFMG), Camila Cristina Almeida de Paula (CEFET-MG), Tarcísio Passos Ribeiro de Campos (UFMG), Rodinei Augusti (CEFET-MG), Géssica Vasconcelos (UFG), Boniek Vaz (UFG).

Higher doses lead to exacerbated effects such as fatigue, erythema, alopecia, headache and nausea, vomiting, dry mouth, conjunctivitis, neuropathies, and neuritis (ototoxicity, retinopathies, blindness, cataracts) and hypothalamic-pituitary dysfunctions. Cognitive deficits lead to a significant impairment in intellectual development (Full-Scale Intelligence Quotient - FSIQ) [7-10]. Ionizing radiation causes direct DNA damage and indirect damage by favoring and forming reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). ROS / RNS represents one of the main threats that cause damage to the genome. Ionizations directly cause base alterations and deletions in DNA, disruption of hydrogen bonds, fragmentation of single-strand breaks (SSBs), or double-strand DNA (DSBs - double-strand breaks), and induce the formation of internal or external cross-linking of molecules with DNA and proteins [11, 12]. The action of ROS triggers the lipoperoxidation process in polyunsaturated fatty acids, generating highly reactive by-products, such as aldehydes, ketones, epoxides, and hydrocarbons, which can even lead to mutations and genetic damage. [11, 13-16]. Lipid peroxidation is a cytotoxic event defined by successive biochemical events activated by free radicals determining the extensive oxidation of unsaturated fatty acids and membranes. The by-products formed generate structural and functional changes in the cell membrane, causing changes in the ionic and molecular substrate flow, initiating several processes [17]. The peroxidation of the esterified arachidonic acid, a constituent of the cell membrane, favors mainly the formation of isoprostanes (compounds formed during the peroxidation of arachidonic acid), resulting in important physico-chemical alterations that cause changes in the fluidity and inactivation of the enzymatic transmembrane receptors responsible for intracellular and nuclear signaling [18].

Oxidation of membrane lipids also occurs with aging and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) [19-21]. Oxidative stress is essential in the initial development of AD, showing a significant expressive increase in lipid peroxidation [22-25]. Samples of the cerebral cortex and hippocampus have already demonstrated high concentrations of malondialdehyde (MDA) and carbonyl protein (CP), demonstrating the importance of lipid peroxidation in the development of AD [26]. Oxidized lipid by-products, as well as DNA / RNA, can be measured in peripheral fluids by increased levels of MDA and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8OHdG) / 8-hydroxyguanosine (8OHD), respectively [27]. Increased levels of MDA and 8OHdG were also measured in urine, cerebrospinal fluid (CSF) and blood for other neurodegenerative diseases such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (DH) and Friedreich's ataxia (FRDA)[28-33].

In other studies, disorders in lipid signaling with decreased levels of endocannabinoids have been reported in patients with schizophrenia and depression. Changes in the levels of non-esterified fatty acids (NEFA) and phosphatidylcholines (PC) in the gray/white matter and an increase in the ceramide levels in white matter have also been found in patients with schizophrenia. In patients with depression, however, an increase in certain species of PCs containing arachidonic acid was observed. The use of antipsychotic medication led to changes in serum lipid profiles showing a strong association with altered gene expression of lipid metabolism [34-40].

Lipidomics refers to the investigation of the cellular lipid profile resulting from the metabolome of biomolecules (DNA / RNA, amino acids, carbohydrates, and lipids) using mass spectrometry to contribute and add to the recent advances in molecular genomics and proteomics. Lipidomic investigation involves identification and quantification, evaluates interactions with other biomolecules and metabolites, and also allows structural assessment as well as intracellular morphophysiology and its behavior towards the numerous disorders that occur in the system. Spatial and temporal changes in the content and composition of different molecular species of lipids (membrane lipidomics and lipid neurotransmission) through changes in their physiological or pathological state allow broadening the understanding of the mechanisms that cause changes in cellular functioning. Lipidomics play an essential role in defining the biochemical mechanisms underlying the pathophysiological processes related to lipid dysfunction by identifying changes in cell lipid signaling, metabolism, traffic, and homeostasis. The elucidation of such mechanisms helps to understand specific pathophysiological mechanisms involved mainly in neurodegenerative diseases. [41-47]

Desorption electrospray ionization mass spectrometry by image (DESI -MSI) can promote the desorption, in ambient conditions, of biomolecules in animal tissues allowing the qualitative and quantitative spatial analysis of these molecules. For this reason, this technique has been used to investigate the lipid profile of different animal tissues in the search for markers that may be associated with diseases and also to understand the metabolic role of different classes of lipids in the body. [48 – 55]

Electrospray desorption ambient ionization mass spectrometry (DESI-MS) was first described in 2004 by Takats and colleagues. [56] In this technique, a high voltage (~ 5 kV) is applied to a capillary in which a low flow of solvent (0.5 to 10.0 mL.min⁻¹) - such as acetonitrile and methanol - is percolated. When expelled from the capillary, with the aid of an inert nebulizer gas, the solvent beam reaches the surface that contains the sample at an appropriate

angle and transfers charge to the ionizable species. The generated ions readily interact with the electric field and enter the mass spectrometer. For image generation, spectra are obtained all over the sample in order to scan the entire tissue. The intensities of the ion signals observed in the spectra are converted into an image using a software that allows the spatial distribution of a given ion to be evaluated through a color scale.

The present study describes the spatial distribution of the different lipid molecules present in the structures of the Wistar rat brain and the radio-induced response of these tissues before and after the administration of gamma radiation. To the best of our knowledge, the present study comprises the first investigation of whether radiation exposure can affect the lipids profile.

8.2 Materials and methods

8.2.1 Animals

Fifteen healthy Wistar rats, aged 11 weeks and body weight between 300 ± 15 g were selected. The animals were divided into two groups: a control ($n = 3$), called GC, and another subjected to total body irradiation (TBI), called GIR ($n = 12$) subdivided into 04 subgroups containing 03 animals each. The animals were submitted to the same photographic period of 12h day/night with free access to food and water. Animals of the same lineage, family, with the same weight and age, were used to linearize the experiment, provided by the Laboratory of the Federal University of Minas Gerais, Biotério Central. Animal experiments took place with the approval of the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (CETEA - UFMG).

8.2.2 Irradiation protocol

Each subgroup of GIR animals was placed in appropriate boxes and subjected to total body irradiation by exposure to the Co-60 source (absorbed dose of 5 Gy) at the Gamma-LIG Irradiation Laboratory of the Nuclear Technology Development Center of the Federal University of Minas Gerais - CDTN - UFMG. The following irradiation parameters were followed: the animals' activity on the irradiation date was 26,940.00 Ci; chimney distance of

1.6 m; current dose rate of $87.91 \text{ Gy}\cdot\text{h}^{-1}$; applied dose of 5 Gy; exposure time of (h: min: s) 0:03:25.

8.2.3 Preparation of tissue

The animals belonging to each subgroup were sacrificed on the same date to remove the brains. Therefore, each subgroup was exposed to the same radiation conditions at different times before the sacrifice date to perform the post-radiation kinetic study. Thus, each subgroup was submitted to the radiation protocol 7 days, 96 h, 48 h, and 24 h before sacrifice, respectively, totaling 4 subgroups.

To remove the organs, the animals were anesthetized by intramuscular injection with a combination of 5% ketamine (0.2 mL for each 100 g of body weight) and 2% xylazine (0.1 mL for each 100 g of body weight).

After sacrificing and removing the brain, the organs were weighed, stored in duly identified plastic bags, and instantly frozen in a mixture of dry ice and n-heptane at approximately -78°C to avoid denaturation. Then, the organs were stored in a freezer (-80°C) until the slides were prepared in the cryostat.

For the preparation of the slides, the Leica CM3050-S microtome was adjusted to a temperature of -30°C , and the thickness of the slide was adjusted to $14 \mu\text{m}$. The organs were previously removed from the freezer to reach the cryostat temperature before cutting. The slides were then returned to the freezer at -80°C for further analysis by DESI.

8.2.4 Desorption electrospray mass spectrometry (DESI)

Before analysis, the plates with the slide samples were transferred to a vacuum desiccator for 15-20 min until thawing. The solvents chosen were acetonitrile and N, N-dimethylformaldehyde ACN: DMF (1: 1) to avoid morphological changes. The infusion pump was adjusted with a flow rate of $3.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The nitrogen nebulizer gas pressure was 160 psi. The high voltage applied to the ionization source was 5 kV. The angle of incidence between the source and the sample surface was approximately 54° . Mass spectra were acquired in the 200-1000 mass range. The analysis was performed by a Thermo Fisher Scientific Q Exactive Orbitrap MS (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) operating in negative ion mode. For data translation into the acceptable format for graphical analysis: FireFly, see 2.0.1 (Prosolia,

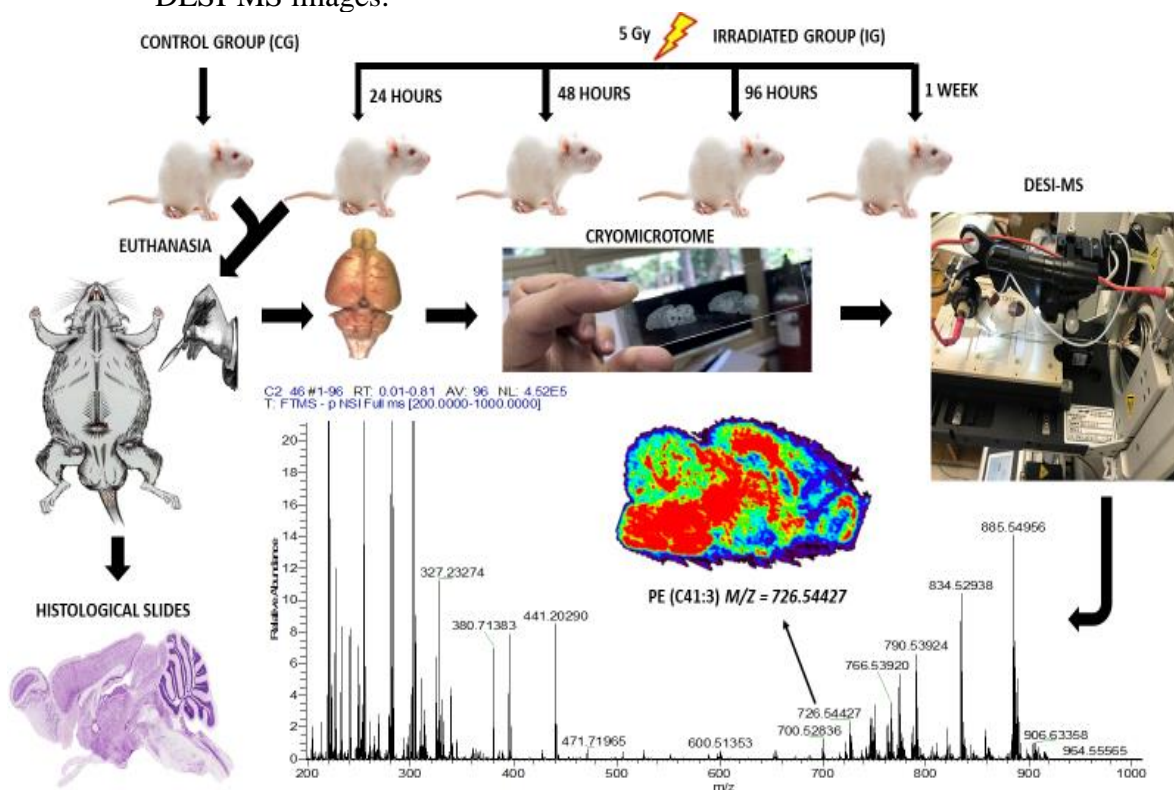
Indianapolis, USA) and for data visualization and interpretation: BioMap see. 3x (Novartis Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland). All analyzes were performed on the same day to avoid inconsistency in the dates.

8.2.5 Ion identification

All ions attributed to possible lipids observed in the mass spectra were identified in the METLINTM (Metabolite and Chemical Entity Database) and LIPID MAPS® (Lipid Metabolites and Pathways Strategy) databases.

In the METLINTM database, only those species with a maximum error of 1 ppm between the theoretical and experimental masses of the ions observed in the images were considered when assigning categories to lipids. This parameter was assigned to give reliability to the results since no analytical standards were used to confirm the proposed species. Besides, heavier isotopologues (containing ^{13}C) with a maximum error of 5 ppm between the theoretical and experimental masses and with quite similar images than those of the lighter isotopologues were not considered. All proposed lipids were classified according to their category, using the nomenclature and abbreviations established by LIPID MAPS®. The Figure 17 summarizes the entire experimental project.

Figure 17: Graphical representation of the experimental flowchart up to the attainment of the DESI-MS images.



Source: Prepared by the authors.

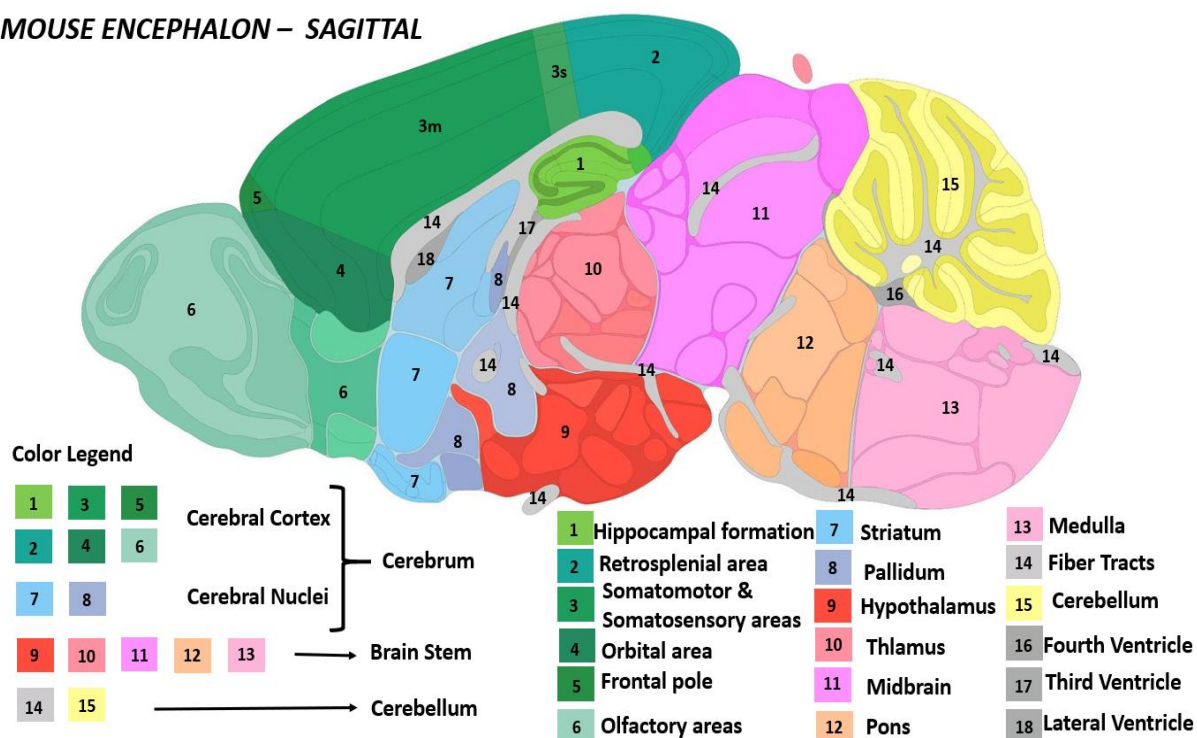
8.3 Results

The results presented refer to the lipids observed in negative ion mode. Due to the high number of isomers, each signal observed in spectra refer to several lipids. Thus, the signals that generated image were associated in the following classe of lipids - fat acids (FA), glycerophosphates (PA), glycerophosphoethanolamines (PE), glycerophosphoglycerols (PG), glycerophosphoserines (PS), sphingolipids (SP) and glycerophosphoinositols (PI).

The Figure 18 shows the brain regions of Wistar rats didactically identified by numbers. Table 10 presents some of the identified lipids and their different spatial distributions over the brain in control group. Figure 19 shows the radioinduced modulation of lipid molecules in the brain of Wistar rats in said time kinetics.

Figure 18: Scheme of regions in the rat brain identified by colors and numbers. Adapted from Allen Brain Reference Atlases

MOUSE ENCEPHALON – SAGITTAL



Source: Prepared by the authors.

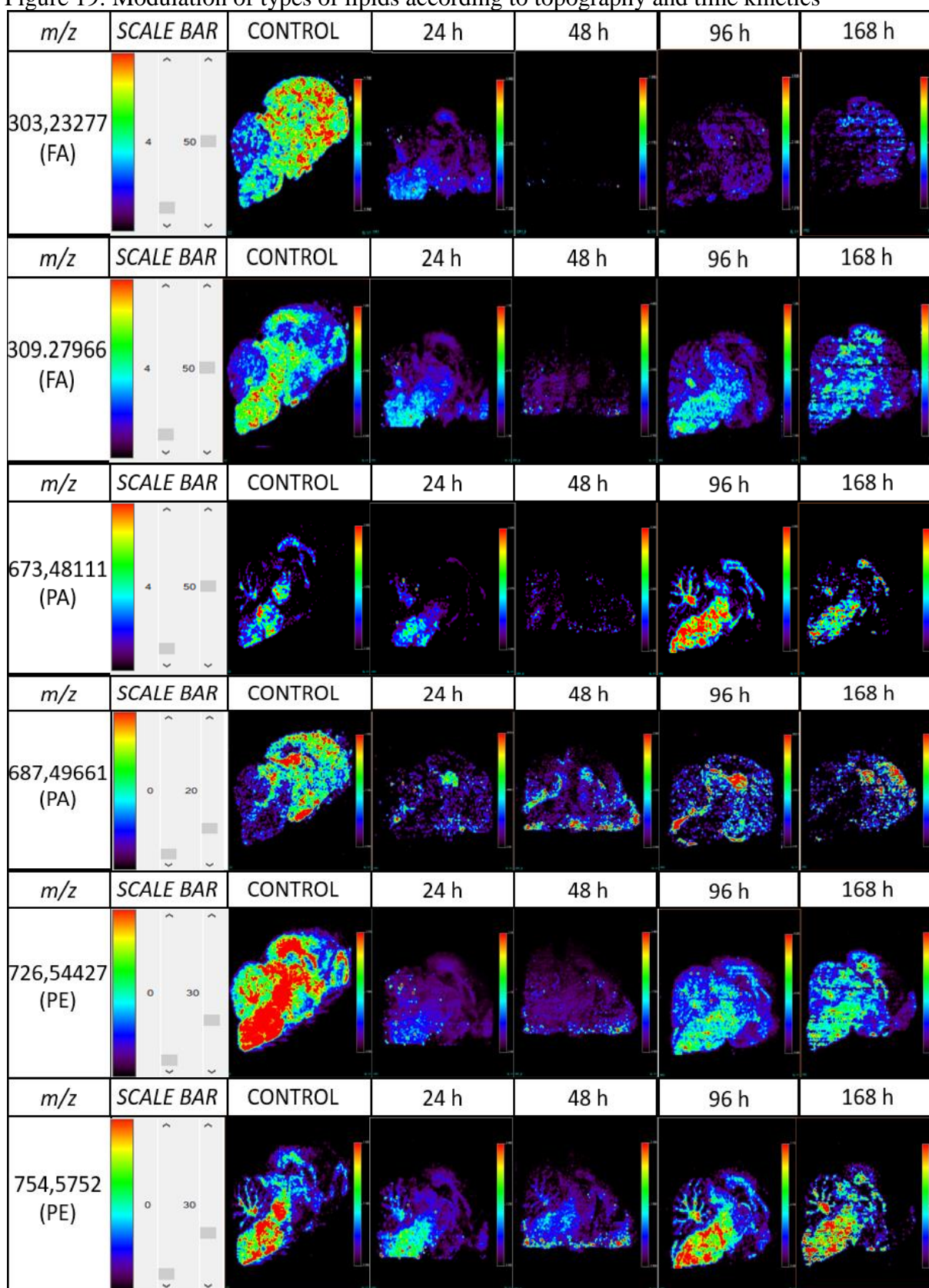
Table 10: Ion images and the distinct brain regions of healthy Wistar rats control group.

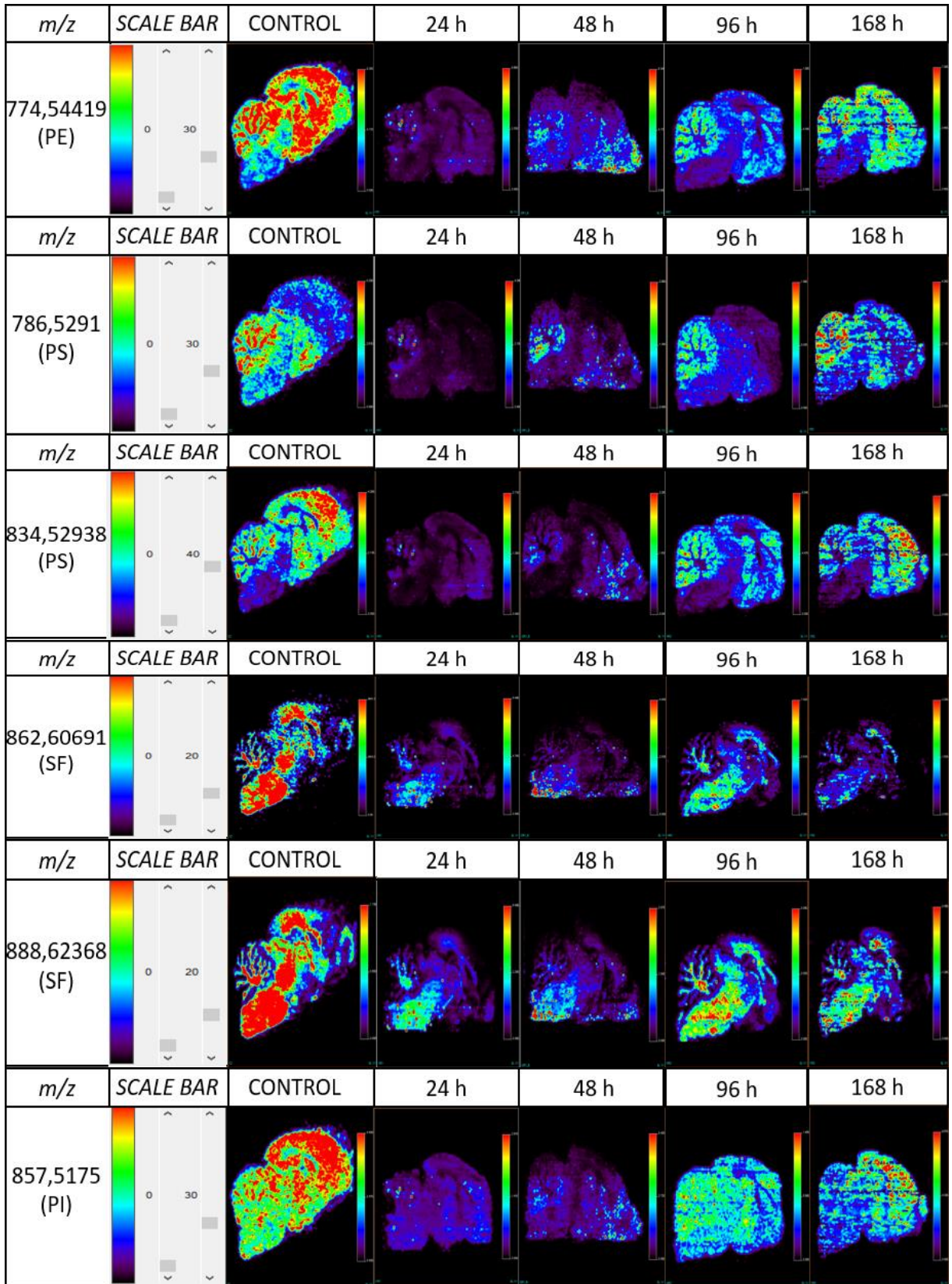
<i>m/z</i> (Class)	Brain Regions with High Contents (red spots)
303.23277 (FA)	High intensity dispersed in the parenchyma in the areas (11), (1), (10), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8) and (9).
309.27966 (FA)	High intensity with greater density in the parenchyma in the brainstem areas of the: (13), (12), (10), (11) and (9) with high density at the base of the hypothalamus. Present in (2) and (3). Present in (14) and in the fastigial nucleus of the cerebellum.
673.48111 (PA)	High intensity with greater density in the parenchyma at: (12) and (11); present (14) nerve fibers and tracts in the isocortex, (14) cerebellar tracts and fibers.
687.49661 (PA)	High intensity with greater density in the parenchyma in the areas: (1), (10), (11), (2) and (3); focuses scattered on (9) and (12).
726.54427 (PE)	High density in the brainstem (11; 12; 13), (10) and (14) and tracts in the cerebral parenchyma: (3), (6), (7), (8); punctually at the base of the (9).

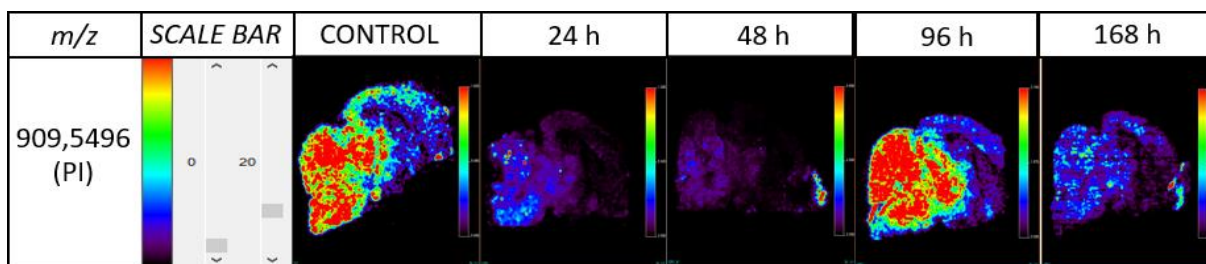
<i>m/z</i> (Class)	Brain Regions with High Contents (red spots)
754.5752 (PE)	High intensity mainly in the areas of (14) and isocortex (between the hippocampus and somatomotor/sensory cortex). high intensity and density of points mainly in the brain stem: (11), (12), and (13).
774.54419 (PE)	High intensity diffusely throughout the cerebellar parenchyma, (1), (9), (10), (7), (8), (2), (3), (4), (5), (6); present in high density in the upper part of the (11) and the lower part of the midbrain near the hypothalamus.
797.5333 (PG)	High intensity with great density in the parenchyma in the areas (7), (8), (10), (11), (2), (3), (4), (5), (9) and punctually in the (15).
786.5291 (PS)	High intensity diffusely spread throughout the (15), (9), and present in the upper part of the (11). Punctually in the (13) and (3).
834.52938 (PS)	High intensity in the cerebral parenchyma: (1), (10), (3), (4), (5), (6), (7), (8); Present with great density in the cerebellar leaves. Upper midbrain with greater density. However, pons, medulla, and lower midbrain have virtually no lipid intensity and density.
862.60691 (SP)	The strong intensity with high density, mainly in the areas of (14) and fibers in the cerebellum and isocortex (between the hippocampus and somatomotor/sensory cortex). High intensity and density of points mainly in (10), (11), (12) and (13). Regions with the highest density in the (2), (3) and (6).
888.62368 (SP)	Strong intensity with great density mainly in the areas of (14). Great intensity and density of points mainly in the Brain Stem: (11), (12) and (13). Regions with the highest density in the (10), (11), (2) and (3). Punctually in the (6) and (7).
857.5175 (PI)	Strong intensity with great density diffusely throughout the (15), (1), (9), (10), (7), (8), (2), (3), (4), (5) and (6); Present in high density in the upper part of the (11) and dispersed with areas of greater density in the (12) and (13).
909.5496 (PI)	Strong intensity with high density diffusely throughout the (15) cerebellar parenchyma, and brainstem (11-midbrain; 12-bridge; 13-bulb) and part of the (10) Thalamus. Great density at the base of (9) Hypothalamus

Source: Prepared by the authors.

Figure 19: Modulation of types of lipids according to topography and time kinetics







Source: Prepared by the authors.

8.4 Discussion

In the present study, DESI-MSI allowed the analysis of the main constituent lipids in the Wistar rat brain, in addition to demonstrating the main changes in cerebral lipid expression resulting from radiotherapy treatment. DESI-MS fingerprints biological tissues based on the m/z ratio of the constituent molecules in brain tissue. At the same time, it is possible to acquire images of the distribution of each lipid species, allowing to evaluate the spatial distribution of the molecules in the structures of the brain. In addition, according to the methodology proposed in the referred time kinetics, the molecular imaging associated with the lipid profile also allows to evaluate the radioinduced response and to evaluate the changes in the spatial distribution and the relative intensity of each ion in the samples.

The ions observed in the DESI-MS images were categorized into classes according to the molecular structures suggested in the Metlin database. Some structures suggested by the database, despite having an error of 0 ppm between the theoretical and experimental masses, are not likely to be observed by DESI-MS in the negative mode. Thus, lipids with Wax Esters (WE), Esterol Lipids (ST), Prenol Lipids (PR), and Glycerophosphocholines (PC) were not considered when assigning the lipid category to the species suggested in this work.

Some of these classes of lipids have already been identified and correlated to some diseases. For instance, FA is one of the various fatty acids found in the serum and urine of patients with schizophrenia[57], and is also correlated with colorectal cancer (CRC) [58]. PG and PS fatty acids have already been observed in ductal fluid panels for breast cancer diagnosis validation [59], whereas PE has been associated with the diagnosis of myeloid leukemia, hepatocellular carcinoma, genitourinary cancer and lung carcinoma [60-63].

Table 1 shows the spatial distribution of lipids in the brain. Different types of lipids may belong to the same region and may be related to the same sensory, motor or cognitive function.

The spatial distribution pattern shows that each lipid presents important differences in intensity between specific and adjacent regions.

The ions m/z 754.5752 (PE) and m/z 862.60691 (SF) are of different classes but have an important similarity in the spatial distribution with presence in the cerebellar fibers and tracts and in the brain stem. This is evidence that these ions are constituents of these areas and may be related to balance, motor skills, gait and fine movements and coordination in the execution of motor automation. It is known that the reduction of docosahexaenoic acid (DHA) a fatty acid from the omega-3 group is essential for humans and low levels present are correlated with depression, tardive dyskinesia and senile dementia [64], visual disturbances including retinitis pigmentosa [65], macular degeneration, dyslexia [66] and decreased nocturnal visual acuity. More serious cases can also lead to adrenoleukodystrophy (deficiencies in peroxisomes lead to accumulation of very long chain fatty acids leading to demyelination, manifesting with loss of perception, memory, vision, hearing, speech, impaired gait movements and severe dementia) [67]. Other studies report the importance of DHA in the activity of acetylcholine in the hippocampus [68], suggesting that it acts as an optimizer in signal transduction, improving cognitive response [69].

The ions m/z 687.49661 (PA), m/z 774.54419 (PE), m/z 888.62368 (SF) and m/z 857.5175 (PI) are also of different classes with a distribution covering mainly the somatosensory areas and the hippocampus. So the ions in these areas can be related to sensory perceptions, emotional modulation and recent memory. Studies have also shown the decrease in DHA levels may be correlated with the pathophysiology of Alzheimer's Disease (AD). In AD, a direct association of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), mainly DHA, was observed, with a decrease in the formation of β -amyloid peptides. The decrease in DHA was associated with a greater aggregation of β -amyloid peptides mainly identified in the hippocampus region [70].

The ions m/z 774.54419 (PE), m/z 797.5333 (PG), m/z 834.52938 (PS), m/z 857.5175 (PI) in m/z 888.62368 (SF) are also of different classes with a distribution covering mainly the somatosensory areas, somatomotor, olfactory, frontal, basal ganglia. Practically these groups of ions are present in an extensive area called the isocortex. In this area there is a large amount and neuronal diversity resulting in numerous functions such as sensory perceptions, behavior, olfactory perception, cognition and production and inhibitory control of movements of voluntary / complex movements. The lipid peroxidation markers (MDA and 8OHdG) have been implicated in studies referring to the beginning of cognitive decline in dementia

neurodegenerative processes. Physico-chemical changes in the membrane lead to changes in membrane fluidity and potential, causing dysfunctions in the neurophysiology of synapses [71]. Thus, the decrease in certain lipids can lead to important neurocognitive disorders and with important implications in the development of important neurodegenerative diseases such as AD, ALS and DP.

The ions of m/z 303.23277, m/z 309.27966, m/z 687.49661, m/z 774.54419 and m/z 888.62368 are spatially distributed in the hypothalamic region. Recent work has already shown that lipid metabolism in the brain is tightly regulated to maintain neuronal structure and function. The hypothalamus is a key region of the brain in modulating eating behavior and energy expenditure. Through signs peripheral nutritional and through sensors specialized in the control of the energy balance, the hypothalamus is able to modulate and alter the energy metabolism of different organs [72, 73]. The presence of fatty acids (FA) or FA metabolites can signal nutritional sufficiency resulting in decreased glycogenolysis, gluconeogenesis and liver lipogenesis. Thus, the lipids found in this hypothalamic region may signal the pathophysiology involved in the development of obesity and the metabolic syndrome (MetS). [74, 75]

Table 2 contains the images obtained from the spatial distribution of each lipid in the brain in the proposed time kinetics. Ionizing radiation provided significant changes in the metabolome resulting in a modulatory response, significantly altering the spatial distribution and the intensity of the lipids. The images in the time kinetics show a sharp drop in the first 48 hours in all regions. Thus, each structure in the brain has several lipids in its composition and the decrease may represent important neurophysiological changes with changes in neurocognitive functions in the short and / or long term. After 96 h and 1 week, a metabolic response was observed to minimize changes and restore physiology. However, it is noticed that even after 01 week, the levels of some lipids such as m/z 303.23277, m/z 687.49661, m/z 726.54427 and m/z 862.60691 remained very different in relation to the distribution and intensities of the control group. Other lipids such as m/z 673.48111, m/z 754.5752, m/z 797.5333 and m/z 834.52938 demonstrate a satisfactory response to minimize the effects of ionizing radiation.

8.5 Conclusions

Through the developed study we obtained irrefutable evidences that the radiation induced significant alterations in the lipid profile of the animals submitted to the radiotherapy treatment. This fact lead us to infer that the synthesis of these lipids in the organism was disturbed after exposure to radiation. It is noted that the individuals probably developed a regulatory mechanism in order to minimize the changes caused by the action of radiation, but we cannot say that permanent changes were triggered.

The proposal to investigate brain metabolomic changes resulting from radiotherapy treatment made it possible the development of an analysis methodology that employ to use a powerful experimental technique. The data acquired through the DESI-MSI, paved the way the understanding of radio-induced lipidomic changes. More studies still in development looking for of possible injury biomarkers in the radiotherapy treatment of brain neoplasms, as well as their feasibility to be used as quality control in therapy.

The radiation effects needs to be better studies in order to unravel the physiological and molecular mechanisms induced by radiation. Several possibilities have been pointed out, such as direct DNA damage, the formation of ROS inducing the rupture of intermolecular DNA bonds, lipid oxidation, changes in signaling mechanisms for cellular and molecular repair, and intracellular microstructural changes.

The understanding of the main phenomena of the molecular response of brain tissue to radiation exposure will allow a review of planimetry and therapeutic protocols in order to minimize the many undesirable short and long term neurocognitive adverse effects.

REFERENCES

- [1] P. Deb, A. Fielding, Radiobiological model comparison of 3D conformal radiotherapy and IMRT plans for the treatment of prostate cancer, *Australas Phys Eng Sci Med*, 32 (2009) 51-61.
- [2] M. Mingote, Análise lipídica de tecido cerebral expostos à radiação por DESI-MS., Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, (2017) 158.
- [3] J.W. Goldwein, J.M. Leahy, R.J. Packer, L.N. Sutton, W.J. Curran, L.B. Rorke, ... , G.J. D'Angio, Intracranial Ependymomas in children. , *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.*, 19 (1990) p.1497-1502.

- [4] R. MIRALBELL, A. BLEHER, P. HUGUENIN, G. RIES, e. al., Pediatric medulloblastoma: Radiation treatment Tecchnique and patterns of failure., *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.*, 37 (1997) p.523-529
- [5] P.D. BROWN, J.C. BUCKNER, U.J. H, e. al., The neurocognitive effects of radiation in adult low-grade glioma patients., *Neuro-Oncology*, 5 (2003) p.161–167.
- [6] L.L. GUNDERSON, J.E. TEPPER, *Clinical Radiation Oncology*. Elsevier, (2015).
- [7] N.L. Burt, e. al., Central Nervous System Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology. , *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.*, 11 (2013) p.1114–1151.
- [8] T.E. MERCHANT, H.M. CONKLIN, S. WU, e. al., Phase II trial of conformal Radiation therapy for pediatric low-grade glioma., *Journal of Clinical Oncology*, 27 (2009) p. 3598–3604.
- [9] R.K. MULHERN, S.L. PALMER, T.E. MERCHANT, e. al., Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma. , *Journal of Clinical Oncology*, 23 (2005) p.5511–5519.
- [10] M. RIS, K. WALSH, D. WALLACE, e. al., Intellectual and academic outcome following two chemotherapy regimens and radiotherapy for average-risk medulloblastoma: COG A9961. , *Pediatric Blood and Cancer*, 60 p. 1350–1357.
- [11] E. Okuno, E. Yoshimura, *Física das Radiações*, (2010) 296.
- [12] Omar R. Alshykhly, Aaron M. Fleming, C.J. Burrows, Guanine Oxidation Product 5-Carboxamido-5-formamido-2-iminohydantoin Induces Mutations When Bypassed by DNA Polymerases and Is a Substrate for Base Excision Repair., *Chemical Research in Toxicology.*, 28 (2015) p. 1861–1871.
- [13] Butterfield DA, Swomley AM, S. R., Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression., *Antioxidants & Redox Signaling.*, 19 (2013) p. 823-835.
- [14] S.S. DAVID, V.L. O'SHEA, S. KUNDU, Base-excision repair of oxidative DNA damage., *Nature*, 447 (2007) p.941-950.
- [15] J.P. DUXIN, J.C. WALTER, What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia?, *Current Opinion in Cell Biology.*, 37 (2015) p.49–60.
- [16] M. ZABEL, A. Nackenoff, W.M. Kirsch, F.E. Harrison, G. Perry, M. & Schrag, Markers of oxidative damage to lipids, nucleic acids and proteins and antioxidant enzymes activities in Alzheimer's disease brain: A meta-analysis in human pathological specimens., *Free Radical Biology and Medicine.*, 115 (2018) p. 351-360.
- [17] E. ACKERSTAFF, e. al., Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells?, *Journal of Cellular Biochemistry.*, 90 (2003) p.525-533.

- [18] C. Peña-Bautista, C. Vigor, J. Galano, e. al., New screening approach for Alzheimer's disease risk assessment from urine lipid peroxidation compounds., *Scientific Reports*, 9 (2019) 14244.
- [19] MARKESBERY WR, L. MA., Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. , *Neurobiology of Aging*, 19 (1998) p. 33-36.
- [20] MONTINE TJ, Neely MD, Quinn JF, e. al., Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. , *Free Radical Biology and Medicine*., 33 (2002) p. 620–626.
- [21] SAYRE LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, S. MA., 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1997;68(5):2092–209, *Journal of Neurochemistry*., 68 (1997) p. 2092–2209.
- [22] SNALINA N, Alessenko A, Gavrilova S, Gurianova S, Prochorov A, Kononova E, F. Y, Memantine changes lipids spectrum and lipid peroxidation in animal brain and plasma of patients with Alzheimer's disease., *FEBS Journal*, (2014) p.281-286.
- [23] CHANG Y, Kong Q, Shan X, Tian G, Ilieva H, Cleveland DW, Rothstein JD, Borchelt DR, Wong PC, L. C-G, Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. , *PLoS ONE* 3, 3 (2008).
- [24] CHANG Y.T., Chang W.N., Tsai N.W., Huang C.C., Kung C.T., Su Y.J., Lin W.C., Cheng B.C., Su C.M., Chiang Y.F., L. C.H., The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review., *Biomed Research International*., (2014) p. 1-14.
- [25] FENG Z, Qin C, Chang Y, Z. J, Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease., *Free Radical Biology and Medicine* 40 (2006) p. 101-109.
- [26] E. NIEDZIELSKA, I. Smaga, M. Gawlik, A. Moniczewski, P. Stankowicz, J. Pera, M. & Filip, Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases., *Molecular Neurobiology*, 53 (2016) p. 4094–4125.
- [27] A. BLANCO, M. Baquero, M. Vento, e. al., Potential oxidative stress biomarkers of Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer Disease. , *Journal of the Neurological Sciences*., 373 (2017) p. 295-302.
- [28] R. ABETI, A. BACCARO, e. al., Novel Nrf2-Inducer Prevents Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia Models. , *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12 (2018).
- [29] H. BLASCO, G. GARCON, F. PATIN, e. al., Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study., *Canadian Journal of Neurological Sciences*., 00 (2016) p. 1-6.

- [30] P. BROCARD, E. MCGINNIS, B.R. CHRISTIE, e. al., Time-course analysis of protein and lipid oxidation in the brains of yac128 huntington's disease transgenic mice., *Rejuvenation Research*, 19 (2015) p. 140-148.
- [31] K. CHANGA, M. CHENG, M. CHIANGD, C. CHENA, Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases, *Clinica Chimica Acta*, 485 (2018) p. 79-87.
- [32] A. HATAMI, C. ZHU, e. al., Deuterium-reinforced linoleic acid lowers lipid peroxidation and mitigates cognitive impairment in the Q140 knock in mouse model of Huntington's disease., *The FEBS Journal.*, 285 (2018) p. 3002-3301.
- [33] Medi Kori, Busra Aydın, Semra Unal, K.Y. Arga, D. Kazan, Metabolic Biomarkers and Neurodegeneration: A Pathway Enrichment Analysis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis., *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 20 (2016) p. 645-661.
- [34] Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, e. al., Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial., *Archives Of General Psychiatry.* , 67 (2010) p. 146-154.
- [35] De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, D.M. V., Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia., *Lipids in Health and Disease.*, 2 (2003).
- [36] P. GREEN, N. Anyakoha, G. Yadid, I. Gispán-Herman, A. Nicolaou, Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine species are increased in selected brain regions of a depressive animal model: Implications for pathophysiology., *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* , 80 (2009) p. 213-220. .
- [37] Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, H. CJ., Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress., *Psychoneuroendocrinology.*, 34 (2009) p. 1257-1262.
- [38] Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie RA, e. al., Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia., *Molecular Psychiatry.*, 12 (2007) p. 934-945.
- [39] Orešič M, Tang J, Seppänen-Laakso T, e. al., Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders: a general population-based study., *Genome Med.*, 3 (2011) 19.
- [40] Polymeropoulos MH, Licamele L, Volpi S, e. al., Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia., *Schizophrenia Research.*, 108 (2009) p. 134-142.
- [41] X. Han, *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*, (2016) 496.
- [42] X. Han, R. Gross, Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics.44(6):1071-1079., *Journal of Lipid Research.*, 44 (2003) p. 1071-1079.

- [43] X. Han, X. Jiang, A review of lipidomic technologies applicable to sphingolipidomics and their relevant applications. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2009;111(1):39-52. doi:10.1002/ejlt.200800117, *European Journal of Lipid Science and Technology.*, 111 (2009) p. 39-52. .
- [44] Jung HR, Sylvänne T, Koistinen KM, Tarasov K, Kauhanen D, E. K., High throughput quantitative molecular lipidomics. 2011;1811(11):925-934. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.025, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1811 (2011) P. 925-934.
- [45] Merrill AH Jr, Stokes TH, Momin A, e. al., Sphingolipidomics: a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease. , *Journal of Lipid Research.*, 50 (2009).
- [46] T.W. MITCHELL, S.H.J. Brown, S.J.S.I. Blanksby, *Structural lipidomics.*, (2012) pp. 99–128.
- [47] Lam SM, Wang Y, Duan X, e. al., Brain lipidomes of subcortical ischemic vascular dementia and mixed dementia. , *Neurobiology of Aging.*, 35 (2014) p. 2369-2381.
- [48] Cooks RG, Ouyang Z, Takats Z, W. JM., *Detection Technologies. Ambient mass spectrometry.*, *Science.*, 311 (2006) p. 1566 - 1570.
- [49] Dill AL, Ifa DR, Manicke NE, Ouyang Z, C. RG., *Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization.*, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.*, 877 (2009) p. 2883 - 2889.
- [50] Eberlin LS, Ferreira CR, Dill AL, Ifa DR, C. RG., *Desorption electrospray ionization mass spectrometry for lipid characterization and biological tissue imaging.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 1811 (2011) p. 946 -960.
- [51] Wu C, Dill AL, Eberlin LS, Cooks RG, I. DR., *Mass spectrometry imaging under ambient conditions.*, *Mass Spectrometry Reviews.*, 32 (2013) p. 218 - 243.
- [52] Cordeiro, F.B., Jarmusch, A.K., León, M. et al. *Mammalian ovarian lipid distributions by desorption electrospray ionization–mass spectrometry (DESI-MS) imaging.* *Anal Bioanal Chem* 412, 1251–1262 (2020).
- [53] Pirro V., Guffey S. C., Sepúlveda M. S., Mahapatra C. T., Ferreira C. R., Jarmuscha A. K. and Cooks R. G., *Lipid dynamics in zebrafish embryonic development observed by DESI-MS imaging and nanoelectrospray-MS.* *Mol. BioSyst.*, 2016,12, 2069-2079.
- [54] Oliveira-Lima O.C., Carvalho-Tavares J., Rodrigues M. F., Gomez M. V., Oliveira A.C.P., Resende R. R., Gomez R. S., Vaz B. G., Pinto M.C.X., *Lipid dynamics in LPS-induced neuroinflammation by DESI-MS imaging,* *Brain, Behavior, and Immunity*, 79 (2019), p.186-194.
- [55] Severiano D. L.R., Oliveira-Lima O. C., Vasconcelos G.A., Marques B. L., Carvalho G. C., Freitas E. M. M., Xavier C. H., Gomez M. V., Pinheiro A. C. O., Gomez R. S., Vaz B. G.,

Pinto M. C. X., Cerebral Lipid Dynamics in Chronic Cerebral Hypoperfusion Model by DESI-MS Imaging, *Neuroscience*, 426 (2020),p. 1-12.

[56] Takáts, Zoltán & Wiseman, Justin & Gologan, Bogdan & Cooks, R. (2004). Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science (New York, N.Y.)*. 306. 471-3.

[57] Yang J, Chen T, Sun L, e. al., Potential metabolite markers of schizophrenia., *Molecular Psychiatry*., 18 (2013) p. 67-78.

[58] Brown DG, Rao S, Weir TL, e. al., Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, adjacent mucosa, and stool. , *Cancer & Metabolism*., 4 (2016).

[59] Matos Do Canto L, Marian C, Varghese RS, e. al., Metabolomic profiling of breast tumors using ductal fluid., *International Journal of Oncology*., 49 (2016) p. 2245-2254.

[60] Lin L, Huang Z, Gao Y, e. al., LC-MS-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery. , *Proteomics*., 12 (2012) p. 2238-2246. .

[61] Nagai K, Uranbileg B, Chen Z, e. al., Identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma by high-definition mass spectrometry: Ultrahigh-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*., 34 (2020).

[62] Pabst T, Kortz L, Fiedler GM, Ceglarek U, Idle JR, B. D., The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. , *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - CLINICAL*, 7 (2017) p. 105-114.

[63] Wu H, Chen Y, Li Z, L. X., Untargeted metabolomics profiles delineate metabolic alterations in mouse plasma during lung carcinoma development using UPLC-QTOF/MS in MSE mode., *Royal Society Open Science*., 5 (2018) 181143.

[64] Vaddadi KS, Courtney P, Gilleard CJ, Manku MS, H. DF., A double-blind trial of essential fatty acid supplementation in patients with tardive dyskinesia. , *Psychiatry Research*, 27 (1989) p. 313-323.

[65] D.R. Hoffman, R. Uauy, D.G. Birch, Metabolism of omega-3 fatty acids in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. , *Experimental Eye Research*, 60 (1995) p. 279-289.

[66] B Jacqueline Stordy, m.s. Dark adaptation, docosahexaenoic acid, and dyslexia, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 71, Issue 1, January 2000, Pages 323S–326S, <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.323S>, Dark adaptation, motor skills, docosahexaenoic acid, and dyslexia, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71 (2000) p. 323S-326S.

[67] M. M., Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders. , *Brain Research*, 583 (1992) p. 171-182.

[68] Young C, Gean PW, Wu SP, Lin CH, S. YZ., Cancellation of low-frequency stimulation-induced long-term depression by docosahexaenoic acid in the rat hippocampus., *Neuroscience Letters*, 247 (1998) p. 198-200.

[69] Minami M, Kimura S, Endo T, e. al., Dietary docosahexaenoic acid increases cerebral acetylcholine levels and improves passive avoidance performance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats., *Pharmacology Biochemistry and Behavior.*, 58 (1997) p. 1123-1129.

[70] Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, e. al., A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. , *Journal of Clinical Investigation.*, 115 (2005) p. 2774-2783.

[71] Suridjan I, Herrmann N, Adibfar A, e. al., Lipid Peroxidation Markers in Coronary Artery Disease Patients with Possible Vascular Mild Cognitive Impairment, *Journal of Alzheimer's Disease.*, 58 (2017) p. 885-896.

[72] Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, L. MJ., The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis., *International journal of obesity and related metabolic disorders.*, 25 (2001).

[73] Lenard NR, B. HR., 11, Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. , *Obesity (Silver Spring)*. 16 (2008).

[74] K.D. Bruce, A. Zsombok, R.H. Eckel, Lipid Processing in the Brain: A Key Regulator of Systemic Metabolism, *Frontiers in Endocrinology*, 8 (2017).

[75] P.B. Martínez de Morentin, L. Varela, J. Fernø, R. Nogueiras, C. Diéguez, & , M. López, Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. , *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, , 1801 (2010) p. 350 - 361.

Annexes

Table 11: Ion Formula, experimental mass and category of lipids detected in negative mode

Ion Formula	[M-H] ⁻ (m/z)	Category	Error (ppm)
C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281,24840	FA (C18:1)	1,225617363
C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283,26397	FA (C18:0)	0,93424747
C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303,23277	FA (C20:4)	1,202927833
C ₂₀ H ₃₇ O ₂	309,27966	FA (C20:1)	0,984786713
C ₂₂ H ₃₅ O ₂	331,26404	FA (C22:4)	1,010187336
C ₃₇ H ₇₀ O ₈ P	673,48111	PA (C37:1)	0,414512911
C ₃₈ H ₇₂ O ₈ P	687,49661	PA (C38:1)	0,18778627
C ₃₉ H ₇₅ NO ₇ P	700,52836	PE (C39:1)	0,349194978
C ₃₉ H ₇₅ NO ₈ P	716,52395	PE (C39:1)	1,283980084
C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722,51278	PE (C41:5)	0,435542659
C ₄₁ H ₇₇ NO ₇ P	726,54427	PE (C41:3)	0,694461537
C ₄₁ H ₇₉ NO ₇ P	728,55951	PE (C41:2)	0,129697864
C ₄₁ H ₇₃ NO ₈ P	738,50775	PE (C41:4)	0,501099258
C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744,55444	PE (C41:1)	0,147568815
C ₄₃ H ₇₃ NO ₇ P	746,51323	PE (C43:6)	1,024343244
C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750,54393	PE (C43:4)	0,219249973
C ₄₃ H ₈₁ NO ₇ P	754,5752	PE (C43:2)	0,178151262
C ₄₃ H ₇₃ NO ₈ P	762,5077	PE (C43:6)	0,41975397
C ₄₃ H ₇₅ NO ₈ P	764,52263	PE (C43:5)	-0,523200328
C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766,5392	PE (C43:4)	0,67829219
C ₄₅ H ₇₅ NO ₇ P	772,52774	PE (C45:7)	-0,485909953
C ₄₅ H ₇₇ NO ₇ P	774,54419	PE (C45:6)	0,54813778
C ₄₅ H ₈₁ NO ₇ P	778,575	PE (C45:5)	-0,084219882
C ₄₂ H ₇₇ NO ₁₀ P	786,5291	PS (C42:2)	0,751019312
C ₄₅ H ₇₇ NO ₈ P	790,53924	PE (C45:6)	0,708298296
C ₄₄ H ₇₈ O ₁₀ P	797,5333	PG (C44:4)	0,049741875
C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₀ P	834,52938	PS (C46:6)	1,043341348
C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P	857,5175	PI (C45:4)	-0,587961766
C ₄₆ H ₈₈ NO ₁₁ S	862,60691	SF (C46:1)	-1,041775638
C ₄₇ H ₈₀ O ₁₃ P	883,53376	PI (C47:5)	0,119687574
C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885,54956	PI (C47:4)	0,288729152
C ₄₈ H ₉₀ NO ₁₁ S	888,62368	SF (C48:2)	0,249027975
C ₄₉ H ₈₂ O ₁₃ P	909,5496	PI (C49:6)	0,325088369

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a investigação experimental, a obtenção dos resultados analíticos e de imageamento por DESI-MSI, é possível afirmar que a radiação induz alterações metabólicas no perfil lipídico cerebral, em regiões específicas do encéfalo.

A proposta de investigar as alterações metabólicas cerebrais radioinduzidas provenientes dos tratamentos radioterápicos de tumores cerebrais, permitiu lançar mão de novas técnicas experimentais diferenciais no estudo dos efeitos biológicos adversos. O desenvolvimento da metodologia e protocolos únicos tornaram possível a aquisição de dados analíticos preciosos e de imageamento por DESI-MSI, facilitando a compreensão das alterações lipídicas radioinduzidas. Os resultados alcançados não encerraram definitivamente as investigações. Inúmeras possibilidades de investigação no campo da metabolômica foram abertas culminando com o surgimento de uma nova área ainda incipiente: radiometabolômica. Um melhor detalhamento ainda poderá ser confirmado e avaliado associando as técnicas de massas sequenciais MS/MS, permitindo ainda um refinamento ainda maior dos resultados. Os mecanismos de radioindução bem como os mecanismos de reparo associados permitirão utilizar possíveis biomarcadores de toxicidade do tratamento radioterápico bem como a sua viabilidade para melhor controle terapêutico.

Os estudos são de extrema importância e urgência e deverão ser ampliados futuramente associados a imuno-histoquímica, ativação/inativação gênica radioinduzida, proteômica com digestão e sequenciamento proteico para identificação e rastreamento molecular. Cabe ainda ressaltar o aumento expressivo de doenças neurodegenerativas podem estar associados as alterações metabólicas importantes no desenvolvimento de doenças como Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, L. et al. Lipidomic analyses identify injury-specific phospholipid changes 3 mo after traumatic brain injury. **FASEB J**, v. 28, n. 12, p. 5311–5321, 2014.
- ABETI, R. et al. Novel Nrf2-Inducer Prevents Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia Models. **Front. Cell. Neurosci.**, 17 July, 2018.
- ALBERT, M. S. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, p. 270-279, 2011.
- ACKERSTAFF, E et al. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, p. 525-533, 2003.
- ADIBHATLA R. M.; HATCHER, J. F.; DEMPSEY, R. J. Lipids and lipidomics in brain injury and diseases. **AAPS J**, v. 8, n. 2, p. 314-321, 2006.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Types of brain and spinal cord tumors in adults. <https://bit.ly/3N2DI2e>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- BAGCHI, M. et al. Protective effects of lazaroid u74389f (16-desmethyl tirilazad) on endrin-induced lipid peroxidation and dna damage in brain and liver and regional distribution of catalase activity in rat brain. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 6, p. 867- 872, 1995.
- BARTKE, N. et al. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 91-96, 2009.
- BERTENS, D. et al. Temporal evolution of biomarkers and cognitive markers in the asymptomatic, MCI, and dementia stage of Alzheimer's disease for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. **Alzheimer's & Dementia**, v. 11, p. 511-522, 2015.
- BLANCO, A. G. et al. Potential oxidative stress biomarkers of Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer Disease. **Journal of the Neurological Sciences**, 2017.
- BLASCO, H. et al. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. **Can J Neurol Sci.**, p. 1-6, 2016.
- BROCARD, P. et al. Time-course analysis of protein and lipid oxidation in the brains of yac128 huntington's disease transgenic mice. **Rejuvenation Research**, 2015.
- BROWN, P. D. et al. The neurocognitive effects of radiation in adult low-grade glioma patients. **Neuro Oncol**, v. 5, n. 3, p. 161-167, 2003.

- CATALA A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 38, n. 9, p. 1482-1495, 2006.
- CERMENATI, G. et al. Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 1, p. 51-60, 2015.
- CHAN, R. B. et al. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. **Biol Chem**, v. 287, p. 2678-2688, 2012.
- CHANG, Y. T. et al. Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. **PLoS ONE**, v. 3, 2008.
- CHANG, Y. T. et al. The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in alzheimer's disease: a systematic review. **Biomed Research International**, p. 1-14, 2014.
- CHANGA, K. H. et al. Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 485, p. 79-87, 2018.
- CHUGHTAI, K.; HEEREN, R. M. Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. **Chem Rev**, v. 110, n. 5, p. 3237-3277, May 12, 2010.
- COLE, R. B. (Eds.). **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2010.
- COOKS, R. G. et al. Ambient Mass Spectrometry. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1566-1570, 2006.
- CUMMINGS, J. L. Biomarkers in alzheimer's disease: perspectives for the future. **Neurodegenerative Disease**, p. 23-27, 2010.
- DASS, C. **Fundamental of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: Jonhn Wiley & Sons, 2007.
- DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941-950, Jun 21, 2007.
- DAVIES, S. S.; Amarnath, V.; Montine, K. S.; Bernoud-Hubac, N.; Boutaud, O.; Montine, T. J.; Roberts, L. J. Effects of reactive gamma-ketoaldehydes formed by the isoprostane pathway (isoketals) and cyclooxygenase pathway (levuglandins) on proteasome function. **FASEB J.**, v. 16, p. 715, 2002.
- DEB, P.; FIELDING, A. Radiobiological model comparison of 3D conformal radiotherapy and IMRT plans for the treatment of prostate cancer. **Australasian Physical and Engineering Sciences in Medicine**, v. 32, n. 2, p. 51-61, 2009.
- DILL, A. L et al. Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 26, p. 2883-2889, Sep 15, 2009.

- DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 421-431, 1990.
- DUXIN, J. P.; WALTER, J. C. What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia? **Curr Opin Cell Biol**. v. 37, p. 49-60, Dec, 2015.
- EBERLIN, L. S. et al. Non-Destructive, Histologically Compatible Tissue Imaging by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Chembiochem**, v. 12, n. 14, p. 2129-2132, Sep 19, 2011.
- FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **Journal Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 839-861, 2005.
- FENG, Z. et al. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 101-109, 2006.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, Mar 1, 2015.
- FERNANDES, A. M. et al. Direct Visualization of Neurotransmitters in Rat Brain Slices by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI - MS). **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 27, n. 12, p. 1944-1951, Dec, 2016.
- FREITAS, J. R. L. **Aplicação da técnica DESI-MSI em metabolômica vegetal: estudos de fisiologia e farmacognosia e detecção de transgenia**. 2018. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- GARCÍA-BLANCO, A. et al. Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 373, p. 295-302, 2017.
- GOLDWEIN, J. W. et al. Intracranial Ependymomas in children. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 19, p. 1497-1502, 1990.
- GULER, G. et al., Neurodegenerative changes and apoptosis induced by intrauterine and extrauterine exposure of radiofrequency radiation. **J. Chem. Neuroanat**, 2015.
- GUNDERSON, L. L.; TEPPER, J. E. clinical radiation oncology. **Elsevier**, p. 419-425, cap. 23, 2015.
- HALL, E. J. **Radiobiology for the radiologist**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- HALPERIN, E. C. et al. Perez and Brandy's Principles and Practice of Radiation Oncology. **LWW**, 6 ed., cap. 35, p. 649-676, 2018.

HATAMI, A. et al. Deuterium-reinforced linoleic acid lowers lipid peroxidation and mitigates cognitive impairment in the Q140 knock in mouse model of Huntington's disease. **The FEBS Journal**, v. 285, p. 3002-3301, 2018.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3. ed. London: John Wiley & Sons Inc, 2007.

HOFFMAN, S. W.; ROOF, R. L.; STEIN; D. G. A reliable and sensitive enzyme immunoassay method for measuring 8-isoprostaglandin F2 alpha: a marker for lipid peroxidation after experimental brain injury. **J. Neurosci. Methods**, v. 68, p. 133-136, 1996.

IFA, D. R. et al. Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview. **The Analyst**, v. 135, n. 4, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

JARMUSCH, A. K. et al. Differential Lipid Profiles of Normal Human Brain Matter and Gliomas by Positive and Negative Mode Desorption Electrospray Ionization - Mass Spectrometry Imaging. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 163-180, 2016.

JELONEK, K. et al. Radiation-induced changes in serum lipidome of head and neck cancer patients. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 4, p. 6609-6624, Apr 17, 2014.

JELONEK, K. et al. Radiation-Induced Changes in Serum Lipidome of Head and Neck Cancer Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 6609-6624, 2014.

KASPRZAK, H. A. et al. Enhanced lipid peroxidation processes in patients after brain contusion. **J. Neurotrauma**, v. 18, p.793-797, 2001.

KHAN, F. M. et al. **The physics of radiation therapy**. 5. ed. Philadelphia: Wolters, 2017.

KOLOMIYTSEVA, I. K. et al. Nuclear and chromatin lipids: metabolism in normal and γ -irradiated rats. **Bioelectrochemistry**, v. 58, p. 31-39, 2012.

KOOHPEYMA, H. et al. Postnatal Administration of Homocysteine Induces Cerebellar Damage in Rats: Protective Effect of Folic Acid. **Neurotoxicity Research**, 2018.

LAM, S. M. et al. The brain lipidomes of subcortical ischemic vascular dementia and mixed dementia. **Neurobiol Aging**, v. 35, p. 2369-2381, 2014.

LI, L. H.; HSIEH, H. Y.; HSU, C. C. Clinical Application of Ambient Ionization Mass Spectrometry. **Mass Spectrom**, v. 6, n. Spec Iss, p. 00-60, 2017.

LUKIW, W. J.; Cui, J. G.; Marcheselli, V. L.; Bodker, M.; Botkjaer, A.; Gotlinger, K.; Serhan, C. N.; Bazan, N. G.; A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. **J Clin Invest.**, v. 115, n. 10, p. 2774-2783, out. 2005.

MARKESBERY, W. R.; LOVELL, M. A. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 19, n. 1, p. 33-36, 1998.

MERCHANT, T. E. et al. Anaplastic ependymoma: treatment of pediatric patients with or without craniospinal radiation therapy. **Journal of neurosurgery**, v. 86, p. 943-949, 1997.

MERCHANT, T. E. et al. Late effects of conformal Radiation therapy for pediatric patients with low-grade glioma: Prospective evaluation of cognitive, endocrine, and hearing deficits. **J Clin Oncol**, v. 27, p. 3691-3697, 2009.

MERCHANT, T. E. et al. Phase II trial of conformal Radiation therapy for pediatric low-grade glioma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 22, p. 3598-3604, 2009.

MERCHANT, T. E. et al. Growth hormone secretion after conformal radiation therapy in pediatric patients with localized Brain tumors. **J Clin Oncol**, v. 29, p. 4776-4780, 2011.

MINGOTE, M. F. S. **Análise lipídica de tecido cerebral expostos à radiação por DESI-MS**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MIRALBELL, R. et al. Pediatric medulloblastoma: Radiation treatment Tecchnique and patterns of failure. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 37, n. 3, p. 523-529, 1997.

MONTINE, T. J. et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med.**, v. 33, n. 5, p. 620-626, 2002.

MORETTI, D. V. Mild cognitive impairment: structural, metabolical, and neurophysiological evidence of a novel eeG biomarker. **Frontiers in neurology**, v. 152, p. 1-13, 2015.

MULHERN, R. K. et al. Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 5511-5519, 2005.

NABORS, L. B. et al. Central Nervous System Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw.**, v. 11, n. 9, p. 1114-1151, 2013.

NAIR, V. et al. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. **Lipids**, v. 21, p. 6-9, 1986.

NIEDZIELSKA, E. et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4094-4125, 2015.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem Biophys Res Comm.**, v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. **Estud. av.**, v. 27, n. 77, 2013.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. M. **Física das radiações**. 2 ed. São Paulo: Oficina dos textos, 2010.

PEÑA-BAUTISTA, C. et al. New screening approach for Alzheimer's disease risk assessment from urine lipid peroxidation compounds. **Sci Rep**, v. 9, p. 142-144, 2019.

RAPPLEY I, M. D. S. et al. Lipidomic profiling in mouse brain reveals differences between ages and genders, with smaller changes associated with alpha-synuclein genotype. **J Neurochem**, v. 111, n. 1, p. 15-25, 2009.

RIS, M. D. et al. Intellectual and academic outcome following two chemotherapy regimens and radiotherapy for average-risk medulloblastoma: COG A9961. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, p. 1350-1357, : 2013.

SALVAJOLI, J. V. et al. **Radioterapia em oncologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 427-457.

SAYRE LM, Z. D. A. et al. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 68, n. 5, p. 2092-2209, 1997.

SETOU, M. **Imaging mass spectrometry – protocols for mass microscopy**. Berlin: Springer, 2010.

SHARVARI LOTANKAR, S.; PRABHAVALKAR, K. S.; BHATT, L. K; Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol**, v. 53, p. 4094-4125, 2016.

SNALINA, N. et al. Memantine changes lipids spectrum and lipid peroxidation in animal brain and plasma of patients with Alzheimer's disease. **FEBS J**, p. 281-286, 2014.

SURIDJANA, I. et al. Lipid Peroxidation Markers in Coronary Artery Disease Patients with Possible Vascular Mild Cognitive Impairment, **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 58, p. 885-896, 2017.

TAJIMA, Y. et al. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. **Lipids Health Dis.**, p. 12-68, 2013.

TAKATA M., N. M. et al. Detection of amyloid protein in the urine of Alzheimer's disease patients and healthy individuals. **Neuroscience Letters**, v. 435, p. 126-130, 2008.

TU, J. et al. Absolute quantitative lipidomics reveals lipidome-wide alterations in aging brain. **Metabolomics**, v. 14, n. 5, 2017.

TYURIN, V. A. et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. **J. Neurochem**, v. 75, p. 2178-2189, 2000.

VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of Lipid Peroxidation Products With DNA. A Review. **Mutation Research**, v. 195, p. 137-149, 1988.

WANG, L. W. et al. Gamma Knife surgery for low-grade astrocytomas: evaluation of long-term outcome based on a 10-year experience. **Journal of Neurosurgery**, v. 105 (Suppl), p. 127-132, 2006.

WANG, C et al. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of rats following radiation exposure based on liquid chromatography-mass spectrometry technique. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 1079-1085, 2009.

WATSON, J. et al. **Molecular biology of the cell**. 5. ed. New York: Artmed, 2010.

WHO. Cancer. Ficha técnica. Fev., 2018. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 12 set. 2018.

WOODS, A. S.; JACKSON, S. N. Brain tissue lipidomics: direct probing using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **AAPS J**, v. 8, n. 2, p. 391-395, 2006.

WRIGHT, M. M. et al. Cell membranes and apoptosis: Role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. **Biochemistry Cell Biology**, v. 84, p. 18-26, 2004.

YOSHIMURA, E. M. Física das radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57-67, 2009.

ZABEL, M. et al. Markers of oxidative damage to lipids, nucleic acids and proteins and antioxidant enzymes activities in Alzheimer's disease brain: A meta-analysis in human pathological specimens. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 115, p. 351-360, 2018.

ANEXO A – Avaliações em alterações na concentração de metais em tecidos irradiados in vivo⁶

1 Introdução

Os metais essenciais desempenham função fundamental na manutenção da saúde do corpo, por causa de seu papel nas funções enzimáticas e hormônios. Algumas deficiências nutricionais são capazes de suprimirem algumas funções estruturais e metabólicas das células e da imunidade humoral. Também têm um grande efeito sobre o desenvolvimento normal do sistema imune. Por isso, adicionar alguns desses metais como cobre, zinco e selênio na alimentação pode ser necessário para uma imunidade adequada (HAWAS, 2013).

O ferro é elemento essencial para proliferação das células imunes e o cobre para a fosforilação oxidativa, atividade antioxidante celular, formação dos tecidos conjuntivos, funções neurológicas e o metabolismo do próprio Fe. O zinco atua como cofator de mais de 300 enzimas influenciando a funcionalidade de diversos órgãos e tendo efeito secundário no sistema imune, onde é essencial para sua integridade. Da mesma forma, o Zn é um elemento crítico no crescimento e diferenciação celular, necessário para a síntese de DNA, para a transcrição do RNA e ativação celular (HAWAS, 2013). Pela sua importância, o interesse dos cientistas na mensuração das concentrações de metais nos tecidos vivos e o entendimento da forma como a alteração desses valores pode ocasionar disfunções e doenças têm aumentado (PARR; TAYLOR, 1964).

As alterações biológicas em consequência à exposição à radiação ionizante ocorrem devido a uma série de fatores físicos, químicos, bioquímicos e à resposta celular iniciada logo após a deposição da energia da radiação no meio. Essa energia absorvida é em geral maior do que as energias de ligação de várias moléculas do corpo e pode levar a ionização das moléculas. O tempo decorrido da deposição energética, dissociação e ionização molecular é da ordem de 10^{-13} segundos. Como a água é o principal constituinte das células é, basicamente, a ionização desta molécula que gera as espécies primárias com alta reatividade e baixa meia vida, como o radical de hidroxila $\text{OH}\cdot$, que irão mediar as reações químicas danosas aos componentes biológicos como a membrana celular, enzimas, proteínas e o próprio DNA (SOULE et al., 2007).

⁶ Autores: Matheus Figueiredo Soares Mingote, Daniel Coelho, Tarcísio Passos Ribeiro de Campos.

Como consequência, a exposição à radiação de pacientes pode levar a modificações genéticas e efeitos determinísticos deletérios graves, que dependerão da tolerância limiar do organismo, do tipo de radiação e das doses e taxas de doses envolvidas. Os sintomas clínicos imediatos indicativos da toxicidade da radiação ionizante em tratamentos radioterápicos incluem: náusea, emese, parotidite, xerostomia, dor de cabeça, fadiga, mucosite, diarreia e perda de apetite. De forma tardia, poderão aparecer pneumopatias, doença veno-oclusiva hepática, disfunção renal, catarata, hipotireoidismo, infertilidade e neoplasias secundárias. Esses efeitos colaterais de risco de curto e longo prazo demandam um acompanhamento clínico de oncologistas e radioterapeutas (WOLDEN et al., 2013).

Deste modo, faz-se necessário analisar a fundo as diversas alterações nas concentrações de metais, em termos teciduais, causadas pela radiação em tratamentos terapêuticos, de tal modo a esclarecer essas modificações nos tecidos vivos. Para isso, tomam-se como referência os dados existentes em variados estudos feitos em ratos, com exposição a alta e baixa dosagem de raios γ .

2 Metodologia

Os dados analisados estão fundamentados em estudos de alto rigor científico, publicados em artigos, até junho de 2016, nas bases de dados Periódicos CAPES, SciELO (Scientific Electronic Library Online), Elsevier e Science Direct. As informações foram divididas em exposições crônicas e agudas.

3 Análise dos resultados

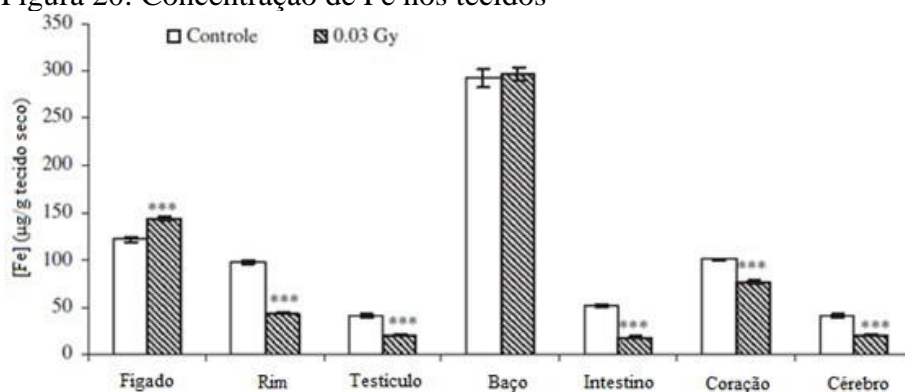
3.1 Exposição crônica

Na exposição crônica à radiação de baixa dosagem, a taxa de dose é definida como aquela em torno de (2 mSv. a 8 Sv.) ano⁻¹. Quando comparados com grupos controles, os dados de pesquisas com ratos demonstram um limiar de 8 Sv.ano⁻¹ para nocividade induzida por radiação, considerando quatro parâmetros: mortalidade por câncer, capacidade reprodutiva, desenvolvimento precoce e expectativa média de vida (LUCKEY, 2008); entretanto serão abordados neste estudo revisional apenas os níveis de concentração de metais em órgãos.

Estudos feitos com ratos Wistar albinos, do sexo masculino, entre 120g e 150g, mantidos sobre condições controladas, irradiados em corpo inteiro, através de baixa dose de radiação γ (0,03 Gy durante 12h – taxa de dose de 2,5 mGy.h⁻¹), demonstraram variações significantes nos níveis de metais nos tecidos. Os animais foram sacrificados 1 hora após a irradiação e analisados tecidos do fígado, rim, coração, testículos, baço, intestino, coração e cérebro, medindo-se as concentrações de Fe, Cu, Ca e Zn (HAWAS, 2013a).

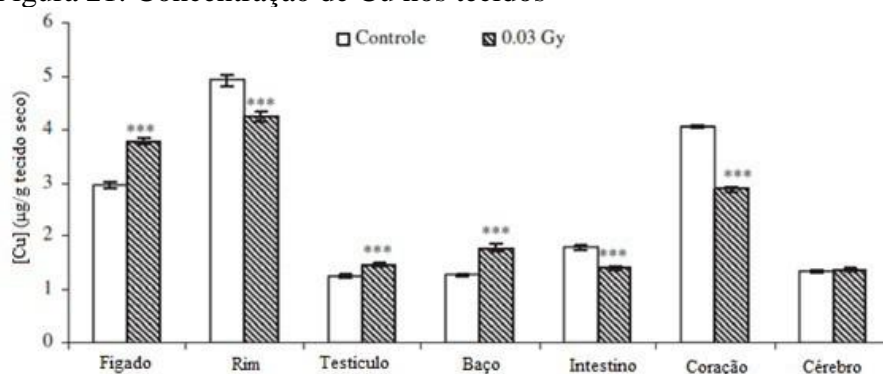
Apesar da baixa dosagem de radiação a que foram expostos, observou-se alterações nos níveis dos metais analisados. A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student e os resultados encontram-se nas Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22 e Fig. 23 (*significativamente diferente do controle com $p \leq 0,05$; **significativamente diferente do controle com $p \leq 0,005$; ***significativamente diferente do controle com $p \leq 0,0005$) (HAWAS, 2013a).

Figura 20: Concentração de Fe nos tecidos



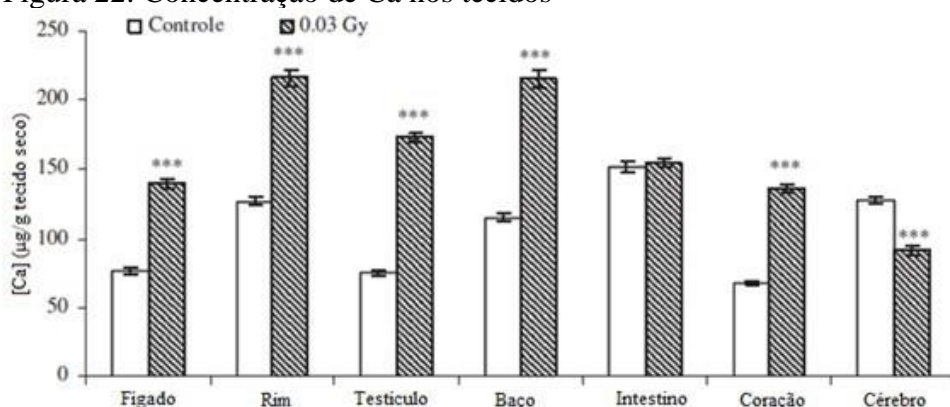
Fonte: Modificado de HAWAS, 2013a.

Figura 21: Concentração de Cu nos tecidos



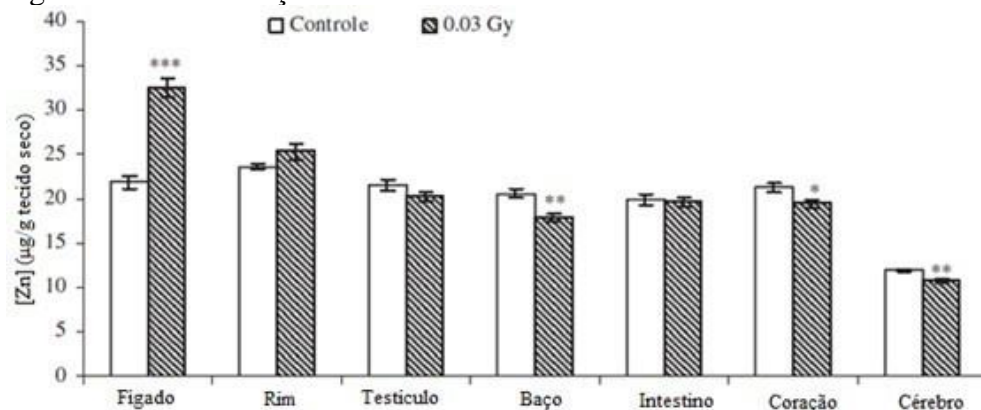
Fonte: Modificado de HAWAS, 2013a.

Figura 22: Concentração de Ca nos tecidos



FONTE: Modificado de HAWAS, 2013a.

Figura 23: Concentração de Zn nos tecidos



Fonte: Modificado de HAWAS, 2013a.

A concentração de Fe aumentou significativamente no fígado e diminuiu consideravelmente nos demais órgãos, exceto no baço, onde não ocorreram mudanças significativas. Os níveis de Cu apresentaram um aumento relevante no fígado, nos testículos e no baço, enquanto nos rins, intestino e coração as concentrações do metal diminuíram significativamente. Não foram observadas alterações no cérebro. Na concentração de Ca, observou-se aumento relativamente maior que o grupo controle em quase todos os órgãos, exceto no cérebro, cujos níveis diminuíram substancialmente, e no intestino, onde não foi constatada nenhuma variação significativa. A análise dos níveis de zinco demonstra um aumento na sua concentração no fígado e uma redução nos tecidos do baço, coração e cérebro. Neste caso, não foram encontradas alterações nos rins, testículos e intestino (HAWAS, 2013a).

3.2 Exposição aguda

Os estudos de exposição aguda envolvem em geral altas doses e altas taxas de dose, usualmente utilizadas na radioterapia. Esta revisão avalia dados de uma dose de radiação gama de corpo inteiro de 6,5 Gy (com taxa de dose de $0,88381 \text{ cGy.s}^{-1}$), onde foram utilizados ratos albinos pesando entre 150g e 200g.

Irradiou-se um total de 12 ratos, divididos em 2 grupos com 6 animais cada: o 1º grupo foi sacrificado um dia após a irradiação e o 2º, 3 dias depois da exposição à radiação. Após o sacrifício, foram medidos os níveis de Fe, Cu e Zn nos órgãos, analisados através de espectrometria de absorção atômica (EAA), conforme Tab. 12. A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student. Os resultados apresentados com valores $p \leq 0,05$ foram considerados significantes (*significativamente diferente do controle com $p \leq 0,05$) (SHABAN; HAWAS, 2008).

Tabela 12: Concentração de Fe, Cu e Zn nos órgãos

Grupos Órgãos		Não Irradiados	Irradiados	
			1º dia	3º dia
Fígado	Fe	183,7 ± 3,519	228,3 ± 9,924*	230,1 ± 6,087*
	Cu	3,150 ± 0,111	2,382 ± 0,077*	2,841 ± 0,096*
	Zn	33,18 ± 1,215	24,99 ± 0,821*	26,72 ± 0,978*
Rim	Fe	121,9 ± 2,425	110,0 ± 1,642*	131,0 ± 3,017*
	Cu	3,645 ± 0,081	3,981 ± 0,077*	4,087 ± 0,134*
	Zn	34,11 ± 1,094	29,28 ± 0,904*	29,61 ± 0,986*
Baço	Fe	1003 ± 39,02	1385 ± 64,23*	1300 ± 29,73*
	Cu	1,280 ± 0,060	1,444 ± 0,035*	1,843 ± 0,057*
	Zn	30,55 ± 1,171	38,07 ± 1,272*	40,22 ± 0,670*
Intestino	Fe	31,21 ± 1,048	42,56 ± 1,714*	42,10 ± 1,544*
	Cu	1,451 ± 0,033	1,603 ± 0,049*	1,467 ± 0,064
	Zn	32,65 ± 1,356	38,81 ± 0,899*	35,62 ± 0,985

Fonte: Modificado de SHABAN; HAWAS, 2008.

Examinando os resultados obtidos nos ratos sacrificados após um dia, percebe-se um expressivo aumento dos níveis de ferro, com queda nas concentrações de cobre e zinco no fígado. Os rins apresentaram uma queda considerável nos níveis de Fe e Zn, com um aumento na quantidade de Cu. Contudo, intestino e baço exibiram um decréscimo vultoso nas concentrações dos três metais (Fe, Cu e Zn) analisados (SHABAN; HAWAS, 2008).

Nos dados referentes aos ratos sacrificados três dias posteriormente à radiação, encontrou-se um aumento ainda maior nas quantidades de Fe no fígado e um valor menor de Cu e Zn quando comparados ao grupo controle. Apesar da diminuição dos níveis de Cu e Zn, as medidas obtidas desses metais indicou uma recuperação, aproximando-se mais à concentração do grupo controle. Nos rins a concentração de Fe e Cu aumentou expressivamente, tornando-se maior até que a existente no grupo controle, enquanto o nível de Zn diminuiu. Os valores de todos os metais no baço demonstrou um acréscimo se comparado aos ratos não irradiados. Já no intestino apenas o Fe apresentou uma variação negativa significativa (SHABAN; HAWAS, 2008).

4 Conclusão

As análises dos resultados dos estudos apresentados permitiram observar que mesmo em uma baixa dosagem de exposição à radiação γ , equivalente a uma exposição crônica, os níveis de concentração de metais essenciais no organismo foram alterados. Pode-se perceber a baixa sensibilidade do organismo submetido à irradiação ionizante a este efeito determinístico. Porém, esses elementos ocorrem em baixa concentração nos tecidos biológicos e sua determinação através de métodos convencionais torna-se complexa e incerta. Deste modo, faz-se necessário analisar com profundidade as diversas alterações de concentrações de metais radioinduzidas no tecido vivo com técnicas acuradas, de tal modo a elucidar seus efeitos biológicos e clínicos. Tal conhecimento poderá contribuir para a adoção de protocolos com maior segurança para pacientes submetidos a diagnóstico por imagem ou radioterapia. Considerando-se as pesquisas de referência, torna-se necessário ampliar os tipos de metais analisados bem como buscar outra metodologia de análise, como a técnica de Análise por Ativação Neutrônica (LEITE et al., 2008), que proverá maior sensibilidade nas medidas. Esta técnica, além de multielementar, não exige que as amostras analisadas sejam solubilizadas, evitando contaminação pelos reagentes, condição imprescindível para a análise por espectrometria de absorção atômica, utilizada nos artigos desta revisão.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, ao CDTN e à UFMG pelo apoio técnico e financeiro.

REFERÊNCIAS

- HAWAS, A. M. **The biosensitivity of certain organs in rats exposed to low doses of γ - radiation.** Journal of Radiation Research; Applied Sciences, Vol. 6, n. 2, 2013b. p.56-62.
- PARR, R. M; TAYLOR, D. M. **The concentrations of cobalt, copper, iron; zinc in some normal human tissues as determined by neutron-activation analysis.** Biochemical Journal, Vol. 91, n. 3, pp.424 (1964).
- SOULE , B. P et al. **The chemistry; biology of nitroxide compounds.** Free Radical Biology; Medicine, Vol. 42, n. 11, 2007. p.1632-1650.
- WOLDEN, S. L et al., **American College of Radiology (ACR); American Society for Radiation Oncology (ASTRO) Practice guideline for the performance of total body irradiation (TBI).** American journal of clinical oncology, Vol. 36, n. 1, 2013. p.97-101.
- LUCKEY, T. D. **The health effects of low-dose ionizing radiation.** Journal of American Physicians; Surgeons, Vol. 13, n. 2, 2008. p.39.
- HAWAS, A. M. **Effect of low dose gamma rays on certain essential metals; oxidative stress in different rat organs.** Journal of Radiation Research; Applied Sciences, Vol. 6, n. 2, 2013a. p.38-44.
- SHABAN, A. E; HAWAS, A. M. **Pentoxifylline as a radioprotector against certain biochemical; metal disorders of whole body gamma irradiation in rats.** Egyptian Journal of Hospital Medicine, Vol. 30, 2008. p.133-144.
- LEITE, R. E. P et al. **Determination of trace elements in human brain tissues using neutron activation analysis.** Journal of Radioanalytical; Nuclear Chemistry, Vol. 278, 2008. p.581-584.

ANEXO B – Análise lipídica através de DESI-MS – uma revisão dos efeitos da radiação gama no perfil lipídico em tecidos biológicos⁷

1 Introdução

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial da Saúde (IARC/WHO) demonstrou que o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes diretamente relacionadas as neoplasias em 2012 (FERLAY; FORMAN, 2014). Estima-se que o número de casos anuais sofrerá um incremento de aproximadamente 57,14% atingindo 22 milhões de novos casos nas próximas duas décadas (FERLAY; FORMAN, 2014). Lesões neoplásicas são caracterizadas pela intensa proliferação celular desordenada associada a falhas nos mecanismos de reparo e eliminação celular, podendo acarretar danos biológicos aos tecidos acometidos com possibilidade de metástase (HALL; GIACCIA, 2012).

A associação entre um diagnóstico precoce e a indicação de tratamentos eficientes como a Radioterapia (RT), que emprega radiações ionizantes no combate às células neoplásicas torna-se imprescindível. Assim, se os efeitos nocivos da radiação ionizante acarretarem um dano biológico às células neoplásicas superior ao dano indireto às células dos tecidos saudáveis adjacentes, o tratamento radioterápico tem boa indicação e está respaldado (DEB; FIELDING, 2009). Sabe-se que a radiação ionizante causa danos aos tecidos saudáveis e neoplásicos indiscriminadamente e seus efeitos se manifestam de acordo com a radiosensibilidade inerente das células, a cinética do tecido e a forma de organização celular (JELONEK et al., 2014). Contudo, mesmo com a adoção de protocolos rígidos para minimização de danos biológicos nos órgãos de riscos, garantindo uma cinética de reparo adequado em tecidos saudáveis, efeitos das radiações já foram identificados através de alterações principalmente no metaboloma protéico e lipídico intracelular.

A metabolômica permite o estudo analítico de biomoléculas bem como seus produtos finais e processos celulares envolvidos para sua síntese. Lipidômica permite analisar dinamicamente as alterações envolvidas referentes aos lipídios e os efeitos biológicos nos tecidos irradiados (JELONEK et al., 2014). A categoria de lipídios mais abundantes são os glicerofosfolipídios (PLs) presentes nas membranas biológicas e envolvidos na sinalização,

⁷ Autores: Matheus Figueiredo Soares Mingote, Tarcísio Passos Ribeiro de Campos.

regulação, proliferação e apoptose (WRIGHT et al., 2004; BARTKE; HANNUN, 2009). A utilização de técnicas analíticas como a espectrometria de massas (Mass Spectrometry- MS) permite a determinação de composições elementares, estruturas moleculares e análises quantitativas e qualitativas de misturas complexas. Através da ionização ambiente por uma técnica baseada em dessorção por ionização, denominada DESI (*Desorption ElectroSpray Ionization*), tecidos orgânicos podem ser submetidos à análise de seus componentes estruturais tais como lipídios e proteínas, principalmente fosfolípidos dos tecidos biológicos (COOKS et al., 2006).

Recentemente, inúmeras evidências de alterações no metaboloma foram constatadas principalmente pelas alterações lipídicas nos tecidos. Parece evidente que RT pode induzir alterações no metaboloma humano. Para aprofundar este conhecimento, o presente trabalho revisa as alterações lipídicas de tecidos irradiados, em especial através da técnica de espectrofotometria de massas com o objetivo de trazer uma luz sobre o tema.

2 Metodologia

Para a coleta de dados, foram consultados artigos entre o período de 2002 até fevereiro de 2016, nas bases de dados Periódicos CAPES, PUBMED (*National Library of Medicine; The National Institute of Health*), MEDLINE (*US National Library of Medicine*), SciELO (*Scientific Electronic Library Online*) e *Science Direct*. Na estratégia de busca, os descritores utilizados foram *dessorção por ionização (DESI)*, *espectrometria de massas*, *efeitos das radiações*, *lipídios*, *radiação- γ* , *radiação ionizante*, *metabolômica*, *lipidômica* utilizados em cada base de dados.

3 Resultados

3.1 Efeitos das Radiações Ionizantes no Tecido Biológico

A radiação ionizante é a radiação que apresenta energia suficiente capaz de provocar excitação eletrônica e ionização de moléculas acarretando na quebra de ligações químicas nas moléculas biológicas dos tecidos (YOSHIMURA, 2009). Raios gama ($R\gamma$) são radiações emitidas de núcleos radioativos, através das desintegrações nucleares, ou de processos de aniquilação de pósitrons na matéria (MAIA et al., 2013). Raios gama são radiações de baixa

LET (*Linear Energy Transfer*) usualmente empregadas em RT que produzem ionização e conseqüentemente radicais livres danificando os tecidos biológicos.

Dose e taxa de dose são essenciais na análise da energia absorvida nos pacientes de RT. A resposta clínica a um efeito determinístico está diretamente relacionada à frequência e a taxa de dose absorvida quando excedido um limiar de dose referente à sensibilidade do tecido exposto ao respectivo efeito (KOLOMIYTSEVA et al., 2012)

Em células, a integridade da membrana é imprescindível para garantir a sinalização do metaboloma protéico e lipídico. No entanto, a radiação ionizante induz a oxidação de lipídios e proteínas pelas espécies reativas do oxigênio (*Reactive Oxygen Species* -ROS).

A peroxidação lipídica é um evento citotóxico definido por eventos bioquímicos sucessivos desencadeados pelos radicais livres determinando a oxidação extensa de ácidos graxos insaturados e membranas. Os subprodutos formados geram alterações estruturais e funcionais na membrana celular acarretando alteração no fluxo de substrato iônico e molecular desencadeando diversos processos (ACKERSTAFF et al., 2003). Assim, radiações ionizantes causam inibição da mitose, indução de apoptose ou ainda podem desencadear o processo de reparo celular (WANG et al., 2009). Alterações radioinduzidas lipídicas e protéicas são esperadas.

Estudos já demonstram que lipídios nucleares estão implicados nos processos de indução da tradução. A cromatina descondensada apresenta grande atividade sinalizadora sendo rica em fosfolípidos e colesterol em relação à cromatina condensada e inativa e pode ser medida pela incorporação de 1,3- ¹⁴C-glicerol em lipídios nucleares. Fosfolípidos da cromatina têm sua atividade aumentada na fase "S" do ciclo celular (WANG et al., 2009). Neste caso, parâmetros como massa do órgão, quantidade total de RNA citoplasmático, quantidade total da síntese protéica foram adotados como critérios de mensuração da resposta metabólica e a atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) foi utilizada como marcador celular (WANG et al., 2009). Em modelo *in vivo*, foi realizado a irradiação R_γ de ratos na dose de 2Gy em três frações, em uma semana, totalizando 6 Gy. Após a terceira dose, a massa do timo foi reduzida a 1/3 de sua massa original. A atividade da enzima ODC foi diminuída após 1 hora do processo de irradiação se elevando a níveis normais após um período de 7 dias. Foram observadas também alterações radioinduzidas quantitativas e qualitativas dos lipídios. Houve redução nos níveis séricos de lipídios nucleares: aumento de ácidos graxos e diminuição de fosfatidilcolina + fosfatidilserina (PC+PS) e fosfatidiletanamina (PE), de acordo sumário apresentado na Tab. 13.

O aumento de PE e PC sinalizam para o aumento da condensação de cromatina inativando a RNA polimerase afetando diretamente os mecanismos de reparo celular (WANG et al., 2009).

Tabela 13: Quantitativo e qualitativo de ácidos graxos, colesterol e fosfolipídios em timo após irradiação RT, em ratos a uma dose de 6 GY (2 GY, 3 frações por semana)

Lipídios	Homogeneizado		Núcleo		Cromatina	
	Controle	6Gy	Controle	6Gy	Controle	6Gy
Ácidos Graxos	63±2	74±8	21±2	50±6*	18,4±1,2	35±2*
Colesterol	10,5±0,1	10,8±0,2	5,6±0,2	5,3±0,3	5,9±0,5	5,4±0,1
Esfingomielina	1,3±0,2	1,4±0,4	1,2±0,3	1,1±0,4	1,1±0,5	0,8±0,1
Fosfatidilcolina + Fosfatidilserina	20,2±1,7	18,0±1,0	16,2±1,5	10,1±0,1*	22,7±1,0	15,4±0,5*
Fosfatidiletanamina	5,9±0,5	4,6±0,5	3,7±0,5	2,5±0,2*	4,9±0,3	3,2±0,1*
Cardiolipina	1,8±0,5	1,4±0,4	1,9±0,3	1,4±0,5	0,9±0,2	1,0±0,2

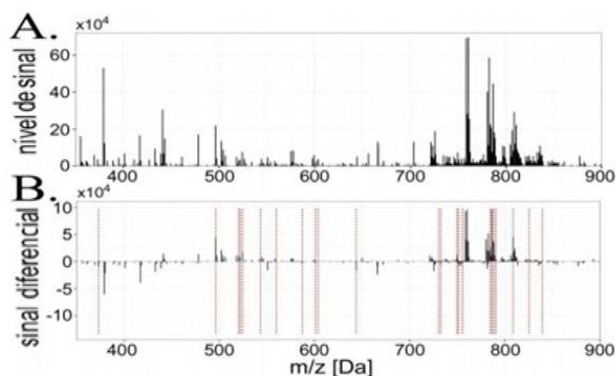
Os valores são as médias de desvio padrão de três experimentos independentes. Para cada um, foram utilizados de três a cinco animais. A significância estatística foi calculada pelo teste t-Student.

* Diferença significativa sob comparação pareada em $p < 0,05$

Fonte: Adaptado de KOLOMIYTSEVA et al., 2012.

RT é uma das principais modalidades terapêuticas no controle tumoral sendo necessário compreender melhor as alterações do metabolismo pós-RT. Através de um estudo analítico percebeu-se que o metabolismo de fosfatidilcolina (PCs) e PLs está alterados em células neoplásicas aumentando o nível sérico de seus precursores tais como colina e derivados como lisofosfatidilcolinas (LPCs) (KANG et al., 2009). O metabolismo e o nível sérico de PLs foi alterado após a exposição à radiação ionizante (WANG et al., 2009). A irradiação local na radioterapia induz a uma reposta do organismo que pode ser evidenciada pela alteração nos componentes séricos sanguíneos (COOKS et al., 2006). Como mostrado na Fig. 24. O gráfico evidencia os picos séricos dos fragmentos lipídicos separados pela sua relação m/z demonstrando que a diferença entre a intensidade dos picos bem como suas amplitudes reflete a alteração qualitativa e quantitativa desses lipídios. Os efeitos das radiações ionizantes induzem a redução nos níveis séricos de lipídios sanguíneos, principalmente PC34, PC36, PC38, LPC16 e LPC18 respaldado (DEB; FIELDING, 2009). Após a suspensão do tratamento, os níveis séricos retornaram ao normal após 1 – 2 meses respaldado (DEB; FIELDING, 2009).

Figura 24: Perfil de massa dos lipídios séricos antes (A) e após a radioterapia (B)



Fonte: Adaptado de JELONEK et al., 2014.

3.2 A técnica de espectrometria de massas - DESI-MS

Espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a completa análise qualitativa e quantitativa de moléculas em compostos ou misturas através da determinação de suas massas de seus componentes ionizados. A movimentação dentro de um campo elétrico ou magnético apresentará características próprias e únicas da molécula devido a sua massa e carga elétrica. A razão entre a massa/carga molecular é designada por m/z (*mass to charge ratio*) e permite inferir e determinar sua composição química e estrutural (BRAMER, 2016). DESI é uma nova tecnologia de ionização baseada nos conceitos do ESI (*Electrospray Ionization*). Sua principal característica é que a amostra pode ser depositada em alguma superfície sem a necessidade de preparo das amostras sendo chamada de *ambient ionization*, ou seja, a ionização pode ocorrer fora do espectrômetro. A superfície onde a amostra está depositada recebe um jato de spray, com solvente apropriado, em alta velocidade, provocando a dessorção e ionização do analito e conseqüentemente transferência dos íons para fase gasosa. A caracterização de fosfolipídio é de extrema importância devido à diversidade de funções celulares além da possibilidade de ser utilizado como biomarcador em neoplasias (COOKS et al., 2006). A utilização do sistema de análise de massas por DESI em modo *fullscan* em tecidos saudáveis e tumorais demonstrou grande variação no conteúdo de fosfolipídios entre os tecidos. Nesta revisão, vários padrões de fosfolipídios foram submetidos a análises por injeção direta na fonte de ESI-MS, para determinação de condições ideais de ionização e fragmentação.

4 Conclusão

Os efeitos das radiações ionizantes foram observados através das alterações dos níveis séricos de lipídios na literatura revisada. Mesmo com toda preocupação em delinear o volume tumoral através de técnicas conformacionais e a adoção de protocolos de irradiação para minimização dos danos como o hipofracionamento de dose, torna-se necessária uma avaliação mais criteriosa do metaboloma para mensuração da toxicidade do tratamento. DESI-MS demonstrou ser a técnica essencial para esta análise.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES pelo apoio e bolsa de mestrado concedida.

REFERÊNCIAS

ACKERSTAFF, E et al. **Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells?** Journal of Cellular Biochemistry, Vol. 90, United States, 2003. p.525-533.

BARTKE, N; HANNUN, Y. A. **Bioactive sphingolipids: Metabolism; function.** Journal of Lipid Research, Vol. 50(suppl.). United States, 2009. p.91- 96.

BRAMER, S. E. V. **An Introduction to Mass Spectrometry.** Disponível em: <<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>>. Acesso em: 21 jul 2016.

COOKS, R. G. et al. **Ambient Mass Spectrometry.** Science, Vol. 311, Issue 5767, United States, 2006. p.1566–1570.

DEB, P; FIELDING, A. **Radiobiological model comparison of 3D conformal radiotherapy; IMRT plans for the treatment of prostate cancer.** Australasian Physical; Engineering Sciences in Medicine, Vol. 32 (2), 2009. p.51-61.

FORMAN D; FERLAY; J. **World Cancer Report 2014.** The global; regional burden of cancer, pp.16-53, Lyon, 2014.

HALL, E. J; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist.** 7thed., Philadelphia, Ed. Lippincott Williams; Wilkins, 2012.

JELONEK, K et al. **Radiation-Induced Changes in Serum Lipidome of Head; Neck Cancer Patients.** International Journal of Molecular Sciences, Vol. 15, Switzerland, 2014. p.6609-6624.

KANG, C. M et al. **Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes.** Radiation Research, Vol. 159, United States, 2009. p.312-319.

KOLOMIYTSEVA, I. K et al. **Nuclear; chromatin lipids: metabolism in normal; γ -irradiated rats.** Bioelectrochemistry, Vol. 58, Moscow, 2012. p.31-39, Elsevier.

MAIA, G. A. S et al. **The effect of gamma radiation on the lipid profile of irradiated red blood cells.** Ann.Hematol., Vol. 93, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg, 2013. p.753-760.

WANG, C et al **Plasma phospholipid metabolic profiling; biomarkers of rats following radiation exposure based on liquid chromatography-mass spectrometry technique.** Biomedical Chromatography, Vol. 23, United States, 2009. p.1079-1085,

WRIGHTET, M. M et al. **Cell membranes; apoptosis: Role of cardiolipin, phosphatidylcholine, anticancer lipid analogues.** Biochemistry Cell Biology, Vol. 84, Canada, 2004. p.18-26.

YOSHIMURA, E. M. **Física das Radiações: interação da radiação com a matéria.** São Paulo, Revista Brasileira de Física Médica, 2009.

ANEXO C – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 339 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Investigação Proteica pós-Irradiação", que tem como responsável Tarcisio Passos Ribeiro de Campos, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 28/04/2015. Este certificado espira-se em 28/04/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 339 / 2014, related to the Project entitled "Protein Investigação post-radiation", under the supervision of Tarcisio Passos Ribeiro de Campos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 28/04/2015. This certificates expires in 28/04/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 28/04/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO D – Solicitação à Comissão de Ética no Uso de Animais**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES**

Belo Horizonte, 8 de setembro de 2016

Para: CEUA-UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005, 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua;

cetea@prpq.ufmg.br

De: Prof. Tarcisio Passos Ribeiro de Campos

Departamento de Engenharia Nuclear, Escola de Engenharia, Bloco 4, S.2285

Tel: 55-3134096691 Email: trpcampos@pq.cnpq.br; trpcampos@yahoo.com.br

Assunto: Adendo Protoc. 339/2014 - Investigação Proteica pós-Irradiação, aprovado no CEUA.

Caro(a) Senhor(a),

Primeiramente gostaria de recordar que não houve no site a atualização solicitada no Protocolo 339/2014, para o número de cobaias no atendimento aos parâmetros estatísticos demonstrados em diligência e aprovado para 40 animais, pelo fato do site do CEUA na época não ter permitido edição. Recordo que no protocolo 339/2014 está sendo prevista a retirada de fluidos. No presente, o uso de órgãos das cobaias após eutanásia em análises complementares é tema deste adendo que não alterará o número de animais, as condições de manuseio e guarda, e experimentação, mantendo-se como descrito no protocolo. Tais informações complementarão os dados de proteínas plasmáticas radioinduzidas.

ADENDO

Informo nossa intenção de uso de órgãos das cobaias pós-eutanásia para análises científicas complementares, a saber: histológicas, composição química de metais essenciais, e conteúdo lipídico, no intuito de complementar os estudos de alterações fisiológicas induzidas pela radiação. Informo também a presença dos discentes Matheus Soares e Daniel Coelho na equipe do projeto.

Atenciosamente,

Prof. Tarcisio P.R. Campos

ANEXO E – Resposta da Comissão de Ética no Uso de Animais

**Universidade Federal de Minas Gerais
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA**

OF. CEUA-028/16

Belo Horizonte, 11 de outubro de 2016.

Sr.
Prof. Tarcisio Passos Ribeiro de Campos
Departamento de Engenharia Nuclear
Escola de Engenharia

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG informa que na reunião ordinária do dia 10/10/2016, em face da solicitação apresentada por V. Sa., aprovou a solicitação de pedido de adendo de pesquisa protocolado sob o número 339/2014, título “*Investigação Proteica pós-Irradiação*” para a retirada de órgãos de cobaias cuja eutanásia já foi aprovada.

Sendo o que nos apresenta no momento, ficamos à sua inteira disposição para outros esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente


Profa. Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenadora da CEUA/UFMG

A CEUA tem novo site: <http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>.
E-mail : cetea@prpq.ufmg.br
Endereço: Unidade Administrativa II, 2º. andar, sala 2005.