



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES



MATHEUS FIGUEIREDO SOARES MINGOTE

**ANÁLISE LIPÍDICA DE TECIDO CEREBRAL EXPOSTOS À RADIAÇÃO
POR DESI-MS**

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES

MATHEUS FIGUEIREDO SOARES MINGOTE

**ANÁLISE LIPÍDICA DE TECIDO CEREBRAL EXPOSTOS À RADIAÇÃO
POR DESI-MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências e Técnicas Nucleares.

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

Coorientador: Prof. Dr. Rodinei Augusti

Belo Horizonte

2017

M664a	<p>Mingote, Matheus Figueiredo Soares. Análise lipídica de tecido cerebral expostos à radiação por DESI-MS [manuscrito] Matheus Figueiredo Soares Mingote. - 2017. 158 f., enc.: il.</p> <p>Orientador: Tarcísio Passos Ribeiro Campos. Coorientador: Rodinei Augusti.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.</p> <p>Anexos: 133-142.</p> <p>Bibliografia: f.143-158.</p> <p>1. Engenharia nuclear - Teses. 2. Espectrometria de massa - Teses. 3. Radiação ionizante - Teses. I. Campos, Tarcísio Passos Ribeiro de. II. Augusti, Rodinei. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.</p>
	CDU: 621.039(043)



FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE LIPÍDICA DE TECIDO CEREBRAL EXPOSTOS À RADIAÇÃO POR DESI-MS

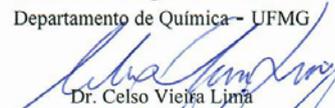
MATHEUS FIGUEIREDO SOARES MINGOTE

Dissertação 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 Mestre em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, área de concentração CIÊNCIAS DAS RADIAÇÕES.

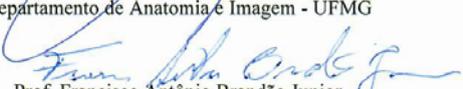
Aprovada em 26 de janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


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


Prof. Rodinei Augusti - Coorientador
Departamento de Química - UFMG


Dr. Celso Vieira Lima
UFMG


Prof. Marcelo Henrique Mamede Leber
Departamento de Anatomia e Imagem - UFMG


Prof. Francisco Antônio Brandão Junior
CEFET-MG

Belo Horizonte, 26 de janeiro de 2018.

Dedico esse trabalho a minha eterna vovó
Carmem e ao Pedro, materialização do amor e
estímulo eterno de superação.

Dezembro, 2017

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.

Aos professores da Patologia, Geovanni Dantas Cassali e Patrícia Massara Martinelli pelo apoio e orientações experimentais decisivas e pelas análises teciduais contribuindo decisivamente para reforçar ainda mais os resultados já obtidos.

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

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 ao Prof. Marcos Eberlin pela oportunidade em desenvolver o trabalho em massas.

Agradeço a Julia Raquel Lino e Freitas pela enorme paciência e disponibilidade na análise dos resultados, a você a minha eterna gratidão.

Agradeço ao Paulo Celso, o melhor amigo que Deus poderia ter me enviado e colocado em minha vida, a você minha eterna gratidão e o meu muito obrigado por tudo, conte comigo sempre.

Agradeço a minha Mãe, fonte de amor incondicional e de inspiração para que sempre siga seus passos e aos meus irmãos por todo apoio.

Agradeço a Patrícia pelo companheirismo, apoio e toda compreensão nos momentos de ausência no árduo exercício solitário e intelectual diante do computador e ao Dino, eterno companheiro nas intermináveis horas de leitura e escrita, sempre ao meu lado pacientemente.

*Uma pessoa que nunca cometeu um erro, nunca
tentou nada novo.*
(Albert Einstein)

RESUMO

O presente trabalho aborda alterações lipídicas radioinduzidas em tecido cerebral. Através de DESI (ionização por pulverização eletrolítica de dessorção) os tecidos orgânicos podem ser submetidos à análise de seus componentes estruturais, como as inúmeras classes de lipídios. A caracterização da quantificação de fosfolipídios é de relevância considerando que estes estão correlacionados a uma diversidade das funções celulares, além da possível utilização como biomarcador nas neoplasias. Objetivo: Investigar a viabilidade da geração de perfis de lipídeos de tecido cerebral irradiado, no intuito de identificação de alterações lipídicas radioinduzidas. Metodologia: ratos Wistar saudáveis foram selecionados e divididos em dois grupos: um controle (n = 4), denominado GC e outro submetido à irradiação corporal total (TBI), chamado GIR (n = 24) subdividido em 04 subgrupos correspondentes a cinética de tempo 24, 48, 96hrs e 01 semanas contendo 06 animais cada. Os animais do grupo GIR (n = 24) tiveram o corpo total irradiado através da exposição a uma fonte Co-60, todos juntos colocados em 4 caixas, com uma dose absorvida de 5 Gy. Eles foram irradiados após uma cinética de tempo distinta. Foi realizado a eutanásia, com a retirada dos órgãos e armazenamento em freezer -80°C e realizado os cortes no criostato, em cortes sagitais dos hemisférios cerebrais com 14 µm de espessura. As lâminas foram analisadas com uma fonte DESI acoplada a um espectrômetro de massas. As análises foram conduzidas no modo de varredura completa e os espectros de massas foram obtidos no modo negativo, abrangendo uma faixa de massa de 200 a 1000 Da. Resultados: A maioria dos íons observados nos espectros de massa correspondem a 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 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. Conclusão: A radiação altera o perfil lipídico em tecido cerebral sendo necessário aprofundar ainda mais os estudos para a identificação dos principais biomarcadores de injúria no tratamento radioterápico.

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

ABSTRACT

The present work deals with radioinduced lipid alterations in brain tissue. Through DESI (electrolytic desorption spray ionization) organic tissues can be subjected to analysis of their structural components, such as the numerous classes of lipids. The characterization and quantification of phospholipids is of relevance considering that they are correlated to a diversity of cellular functions, besides the possible use as biomarker in the neoplasias. Objective: To investigate the viability of the generation of lipid profiles of irradiated brain tissue, in order to identify radioinduced lipid alterations. METHODS: Healthy Wistar rats were selected and divided into two groups: one control (n = 4), called GC and another one submitted to total body irradiation (TBI), called GIR (n = 24) subdivided into 04 subgroups corresponding to time kinetics 24, 48, 96hrs and 01 weeks containing 06 animals each. Animals from the GIR group (n = 24) had the whole body irradiated through exposure to a Co-60 source, all together placed in 4 boxes, with an absorbed dose of 5 Gy. They were irradiated after a different time kinetics. Euthanasia was performed, with the removal of the organs and freezer storage at -80°C and cuts in the cryostat in sagittal sections of the cerebral hemispheres with 14 µm thickness. The slides were analyzed with an DESI source coupled to a mass spectrometer. The analyzes were conducted in the full scan mode and the mass spectra were obtained in the negative mode, covering a mass range of 200 to 1000 Da. Results: Most of the ions observed in the mass spectra correspond to deprotonated free fatty acids, phosphatidylserines (PS), phosphatidylinositol (PI) and sulfatide (ST). Several ions undergo changes in intensity and region of origin demonstrating the effect of radiation on the metabolome of brain tissue. The m / z 868,529 ion presented 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 kinetics of time. Conclusion: Radiation changes the lipid profile in brain tissue and it is necessary to further deepen the studies for the identification of the main biomarkers of injury in the radiotherapy treatment.

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	INCIDÊNCIA MUNDIAL DOS PRINCIPAIS TIPOS DE CÂNCER	22
FIGURA 2.2	PRINCIPAIS CAUSAS DE MORTE POR CÂNCER	22
FIGURA 2.3	INCIDÊNCIA DE CÂNCER MASCULINO NO BRASIL	23
FIGURA 2.4	INCIDÊNCIA DE CÂNCER FEMININO NO BRASIL	23
FIGURA 2.5	CONCENTRAÇÃO DE CICLINAS NO CICLO CELULAR	27
FIGURA 2.6	REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO E FORMAÇÃO DO COMPLEXO CDK-CICLINA DEPENDENTE DE QUINASES	27
FIGURA 2.7	DETALHAMENTO MOLECULAR DO CICLO CELULAR	28
FIGURA 2.8	SEQUÊNCIA DE DEGRADAÇÃO PROTEICA	29
FIGURA 2.9	RESPOSTA A QUEBRA DE FITA DUPLA DE DNA (DSBS)	30
FIGURA 2.10	ESQUEMA DE DECAIMENTO DO RADIONUCLÍDEO CO-60	32
FIGURA 2.11	RADIÓLISE DA ÁGUA E FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES	33
FIGURA 2.12	BASES PÚRICAS E PIRIMÍDICAS	34
FIGURA 2.13	MUTAÇÕES TRANSIÇÃO E TRANSVERSÃO	34
FIGURA 2.14	OXIDAÇÃO DA GUANINA POR ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	35
FIGURA 2.15	ABSORÇÃO DE DOSE EM RELAÇÃO À PROFUNDIDADE ENTRE DIFERENTES TIPOS DE TRATAMENTO	38
FIGURA 2.16	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	51
FIGURA 2.17	ESQUEMA DO PROCESSO DE IONIZAÇÃO POR ESI	54
FIGURA 2.18	FONTE DE IONIZAÇÃO DO TIPO DESI	55
FIGURA 2.19	ESQUEMA DA FONTE DE IONIZAÇÃO POR DESI-MS	56

FIGURA 2.20	DESI-MS	56
FIGURA 2.21	ESPECTRO COM OS VALORES <i>M/Z</i> MAIS ABUNDANTES (A) IMAGEM TOTAL DOS IONS (B) ADQUIRIDO POR DESI-MSI EM MODO POSITIVO	67
FIGURA 2.22	CORTE SAGITAL CEREBRAL	63
FIGURA 3.1	PERFIL DE MASSA DOS LIPÍDIOS SÉRICOS ANTES (A) E APÓS A RADIOTERAPIA	68
FIGURE 4.1	Representation of the Stages to Obtain the Images of the Ions Generated By DESI	75
FIGURE 4.2	Representation of the Stages to Obtain the Images of the Ions Generated By MALDI	76
FIGURE 4.3	Image of a Sagittal Brain Section from an Irradiated Animal, Recorded on a Maldi-Tof Instrument	76
FIGURE 5.1	BRAIN 100x SLIDES	89
FIGURE 5.2	BRAIN 400x SLIDES	89
FIGURE 5.3	LUNG 100x SLIDES	90
FIGURE 5.4	LUNG 400x SLIDES	90
FIGURE 5.5	KIDNEY 100x SLIDES	91
FIGURE 5.6	KIDNEY 400x SLIDES	91
FIGURE 5.7	LIVER 100x SLIDES	92
FIGURE 5.8	LIVER 400x SLIDES	92
FIGURE 5.9	HEART 100x SLIDES	93
FIGURE 5.10	HEART 400x SLIDES	93
FIGURA 6.1	ESPECTRO DO CONTROLE (C2)	108
FIGURA 6.2	ÍON 600.513	110
FIGURA 6.3	ÍON 607.471	114
FIGURA 6.4	ÍON 608.525	115
FIGURA 6.5	ÍON 625.514	116

FIGURA 6.6	ÍON 652.552	117
FIGURA 6.7	ÍON 687.497	118
FIGURA 6.8	ÍON 689.535	119
FIGURA 6.9	ÍON 713.512	120
FIGURA 6.10	ÍON 726.544	121
FIGURA 6.11	ÍON 749.528	122
FIGURA 6.12	ÍON 774.544	123
FIGURA 6.13	ÍON 794.622	124
FIGURA 6.14	ÍON 856.508	125
FIGURA 6.15	ÍON 868.529	125
FIGURA 6.16	ÍON 901.544	126
FIGURA 6.17	ÍON 902.547	127
FIGURA 6.18	ÍON 914.693	128
FIGURA 6.19	ÁREAS DE DISTRIBUIÇÃO DO LIPÍDIO <i>M/Z</i> 726,544	129
FIGURA 6.20	ÁREAS DE DISTRIBUIÇÃO DO LIPÍDIO <i>M/Z</i> 774,544	130
FIGURA 8.1	CONCENTRAÇÃO DE Fe NOS TECIDOS	136
FIGURA 8.2	CONCENTRAÇÃO DE Cu NOS TECIDOS	136
FIGURA 8.3	CONCENTRAÇÃO DE Ca NOS TECIDOS	137
FIGURA 8.4	CONCENTRAÇÃO DE Zn NOS TECIDOS	137

LISTA DA TABELAS

TABELA 2.1	CLASSES MOLECULARES DE LIPÍDIOS PRESENTES EM TECIDO CEREBRAL – ALTA RESOLUÇÃO	60
TABELA 2.2	CLASSES MOLECULARES DE LIPÍDIOS PRESENTES EM TECIDO CEREBRAL – BAIXA RESOLUÇÃO	61
TABELA 3.1	QUANTITATIVO E QUALITATIVO DE ÁCIDOS GRAXOS, COLESTEROL E FOSFOLIPÍDIOS EM TIMO APÓS IRRADIAÇÃO R Γ , EM RATOS A UMA DOSE DE 6 GY (2 GY, 3 FRAÇÕES POR SEMANA)	67
TABLE 5.1	DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE TOTAL WEIGHT OF THE RATS, BY GROUPS	87
TABELA 6.1	SPEARMAN'S COEFFICIENT OF RHO	88
TABELA 6.2	PRINCIPAIS LIPÍDIOS QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES ENTRE OS GRUPOS E ENTRE OS ANIMAIS IRRADIADOS	111
TABELA 6.3	DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA CEREBRAL DOS IONS CONTROLE (C2)	112
TABELA 8.1	CONCENTRAÇÃO DE Fe, Cu E Zn NOS ÓRGÃOS	138

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	Carbono
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 dessorção
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
RNA _m	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 estereotáxica
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	17
1.1 Apresentação do tema	17
1.2 Objetivos	18
1.2.1 <i>Objetivos gerais</i>	18
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
1.3 Justificativa	19
1.4 Organização da dissertação	19
2 – ESTADO DA ARTE	21
2.1 Epidemiologia	21
2.1.2 <i>Principais dados estatísticos sobre os tumores cerebrais e sistema nervoso central (SNC)</i>	24
2.1.3 <i>Neoplasias</i>	25
2.1.4 <i>Ciclo Celular</i>	26
2.2 Radiação gama e mutações por oxidação	32
2.3 Radioterapia	36
2.3.1 <i>Radiocirurgia para Tumores Cerebrais</i>	37
2.3.2 <i>Tumores Cerebrais/SNC</i>	39
2.3.2.1 <i>Tumores Primários</i>	39
2.3.2.2 <i>Tumores secundários</i>	45
2.3.3 <i>Toxicidades da radioterapia</i>	46
2.4 Espectrometria de massas	50
2.4.1 <i>Instrumentação</i>	51
2.4.2 <i>Fontes de Ionização</i>	51
2.4.3 <i>Ionização por spray de elétrons (ESI – Electrospray Ionization)</i>	52
2.4.4 <i>Ionização por dessorção de spray de elétrons (DESI – Desorption Electrospray Ionization)</i>	54
2.4.5 <i>Lipidômica</i>	58
3.1 Introdução	64
3.2 Metodologia	65
3.3 Resultados	65
3.3.1 <i>Efeitos das Radiações Ionizantes no Tecido Biológico</i>	65
3.3.2 <i>A técnica de espectrometria de massas - DESI-MS</i>	68

3.4 Conclusão	69
AGRADECIMENTOS	69
REFERÊNCIAS	70
4 - METODOLOGICAL ISSUES IN PROTEIN; LIPIDIC EXPRESSIONS IN BRAIN TISSUE EXPOSED TO Co⁶⁰ BASED ON DESI/MALDI-MS	72
4.1 Introduction	72
4.2 Materials; Methods	73
4.2.1 <i>Group selection</i>	73
4.2.2 <i>Irradiation protocol</i>	74
4.2.3 <i>Cryostat</i>	74
4.2.4 <i>DESI</i>	74
4.2.5 <i>MALDI</i>	75
4.3 Issues addressed on methodology	76
4.4 Discussions	78
4.5 Conclusions	79
ACKNOWLEDGMENTS	79
REFERENCES	80
5 - MASS WEIGHT AND HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON WISTAR MOUSE ORGANS	82
5.1 Introduction	82
5.2 Materials and methods	84
5.2.1 <i>Group selection</i>	84
5.2.2 <i>Irradiation Protocol</i>	84
5.2.3 <i>Euthanasia and organ preservation</i>	84
5.2.4 <i>Statics method</i>	85
5.2.5 <i>Histological method</i>	85
5.3. Results	86
5.3.1 <i>Statistical analyzes of organ weights</i>	86
5.3.2 <i>Histopathological analyses of organs</i>	89
5.3.2.1 <i>Brain</i>	89
5.3.2.2 <i>Lung</i>	90
5.3.2.3 <i>Kidney</i>	91
5.3.2.4 <i>Liver</i>	92
5.3.2.5 <i>Heart</i>	93

5.4 Discussion	94
5.5 Conclusion	94
ACKNOWLEDGMENTS	95
REFERENCES	96
6 – ALTERAÇÕES LIPÍDICAS EM TECIDO CEREBRAL EXPOSTO A RADIAÇÃO DE BAIXA LET	98
6.1 Introdução	98
6.2 Materiais e métodos	99
6.2.1 <i>Principais reagentes</i>	99
6.2.2. <i>Principais equipamentos</i>	100
6.2.3 <i>Animais</i>	101
6.2.4 <i>Metodologia e procedimentos</i>	101
6.3 Resultados	108
6.4 Discussão	129
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES	132
ANEXOS	133
ANEXO A	133
8 - AVALIAÇÕES EM ALTERAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM TECIDOS IRRADIADOS IN VIVO	133
8.1 Introdução	133
8.2 Metodologia	134
8.3 Análise dos resultados	134
8.3.1 <i>Exposição crônica</i>	134
8.3.2 <i>Exposição aguda</i>	137
8.4 Conclusão	138
AGRADECIMENTOS	138
REFERÊNCIAS	139
ANEXO B	140
ANEXO C	141
ANEXO D	142
REFERÊNCIAS	143

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do tema

O desenvolvimento científico e tecnológico na área de saúde, associado ao maior acesso a medicamentos e exames diagnósticos, proporcionou um aumento expressivo na expectativa de vida. Contudo, o envelhecimento da população traz consigo peculiaridades próprias da chamada transição demográfica demonstrando necessidade de adequação às novas demandas e necessidade de revisão nos protocolos de saúde devido à elevação da prevalência das doenças crônicas não transmissíveis – DCNT (GOTTLIEB, 2011). O envelhecimento da população proporciona um aumento do risco e da incidência de neoplasias devido à exposição a fatores ambientais (radiações ionizantes, raios U.V, alcoolismo, tabagismo, obesidade, poluição comportamento sexual de risco) e ocupacionais que podem induzir a alterações clonogênicas que favorecem o surgimento de neoplasias malignas (INCA, 2016).

A radioterapia é uma das especialidades que compõem o tripé no tratamento oncológico e emprega o uso de radiações para controle e/ou cura tumoral. Contudo a radiação atua indiscriminadamente sobre as células tumorais e sadias adjacentes causando danos subletais principalmente nas células com baixa capacidade de renovação e reparo causando efeitos adversos tais como estomatites, radiodermites e colites acompanhados de ulcerações, sangramentos e infecções. Contudo, os benefícios do tratamento radioterápico ainda estão totalmente respaldados diante da extensão de danos tumorais frente aos danos causados pela irradiação dos tecidos sadios adjacentes, acarretando em danos teciduais como o desenvolvimento de neurotoxicidade aguda e/ou crônica (DEB; FIELDING, 2009; RUDÀ, et al., 2013). Os procedimentos radioterápicos estão diretamente relacionados à taxa de dose, ao volume tumoral, à radiobiologia e à cinética de reparo determinando diretamente a proporção de apoptose e de clonogenicidade celular (GEMMEL et al., 2009). A perda da clonogenicidade de tecidos neoplásicos bem como a preservação dos tecidos sadios determina a efetividade e o sucesso do tratamento radioterápico (BECKER et al., 2001).

A radiação gama é um tipo de radiação ionizante que pode causar diversos danos celulares por alterações estruturais diretas e/ou indiretas devido à ruptura de ligações interatômicas e moleculares, determinando alterações morfofuncionais (OKUNO, et al., 2010). O foco principal representa o dano direto no DNA de células neoplásicas resultando na perda de sua clonogenicidade. A radiação ionizante causa danos diretos no DNA pela ruptura de ligações

estruturais das bases nitrogenadas bem como danos indiretos, desencadeados pelo intenso stress oxidativo produzido pelo aumento de espécies reativas do oxigênio (ROS) e pela formação de outros radicais livres, que contribuem com as lesões no DNA. As alterações no sequenciamento e leitura do DNA acarretam alterações na proteômica e lipidômica celular. As alterações morfofisiológicas celulares são responsáveis tanto pela inibição clonogênica como pela indução do processo apoptótico.

Assim, torna-se necessário uma avaliação biomolecular dos efeitos induzidos pela radiação durante os tratamentos radioterápicos, visando entender e minimizar os efeitos adversos, podendo ainda contribuir para a otimização do controle tumoral. Os benefícios da radioterapia devem estar associados a uma baixa toxicidade para os tecidos adjacentes sadios possibilitando o seu reparo e regeneração.

A metabolômica permite o estudo analítico de biomoléculas, bem como, de seus produtos finais e dos processos celulares envolvidos na sua síntese. Por sua vez, lipidômica permite analisar dinamicamente as alterações envolvidas referentes aos lipídios e os efeitos biológicos nos tecidos irradiados (JELONEK, 2014).

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*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), tecidos orgânicos podem ser submetidos à análise de seus componentes estruturais tais como lipídios e proteínas (COOKS, 2006).

Este trabalho está inserido nas propedêuticas da radioterapia, e procura analisar o metaboloma frente a ação direta e indireta da radiação ionizante. Para que haja possibilidades de ampliar a resposta terapêutica, torna-se necessário avaliar ainda mais a presença de subprodutos moleculares devido aos efeitos lesivos da radiação- γ no DNA.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos gerais

São objetivos gerais:

- Avaliar de forma qualitativa e quantitativa as alterações radioinduzidas em tecidos irradiados por radiação- γ por meio de espectrometria de massas.

1.2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos:

- Investigar as alterações de peso nos órgãos dos animais irradiados;
- Realizar os experimentos em modelo animal e analisar estatisticamente as alterações significativas presentes nos animais irradiados;
- Investigar e avaliar as possíveis alterações morfológicas presentes nos órgãos dos animais irradiados;
- Investigar e avaliar as possíveis alterações no lipidoma induzido por radiação;

1.3 Justificativa

Mesmo com toda preocupação em delinear o volume tumoral através de técnicas conformacionais além da adoção de protocolos de irradiação para minimização dos danos, torna-se necessário uma avaliação mais criteriosa do metaboloma para mensuração da toxicidade do tratamento radioterápico. As técnicas analíticas poderão ajudar a elucidar ainda mais os efeitos da radiação no DNA e, conseqüentemente, no metaboloma celular. DESI-MS demonstrou ser essencial para esta análise. Assim, os resultados analíticos da lipidômica podem ser determinantes para se estabelecer revisões em protocolos de modo a otimizar a intensidade das doses e contribuir para a diminuição da 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 planimetria sejam aprimoradas e/ou desenvolvidas.

1.4 Organização da dissertação

Este trabalho será apresentado sob capítulos 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 contém o primeiro artigo de revisão a respeito dos efeitos da radiação gama nos órgãos demonstrando a resposta tecidual frente as alterações radioinduzidas. O capítulo 4 contém o segundo artigo que irá discutir as principais metodologias empregadas no estudo da lipidômica. O capítulo 5 contém o terceiro artigo que avaliará a influência da radiação nas massas dos órgãos e as possíveis alterações histológicas radioinduzidas. E, por fim, o capítulo 6 contém o quarto artigo que demonstra as alterações lipidômicas observadas nos tecidos cerebrais de ratos expostos a radiação de baixa LET.

2 – ESTADO DA ARTE

2.1 Epidemiologia

O câncer é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos em 2012 (FERLAY, 2015). Em países em desenvolvimento é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (World Cancer Report 2014). O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo responsável por 1 em 6 óbitos contabilizando 8,8 milhões de mortes em 2015 (WHO, 2017).

O câncer surge da transformação de células normais em células tumorais resultado da interação entre os fatores genéticos de uma pessoa e agentes externos como carcinogênicos físicos (como radiação ultravioleta e ionizante), carcinógenos químicos (amianto, tabaco, aflatoxina e arsênico) e carcinógenos biológicos (vírus, bactérias ou parasitas) (WHO, 2017). O uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer e é responsável por aproximadamente 22% das mortes por câncer (GBD, 2015). A idade é outro componente de risco para o desenvolvimento ao efeito acumulativo associado a menor efetividade nos mecanismos de reparação celular (WHO, 2017).

Dados anuais mundiais, demonstram que as prevalências de diagnósticos foram: pulmão (1,82 milhões), mama (1,67 milhões) e colorretal (1,36 milhões) e próstata (1,1 milhão), conforme Fig. 2.1. Já os índices de mortalidade para os principais cânceres foram câncer de pulmão (1,69 milhão de mortes), câncer de fígado (788 mil mortes), colorretal (774 mil mortes), câncer de estômago (754 mil mortes) e câncer de mama (571 mil mortes), conforme Fig. 2.2. Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (FERLAY, 2015).

FIGURA 2.1 - INCIDÊNCIA MUNDIAL DOS PRINCIPAIS TIPOS DE CÂNCER

Tipos mais comuns de câncer no planeta 2012

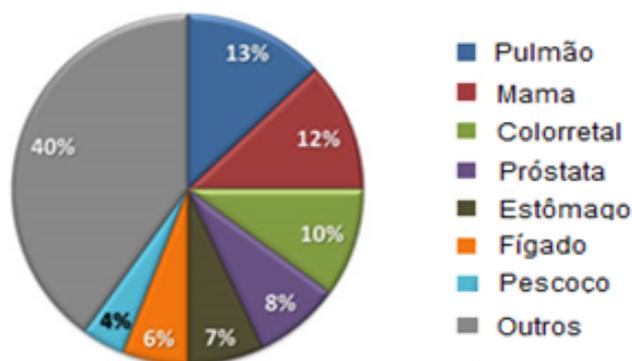
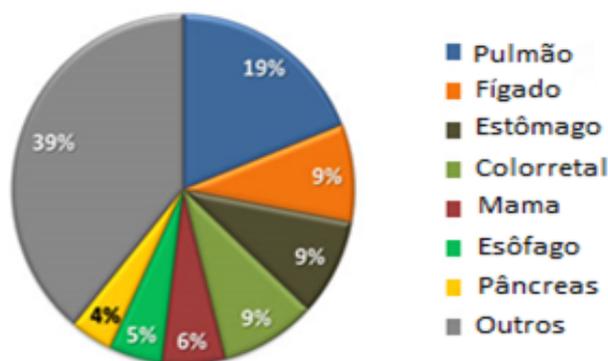


FIGURA 2.2 - PRINCIPAIS CAUSAS DE MORTE POR CÂNCER

Causas de óbitos por cancer no planeta 2012



FONTE: Modificado de FERLAY, 2015.

As estimativas para o Brasil, entre 2016-2017, apontam para uma incidência de 600 mil casos novos de câncer. Os tumores pediátricos respondem por, aproximadamente 3% desses casos compreendendo diretamente crianças e adolescentes até 19 anos. Analisando-se os 600 mil novos casos, 295.200 correspondem a novos casos entre a população masculina e 300.800 correspondem a população feminina. Infelizmente, 60% dos pacientes no Brasil são diagnosticados em estágio avançado da doença. O perfil epidemiológico demonstra que, excetuando os casos de câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil novos casos), ocorrerá cerca de 420 mil novos casos de câncer. O perfil epidemiológico demonstra que os

cânceres de próstata (61 mil casos) em homens e mama (58 mil casos) em mulheres são os mais frequentes. As frequências de cânceres no sexo masculino serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%) e no sexo feminino, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os cânceres de maior frequência (INCA, 2016). As Figs.2.3 e 2.4 ilustram a distribuição de incidência de casos novos de câncer por localidade primária, para o sexo masculino e feminino, respectivamente.

FIGURA 2.3 - INCIDÊNCIA DE CÂNCER MASCULINO NO BRASIL



Masculino ♂		
Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	61.200	28,6%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%
Cólon e Reto	16.660	7,8%
Estômago	12.920	6,0%
Cavidade Oral	11.140	5,2%
Esôfago	7.950	3,7%
Bexiga	7.200	3,4%
Laringe	6.360	3,0%
Leucemias	5.540	2,6%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%
Linfoma não Hodgkin	5.210	2,4%
Pele Melanoma	3.000	1,4%
Linfoma de Hodgkin	1.460	0,7%
Glândula Tireoide	1.090	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele	214.350	x
Todas as Neoplasias	295.200	x

FONTE: INCA, 2016.

FIGURA 2.4 - INCIDÊNCIA DE CÂNCER FEMININO NO BRASIL



Feminino ♀		
Localização Primária	Casos Novos	%
Mama	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon do Útero	16.340	7,9%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do Útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele	205.960	x
Todas as Neoplasias	300.870	x

FONTE: INCA, 2016

2.1.2 Principais dados estatísticos sobre os tumores cerebrais e sistema nervoso central (SNC)

A Sociedade Americana do Câncer realizou uma projeção de casos para crianças e adultos em 2017 nos EUA e acredita que o número de casos tumores malignos de SNC representarão cerca de 23.800 diagnósticos (13.450 masculinos e 10.350 nos femininos) e ocorrerão aproximadamente 16.700 óbitos (9.620 homens e 7.080 mulheres). Em geral, a probabilidade de desenvolvimento de um tumor de SNC primária é inferior a 1%, cerca de 1 em 140 em homens e cerca de 1 em 180 em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). No entanto, a incidência de tumores cerebrais primários tem aumentado nos últimos 30 anos, especialmente no idosos (MAHER; MCKEE, 2003) Metástases no SNC são responsáveis por uma incidência 10 vezes maior que tumores primários. Uma estimativa demonstra que de 20% a 40% dos pacientes com câncer sistêmicos irão apresentar metástases cerebrais (PACHELL, 2003; NABORS et al., 2013).

O Instituto Nacional de Câncer estima para 2014 e 2015, no Brasil, que sejam diagnosticados 9.090 novos casos de tumores cerebrais e sistema nervoso central (SNC), sendo 4.960 em homens e 4.130 em 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. Outros tipos histológicos de câncer do SNC são os meningiomas, representando entre 20 e 35% dos casos, e os neurilemomas (de 5% a 10%). Existem ainda tipos histológicos mais raros, como os adenomas pituitários, os meduloblastomas e os tumores de medula espinhal e nervos periféricos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

É fundamental que o monitoramento da morbimortalidade por câncer incorpore-se na rotina da gestão da saúde de modo a tornar-se instrumento essencial para o estabelecimento de ações de prevenção e controle do câncer e de seus fatores de risco. Esse monitoramento engloba a supervisão e a avaliação de programas, como ações necessárias para o conhecimento da situação e do impacto no perfil de morbimortalidade da população, bem como a manutenção de um sistema de vigilância com informações oportunas e de qualidade que subsidie análises epidemiológicas para as tomadas de decisões.

2.1.3 Neoplasias

Neoplasia representa um descontrole reprodutivo celular devido à perda dos mecanismos de auto regulação e alta clonogenicidade celular, acarretando crescimento tecidual excessivo, infiltração tecidual e metástases. Alterações genéticas e moleculares induzidos pela ação de agentes externos ou endógenos mutagênicos podem determinar alterações nos mecanismos de controle mitogênico. Os processos metaplásicos de substituição tecidual sadio por tecidos alterados ocorrem associados aos processos de dano, reparo e regeneração tecidual onde é possível encontrar células displásicas com intensa proliferação celular.

As características histológicas bem como o seu comportamento biológico determinam o tipo de tumor. Assim tumores benignos são bem diferenciados, com baixa clonogenicidade, e bem delimitados localmente próximos ao seu parênquima de origem. Contudo tumores malignos são compostos por células anaplásicas e pleomórficas, com alto grau de indiferenciação, contornos imprecisos com alta possibilidade infiltrativa e metastática. Os tumores são classificados em dois grandes grupos de acordo com sua origem: tecido epitelial (carcinoma) e tecido não-epitelial (sarcomas; leucemia e linfomas; gliomas, glioblastomas e neuroblastomas). Os sarcomas derivam dos diversos tecidos conjuntivos; Leucemia e linfomas desenvolvem-se a partir de diversos tipos de células que constituem os tecidos formador de sangue; os gliomas, glioblastomas e neuroblastomas desenvolvem-se a partir de células que formam diversos componentes do sistema nervoso central e periférico.

Processos inflamatórios crônicos podem se desenvolver devido à alta imunogenicidade e aos estímulos ambientais que mobiliza mecanismos de dano, reparo e regeneração. O intenso “*turn over*” celular promove remodelação celular frente às injúrias desencadeando processos metaplásicos e displásicos teciduais.

O período do ciclo mitótico celular influencia diretamente no sucesso das propeidêuticas estabelecidas para redução do volume tumoral, através da cirurgia e radioterapia.

Uma pequena porcentagem dos cânceres deve ser atribuída a mutações ou falhas genéticas reforçando ainda mais a importância e a força dos fatores ambientais na carcinogênese. Substâncias mutagênicas químicas e físicas (tabaco, Aminas heterocíclicas, amianto e irradiação UV), agentes biológicos patogênicos (virais ou bacterianos) causam mutações no DNA e alterações aberrantes por metilações no DNA (alteração epigenética) acarretando em modificações pós-traducionais protéicas, incluindo proteínas reguladoras como as oncoproteínas e proteínas supressoras de tumores (MINAMOTO,1999)

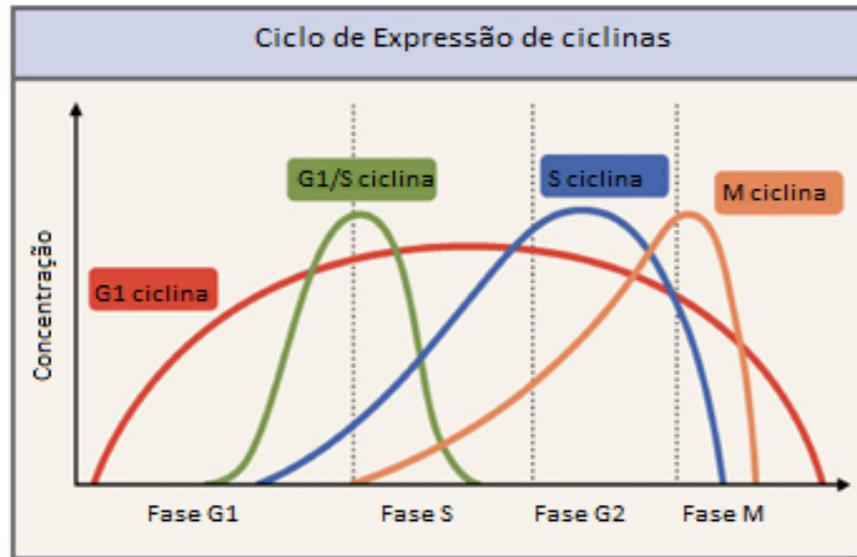
Acredita-se que os fatores ambientais sejam os fatores preponderantes no desenvolvimento de neoplasias. De acordo com Parkin et al., (2000, 2002), causas ambientais representaram 65% do risco de câncer, enquanto os fatores hereditários contribuíram com 26% a 42%. Diferenças marcantes encontradas nas taxas de incidência e de mortalidade de forma específica de câncer em todo o mundo também sugerem um importante papel para os fatores ambientais (PARKIN et al., 2000, 2002). Entre os fatores ambientais carcinogênicos destacam-se os de ambiente externo (raios ultravioletas [UV], poluição), medicamentos (metotrexato), ocupacionais (asbestos, cloreto de vinil), hábitos de vida (alimentação rica em gorduras, álcool) e estilo de vida (obesidade, sedentarismo) (WHO, 2017).

2.1.4 Ciclo Celular

O ciclo celular apresenta extrema importância para a clonogenicidade de tecidos normais demonstrando que a perda dos mecanismos auto regulatórios são decisivos no desenvolvimento de células neoplásicas e doenças proliferativas (HUSSAIN et al., 2017). O ciclo celular apresenta dois períodos distintos, um de repouso (G0) e outro de intensa atividade chamada interfase, composta pelas fases G1, S, G2, M. A fase de crescimento 1 (G1) ou pós-mitótica realiza a síntese de códons de RNA mensageiro (RNAm). A segunda fase (S) corresponde à síntese e duplicação do DNA. A fase de crescimento 2 (G2), ou pré-mitótica, sintetiza códons de RNAm para proteínas formadoras do fuso mitótico. Por fim, a fase (M) ou mitose, finaliza com a separação das cromátides irmãs e a formação de dois clones celulares (WATSON et al., 2010).

A progressão do ciclo celular depende de uma classe especial de enzimas do tipo quinase de serina/treonina, cuja subunidade catalítica é conhecida como CDK (*cyclin-dependent kinase*). São enzimas constitucionais sendo constantemente expressas no ciclo celular, porém encontram-se na forma inativa e só são ativadas quando ocorre a ligação entre elas e subunidades regulatórias chamadas ciclinas (Cyc). As ciclinas já apresentam um padrão cíclico de variação em seu ciclo sendo sintetizadas em fases específicas e degradadas após a sua utilização, conforme ilustra a Fig.2.5.

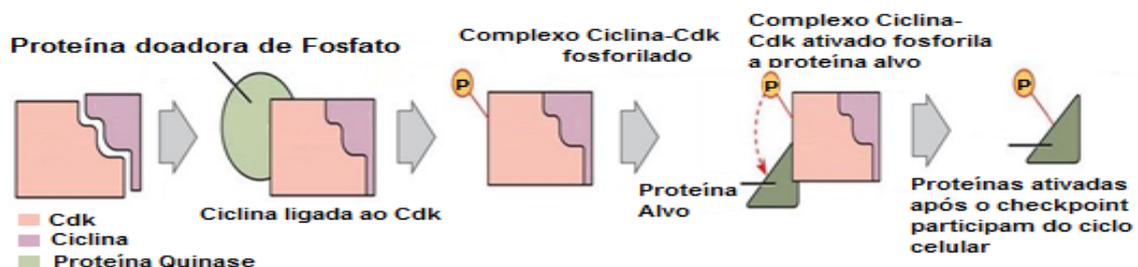
FIGURA 2.5 - CONCENTRAÇÃO DE CICLINAS NO CICLO CELULAR



FONTE: Adaptado de OpenStax College, Biology.

A ativação das CDKs-ciclinas depende da fosforilação e a inativação do complexo formado pela degradação de ciclina, adição ou remoção de fosfato, e pela ligação de CKIs (cyclin kinase inhibitors), conforme ilustra a Fig.2.6. O complexo ciclina-CdKs ativa processos fosforilativos regulatórios de proteínas alvo do ciclo celular. Assim, por exemplo, pode-se citar o aumento na atividade Cdk-ciclina na transição G2/M, e conseqüente aumento da fosforilação das proteínas que controlam a condensação cromossômica, desintegração da carioteca, montagem do fuso e outros eventos da mitose (ALBERTS, 2007).

FIGURA 2.6 - REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO E FORMAÇÃO DO COMPLEXO CDK-CICLINA DEPENDENTE DE QUINASES

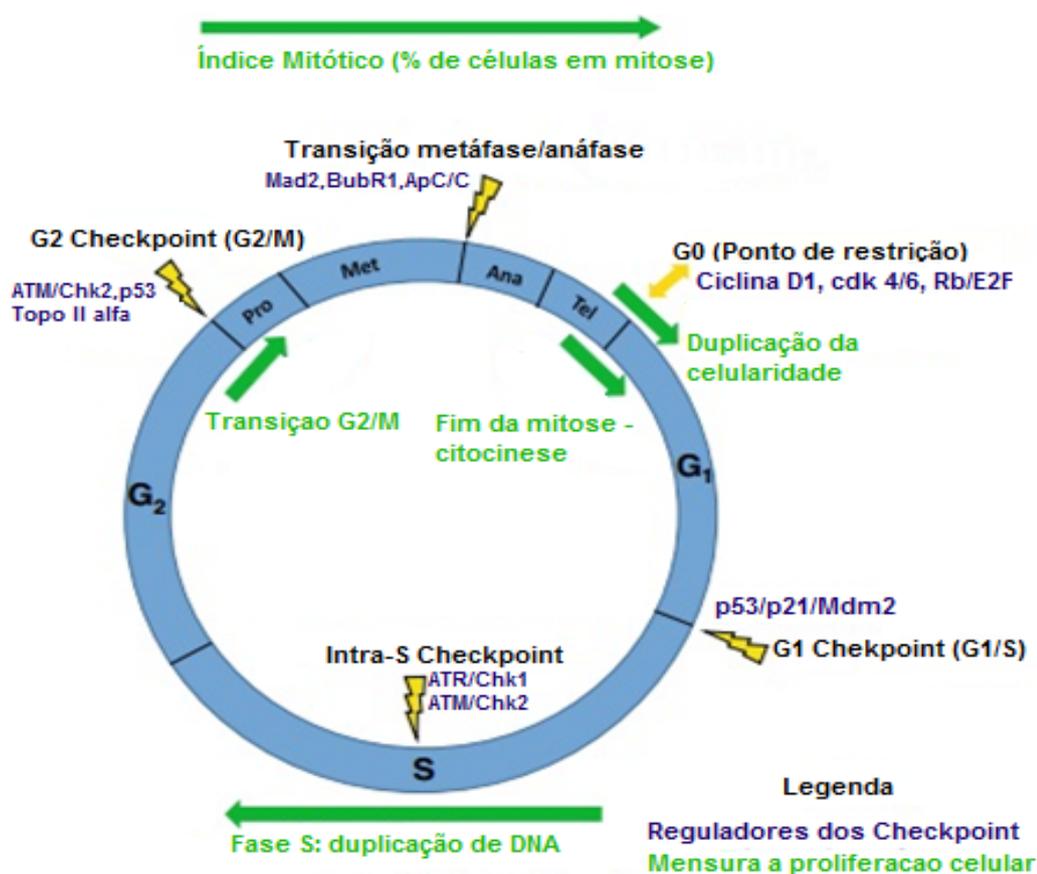


FONTE: Adaptado de OpenStax College, Biology.

O controle do ciclo celular é realizado principalmente nas três grandes transições regulatórias: G1 tardia/S (duplicação do teor de DNAs – DNAd), G2/M (divisão e alinhamento dos cromossomos no fuso mitótico) e pela transição metafase-anáfase (separação das cromátides

irmãs), conforme Fig.2.7. As CDK específicas operam em fases distintas do ciclo celular: CDK4/CycD e CDK6/CycD e são responsáveis pela progressão na fase G₁; CDK2/CycE é necessária para a progressão da fase G₁ a S; CDK2/CycA para a transição de S; enquanto CDK1/CycB para a transição G₂/M. Os CDKs desempenham um papel diferente, como o CDK2, desempenham um papel essencial na apoptose, papel CDK5 nas células neuronais e CDK7, CDK8, CDK9 no processo de transcrição (GRAY et al., 1999; Chao et al., 2000). Os complexos CDK/Cyc são regulados por pequenas moléculas endógenas. A família de inibidores de quinase dependentes de ciclina 4, (INK4, *inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*), que inclui p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C e p19INK4D, inibe especificamente CDK4/CycD; enquanto membros da família INK2, tais como p21WAF1, p27KIP1 e p57KIP2, se ligam e inibem a atividade de CDK2/CycE, CDK2/CycA, CDK1/CycB, e menos efetivamente, CDK4/CycD (SILVA et al., 2009).

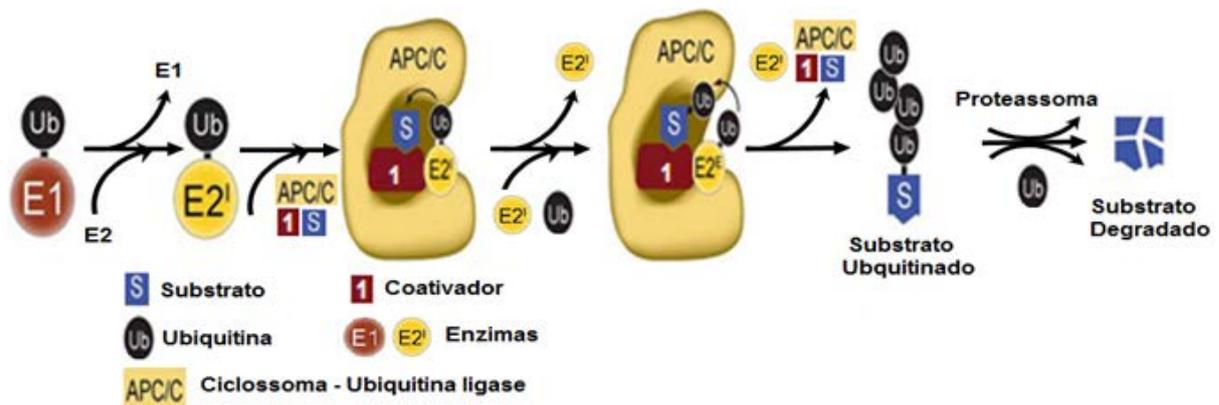
FIGURA 2.7 - DETALHAMENTO MOLECULAR DO CICLO CELULAR



FONTE: Adaptado de BOWER et al., 2017.

O ciclo celular também pode ser controlado pela atuação do complexo ou ciclossoma (APC/C), uma ubiquitina ligase que estimula proteólise de proteínas alvo-específicas através dos proteassomos principalmente na transição entre metáfase-anáfase acarretando na separação das cromátides irmãs. Uma cadeia de poliubiquitina é anexada a um substrato de proteína por uma ubiquitina-ligase, que aponta para degradação pelo proteassoma 26S. Proteassomo é uma protease dependente de ATP usada para destruir proteínas danificadas ou proteínas com erros de síntese, as quais são marcadas para degradação através da ligação de cadeias de ubiquitina (CASTRO et al., 2005), conforme Fig.2.8.

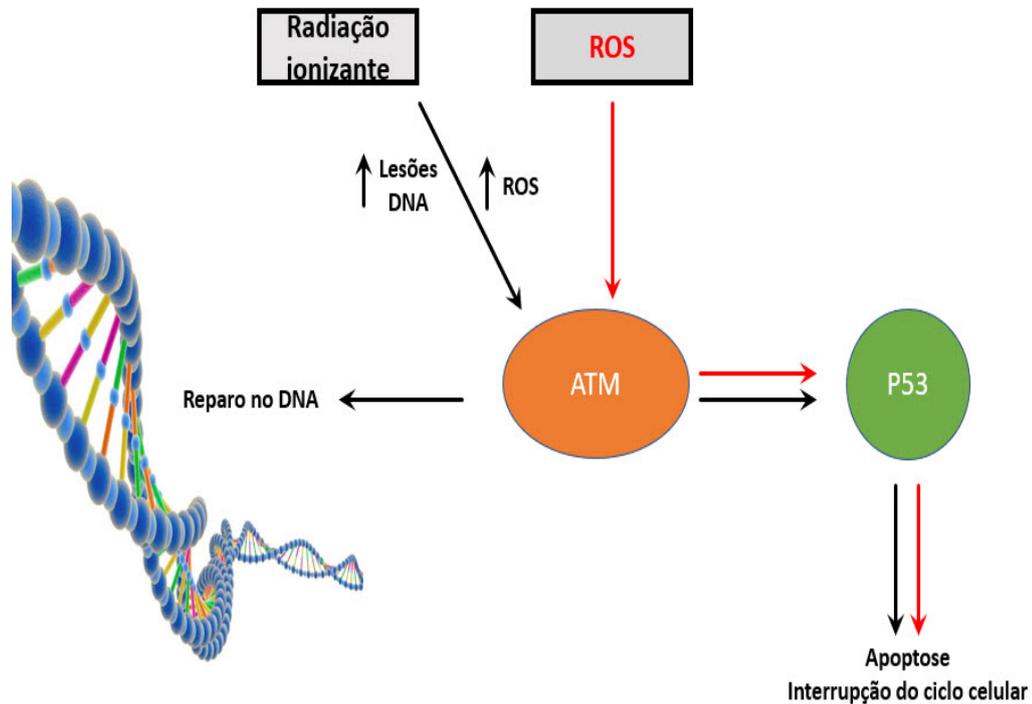
FIGURA 2.8 - SEQUÊNCIA DE DEGRADAÇÃO PROTEICA



FONTE: Adaptado de PRIMORAC; MUSACCHIO, 2013.

As rupturas de dupla cadeia de DNA (*Double Strand Breaks* - DSBs) induzidas por radiação ionizante (IR) levam a uma enorme perda de informações genéticas, que podem causar carcinogênese se não forem reparadas. 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*”) (UHRHAMMER et al., 2002), conforme Fig. 2.9. Foi verificado que uma alta incidência de tumores malignos e um aumento da sensibilidade à radiação ionizante e a agentes que induzem quebra da dupla fita de DNA, está relacionado a uma mutação no gene da proteína ATM (ROYBA, 2017). O reparo do DNA bem como a sinalização para o controle do estresse oxidativo, do ciclo celular e apoptose garante a sobrevivência da célula (LEE; PAULL, 2007; SHILOH; ZIV, SULLI, et al., 2012; 2013, ZHANG, 2015).

FIGURA 2.9 - RESPOSTA A QUEBRA DE FITA DUPLA DE DNA (DSBS)



FONTE: Adaptado de UHRHAMMER et al., 2002.

A expansão clonal da população anormal pode ser avaliada pelo índice mitótico (IM) contribuindo para estabelecer prognósticos acerca do comportamento tumoral (CECCARELLI, 2000). Entretanto, o IM tem sido substituído por marcadores imunohistoquímicos de proliferação, tais como Ki 67/MIB1 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (DERENZINI, 1991; FIGUEIREDO, 2003; LANORE, 2004).

A carcinogênese pode ser dividida em iniciação (agente carcinogênico), promoção (efeitos mutagênicos e ausência de mecanismo reparadores) e progressão (alta clonogenicidade). O alto índice mitótico é devido à supressão de mecanismos normais de homeostasia e de diferenciação celular bem como da alteração de comunicação e adesão das células caracterizando as células neoplásicas (MORRIS, 2007).

Mutações aleatórias em códons podem acarretar em alterações nos aminoácidos principalmente de proteínas GTPase RAS e proteína Myc causando a hiperatividade e a superexpressão das vias de sinalização dependente de RAS bem como o crescimento e a proliferação celular, respectivamente. O desequilíbrio entre a ação estimulatória dos proto-oncogenes e entre a ação inibitória (exercido pelos genes supressores de tumor) sobre o

crescimento e proliferação celular determinará o surgimento dos processos neoplásicos (RODASKI, 2008; WEINBERG, 1995).

Proto-oncogenes são oncogenes celulares (c-onc) sem potencial clonogênico tumoral, contudo, ao sofrerem mutações dominantes bem como translocações apresentam um comportamento maligno (ARGYLE, 2008). Os proto-oncogenes estão relacionados aos fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, proteína quinase, sinais de transdução, proteínas nucleares e fatores de transcrição (HANAHAN, 2004). Já os genes supressores de tumores estão relacionados com a perda das funções inibitórias (WEINBERG, 1995). Mutações nesse tipo de gene têm comportamento bastante diferente quando comparado aos proto-oncogenes, uma vez que as mutações dos proto-oncogenes tem caráter dominante, enquanto nos genes supressores, são recessivas (ARGYLE, 2008).

A proteína p53 está envolvida no controle da progressão do ciclo celular e preservação da estabilidade genética. Lesões no DNA provocam aumento dos níveis da p53, induzindo a apoptose e diferenciação celular (HARRINGTON, 1994; SHERR, 1996).

O desenvolvimento tumoral é dependente da interação de um microambiente propício com adequado aporte nutricional devido à angiogênese, diminuição dos mecanismos homeostáticos de reparo, de diferenciação, e de apoptose celular e aumento proliferativo com formação de metástases (LIOTTA, 2001; MUTSAERS, 2007). A resistência a quimioterapia pode ser apontada por fatores como proteínas relacionadas ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (KUWANO, 1999), alterações nos receptores nas células alvo com baixa resposta (MAO, 1999), aumento do reparo das lesões no DNA pelos quimioterápicos das células tumorais (AEBI, 1997; LAGE, 1999) e alterações no apoptose (SCHMITT, 1999).

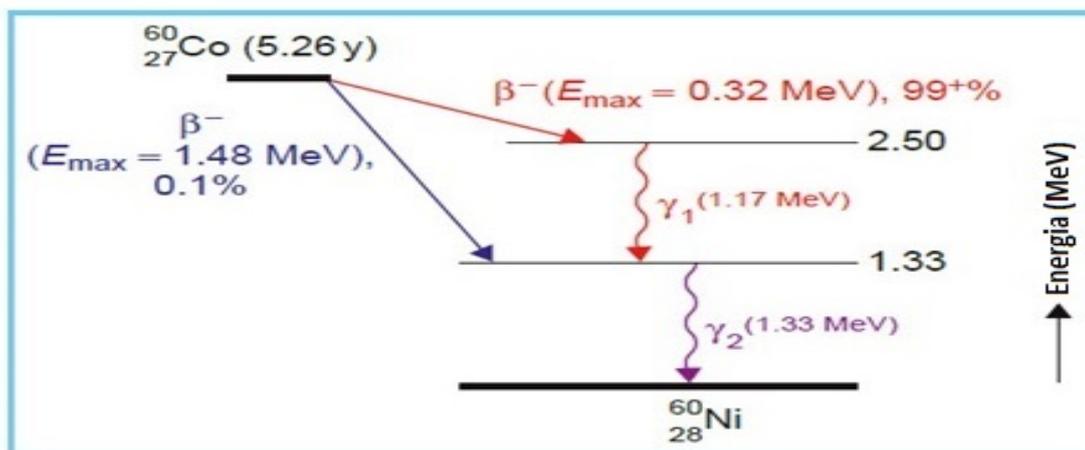
As neoplasias são classificadas em benignas (crescimento lento, bem delimitado, sem metástases) ou malignas (invasivos, crescimento intenso, limites imprecisos e formação de metástases). Os principais mecanismos de morte celular são apoptose (ordenada) e a necrose (abrupta) (RODASKI, 2008). A apoptose apresenta grande importância no crescimento tumoral e sua agressividade (PEREIRA, 2003) já que células tumorais se tornam menos susceptíveis à morte programada tornando-se resistentes aos tratamentos formando metástases. Lesões no DNA, sem a presença de mecanismos de reparo, tornam o gene supressor tumoral p53 inativo e incapaz de induzir a apoptose devido as injurias celulares (FIGUEIREDO, 2003; PAOLONI, 2007). A necrose representa a patologia do estágio final do dano celular irreversível (FRENCH, 2009) devido a hipóxia, isquemia, hipertermia, irradiação e metabólitos tóxicos causando perda

da integridade e seletividade da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular para o meio, causando lesões teciduais e resposta inflamatória (RODASKI, 2008).

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) é um isótopo artificial extremamente radioativo produzido num reator nuclear, a partir do bombardeamento de Co-59 com nêutrons (Moura, 2016). O 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. 2.10. Partículas beta minus (β^-) são elétrons energéticos proveniente da decomposição de um nêutron no núcleo instável (excesso de nêutrons em relação a prótons). O nêutron (${}^0_1n^1$) pode se decompor em um próton (${}^1_1p^1$), um elétron (${}^-1_0e^0$) e um anti-neutrino ($\bar{\nu}$). A radiação gama pode interagir com a matéria através do efeito fotoelétrico, efeito Compton ou ainda pela criação de par elétron-pósitron.

FIGURA 2.10 - ESQUEMA DE DECAIMENTO DO RADIONUCLIDEO CO-60



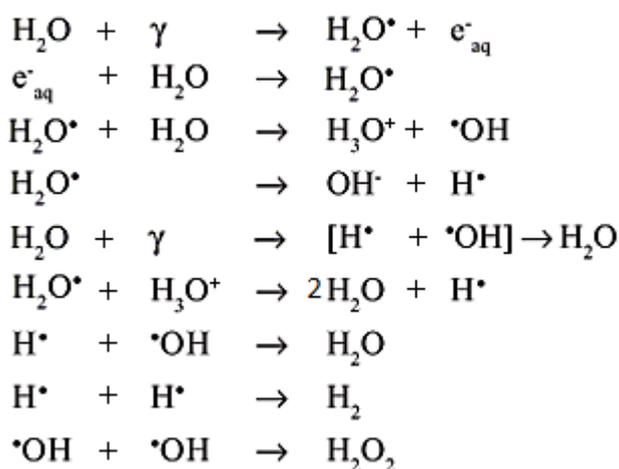
FONTE: Adaptado de KHAN et al., 2014.

Radiação gama é uma radiação ionizante, entretanto de baixa LET (*Linear Energy Transfer*) já que apresenta baixa densidade de eventos ionizantes induzidos em um volume tecidual. Assim, devido o menor tamanho da massa e da carga das partículas beta (β), a probabilidade de colisões efetivas ionizantes diminui e mesmo quando ocorre, a taxa de

transferência de energia é muito pequena (OKUNO et al., 2010; YOSHIMURA, 2009). O uso de radiação de baixa LET permite a ação dos mecanismos de reparo do DNA, de modo a conferir clonogenicidade necessária para garantir o reparo de tecidos saudáveis. O aumento da LET é proporcional ao dano biológico devido ao aumento do número de ionizações e ao aumento da probabilidade de interação com a molécula-alvo (HALL, 2012).

Raios gama (γ) propiciam a formação de ROS (*Reactive Oxygen Species*) proporcionado principalmente pela radiólise da água com a formação de radicais livres ($H\bullet$ e $OH\bullet$) altamente reativos, causando o rompimento de interações intermoleculares do tipo ponte de hidrogênio e alterações morfofuncionais de estruturas de componentes celulares (OKUNO, et al., 2010), conforme Fig.211. O dano do DNA tem sido implicado no envelhecimento, na carcinogênese e nos transtornos neurológicos. As espécies reativas de oxigênio (ROS) representam uma das principais ameaças que causam danos ao genoma, causando quebras de corda e lesões de base (ALSHYKHLIA et al., 2015).

FIGURA 2.11 - RADIÓLISE DA ÁGUA E FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

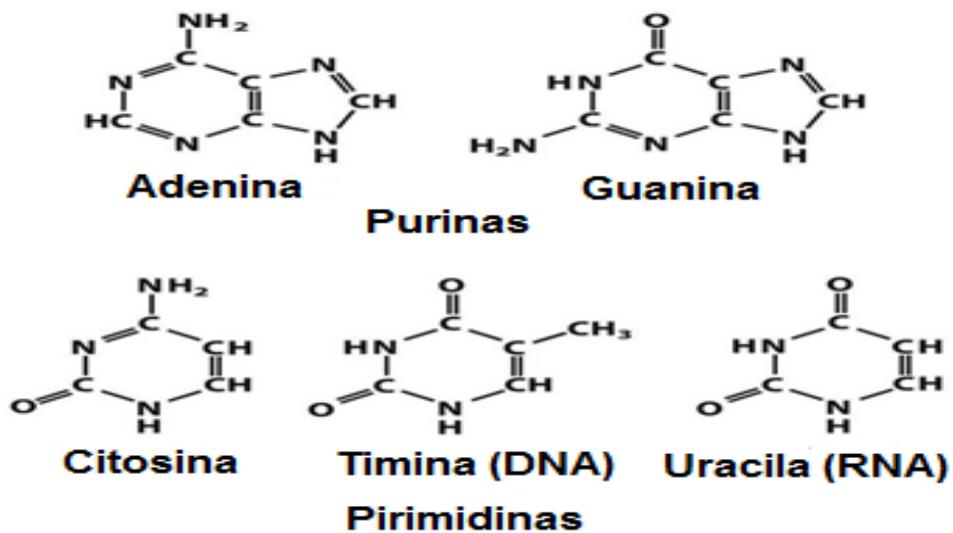


FONTE: Adaptado de CAMPOS et al., 2004.

Os danos mais comuns causados pela ionização seriam as mudanças de bases, deleção de bases, quebra das pontes de H, quebra de uma fita (SSBs - *single strand breaks*) ou dupla fita do DNA (DSBs - *double strand breaks*), ligações cruzadas internas ou externas com outras moléculas de DNA e/ou outros componentes celulares como proteínas. O nucleotídeo guanina (Fig.2.12) tem o menor potencial redox das quatro bases de DNA (STEENKEN, 1997) com grande capacidade de oxidação, sendo que durante a replicação a oxidação de guanina (Fig.

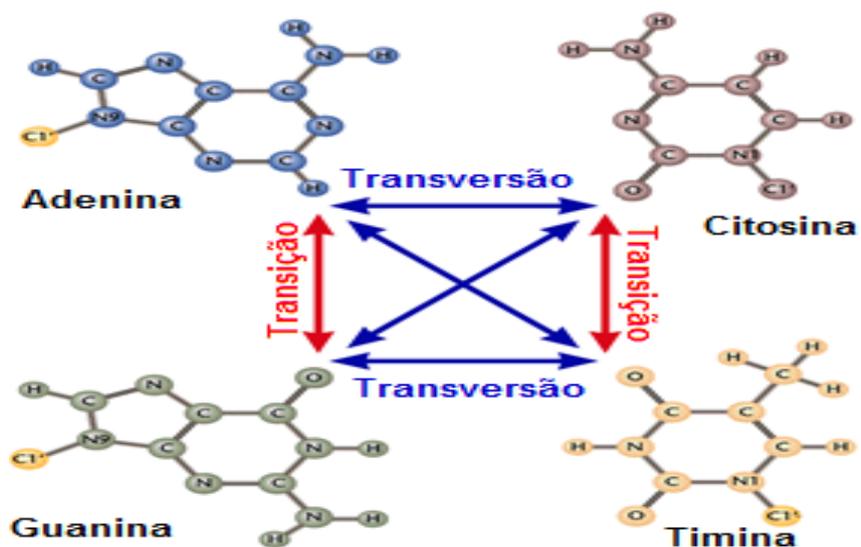
2.14) induz transversões (refere-se à substituição de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa) (SUZUKI, 2012). As polimerases de DNA podem sintetizar o 8-oxoG e incorporar dATP (adenina) ou dCTP (citosina) oposta à lesão, causando mutação transversa $G \cdot C \rightarrow T \cdot A$ e $G \cdot C \rightarrow C \cdot G$ na ausência de reparo (DUARTE et al., GUENGERICH, 1996; 1999; LOWE; SHIBUTANI et al., 1991).

FIGURA 2.12 - BASES PÚRICAS E PIRIMÍDICAS



FONTE: Adaptado LEHNINGER, 2008.

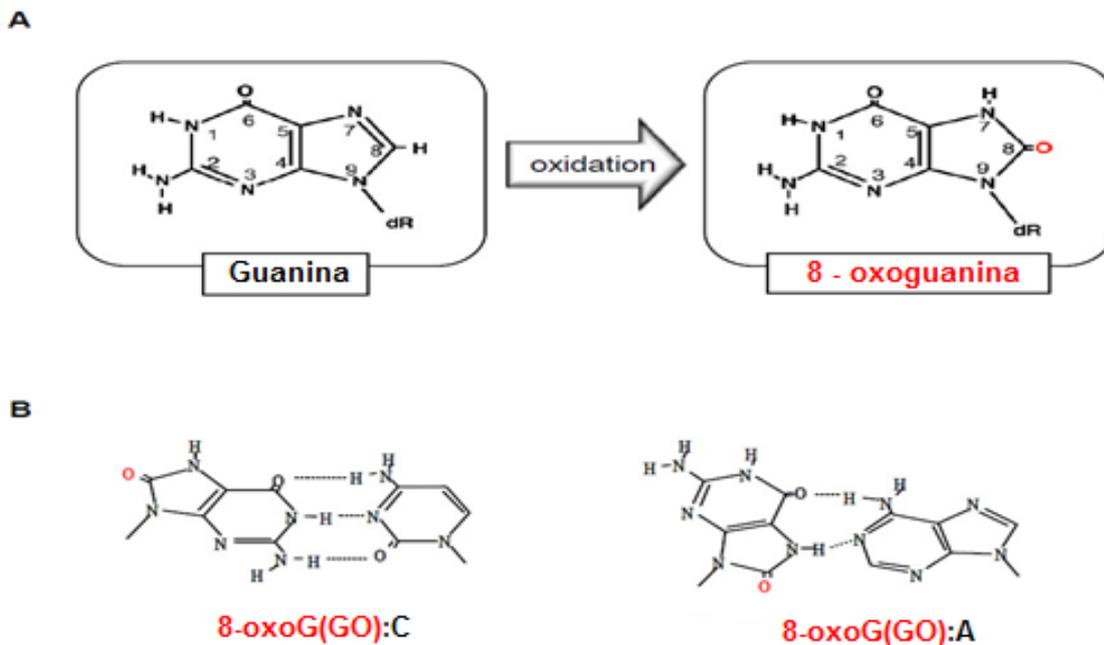
FIGURA 2.13 - MUTAÇÕES TRANSIÇÃO E TRANSVERSÃO



FONTE: Adaptado CARR, 2014.

As transversões são encontradas em genes importantes como no gene supressor tumoral p53 e no oncogene K-ras (GIARETTI, 1998; KHALED, 2003; MAEHIRA, 1999). A 8-Oxoguanina (8-oxo-7,8-dihidroguanina - 8-oxoG) é uma das lesões de DNA mais comuns resultantes das ROS podendo ser utilizada como um biomarcador da extensão do estresse oxidativo. A estrutura química da 8-oxoG (Fig.2.13) permite o *bypass* dessa lesão pela DNA polimerase sem a devida correção conferindo enorme capacidade mutagênica (DAVID et al., 2007).

FIGURA 2.14 - OXIDAÇÃO DA GUANINA POR ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)



FONTE: Adaptado NAKABEPPU, 2014.

Danos irreversíveis surgem de um alto número de lesões simultâneas, ou ainda, da inviabilidade de reparo na fita fragmentada favorecendo a peroxidação nas extremidades livres, conforme Fig.2.14. Em organismos saudáveis, a produção de ROS é balanceada por sistemas de defesa antioxidante, contudo, caso ocorra um excesso de ROS, danos no DNA, proteínas, lipídeos e açúcares inevitavelmente ocorrerão (HALLIWELL, 1999). 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 em mamíferos (OKUNO et al., 2010).

A ação dos radicais livres também desencadeia o processo de lipoperoxidação em ácido graxos polinsaturados gerando uma mistura extremamente complexa de produtos incluindo aldeídos, cetonas, epóxidos e hidrocarbonetos (HALLIWELL, 1999; VACA, 1988). Os produtos finais da lipoperoxidação são altamente reativos e tem sido demonstrado que podem reagir diretamente com o DNA e causar danos genéticos ou serem metabolizados a epóxidos, conhecidos como agentes alquilantes de DNA com alta atividade mutagênica. Entre estes compostos, os mais importantes e mais extensivamente estudados são os aldeídos capazes de lesar o DNA (DAVID et al., 2007; DUXIN; WATER, 2015).

2.3 Radioterapia

A radioterapia consiste no uso da radiação ionizante produzida aceleradores ou por radioisótopos naturais com o objetivo de controle e diminuição clonogênica de neoplasias (malignas e benignas) (HETELEKIDIS et al., 1993; O'SULLIVAN et al., 1994). A planimetria adequada associado a prescrições de doses terapêuticas tendo como base a radiosensibilidade tumoral e o tipo histológico podem garantir um controle tumoral eficiente com um prognóstico favorável (GOLDWEIN et al., 1990; MIRALBELL et al., 1997).

A melhor abordagem radioterápica está relacionada ao tipo histológico tumoral para definição de dose, localização, grau de ressecção (parcial ou total), volume tumoral e o perfil e condição clínica do paciente. A definição da técnica radioterápica a ser empregada depende de uma análise multifatorial como a melhor planimetria para definição de doses, preservação de estruturas críticas, diminuição da neurotoxicidade e controle da clonogenicidade tumoral (GUNDERSON et al., 2015; PEREZ et al., 2013; SALVAJOLI et al., 2013).

A radioterapia externa convencional ou 2D refere-se a planimetria e simulação de tratamento realizado com o raio X diagnóstico especial com campos paralelos e opostos ou ainda com quatro campos (anteroposterior, posteroanterior e laterolaterais) irradiando grande volume de tecidos e órgãos adjacentes com possível desencadeamento de um maior índice de efeitos colaterais agudos e tardios (SALVAJOLI et al., 2013). Já a radioterapia tridimensional conformacionada (3D-CRT) é uma evolução da radioterapia convencional ou bidimensional (2D) em que utiliza a tomografia computadorizada e/ou a ressonância magnética com ou sem fusão de imagens para planimetria 3D permitindo delineamento tumoral e de estruturas

adjacentes em três dimensões, conferindo maior segurança no controle tumoral com diminuição de efeitos adversos (radioterapia conformacional). A radioterapia com modulação da intensidade de feixe (*Intensity-modulated Radiotherapy* - IMRT) utiliza as mesmas técnicas da radioterapia conformacional permitindo a modulação da intensidade do feixe dos diversos feixes (campos) de irradiação garantindo que a dose prescrita seja entregue na região tumoral com preservação de órgãos críticos e tecidos adjacentes normais. Assim, doses no volume tumoral poderão ser maiores para melhor controle da clonogenicidade com melhores respostas terapêuticas. A radioterapia guiada por imagem (*Image Guided Radiation Therapy*- IGRT) utiliza softwares específicos que realizam a fusão entre as imagens da planimetria e as imagens do tratamento de forma a localizar mais precisamente o tumor ou os órgãos internos acometidos. Assim, durante a execução do tratamento, o resultado das fusões das imagens permite o ajuste das variações entre o posicionamento do paciente ou do órgão-alvo (mudanças fisiológicas) e a TC de referência.

2.3.1 Radiocirurgia para Tumores Cerebrais

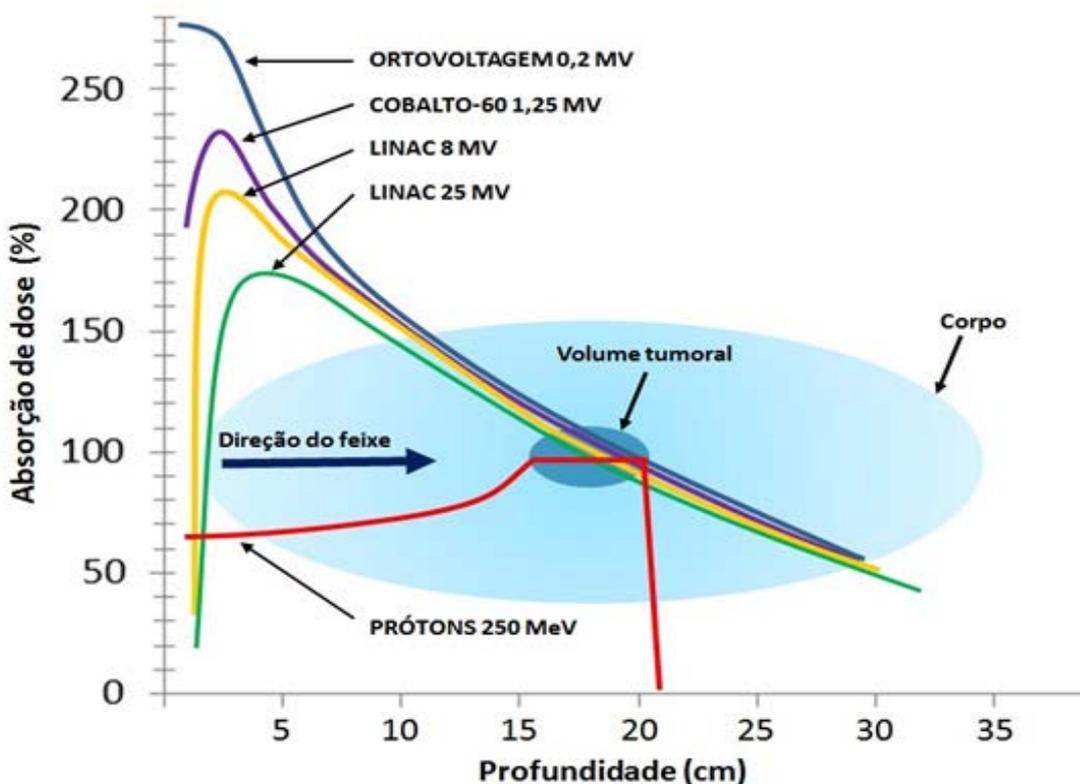
A Radiocirurgia utiliza localização estereotática e IGRT com precisão menor que 1 mm possibilitando que a irradiação seja realizada em dose única por múltiplas entradas, altíssimas doses tumorais e reduzidas doses nos demais tecidos. Softwares de planejamento realizam a fusão entre imagens de CT, RNM e PET, possibilitando um delineamento preciso do alvo e dos órgãos adjacentes. A radioterapia estereotática craniana fracionada bem como a radioterapia estereotática corporal (*Stereotactic body Radiotherapy* - SBRT) utilizam os mesmos princípios da radiocirurgia, mas aplicada em doses fracionadas (GUNDERSON et al., 2015; PEREZ et al., 2013; SALVAJOLI et al., 2013).

O emprego de técnicas que permitem a exata localização tridimensional e a fusão de imagens em tumores do SNC está garantindo uma diminuição de efeitos colaterais proporcionando ainda um aumento na sobrevida de 3 a 4 meses para 7 a 12 meses principalmente em crianças (BOUFFET et al., 1992; HUGHES et al., 1988; MERCHANT et al., 1997; MIRALBELL et al., 1996; STUPP et al., 2005).

As técnicas radiocirúrgicas utilizam três formas de energia que são a irradiação por cobalto-60 (GammaKnife), a irradiação por aceleradores lineares (Linac) e a irradiação por sicro/ciclotron (próton terapia) (GUNDERSON et al., 2015; SALVAJOLI et al., 2013).

A protonterapia é uma técnica que utiliza um feixe de prótons que depositam sua dose a uma localização e profundidade concentrando a energia das partículas no ponto de parada, o chamado pico de Bragg (Fig. 2.15). Ao se modular a energia do feixe, é possível depositar a maior dose na região de interesse, prejudicando bem menos as áreas sadias adjacentes (SCHULTE et al., 2004). Caso o pico necessite ser “alargado” para se adequar ao volume tumoral, “moduladores” podem ser instalados para que ocorra o alargamento do pico resultante final, fruto da soma de vários picos de Bragg (SCHULTE et al., 2004).

FIGURA 2.15 - ABSORÇÃO DE DOSE EM RELAÇÃO À PROFUNDIDADE ENTRE DIFERENTES TIPOS DE TRATAMENTO



FONTE: Adaptado de JOHNSON et al., 2008.

A SRS pode ser realizada usando um sistema acelerador linear convencional ou modificado (LINAC), um acelerador linear miniaturizado controlado por robotização (Cyber Knife; Accuray, Sunnyvale, CA) ou um Gamma Knife (Elekta Corp., Estocolmo).

O LINAC são aceleradores de elétrons que ao colidirem com uma placa de metal de alto peso atômico, emitem energia por bremsstrahlung (radiação eletromagnética que se origina com

a desaceleração, ou dita radiação de frenagem) na forma de fótons, que são obturados por colimadores secundários ao isocentro do LINAC. Os equipamentos adaptados para a radiocirurgia, produzem feixes orientados de fótons em campos de dimensões de 3 mm a 60 mm de diâmetro, sem a necessidade de múltiplos isocentros. Já existem aparelhos que dispõem de colimadores tipo múltiplas folhas que permite a modulação do feixe em intensidade para cada área da lesão (GUNDERSON et al., 2015; PEREZ et al., 2013; SALVAJOLI et al., 2013).

O Cyber Knife (CK) é um sistema de tratamento robotizado não-invasivo para tratamento em fração única ou multifracionados, com grande amplitude de movimentos em torno do paciente mas com entrega de doses fora do alvo 2 a 6 vezes maior do que o Gamma Knife. A imobilização não é rígida e reduz o movimento da cabeça pelo uso da máscara facial termoplástica. Assim como a fonte e o paciente não estão totalmente imobilizados, os dados estereotáxicos de MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) e CT (*Computed Tomography*) são relativos, acarretando em menor precisão desde a planimetria 3D e o procedimento radiocirúrgico (GUNDERSON et al., 2015; PEREZ et al., 2013; SALVAJOLI et al., 2013).

O Gamma Knife (GK) é uma unidade de radiação multisource de feixe fixo contendo 201 fontes de cobalto-60 (com 100x menos radiação para o corpo do que a Cyber knife) que são colimadas para o volume tumoral com até 30 mm e com grande precisão (precisão radiológica superior a 0,3 mm). O Gamma Knife é a técnica padrão ouro direcionada ao cérebro com imobilização rígida para evitar o movimento da cabeça. GK utiliza capacetes com aberturas para limitação do feixe em 4 mm, 8 mm, 14 mm e 18 mm apesar de já existirem softwares que desempenham cálculos dosimétricos capazes de ajustar a distribuição de dose ao formato das lesões tumorais. O GK utiliza um fixador externo estereotáxico cranial proporcionando alta precisão com as imagens provenientes de MRI e CT e com a planimetria 3D, tornando o procedimento radiocirúrgico extremamente preciso com apenas uma única e alta dosagem no volume tumoral (GUNDERSON et al., 2015; PEREZ et al., 2013; SALVAJOLI et al., 2013).

2.3.2 Tumores Cerebrais/SNC

2.3.2.1 Tumores Primários

Os tumores de SNC apresentam uma ampla diversidade histológica (STILLER; NECTOUX, 1994). O período compreendido da infância ao início da adolescência é marcado pelo predomínio de tumores de origem embrionária como tumores do neuroectoderma primitivo

(*Primitive Neuroectodermal Tumor*-PNET) infratentoriais. Já em lactentes e final da adolescência/adulta ocorre predomínio de tumores gliais supratentoriais e usualmente são astrocitomas (COHEN, 1998; HEIDEMAN et al., 1997; STEWART).

O tratamento de tumores primários no SNC, presentes em sua maioria na infância e adolescência, divergem em muito do tratamento de tumores secundários no SNC (metastáticos) presentes em adultos. O tratamento padrão para as lesões em adultos é a ressecção neurocirúrgica com ampliação de margens associado à radioterapia e/ou quimioterapia após avaliação do PS (*Performance Status* – sistema de pontuação que mede o estado clínico geral do paciente oncológico bem como a sua qualidade de vida e indica a possibilidade de quimioterapia ou de ajustes de doses terapêuticas) (NABORS et al., 2013).

As modalidades da radioterapia sugeridas para tumores primários incluem a braquiterapia, radioterapia estereotática fracionada (*Fractionated Stereotactic Radiotherapy* – FSRT) e radiocirurgia (*Stereotactic Radiosurgery* - SRS) (Nabors et al., 2013). A radioterapia fracionada de feixes externos (*External Beam Radiotherapy* - EBRT) é uma abordagem mais comum enquanto que o hipofracionamento normalmente está sendo adotado para pacientes idosos e para aqueles com pior resposta terapêutica. RT com limitação de campos tumorais e adjacentes é utilizada para pacientes de tumor primário, enquanto que a radioterapia total de crânio (Whole Brain RT – WBRT) e SRS são utilizadas primariamente para metástases cerebrais (NABORS et al., 2013).

Os tumores cerebrais são classificados em grupos e de acordo com a velocidade de desenvolvimento (grau de agressividade).

Os principais tipos de tumores cerebrais primários são:

- 1) Gliomas (30% dos tumores primários de SNC e de crescimento rápido) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017): Glioma são tumores provenientes de células gliais tais como glioblastoma (glioblastoma multiforme), astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas.
 - a) Astrocitomas: são os tumores mais comuns provenientes dos astrócitos e respondem por 20% dos tumores cerebrais. Podem ser:
 - Baixo Grau ou difuso grau I e II (*Low Grade Gliomas* - LGG): tendem a ser de crescimento lento, mas podem se tornar mais agressivos e de rápido crescimento ao longo do tempo. Alguns tipos de baixo grau denominados astrocitomas não infiltrante não costumam crescer nos tecidos adjacentes e tendem a ter um bom prognóstico. Estes incluem astrocitomas pilocíticos e tumores gliais disembrionários comumente

encontrados em crianças. A radioterapia fracionada melhora a sobrevida e permite o reparo dos tecidos normais. Contudo, a decisão do tratamento deve ser individualizada levando-se em consideração a toxicidade e o impacto da progressão tumoral em tumores indolentes. Possíveis efeitos adversos da radiação estão relacionados com a localização do tumor, dose por fração, dose total e o volume de parênquima irradiado. Complicações agudas são raras e a toxicidade aguda é autolimitada mas pode-se citar alopecia, fadiga, otites, cefaléia, anorexia e radiodermite grau I. Efeitos subagudos podem incluir a sonolência, irritabilidade, perda do apetite por radionecrose e complicações tardias incluem catarata, retinopatia, perda auditiva (SALVAJOLI, 2013).

- Alto Grau ou gliomas grau III e IV (*High Grade Gliomas* - HGG): Respondem por 7% dos gliomas e são conhecidos como astrocitoma anaplásico (grau III, ritmo de crescimento moderado) sendo caracterizados como tumores malignos infiltrativos mais comuns em adultos, apesar de não serem raros em crianças. Já os glioblastomas (grau IV ou glioblastoma multiforme - GBM), apresentam crescimento rápido e compõe cerca de dois terços dos astrocitomas (WHO, 2007), ou seja, cerca de 54% de todos os gliomas (NABORS et al., 2013). O tratamento inclui a cirurgia para controle dos sintomas, alívio da pressão intracraniana e aumento da sobrevida. A radioterapia adjuvante (consiste na aplicação de quimioterapia, terapia hormonal ou radioterapia, após a remoção cirúrgica de um tumor). RT é indicada independentemente da extensão cirúrgica e proporciona um aumento do controle local e de sobrevida.

b) Oligodendrogliomas (2% dos tumores de SNC podem ter crescimento rápido): tumores de baixo grau (I e II) ou maligno grau III mais comuns em adultos. São encontrados na parte frontal do cérebro, no lóbulo frontal ou temporal (GUNDERSON; TEPPER, 2016). Podem se disseminar pelo líquido cefalorraquidiano (LCR) e muito raramente para fora do SNC (MERCHANT et al., 2009). O tratamento inclui a cirurgia para controle dos sintomas e aumento da sobrevida.

c) Ependimomas (2% dos tumores de SNC): Ependimócitos ou células ependimárias são células cubóides ou prismáticas responsáveis pelo revestimento simples dos ventrículos, formam os plexos coriáceos e o canal central da medula espinhal, sendo ciliadas em alguns pontos para facilitar a movimentação do líquido cefalorraquidiano (com possibilidade de metástase pelo LCR). Ependimomas são o terceiro tipo de tumor cerebral mais comum em crianças sendo que 90% são encontrados na região intracraniana e 80% na fossa posterior (MERCHANT et al.,

2009). São classificados como tumores de baixo grau (I e II) até tumores mais agressivos, grau III e IV, denominados ependimomas anaplásicos. Ao contrário dos astrocitomas e dos oligodendrogliomas, os ependimomas geralmente não infiltram no tecido normal do cérebro, de modo que alguns podem ser completamente removidos cirurgicamente (MERCHANT et al., 2009).

2) Meningiomas (30% dos tumores de SNC) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Tumores que se originam das meninges, sendo mais prevalentes em adultos e com risco aumentado pela idade, sexo (feminino) e presente em portadores de neurofibromatose.

Os meningiomas podem ser:

- Tumores de Baixo Grau (grau I) - Tumores semelhantes às células normais representando 80% dos meningiomas. Meningiomas benignos são abordados prioritariamente com cirurgia na tentativa de ressecção completa macroscópica. A aplicação de radiocirurgia emprega uma fração única de radiação de alta dose causando edema sintomático e estudos já demonstram uma tendência ao descalonamento de dose com melhoras nas taxas de complicação (KREIL, 2005).
- Tumores de Alto Grau (grau II e III) - Para meningiomas de alto grau (grau II e III) é altamente recomendado a radioterapia adjuvante após ressecção macroscópica total com melhoria na sobrevida (AGHI, 2009; PARK, 2009). Devido o alto índice de recidivas, é recomendável que a ampliação de margens a fim de se evitar novas irradiações com piora de prognóstico.
- Grau II (alto grau) – Tumores atípicos ou invasivos apresentam atipias celulares representando 15 a 20% dos meningiomas. Além da ressecção cirúrgica, tem se discutido qual a melhor técnica a ser empregada. A radiocirurgia estereotáxica (SRS) está diretamente relacionada com dose, volume tumoral e tempo de tratamento e a resposta terapêutica está relacionada com o índice de conformidade ($CI = \text{volume de tratamento} \div \text{volume tumoral}$) em relação à dose (ROGERS et al., 2015). Assim sendo, uma dose maior no volume residual vem apresentando melhores respostas para diminuir o índice de recidivas. O início do tratamento deve ser preferencialmente no menor tempo pós-cirúrgico possível (Rogers et al., 2015).

- Grau III (alto grau) – Tumores anaplásicos possuem células dismórficas representando cerca de 1 a 3% dos meningiomas sendo altamente invasivos. Os tratamentos propostos são a cirurgia e o uso da radioterapia adjuvante, incluindo radiocirurgia estereotáxica (SRS) e radioterapia de feixe externo convencionalmente fracionada (EBRT). Contudo os resultados ainda não são totalmente conclusivos uma vez que vários fatores influenciaram na resposta terapêutica final como extensão da cirurgia, o padrão histológico, a extensão e o momento da irradiação (ROGERS et al., 2015).

3) Meduloblastomas (1,8% dos tumores primários de SNC) (SURAWICZ et al., 1999).

Os tumores neuroectodérmicos primitivos cranianos (*Primitive Neuroectodermal Tumors - PNETs*) são neoplasias embrionárias prevalente em crianças (GUPTA et al., 2017). Normalmente, são descritos por sua localização como infratentorial (meduloblastomas) e supratentorial (neuroblastoma cerebral, pineoblastoma ou esthesioneuroblastoma) (NABORS et al., 2013). Todos os PNETs são classificados pela WHO como categoria IV porque são invasivos, crescem rapidamente e apresentam diferentes graus de diferenciação com capacidade de disseminação através do líquido cefalorraquidiano (LCR) (NABORS et al., 2013).

4) Gangliogliomas (1,0% dos tumores primários de SNC) (SURAWICZ et al., 1999)

Tumor, contendo neurônios e células gliais, é denominado ganglioglioma sendo classificado como um gliomas de baixo grau (LGG) progressivo e de crescimento lento com incidência de picos na idade adulta e com prevalência entre brancos e homens (OSTROM et al., 2014). O tratamento inicia-se pela ressecção cirúrgica preferencialmente total, com melhores taxas de sobrevida. A radioterapia adjuvante precoce induz a apoptose de células tumorais mitoticamente ativas mas também causa danos nos tecidos adjacentes como edema, ruptura da barreira hematoencefálica, gliose reativa e um estado pró-inflamatório geral (KIM et al., 2008) desencadenado inúmeros efeitos adversos como cefaléia, tonturas, inflamação da orelha, náuseas, vômitos, convulsão, nível de consciência alterado, alopecia, dermatite, incontinência urinária e mudança de personalidade (CTCAE,2009). Tardiamente , foi observado leucoencefalopatia, declínio neurocognitivo, qualidade de vida reduzida (*Quality of Life - QoL*) e necrose tecidual que podem imitar a progressão tumoral (SURMA-AHO et al., 2001; Douw, et al., 2009). A SRS vem demonstrando melhor resposta de sobrevida com toxicidade aceitável sendo adotado como técnica de eleição para tumores irressecáveis de difícil acesso e próximos

das estruturas críticas (COMBS et al., 2005; HEPPNER et al., 2005; PLATHOW et al., 2003; WANG et al., 2006).

5) Schwannomas vestibulares (8% dos tumores primários de SNC) (*American Cancer Society*, 2017).

Os schwannomas vestibulares (*Vestibular Schwannoma – VS*) ou neurinomas do acústico são tumores benignos, de crescimento lento e insidioso a partir das células de Schwann, da bainha de mielina que acometem o VIII par craniano, nervo vestibulococlear. A incidência foi relatada em aproximadamente 2 em 100.000, após os 40 anos e preferencialmente comete o sexo feminino (BENTO et al., 2012; PUATAWEEPONG et al., 2016).

Os neurinomas do acústico são classificados em 4 graus (BENTO et al., 2012):

I: tumor exclusivamente intrameatal;

II: tumor ocupando ou não o segmento intrameatal e projetando-se na fossa posterior craniana sem encostar no tronco cerebral;

III: tumor ocupando a fossa posterior craniana encostando no tronco cerebral, sem deslocá-lo da linha média;

IV: tumor ocupando a fossa posterior que encosta no tronco cerebral e desloca-o da sua linha média.

6) Craniofaringiomas (1 – 3 % tumores primários do SNC) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Os craniofaringiomas são tumores de natureza cística em base de crânio (*Skull Base – SB*), histologicamente benignos (Grau I WHO) de base do cérebro, frequentemente diagnosticados em crianças, adolescentes e adultos jovens. Contudo, o desenvolvimento destes tumores na infância pode comprimir a glândula pituitária e o hipotálamo acarretando disfunções hormonais e visuais, alterando o desenvolvimento da criança devido às inúmeras intercorrências endocrinológicas, metabólicas e neurocognitivas (HARRABIL et al., 2014).

7) Cordomas (0,2% tumores primários do SNC).

Os cordomas são tumores provenientes de remanescentes da notocorda que se desenvolvem base do crânio ou na extremidade inferior da coluna vertebral com grande recorrência local após cirurgia e/ou RT.

8) Linfomas Não Hodgkin (3,0% tumores primários do SNC) (SURAWICZ et al., 1999).

O linfoma primário do sistema nervoso central (PCNSL) , conhecido anteriormente como sarcoma ou microglioma de células reticulares, é caracterizado pela disseminação de linfoma não-Hodgkin agressivo (NHL) dentro do cérebro, nervos cranianos, leptomeninges, líquido cefalorraquidiano (LCR), estruturas intra-oculares e medula espinhal e acomete pacientes acima de 65 anos de idade (mediana de 56 anos) (HOCHBERG; Loeffler, 2006; MILLER, 1988).

9) Tumores Pituitários (8% de tumores primários de SNC) (SURAWICZ et al., 1999).

Tumores que se originam da glândula pituitária são quase sempre benigno, mas podem acarretar disfunções endócrinas pela compressão de estruturas. O tratamento consiste na realização da microcirurgia com ressecção total ou subtotal do tecido do carcinoma pituitário para descompressão intracraniana e reduzir o efeito de massa e controle endocrinológico e dos déficits neurológicos.

2.3.2.2 Tumores secundários

Tumores secundários no SNC (metastáticos) são os mais comuns tumores intracerebrais presentes em sua maioria em adultos e com frequência 10 vezes maior que os tumores primários do SNC (NABORS et al., 2013). Dados estatísticos demonstram que cerca de 8 – 10 % de todos os tipos de cânceres desencadearão metástases cerebrais (SCHOUTEN et al., 2002; Barnholtz-Sloan et al., 2004) sendo que os cânceres de pulmão e mama são responsáveis pela maior ocorrência de metástases (LIN et al., 2004). A radioterapia total do cérebro (*Whole Brain Radiotherapy* – WBRT) é usado com maior frequência para pacientes com metástases cerebrais, mas também para pacientes com linfomas primários do SNC e glioblastomatose cerebral e como componente de CSI. A irradiação do cérebro inteiro é administrada através de feixes laterais paralelos limitando-se a inferiormente a placa cribriforme, à fossa craniana e ao forame magno (PEREZ et al., 2013). A WBRT apresenta toxicidade aguda (fadiga, alopecia, dermatite, hiporexia, náuseas e vômitos), subaguda (fadiga, sonolência, febre, cefaléia, vômitos, disfagia, anorexia, disartria, irritabilidade e déficits neurocognitivos como perda de memória e sintomas focais) e tardia, ocorrida após 90 dias (degeneração neurocognitiva, leucoencefalopatia, radionecrose, síndrome de Moyamoya – lesão vascular no polígono de Willis como hemorragia e trombose) (MCTYRE et al., 2013)

2.3.3 Toxicidades da radioterapia

a) LGG (*Low Grade Glioma*)

Um amplo espectro de toxicidades induzidas por radiação pode ocorrer em pacientes que recebem irradiação terapêutica cerebral. A fisiopatologia que desencadeia o processo de neurotoxicidade está associado a lesão de substância branca, a radionecrose induzida consequente a lesão vascular e alterações na qualidade de vida (*Quality of Life – QOL*) e neurocognitivas (BROWN et al., 2003; GUNDERSON, 2015). Em crianças, o risco de lesão cognitiva após a irradiação parece estar mais intimamente associado com a baixa idade no momento do tratamento e secundariamente com o volume de cérebro irradiado (DEWIT et al., 1984; HIRSCH et al., 1989; MERCHANT et al., 2009).

b) HGG (*High Grade Glioma*)

A resposta aguda representa os efeitos determinísticos produzidos por doses elevadas acima do limiar de dose celular acarretando em morte celular (OKUNO, 2013). A morbidade aguda da radiação inclui fadiga, eritema, alopecia, dor de cabeça e raramente, náuseas com ou sem vômito são auto-limitantes (WALLNER et al., 1989).

Os efeitos tardios da radiação (por exemplo, sonolência e, especialmente, deficiências cognitivas) são mais preocupantes e podem se tornar manifestam-se muitos anos depois (DOUW et al., 2009). No tratamento de metástases cerebrais com WBRT foi verificado um comprometimento cognitivo importante de longo prazo sendo necessário minimizar o déficit neurocognitivo procurando sempre preservar ao máximo a região do hipocampo (GONDI et al., 2013). Dentro das alterações tardias da radiação, foi verificado a necrose de barro, uma toxicidade tardia grave e incomum prevalente principalmente em crianças (GONZALEZ et al., 2007).

As cataratas induzidas por radiação são facilmente reparáveis. Contudo, avaliando-se a dose bem como uma planimetria adequada procurando-se preservar a glândula lacrimal, já seria o suficiente para minimizar danos radioinduzidos como a catarata, xerostomia ocular e conjuntivite (PAYNE et al., 2009).

Da mesma forma, quando se contorna os canais auditivos, existe agora uma maior conscientização sobre os riscos de desenvolvendo otite externa, bem como otite média. Para os tumores localizados nos lobos temporais, a dose de saída para a glândula parótida pode causar xerostomia podendo ser minimizado com IMRT (MERCHANT et al., 2009).

As citopenias radioinduzidas decorrentes de irradiação craniana foi verificado mesmo entre pacientes que não receberam quimioterapia (HUGHES et al., 2005). O mecanismo de hipótese seria a circulação de sangue irradiado no CTV durante a irradiação tumoral (HUGHES et al., 2005).

c) Toxicidades do EBRT Meningiomas

As toxicidades associadas ao EBRT estão relacionadas ao tratamento volume e localização. Muitos pacientes experimentam fadiga e alguns têm alopecia. As toxicidades tardias incluem a formação de cataratas paralisia do nervo craniano ou neuropatia e pan-hipopituitarismo pode ocorrer (AL-MEFTY O et al., 1990; ANDREWS et al., 1988)

As alterações neurocognitivas apresentam efeito tardio e apresentam estreita relação dose-volume específicas do local (NUTTING et al., 1999; VAN NIEUWENHUIZEN et al., 2007).

Assim foi observado que as alterações neurocognitivas apresentam forte correlação com terapia de irradiação no lóbulo temporal e em regiões do seio cavernoso, próximo ao hipocampo, com aumento do risco de declínio cognitivo (DUCHSTEIN et al., 2003; PEIFFER et al., 2013).

A toxicidade esta relacionada as lesões nervosas ou ao edema radioinduzido. Os nervos sensoriais, tais como o nervo óptico, são mais suscetíveis a lesões do que os nervos motores acarretando em neuropatia óptica principalmente para doses acima de 10 Gy na radiocirurgia estereotáxica (STAFFORD et al., 2001).

A SRS baseada em linac ou a Gamma Knife é empregada para tratamento de lesões intracranianas com precisão submilimétrica com doses marginais tipicamente de 12 Gy a 13 Gy. A toxicidade do nervo craniano aumenta com doses mais elevadas na radiocirurgia estereotáxica causando neuropatia facial, trigeminal e vestibulococlear (mais tardiamente) (BASCHNAGEL et al., 2013; CHIARA et al., 2007; COMBS et al., 2010; FLICKINGER et al., 1996; LINSKEY et al., 1993; YANG et al., 2009; YOMO et al., 2012).

Os meningiomas induzidos por radiação podem ser mais clinicamente agressivos e multifocais e com maior atipia celular (grau II, WHO) (AL-MEFTY O et al., 2004; CAMPBELL et al., 2009; SADETZKI et al., 2002; STROJAN et al., 1999).

d) Toxicidades da radioterapia em crianças

As toxicidades advindas da terapia de irradiação cerebral também podem ser classificadas em agudas, subagudas e tardias, tendo por base o tempo decorrido para o surgimento dos efeitos adversos. Os efeitos agudos, geralmente são transitórios temporários, ocorrem durante ou logo após a irradiação. Toxicidades subagudas ocorrem geralmente até 6 meses e, ocasionalmente, mesmo um ano após a conclusão da radiação e os efeitos tardios podem se desenvolver entre 6 meses a vários anos para manifestar os primeiros sintomas (GUNDERSON, 2015).

As reações agudas mais comuns à radiação para tumores do SNC são náuseas, vômitos, fadiga, dor de cabeça, diminuição do apetite, alopecia temporária e menor recorrência edema induzido por radiação. Náuseas e vômitos são transitórios e desaparecem com o término da irradiação. Contudo fadiga, náusea, hiporexia e o cansaço (síndrome da sonolência) podem persistir por vários anos após o término do tratamento (LITTMAN et al., 1984).

Assim pode-se enumerar:

1) TOXICIDADE NEUROCOGNITIVA

A deficiência cognitiva se manifesta tardiamente, provavelmente entre meses a anos, com comprometimento significativo no desenvolvimento intelectual. A perda de inteligência (*Full-Scale Intelligence Quotient - FSIQ*) e o grau de comprometimento estão correlacionados com a idade no momento da radiação, volume do cérebro irradiado e dose de radiação (MULHERN et al., 2005; RIS et al., 2013). Os piores índices de FSIQ foram obtidos após WBRT (SILBER et al., 1992) e aparente ausência de alterações para pacientes submetidos a radioterapia conformacional (MERCHANT et al., 2009).

2) TOXICIDADE NEUROENDOCRINA

A disfunção endócrina é resultante de lesão hipotalâmica proveniente do tratamento radioterápico em função da dose irradiada acumulada. A alteração na produção foi diagnosticada no hormônio do crescimento (*Growth hormone deficiency - GHD*), hormônio tireotrófico (*Thyrotropin-Releasing Hormone, TRH*), hormônio adrenocorticotrófico (*Adrenocorticotropic Hormone - ACTH*) e hormônio liberador de gonadotrofina (*Gonadotropin-Releasing Hormone - GnRH*). A alteração nos níveis de GHD causa baixa estatura além de alterar o perfil lipídico corporal com ganho de peso além de diminuir a densidade óssea mineral e alterar a capacidade cognitiva (ATTANASIO et al., 1997; MERCHANT et al., 2011; MURRAY et al., 2002).

A deficiência de TRH causa fadiga, letargia e ganho de peso e a deficiência de ACTH causa náuseas, vômitos, diminuição do apetite, hipoglicemia, fadiga e hipotensão (CONSTINE et al., 1987, 1993).

Já na ativação hipotalâmico-hipofisária, os níveis de GnRH aumentam causando o aumento de pulsos secretivos e de liberação de LH (*Luteinizing Hormone*) FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) desencadeando os sintomas característicos da puberdade precoce (PP) tais como o aparecimento de caracteres sexuais secundárias antes dos 8 anos de idade cronológica na menina ou antes dos 9 anos no menino (DAMIANI, 2002; DIDCOCK et al., 1995; MONTE et al., 2001).

3) OTOTOXICIDADE

A neurotoxicidade do nervo vestibulococlear ocorre como resultado da irradiação da cóclea demonstrando que dos danos são proporcionais à dose irradiada no local (BHANDARE et al., 2007; HUA et al., 2008).

4) VASCULARES

As complicações vasculares decorrentes da radiação são raras, mas podem ocorrer agudamente após a irradiação como ocorre na síndrome de Moyamoya (a doença cerebrovascular oclusiva acomete as artérias do sistema nervoso central (SNC), provocando trombozes, isquemias transitórias de repetição e hemorragias intraparenquimatosas). Os pacientes podem apresentar convulsões e eventos isquêmicos devido a oclusão de vasos no círculo de Willis. Os hemangiomas cavernosos são malformações vasculares benignas que pode desenvolver meses a anos após a radiação (STRENGER et al., 2008)

5) VISUAIS

Os nervos ópticos, a retina e o cristalino podem desenvolver alterações relacionadas à dose de irradiação recebida tais como neuropatia óptica, catarata e retinopatia respectivamente (KLINE et al., 1985; KORENKOV et al., 2005; HABRAND et al., 1989).

6) NECROSE DE RADIAÇÃO

A necrose de radiação é um efeito colateral raro, mas devastador, que ocorre a alta dose radiação (tipicamente superior a 55 Gy) que resulta em permanente morte de tecido cerebral.

Embora a maioria dos casos esteja presente até um ano de tratamento, casos foram relatados tão tarde quanto 6 a 7 anos após o tratamento (MURPHY et al., 2012).

7) LEUCOENCEFALOPATIA

Complicação causada pela radiação ou metotrexato desencadeando lesões extensas periventriculares com destruição de matéria branca com áreas de hipodensidade atribuídas para infartos lacunares (MATSUMOTO et al., 1995).

8) TUMORES SECUNDÁRIOS

Tumores secundários provenientes da irradiação terapêutica de tumores primários, podendo citar os meningiomas e gliomas (ARMSTRONG, 2010)

2.4 Espectrometria de massas

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)

A espectrometria de massas também é utilizada na determinação de razões isotópicas. Assim ao realizarmos as análises em modo positivo, obteremos apenas o íon positivo, no caso para soluções salinas seria o Na^+ e em modo negativo o íon Cl^- . Contudo os modos positivos e negativos irão analisar os isótopos mais estáveis naturais sendo que o íon com m/z 23 é referente ao Na^+ e íons com m/z 35 (75%) e outro de m/z 37(25%) são referentes ao Cl^- (AUDI, 1993 e 1995; IUPAC, 1999). Moléculas orgânicas, formadas por átomos de carbono e hidrogênio, contém dois isótopos principais para o carbono (^{12}C - 99%, ^{13}C - 1%) e para o hidrogênio (^1H -99,9%, ^2H - 0,1%), sendo designadas como isotopólogos (AUDI, 1993 e 1995; IUPAC, 1999).

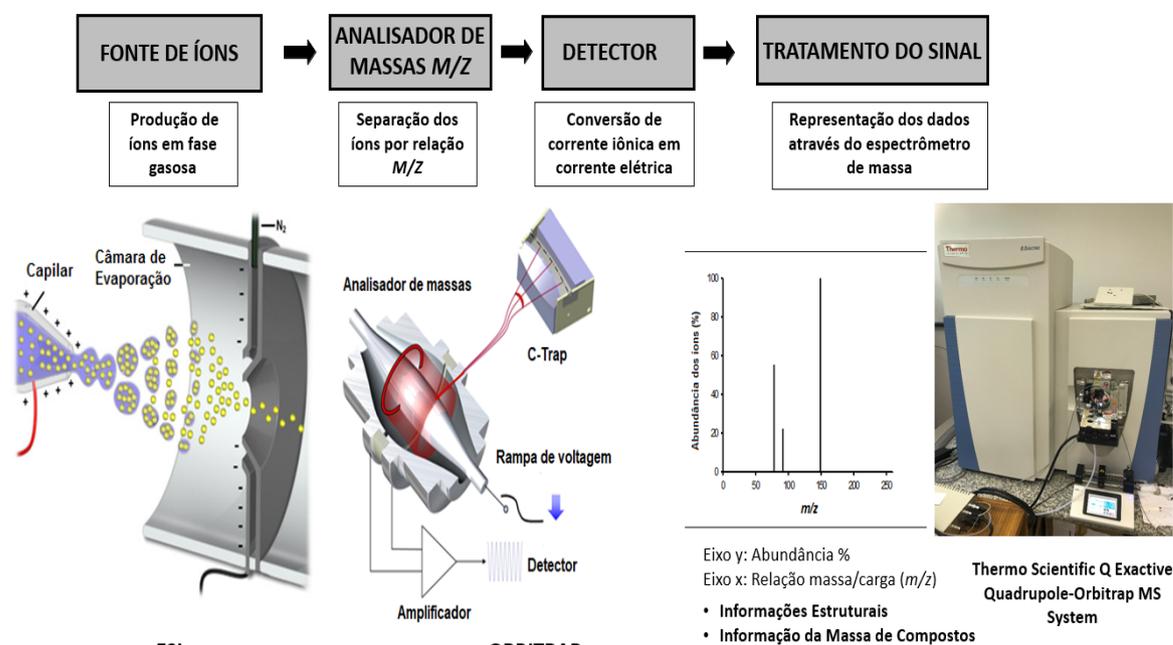
2.4.1 Instrumentação

Um espectrômetro de massas é formado por 3 componentes (Fig. 2.16) que são a fonte de íons, os analisadores de massas e os detectores dos íons.

FIGURA 2.16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

FONTES: 1) Fonte de íons ESI; 2) Analisador Orbitrap

- *Fonte de íons*: realiza a ionização das moléculas da amostra;
- *Analisadores de massas*: realiza a separação dos íons de acordo com seu m/z , através da



aplicação de campos magnéticos e elétricos;

- *Detector*: realiza a detecção e amplificação dos íons.

2.4.2 Fontes de Ionização

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. Íons podem ser produzidos a partir de uma molécula neutra pela remoção ou adição de um elétron ou próton. A ionização pode gerar íons positivos e/ou negativos, sendo os íons positivos predominantes (principalmente para proteínas). O processo de ionização necessita de energia

denominada potencial de ionização para que uma espécie (átomo ou molécula) perca o elétron da eletrosfera formando o íon positivo. Já um íon negativo é formado pela colisão de um elétron livre com seu átomo sendo capturado e permanecendo sob influência de forças nucleares e elétricas.

A Ionização por Elétrons (EI) (EI-MS - *Electron 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 volatilizadas e, assim, não podem ser analisadas por EI.

2.4.3 Ionização por spray de elétrons (ESI – *Electrospray Ionization*)

ESI 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 ionização por ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) é uma técnica branda de ionização que permite a ionização de inúmeras moléculas sem que ocorra sua fragmentação. Através do processo de nebulização, ocorre a formação de um spray com gotículas carregadas da solução contendo o analito em um campo elétrico. O solvente da gotícula é removido gradativamente à medida que as gotículas entram no espectrômetro de massas na região de alto vácuo até restarem somente os íons livres do solvente. Na ionização por electrospray em modo positivo, uma solução é acidificada, formando moléculas protonadas com os seus respectivos contra ânions sendo posteriormente nebulizada através de um tubo capilar com alta voltagem. Ocorre assim, a neutralização de ânions presentes na solução com a conseqüente formação de gotículas contendo um excesso de cargas positivas (moléculas protonadas). Ocorre a evaporação do solvente restando a molécula protonada em fase gasosa. Analogamente, a utilização de uma solução básica associado a um potencial negativo no capilar permite a produção de íons negativos. A ionização por electrospray é sobretudo uma técnica que necessita de baixa energia para formação dos íons além de possibilitar a formação de íons multicarregados (multiprotonados). Moléculas de baixa massa molar normalmente tornam-se monocarregadas ao contrário das macromoléculas como as proteínas que adquirem múltiplas cargas

no processo de ionização permitindo sua análise em modo de ionização positivo pela adição de prótons. O número de resíduos básicos na proteína, principalmente aminoácidos de lisina e arginina, são responsáveis pela carga máxima de prótons que a molécula pode adquirir.

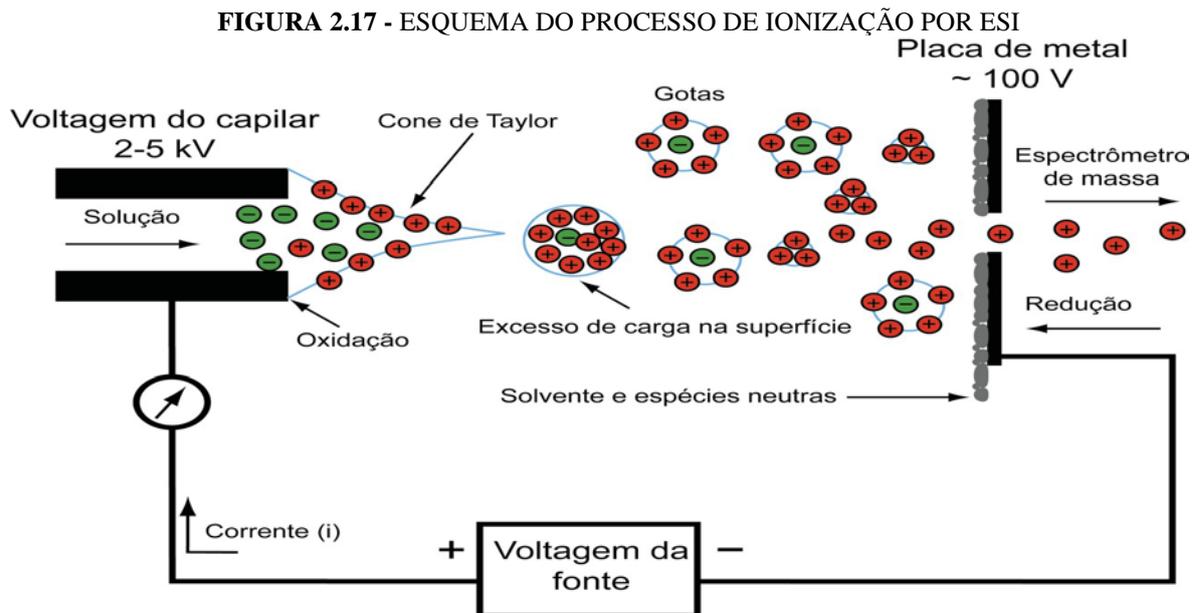
O processo de ionização por ESI ocorre quando um solvente volátil contendo os analito é bombeado através de um capilar o qual é submetido a uma alta tensão aplicada em sua extremidade gerando um aerossol com gotículas extremamente carregadas contendo solvente e analito carregados. As microgotículas do solvente evaporam reduzindo, assim, seu diâmetro rapidamente. Ocorre assim a formação do cone de Taylor com a formação de um spray devido o aumento da intensidade do campo elétrico favorecendo ainda mais a formação de novas gotículas ainda menores (a intensidade das forças de repulsão eletrostáticas aumenta superando a tensão do solvente) caracterizando o processo de fissão Coulômbica.

Existem dois modelos que procuram elucidar os mecanismos de formação dos íons a partir da fissão Coulômbica. O modelo do resíduo carregado (CRM – *charged-residue model*) propõe que as microgotículas sofrem evaporação e fissão até a completa dessolvatação das moléculas com transferência de cargas do solvente para o analito formando os íons. Já o modelo da dessorção de íons (IDM – *ion-desorption model*) indica que a contínua evaporação do solvente diminui a distância entre as partículas fazendo com que a densidade de cargas elétricas na superfície da micro gotícula seja tão intensa a ponto de retirar os analitos da micro gotícula transferindo a carga externa do solvente para o analito formando os íons (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Crotti et al., (2006), em seu trabalho relata “durante a ionização por “electrospray”, três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas (íons quasi-moleculares) (IUPAC, 2006) e moléculas cationizadas ou anionizadas. A extensão com a qual cada um destes íons é formado pode ser compreendida em termos do balanço entre três processos essencialmente distintos, que ocorrem no interior do capilar: reações redox (oxidação/redução), que produzem íons moleculares ($M+\bullet$) ou ($M-\bullet$); reações ácido/base (protonação/desprotonação), que resultam na formação de moléculas protonadas ($[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]^-$) e, coordenação com cátions (geralmente os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), que leva à formação de moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, ou anionizadas $[M+Cl]^-$)” (CROTTI et al , 2006)

Em geral a ionização por ESI (Fig. 2.17) é um processo que pode ser dividido em três etapas principais:

- I. a nebulização da solução de amostra em gotículas carregadas produzidas pela aplicação direta de voltagem no capilar (2-5 kV);
- II. a liberação dos íons a partir das gotículas;
- III. o transporte dos íons da região de pressão atmosférica da fonte de ionização para a região de alto vácuo do analisador de massas (COLE, 1997)



FONTE: Adaptado de COLE, 1997.

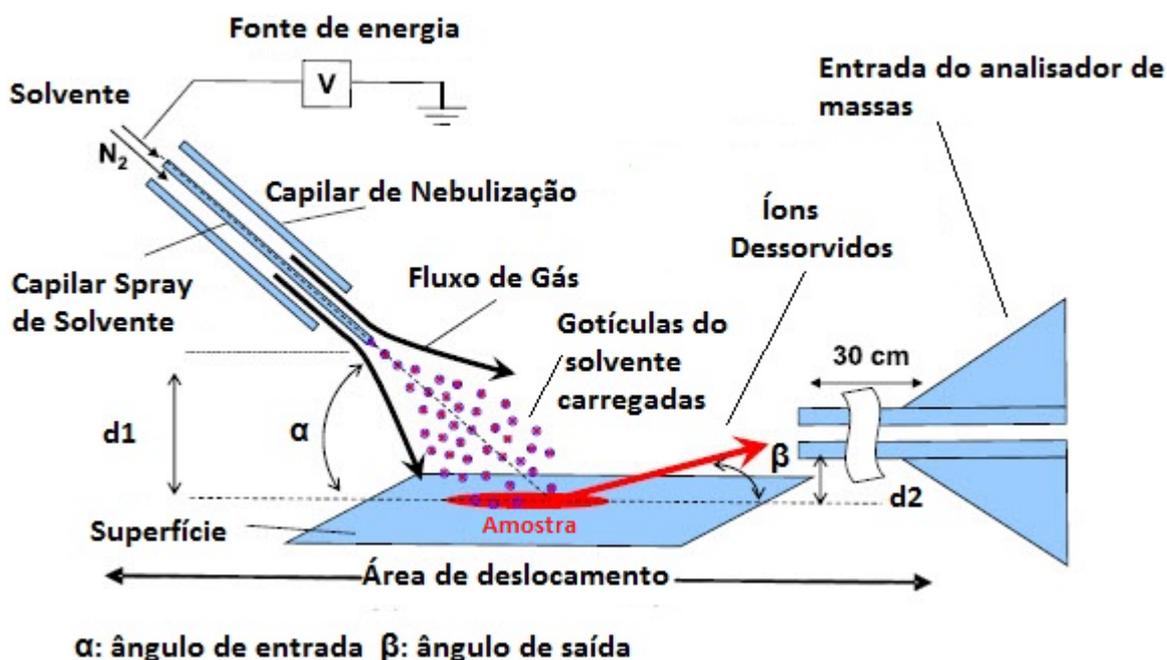
2.4.4 Ionização por dessorção de spray de elétrons (DESI – Desorption Electrospray Ionization)

DESI-MSI (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*) 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. A tecnologia de ionização ambiente é baseada na combinação de dois métodos como a ionização electropray (ESI) e a ionização por dessorção (DI) permitindo a ionização *in-situ* em pressão atmosférica (AP) possibilitando a determinação da relação m/z , e assim correlacionar as espécies químicas com a distribuição espacial (COOKS et al., 2006).

A qualidade dos espectros depende de inúmeros parâmetros tais como: o posicionamento espacial entre a fonte de ionização e a superfície da amostra, refletindo em

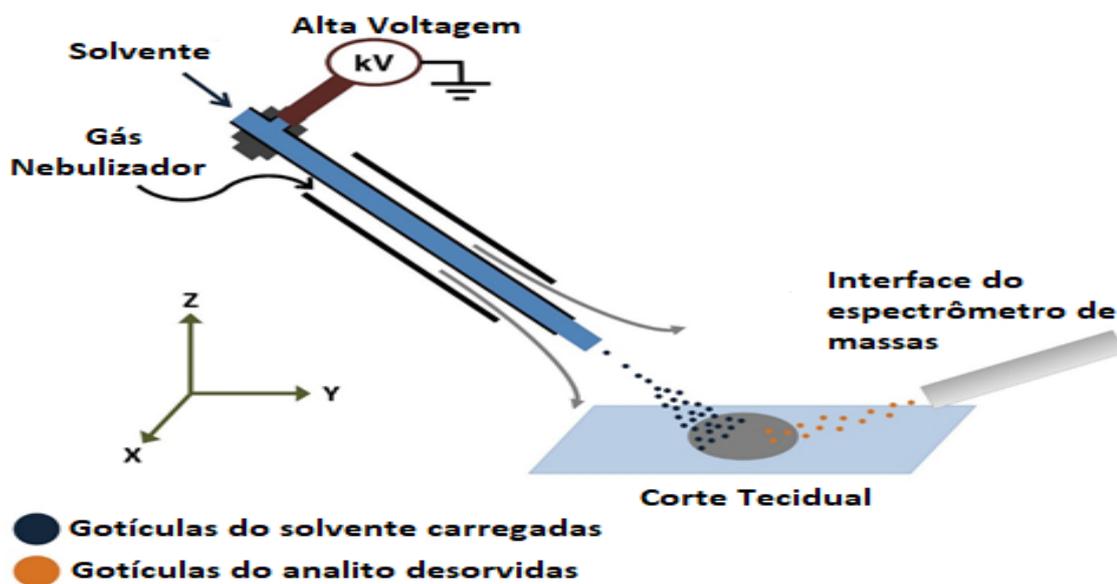
parâmetros como altura do capilar de nebulização, ângulo capilar de nebulização, distância à superfície de entrada do espectrômetro de massa, ângulo de captura do capilar de entrada do analisador de massas, temperatura e pressão do gás nebulizador, tensão capilar, fluxo do solvente e tipo de solvente utilizado (ANGOLINI et al., 2015; BODZON-KULAKOWSKA et al., 2014). A escolha do solvente como dimetilformaldeído (DMF) e acetonitrila (ACN) (V/V 1:1) é importante para preservação da amostra que será submetida por H&E (hematoxilina-eosina) para análise comparativa (EBERLIN et al., 2011; LI et al., 2017). Tais parâmetros são essenciais para o início dos processos de dessorção e ionização dos analitos para fase gasosa (Fig. 2.18, 2.19 e 2.20) além de sua consequente transferência até o capilar de entrada do analisador de massas (COOKS et al., 2006).

FIGURA 2.18 - FONTE DE IONIZAÇÃO DO TIPO DESI



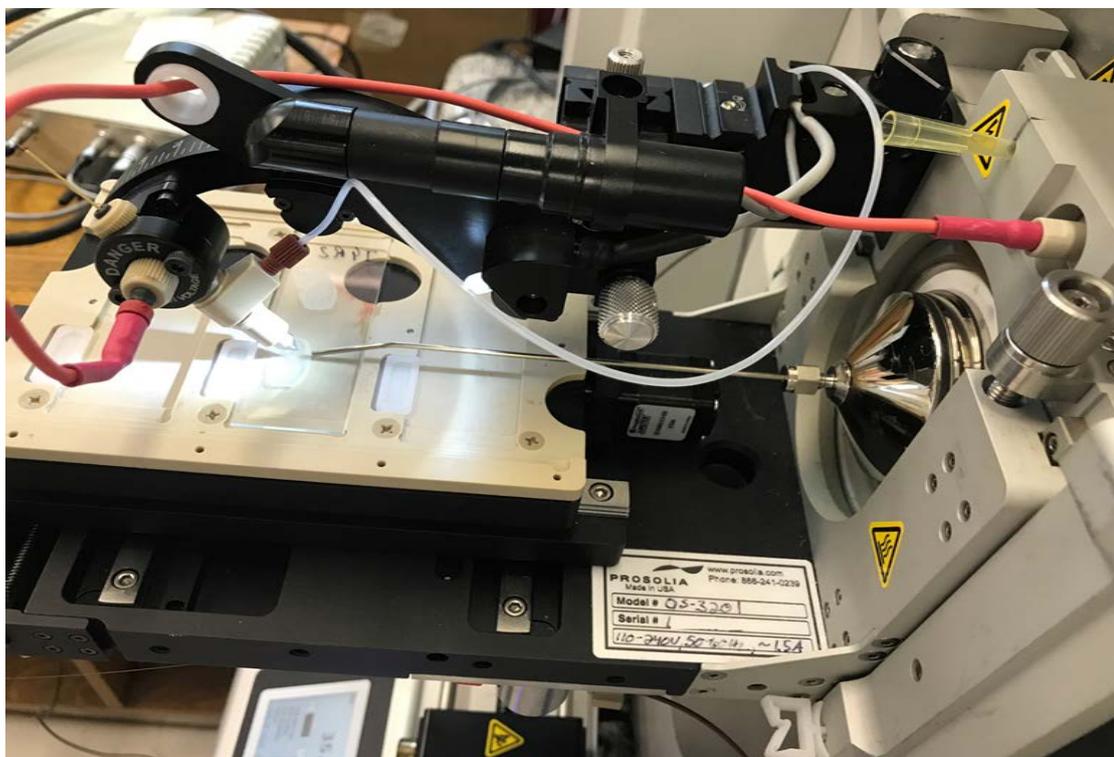
FONTE: Adaptado COOKS et al., 2006.

FIGURA 2.19 - ESQUEMA DA FONTE DE IONIZAÇÃO POR DESI-MS



FONTE: Adaptado de BENNET et al., 2013.

FIGURA 2.20 - DESI-MS

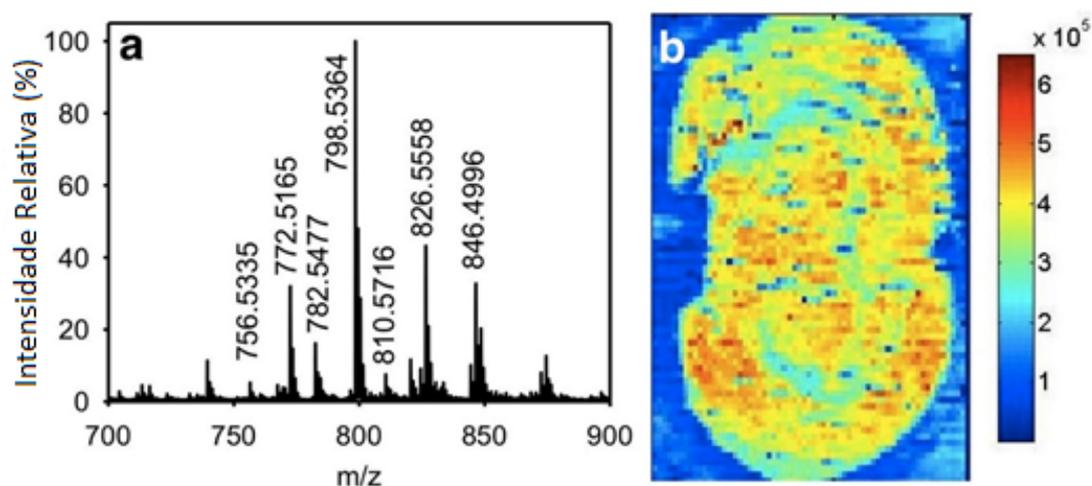


FONTE: Arquivo Pessoal

O processo de imageamento por DESI envolve quatro etapas: preparação de amostras, dessorção e ionização, análise de massas e registro da imagem. A preparação das amostras não

é extensa, mas é fundamental para o sucesso e obtenção de resultados consistentes. As amostras devem ser retiradas e congeladas imediatamente em gelo seco, identificadas e armazenadas em freezer -80°C e seccionadas em um criostato com espessura menor que $20\mu\text{m}$, sempre evitando o excesso de OCT na amostra, o que inviabilizaria a ionização (SETOU, 2010). As amostras devem ser dessecadas a temperatura local 15 min antes de sua utilização. A formação de microgotículas pelo electrospray e o fluxo pneumático de gás nebulizador de nitrogênio (N_2) atuam favorecendo o processo de dessorção e ionização dos analitos em cada ponto da superfície escaneada (CHUGHTAI; HEEREN, 2010) gerando um pixel da imagem. A resolução de cada pixel das imagens formadas é de $100 - 200 \mu\text{m}$ podendo chegar a $40 \mu\text{m}$ e é dependente da superfície efetiva de extração do spray do solvente (BENNET et al., 2013). As microgotículas carregadas ao se colidirem com a superfície realizam uma microextração sólido-líquido resultando em microgotículas secundárias contendo o material extraído da superfície. O analitos ionizados em fase gasosa são capturados pelo capilar de entrada da câmara do analisador de massas. Espécies protonadas ou adutos (molécula AB produto da reação entre moléculas A e B diferentes, resultando em um único produto de reação sem que se produzam mudanças estruturais nas porções A e B) de Na^+/K^+ são encontradas em modo íon positivo e espécies desprotonadas são encontradas em modo íon negativo, conforme Fig. 2.21.

FIGURA 2.21 - ESPECTRO COM OS VALORES m/z MAIS ABUNDANTES (A) IMAGEM TOTAL DOS IONS (B) ADQUIRIDO POR DESI-MSI EM MODO POSITIVO



FONTE: Adaptado de BENNET et al., 2013.

DESI-MSI proporciona uma impressão digital química de tecidos biológicos com base na relação carga/massa (m/z) das moléculas constituintes (perfil químico molecular) (TATA et al., 2016).

DESI-MS apresenta inúmeras aplicações tais como: obtenção dos perfis lipídicos de tecidos normais e neoplásicos, identificação de metabolitos em microbiologia, falsificação de dinheiro, estudo de neurotransmissores cerebrais e metabolômica (ANGOLINI et al., 2015; CORREA et al., 2016; FERNANDES et al., 2016). A metabolômica permite o estudo analítico de biomoléculas bem como seus produtos finais e processos celulares envolvidos para sua síntese.

2.4.5 Lipidômica

Lipidômica permite analisar dinamicamente as alterações envolvidas referentes aos lipídios e os efeitos biológicos nos tecidos irradiados (JELONEK et al., 2014). 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 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 tais como inibição da mitose e indução de apoptose (ACKERSTAFF et al., 2003; WANG et al., 2009). Sabe-se que a radiação ionizante pode causar inibição clonogênica e indução do processo apoptótico. Estresses ambientais exógenos acarretam alterações quantitativas e qualitativas principalmente nos esfingolipídios e fosfolipídios (PLs) estruturais. Ácidos graxos poli-insaturados e lipídios estruturais de membrana celular são amplamente suscetíveis aos danos da irradiação gama causando alteração da permeabilidade, sinalização celular e apoptose. Foi verificada alterações radioinduzidas nos lipídios nucleares: aumento de ácidos graxos e diminuição de fosfatidilcolina + fosfatidilserina (PC+PS) e fosfatidiletanamina (PE). 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 (KOLOMIYTSEVA et al., 2012). A irradiação local na radioterapia induz a uma resposta do organismo que pode ser evidenciada pela alteração nos componentes séricos sanguíneos (WANG et al., 2009). Os efeitos das radiações ionizantes induzem a redução nos níveis séricos de lipídios sanguíneos,

principalmente de PC34, PC36, PC38, LPC16 e LPC18, mas, retornam ao normal após a suspensão do tratamento, em 1 – 2 meses (JELONEK et al., 2014).

Dill et al., 2009, reporta que o uso do sistema DESI-MS no modo de varredura completo em tecidos saudáveis permitiu a identificação de vários lipídios presentes no cérebro tais como fosfolipídios, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e sulfatida (ST) demonstrando que a alteração no perfil lipídico pode ser uma resposta a processos patológicos como o cancer e Alzheimer (Dill *et al.*, 2009).

DESI está sendo utilizado para análises diretas e caracterização de imagens de inúmeras classes de lipídios tais como: ácidos graxos (FA- fatty acids), glicerofosfolípidos (GP), glicerolipídios (GL), esfingolipídios (SP) e lípidios esterois (ST) (Eberlin et al., 2011). Lipídios de membrana tais como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina (SM), ceramida (Cer), fosfatidilserina (PS) fosfatidilinositol (PI) e sulfatida (ST) foram identificados e já se sabe que algumas destas classes ionizam preferencialmente em modo positivo (PC e SM) e outras em modo negativo (ácido fosfatídico, PI e PS) (JARMUSCH, ALFARO et al., 2016). As diferentes classes ajudam a diferenciar a composição da substância branca e da substância cinzenta além de fornecer informações importantes para o diagnóstico de possíveis patologias como os gliomas (JARMUSCH et al., 2016).

A maioria dos íons observados nos espectros de massa correspondem a ácidos graxos livres desprotonados, fosfatidilserinas (PS), fosfatidilinositóis (PI) e sulfatidas (ST), com PS 18: 0/22: 6 sendo o principal lípido encontrado na matéria cinzenta e ST 24: 1 o maior lípido encontrado na matéria branca.

Um perfil lipídico cerebral de camundongos foi obtido por espectrometria de massas em modo íon negativo demonstrando os principais lipídios constituintes das diversas regiões cerebrais.

As Tab. 2.1 e 2.2 identificam os principais picos detectados no cérebro do camundongo no modo íon negativo.

TABELA 2.1 - 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
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 2.2 - 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	

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

FONTE: Adaptado EBERLIN, 2012.

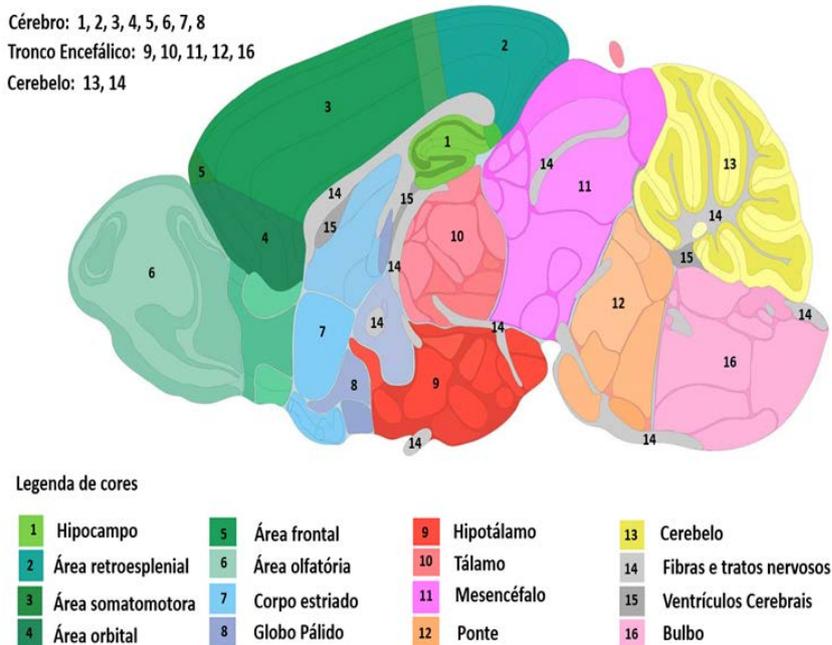
Recentemente, inúmeras evidências de alterações no metaboloma foram constatadas indicando que processos tumorais cerebrais estariam em desenvolvimento pela alteração do perfil lipídico principalmente de ácidos graxos (FA) (EBERLIN et al., 2011). A caracterização do fosfolípido é de extrema importância devido à diversidade das funções celulares além da possibilidade de ser usado como biomarcador nas neoplasias (COOKS et al., 2006). Dentre as funções podemos destacar sumariamente: manutenção de gradiente eletroquímico, sinalização intracelular, transporte de proteínas, ancoramento de membrana, reserva energética, cofatores enzimáticos e são precursores de hormônios esteroídeos e sais biliares (LEHNINGER, 2013). Os lipídios representam 50-60% dos constituintes da célula e das membranas, sendo a classe de glicerofosfolípidos a mais abundante e presentes nas membranas biológicas e envolvidos na sinalização, regulação, proliferação e apoptose (BARTLKE; HANNUN, 2009; MIRANDA; OLIVEIRA, 2015; WRIGHT et al., 2004;). Em alguns tecidos e órgãos, como o cérebro, eles representam 20-25% do peso seco com enorme variedade de espécies moleculares (FAROOQUI; HORROCKS, 2007). Lipídios cerebrais estão envolvidos nos processos de sinalização intracelular com implicações na neurotransmissão além de sua participação na proliferação celular, crescimento e neuroproteção (OSBORNE; MEUNIER, 2001). Além disso, existem receptores específicos que desencadeiam sinalização intracelular assemelhando-se a "neuropeptídeos", podendo ser denominados como "neurolipídios" constituindo, assim, uma nova classe de neurotransmissores no sistema nervoso (ANLIKER; CHUN, 2004). Tais receptores seriam os receptores de canabinóides (CB), receptores para ácido lisofosfatídico (LPA) ou esfingomiéline (SM) e receptores da proteína G (GPCR) (IM, 2004). A biossíntese de neurolipídeos está relacionada ao metabolismo de fosfolípidos de membrana, controladas por enzimas específicas, principalmente fosfolipases (GAITS et al., 1997). 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).

Em processos tumorais já foi evidenciado uma grande variação no conteúdo de fosfolípidos entre os tecidos, permitindo a tomada de decisão para ampliação de margens cirúrgicas com base em informações moleculares a partir do perfil de lipídios nos órgãos afetados por neoplasias, diminuindo, assim, a chance de recidivas e novas cirurgias para remoção das lesões (EBERLIN et al., 2014; JARMUSCH et al., 2016). Vários trabalhos demonstram a estrita correlação do perfil de lipídios e proteínas em tumores cerebrais tais como ácido oleico e calciclina respectivamente, presentes nos gliomas (EBERLIN et al., 2011).

A identificação topográfica de certos lipídios permite a comparação com as regiões neuroanatômicas de cérebro de rato possibilitando até mesmo a proposição de um atlas molecular de lipídios permitindo alicerçar estudos metabolômicos para demonstrar as alterações na distribuição regional molecular. Assim, as áreas neuroanatômicas foram ilustradas conforme Fig. 2.22.

FIGURA 2.22 - CORTE SAGITAL CEREBRAL



FONTE: Allen Brain Reference Atlases

3 - ANÁLISE LIPÍDICA ATRAVÉS DE DESI-MS – UMA REVISÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NO PERFIL LIPÍDICO EM TECIDOS BIOLÓGICOS

3.1 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 proteico 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, 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.

3.2 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 NationalInstituteof Health*), MEDLINE (*US National Library of Medicine*), SciELO (*Scientific Eletronic 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*, *metabolomica*, *lipidomica* utilizados em cada base de dados.

3.3 Resultados

3.3.1 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 núclídeos 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 metabóloma 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 realizada 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. 3.1. 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 3.1 - 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

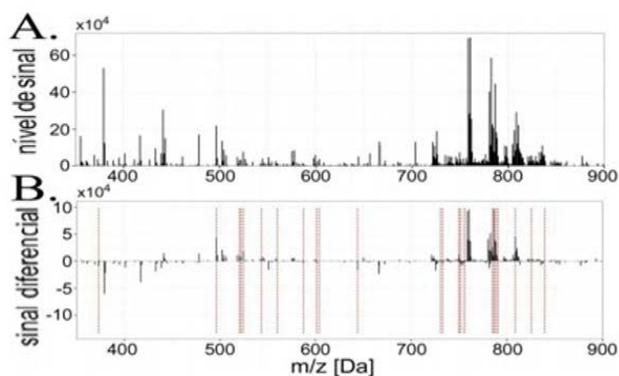
Os valores são as médias de desvio padrão de três experimentos independentes. Para cada um, foram utilizados de três a cinco animais. A significância estatística foi calculada pelo teste t-Student.

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

FONTE: Adaptado de KOLOMIYTSEVA et al., 2012 [9].

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 resposta do organismo que pode ser evidenciada pela alteração nos componentes séricos sanguíneos (COOKS et al., 2006). Como mostrado na Fig. 3.1. 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 3.1 - PERFIL DE MASSA DOS LIPÍDIOS SÉRICOS ANTES (A) E APÓS A RADIOTERAPIA (B)



FONTE: Adaptado de JELONEK et al., 2014.

3.3.2 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 fosfolípido 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 fosfolípidios entre os tecidos. Nesta revisão, vários padrões de fosfolípidios foram submetidos a análises por injeção direta na fonte de ESI-MS, para determinação de condições ideais de ionização e fragmentação.

3.4 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.

4 - METODOLOGICAL ISSUES IN PROTEIN; LIPIDIC EXPRESSIONS IN BRAIN TISSUE EXPOSED TO Co⁶⁰ BASED ON DESI/MALDI-MS

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; mortality worldwide, with about 14 million new cases; 8.2 million deaths directly related to neoplasias since 2012 (FORMAN; FERLAY, 2014). It is estimated that the number of annual cases will increase approximately 57.14%, reaching 22 million new cases in the next two decades 2012 (FORMAN; FERLAY, 2014). Neoplastic malignant lesions are characterized by intense disordered cell proliferation associated with mechanism failures in cell repair, apoptosis's; clonogenic control, which may lead to clinical physiological abnormal alterations, affecting the organs, tissues; cells which hold the ability of infiltrations; metastases (HALL; GIACCIA, 2012).

The association of an early diagnosis; the prescription of efficient treatments, including surgery, chemotherapy; 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; is supported (DEB; FIELDING, 2009). It is known that IR causes non-selective damage to healthy; neoplastic tissues; the intensity of its effects are manifested according to the inherent cell radiosensitivity, tissue kinetics; the way of the cellular organization of the tissues (JELONEK et al., 2014). 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; intracellular lipids (ACKERSTAFF et al., 2003; WANG et al., 2009; GABER, 2005).

The metabolomics allows the analytical study of biomolecules as well as their final products; the cellular processes involved in their synthesis. Lipidomic analysis allows dynamically identification of the changes involved in lipid expression induced by tissue's irradiation (JELONEK et al., 2014). The most abundant lipids are glycerophospholipids (PLs) present in biological membranes; involved in signaling, regulation, proliferation; apoptosis (WRIGHT et al., 2004; BARTKE; HANNUN, 2006). The use of analytical techniques such as

Mass Spectrometry (MS) allows the determination of elemental compositions, molecular structures; quantitative; qualitative analyzes of complex molecular mixtures. Through DESI (Desorption Electro Spray Ionization); 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) (COOKS et al., 2006); 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 (COOKS et al., 2006). The use of the DESI-MSI system in the full scan mode in both healthy; 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; qualitative analysis of lipids in the organs affected by neoplasias, decreasing the chance of relapses; new surgeries to remove lesions (EBERLIN et al., 2014). MALDI-MSI is being used to identify phospholipids, toxins from microorganisms, identification of microorganism species; proteins in various tissues as transmembrane proteins (CLARK et al., 2013; NICKLAY et al., 2013; EBERLIN et al., 2011; CHAURAND et al., 2011). DESI-MSI presents numerous applications besides the obtaining of the lipid profiles of normal; neoplastic tissues such as identification of metabolites in microbiology, falsification of money; study of cerebral neurotransmitters (ANGOLINI et al., 2015; CORREA et al., 2016; FERNANDES et al., 2016).

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; 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; body weight between 300 ± 15 g. The animals were divided in two groups: one control (n = 3), denominated GC; 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; water. Animals of the same lineage, family, with the same weight; 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; approved to CEUA-UFMG, protocol 339/2014, following standardization for animal care; 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

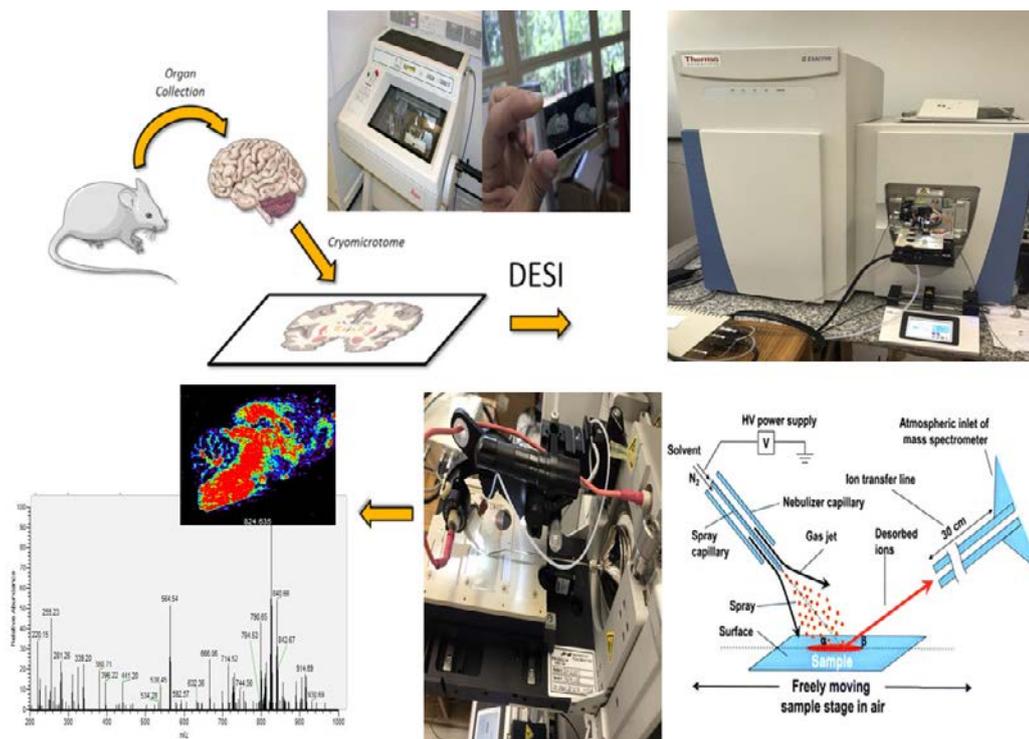
The organs were transported on dry ice to avoid denaturation; losses of the tissue components. The cuts were performed on the Leica CM1850 cryostat. Sagittal sections were preserved preserving a cerebral hemisphere. The chosen hemisphere was sectioned at 12 µm thick; placed on the common foils for analysis 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; N, N-dimethylformaldehyde ACN:DMF (1:1) since they do not cause morphological changes. The

infusion pump was adjusted with a flow rate of $3.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The nitrogen nebulizer gas was turned on at 160 psi pressure. The high voltage source was connected to the ion source; 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; the sample surface. The analysis was made by ThermoFisher Scientific Q exactive Orbitrap MS. All process was represented on a picture below (Fig. 4.1).

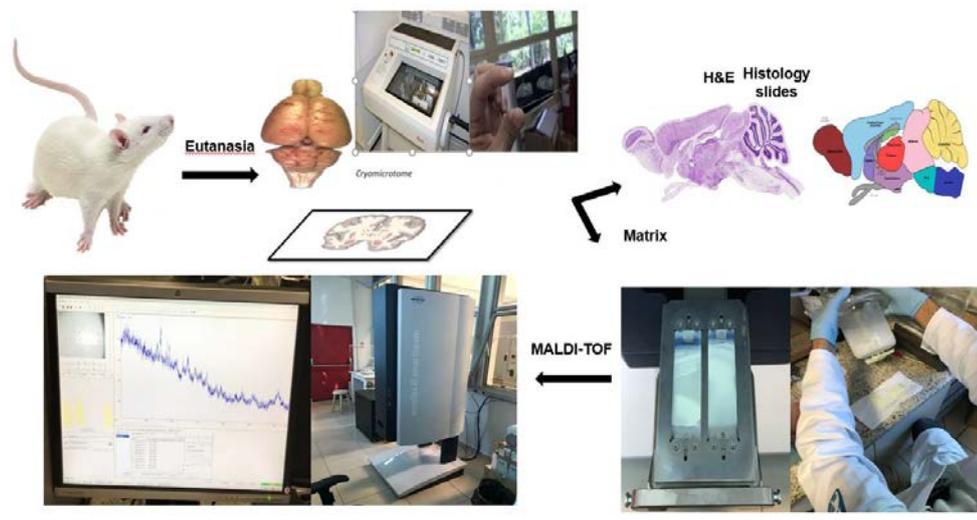
FIGURE 4.1 - Representation of the Stages to Obtain the Images of the Ions Generated By DESI



4.2.5 MALDI

The matrix was dissolved in 60% can; 40% H_2O with 0.2% Trifluoroacetic acid (TFA). The matrix was sublimated; the slides were placed in the adapter. In order to optimize the analyzes in the Maldi-TOF instrument from Autoflex III Smartbeam Bruker, the slides were scanned to determine the scanning area limits. Laser shots (500) were applied (resolution of $150 \mu\text{m}$); the mass spectra acquired in a 1000-15000 mass range. The analysis was performed using the FlexImaging 3.0 software (Fig. 4.2).

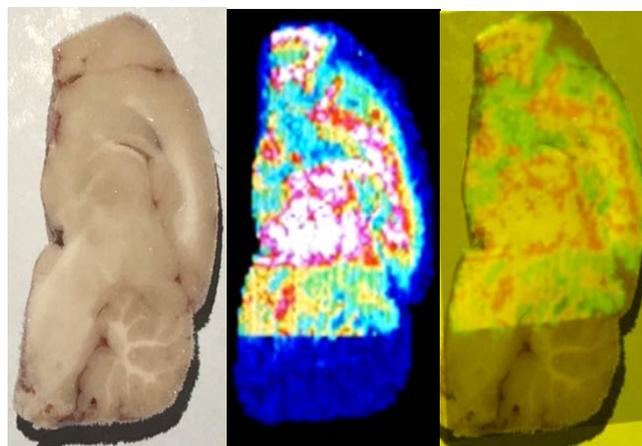
FIGURE 4.2 - Representation of the Stages to Obtain the Images of the Ions Generated By MALDI



4.3 Issues addressed on methodology

The protocols for matrix formation required for ionization in MALDI should be reviewed; 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; 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. 4.3).

FIGURE 4.3 - IMAGE OF A SAGITTAL BRAIN SECTION FROM AN IRRADIATED ANIMAL, RECORDED ON A MALDI-TOF INSTRUMENT



Fonte: Arquivo pessoal

The images' production was directly dependent on the rigorous execution of the methodological procedures. Innumerable interferences could impair the image's generations; protein; 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; 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; frozen in the shortest possible time in order to preserve the morphology; prevent enzymatic degradation. The brain must be withdrawn with extremely careful by removing the temporal bone part; 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 ranges from 15-25 °C should be applied to the brain, heart; lungs; 10-15°C to gonads; 25-50 °C to kidney; liver (Leica CM1850 technical reference). The Tissue-Tek OCT should not be overused to avoid contaminating the tissues; making the samples unfeasible. The cuts should be adjusted to 12µm thickness; 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; angles of the probe; the MS input capillary. The probe should be at a distance of 3 mm from the sample surface; 5 mm input from the MS inlet capillary. The probe should be at an angle of 54° to the surface of the sample; ~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; 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 analyte 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; 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; to verify alignment; positioning with the sample.

4.4 Discussions

The IR provides interactions to the organic molecules that present sufficient energy capable of provoking electronic excitation; ionization, causing in the breakdown of chemical bonds in the biological molecules of the tissues (YOSHIMURA, 2009). Gamma rays ($R\gamma$) are emitted radiations of radioactive nuclides, through nuclear disintegrations, or of positron annihilation processes in matter (MAIA et al., 2013). Gamma rays are low LET (Linear Energy Transfer) radiations usually employed in RT that produce ionization; consequently, free radicals damaging biological tissues. Dose; dose rate is essential in the analysis of energy absorbed in RT patients. The clinical response to a deterministic effect is directly related to the frequency; dose rate absorbed when exceeding a dose threshold relative to the sensitivity of the tissue exposed to its effect (KOLOMIYTSEVA et al., 2012).

From literature, data from brain tissue of guinea pigs suggest a cellular response to oxidative stress. Polyunsaturated fatty acids; cell membrane structural lipids are widely susceptible to gamma irradiation damage causing alteration of permeability, cell signaling, apoptosis (WANG et al., 2009; KOLOMIYTSEVA et al., 2012; GABER, 2005).

In cells, membrane integrity is imperative to ensure signaling of the protein; lipid metabolome. However, IR induces the oxidation of lipids; 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; membranes. The by-products formed generate structural; functional alterations in the cell membrane causing alteration in the ionic; molecular substrate flow, triggering several processes (ACKERSTAFF et al., 2003). Metabolism; serum phospholipid levels (PLs) were altered following exposure to ionizing radiation (WANG et al., 2009).

4.5 Conclusions

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

Thus, lipid-induced changes, especially in phospholipids; in cortical; spinal proteins deserve greater detail; deepening in the attempt to elucidate the metabolic pathways that suggest such expressions. With the possibility of identifying other lipids; proteins; the metabolic pathways involved, we can contribute in the future to the use of metabolic markers of cellular injury; 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; qualitative; 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; proteins obtained by DESI; MALDI respectively, are duly compared; discussed with absolute safety; 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. 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

- ACKERSTAFF, E et al. **Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells?** Journal of Cellular Biochemistry. Vol. 90, United States, 2003. p.525-533.
- ANGOLINI, Célio Fernando F et al. **Direct Protocol for Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture.** Analytical Chemistry, Vol. 87, USA, 2015. p.6925- 6930.
- BARTKE, N.; HANNUN, Y. A. **Bioactive sphingolipids: Metabolism; function.** Journal of Lipid Research. Vol. 50(suppl.), United States, 2009. p.91- 96.
- CHAURAND, Pierre et al. **From Whole-body Sections Down to Cellular Level, Multiscale Imaging of Phospholipids by MALDI Mass Spectrometry.** Molecular; Cellular Proteomics 10, 10.1074/mcp.O110.004259, USA, 2011. p.1-11.
- CLARK, Andrew 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), USA, 2013. p.547-606.
- COOKS, R. G et al. **Ambient Mass Spectrometry,** Science. Vol. 311, Issue 5767, United States, 2006. p.1566–1570.
- CORREA, Deleon Nascimento et al. **Anti-theft device staining on banknotes detected by mass spectrometry imaging.** Forensic Science International, Vol. 260, USA, 2016. p.22- 26.
- 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.
- EBERLIN, Livia S et al. **DESI then MALDI mass spectrometric imaging of lipid; protein distributions in single tissue sections.** Analytical Chemistry, Vol. 83(22), USA, 2011. p.8366-8371.
- EBERLIN, Livia 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), USA, 2014. p.2437–2441.
- FERNANDES, Ana Maria 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.
- FORMAN, D; FERLAY, J. **World Cancer Report 2014.** The global; regional burden of cancer. Lyon, 2014. p.16-53.

- GABER, Mohamed. H. **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.
- 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.
- KOLOMIYTSEVA, I. K et al. **Nuclear; chromatin lipids: metabolism in normal; γ -irradiated rats**. Bioelectrochemistry, Vol. 58, Elsevier, Moscow, 2012. p.31-39.
- MAIA et al., G. A. S. **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.
- NICKLAY, Joshua J et al. **MALDI imaging; *in situ* identification of integral membrane proteins from rat brain tissue sections**. Analytical Chemistry, Vol. 85(13), USA, 2013. p.7191-7196.
- 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**. Revista Brasileira de Física Médica. São Paulo, 2009.

5 - MASS WEIGHT AND HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON WISTAR MOUSE ORGANS

5.1 Introduction

The World Health Organization's International Agency for Research on Cancer (IARC / WHO) has shown that cancer is the major causes of morbidity and mortality worldwide, with about 14 million new cases and 8.2 million deaths directly related to neoplasm in 2012 (FORMAN; FERLAY, 2014). It is estimated that the number of annual cases will increase approximately 57.14% reaching 22 million new cases in the next two decades (FORMAN; FERLAY, 2014).

Cancer is characterized by the appearance of neoplastic lesions, cells that present intense disordered cell proliferation associated with failure mechanisms in cell repair; elimination, may cause biological damage to affected tissues with the possibility of metastasis (HALL; GIACCIA, 2012). Oncological treatment is based on the tripod surgery, chemotherapy; radiotherapy. Inevitably, a large proportion of cancer patients will need to undergo radiotherapy at some time, thus exposure to radiation. Gamma radiation is a type of ionizing radiation (IR) that can cause several cellular damages due to direct and/or indirect structural alterations due to the rupture of interatomic; molecular bonds, determining morphofunctional changes (MAIA et al., 2009).

Gamma rays are low LET (Linear Energy Transfer) radiations usually employed in RT that produce ionization; consequently, free radicals damaging the biological tissues. Dosing; dose rate is essential in the analysis of absorbed energy in RT patients. The clinical response to a deterministic effect is directly related to the frequency; dose rate absorbed when exceeding a dose threshold relative to the sensitivity of the tissue exposed to its effect (MAIA et al., 2009). The primary focus is direct DNA damage of neoplastic cells resulting in the loss of their clonogenicity. Ionizing radiation causes direct DNA damage by rupturing structural bonds of nitrogenous bases as well as indirect damage, triggered by the intense oxidative stress produced by the increase of reactive oxygen species (ROS); by the formation of other free radicals, which contribute to the lesions in DNA. However, changes in DNA sequencing; reading lead to changes in the mechanisms of cellular repair, resulting in structural, molecular; metabolic alterations. The cellular morphophysiological changes are responsible for both the clonogenic inhibition; the induction of the apoptotic process. However, even if the deleterious effects of

ionizing radiation result in a biological damage superior to the neoplastic cells in relation to the indirect damage submitted to the cells of adjacent healthy tissues, the radiotherapy remains indicated; supported (DEB; FIELDING, 2009). It is known that ionizing radiation causes damage to healthy; neoplastic tissues indiscriminately; its effects are manifested according to the inherent radiosensitivity of cells, tissue kinetics; the form of cellular organization (JELONEK et al., 2014). The deterministic effects of ionizing radiation are produced at high doses above a threshold where the severity of the damage increases with the applied dose. The probability of deterministic effect is zero for values below the dose threshold; with 100% occurrence for values above the threshold of cellular sensitivity. Stochastic effects do not present a dose threshold to occur, occurring in proportion to the radiation dose received, that is, there is an increase in the probability of occurrence of certain biological effects (HAMADA; FUJIMICHI, 2014; BOLUS, 2001).

Studies of exposed humans and animals indicate that gamma radiation can affect a wide variety of tissues, particularly those with higher levels of cellular turn-over; mitotic divisions (DEANGELIS; GUTIN, 2002; SCHULTHEISS; STEPHENS, 1992). Non-specific changes such as inflammation exudate; presence of mononuclear infiltrate; plasma cells are present in all organs. However, it is necessary to identify the pathophysiological mechanisms responsible for numerous adverse effects from the radiotherapy treatment. Thus we can mention the already documented radio induced changes such as cerebral edema, radiation necrosis; cerebral atrophy, neurocognitive deficits (LEE; CHENG, 1990), thickened bronchial wall; dilated alveolar space (FAJARDO, 1992), pneumonitis; pulmonary fibrosis (GUNDERSON; TEPPER, 2015), cardiomyopathy, myofibril reduction with fibrosis (JAFAR, 2011), hepatocytes with focal necrosis; being able to develop hepatic disease induced by radiation (LEA, 2010), nephritis with necrosis of the glomerular capillary; degeneration of the cellular lining of the proximal; distal tubules (HALPERIN et al., 2013).

Thus, while cellular pathophysiological mechanisms are not fully understood, it is necessary to review some radiotherapy protocols in order to attenuate the adverse effects induced by radioinduced.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Group selection

Statistical analyzes were performed using the data of the body weight of 40 male albino rats, 90 days old, of the *Rattus norvegicus*, Wistar line, with approximately 300 ± 15 g in weight. However, only 12 rats were used to perform the histological analysis, divided into two groups: one control (n = 3), called GC, another submitted to total body irradiation (TBI), called GIR (n = 09). Thus, the irradiated group was divided into two groups to investigate the radioinduced changes in the time kinetics of 04 days and 07 days for euthanasia. The 4-day group was composed of 04 rats slaughtered after four days of exposure; Finally, the 7-day group consisted of 05 rats, slaughtered after 7 days of exposure. The animals were submitted to the same period of photos of 12h day / night with free access to food; Water. Animals of the same lineage, family, of the same weight; age, were used to linearize the experiment, provided by the laboratory of the Federal University of Minas Gerais, Bioterium Central. All experiments were previously submitted; approved for CEUA-UFGM, protocol 339/2014, after standardization for animal care; euthanasia.

5.2.2 Irradiation Protocol

The animals of the GIR group had their total body irradiated through the exposition to a Co-60 source, all together placed in 4 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.

5.2.3 Euthanasia and organ preservation

The animals were fasted without deprivation of water in the boxes. Each one was submitted individually to the anesthetic procedure following CEUA protocol. The calculation of the anesthetic solutions of 5% Ketamine; 2% Xylazine at the doses of 80mg of ketamine +

15 mg of xylazine, both/kg of animal to be administered parenterally (intraperitoneal) was carried out, maintaining the V/V ketamine/Xylazine (2:1) ratio. After the administration of the anesthetics, tests were carried out to investigate the sedation; the consequent guillotining. A portion of the removed organs were weighed, frozen in ice CO₂ rapidly and stored at -80 ° C to be subjected to the cryostat cut protocols. After all procedures, should start DESI-MS analysis. The remainder of the organs of the groups 04 days; 07 days were weighed; fixed in 10% buffered formalin to make the cuts for confection of the histological slides.

5.2.4 Statics method

The Kruskal-Wallis test is a non-parametric alternative to the one-way ANOVA test, used when the assumptions of normality or equality of variances are met. This test is used to test the hypothesis of equality in location.

The hypotheses tested are: Distributions have the same location parameter; At least one of the populations has a location parameter higher or lower than the others; The Kruskal-Wallis test is based on the sum of the orders of the combined groups in ascending order. The smallest observation has value 1, the next value 2 and so on.

5.2.5 Histological method

The tissues will be submitted to histological processing for the preparation of slides; later observed; analyzed by light microscopy the routine histological technique consists of the following steps:

- A) fixation: interrupted the autolysis process when the material is placed in a Falcon 50 ml tube containing 10% buffered formalin in volume 20x higher than the organ volume.
- B) cleavage: reduce the size of the pieces to 3mm thick fragments to facilitate the penetration of the fixative substance in a shorter time
- C) processing: consisted of a preparation so that the pieces are later embedded in paraffin (or similar products); cut into very thin slices, so that the tissue structures can be observed under an optical microscope

Processing can be divided into:

-dehydration (removal of water so that the paraffin penetrates the tissue

- ethanol (70, 95; 100% -substitution of alcohol by a product in which the paraffin has affinity; dissolves as xylol)
- impregnation (substance that increases consistency; stiffness for cutting like paraffin)
- inclusion (embedded in paraffin wax)
- microtomy (4 μ m thick histological sections)
- staining; assembly with the majority of the slides using the bichrome combination considered universal staining in histology; histopathology is hematoxylin; eosin (HE); few slides need a special dye for structures to be visualized; analyzed.

The slides were observed under a common light microscope with a 400-fold increase, evaluating the presence of the following pathological alterations: inflammatory cells, edema; fibrosis; alterations in blood vessels by means of morphological analysis.

5.3. Results

5.3.1 Statistical analyzes of organ weights

Weights of the brain, heart, liver, lung, kidneys; gonads were observed in addition to the total weight of the rats' bodies. The analyzes were done in the statistical software SPSS, version 18. The level of significance considered was 5%.

The weights of the rats did not differ between the groups (Kruskal-Wallis non-parametric test, p-value = 0.097), that is, with 95% confidence,

Table 5.1 summarizes the descriptive findings of organ weights; Tab. 5.2 represents the Spearman Roh Coefficient. The tables demonstrate that the mass variation in the group of irradiated rats was not statistically significant, indicating that the effects of irradiation did not cause changes in body weight.

TABLE 5.1 - DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE TOTAL WEIGHT OF THE RATS, BY GROUPS

Descriptive Statistics											
Group		N	Average	Standard deviation	Variance	CV (%)	Minimum	Maximum	Percentile		
		Valid							25	50	75
Weight	Control	7	316,43	46,88	2197,62	14,81	267,00	376,00	270,00	292,00	366,00
	1 day	6	296,83	33,59	1128,57	11,32	246,00	345,00	274,50	296,50	321,00
	2 day	6	279,83	19,91	396,57	7,12	249,00	297,00	258,75	287,50	296,25
	4 day	10	310,80	18,62	346,84	5,99	263,00	329,00	306,50	316,00	321,25
	7 day	11	311,18	19,20	368,56	6,17	275,00	345,00	301,00	311,00	323,00
Brain	Control	7	1,89	0,15	0,02	7,78	1,71	2,09	1,75	1,92	2,00
	1 day	6	1,85	0,10	0,01	5,42	1,72	2,01	1,79	1,82	1,93
	2 day	6	1,88	0,06	0,00	3,43	1,78	1,96	1,83	1,88	1,93
	4 day	10	1,93	0,10	0,01	5,32	1,83	2,20	1,87	1,90	1,94
	7 day	11	1,96	0,08	0,01	4,29	1,84	2,11	1,89	1,98	2,02
Heart	Control	7	1,02	0,22	0,05	21,45	0,80	1,34	0,87	0,89	1,31
	1 day	6	0,88	0,05	0,00	5,85	0,81	0,94	0,82	0,87	0,93
	2 day	6	0,88	0,07	0,00	7,66	0,80	0,99	0,82	0,88	0,93
	4 day	10	1,03	0,19	0,04	18,88	0,75	1,32	0,89	0,97	1,18
	7 day	11	1,07	0,30	0,09	28,57	0,87	1,87	0,91	0,94	1,02
Lung	Control	7	1,64	0,23	0,05	13,85	1,29	1,93	1,47	1,61	1,90
	1 day	6	1,58	0,74	0,55	46,84	1,16	3,08	1,19	1,29	1,87
	2 day	6	1,63	0,26	0,07	15,74	1,23	1,85	1,35	1,73	1,83
	4 day	10	1,69	0,34	0,11	19,86	1,37	2,39	1,45	1,52	1,89
	7 day	11	1,92	0,46	0,21	24,09	1,38	2,58	1,47	2,01	2,37
Liver	Control	7	11,36	2,31	5,36	20,37	9,13	14,35	9,56	9,80	14,11
	1 day	6	10,82	1,57	2,48	14,55	8,42	13,13	9,53	11,07	11,78
	2 day	6	10,46	1,36	1,85	12,98	8,17	11,82	9,36	10,69	11,70
	4 day	10	12,48	1,49	2,22	11,94	9,47	14,04	11,36	13,09	13,69
	7 day	11	12,00	1,53	2,34	12,74	9,73	14,58	10,72	12,06	13,27
Kidney	Control	7	2,36	0,32	0,11	13,73	2,05	2,96	2,08	2,25	2,56
	1 day	6	2,39	0,26	0,07	10,97	1,98	2,76	2,19	2,39	2,60
	2 day	6	2,19	0,20	0,04	9,13	1,93	2,39	1,94	2,27	2,35
	4 day	10	2,36	0,25	0,06	10,51	1,76	2,63	2,32	2,42	2,49
	7 day	11	2,46	0,20	0,04	8,30	2,19	2,82	2,25	2,43	2,62
Testicles	Control	3	3,22	0,06	0,00	1,87	3,18	3,29	3,18	3,19	
	4 day	4	3,07	0,14	0,02	4,46	2,94	3,24	2,95	3,04	3,21
	7 day	5	2,78	0,18	0,03	6,42	2,63	3,05	2,65	2,68	2,95

TABLE 5.2 - SPEARMAN'S COEFFICIENT OF RHO

Spearman's Coefficient of Rho	Weight	Correlation Coefficient	1,000	,595**	,509**	,331*	,838**	,728**	0,494
		Sig. (bilateral)		0,000	0,001	0,037	0,000	0,000	0,103
		N	40	40	40	40	40	40	12
		% Explained	100%	35%	26%	11%	70%	53%	24%
	Brain	Correlation Coefficient		1,000	0,164	,482**	,466**	,517**	0,287
		Sig. (bilateral)			0,312	0,002	0,002	0,001	0,366
		N		40	40	40	40	40	12
		% Explained		100%	3%	23%	22%	27%	8%
	Heart	Correlation Coefficient			1,000	-0,091	,537**	,367*	-0,105
		Sig. (bilateral)				0,578	0,000	0,020	0,746
		N			40	40	40	40	12
		% Explained			100%	1%	29%	13%	1%
	Lung	Correlation Coefficient				1,000	0,241	,330*	0,182
		Sig. (bilateral)					0,135	0,037	0,572
		N				40	40	40	12
		% Explained				1%	6%	11%	3%
	Liver	Correlation Coefficient					1,000	,805**	,608*
		Sig. (bilateral)						0,000	0,036
		N					40	40	12
		% Explained					1%	65%	37%
Kidney	Coeficiente de Correlação						1,000	0,287	
	Sig. (bilateral)							0,366	
	N						40	12	
	% Explained						1%	3%	
Testicles	Correlation Coefficient							1,000	
	Sig. (bilateral)								
	N							12	
	% Explained							1%	

** . The correlation is significant at the 0.01 level (bilateral).

* . The correlation is significant at the 0.05 level (bilateral).

5.3.2 Histopathological analyses of organs

Histological slides stained with hematoxylin eosin (HE) were analyzed in a lower magnification (100x) and higher magnification (400x) and observed the main characteristics between the control group and the irradiated group.

5.3.2.1 Brain

FIGURE 5.1 - BRAIN 100x SLIDES

Brain - 100x

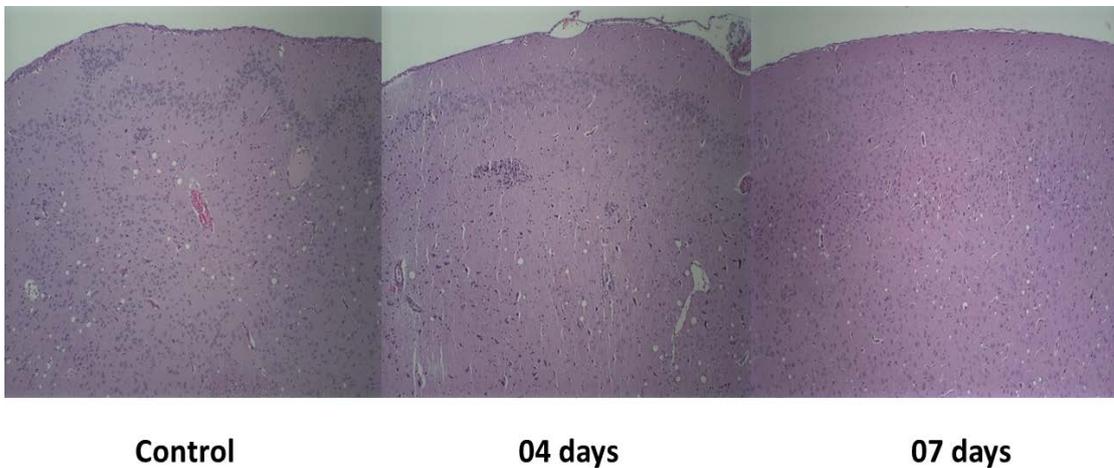


FIGURE 5.2 - BRAIN 400x SLIDES

Brain - 400x

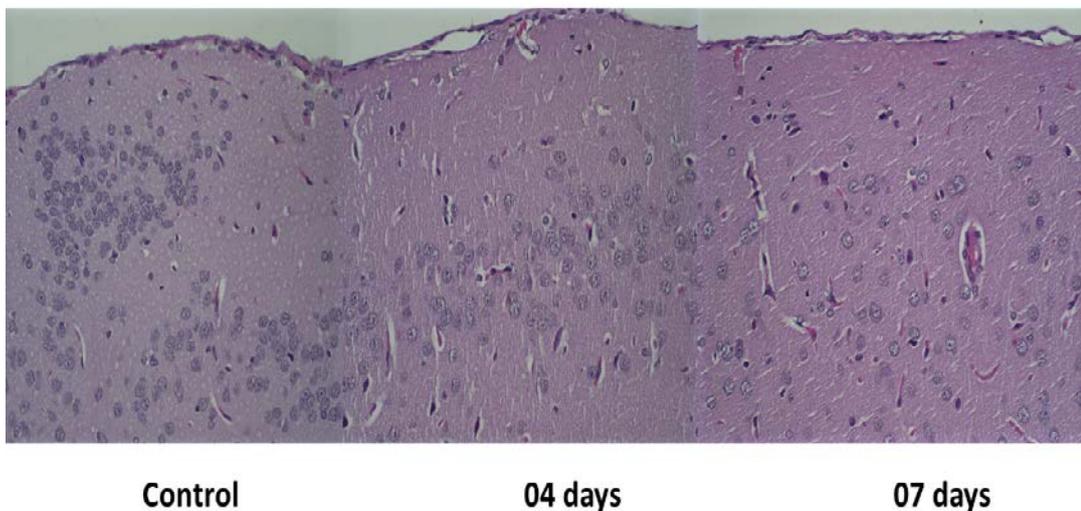
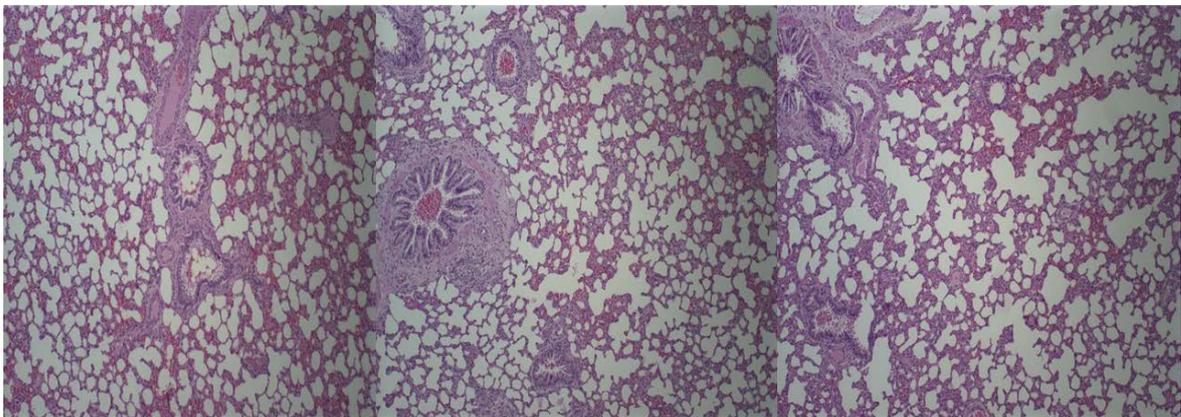


Fig 5.1 and Fig 5.2 - Brain slides from the irradiated group do not present changes such as inflammatory lymphomononuclear infiltrates, edemas, vascular degenerations and areas of necrosis.

5.3.2.2 Lung

FIGURE 5.3 – LUNG 100x SLIDES

Lung - 100x



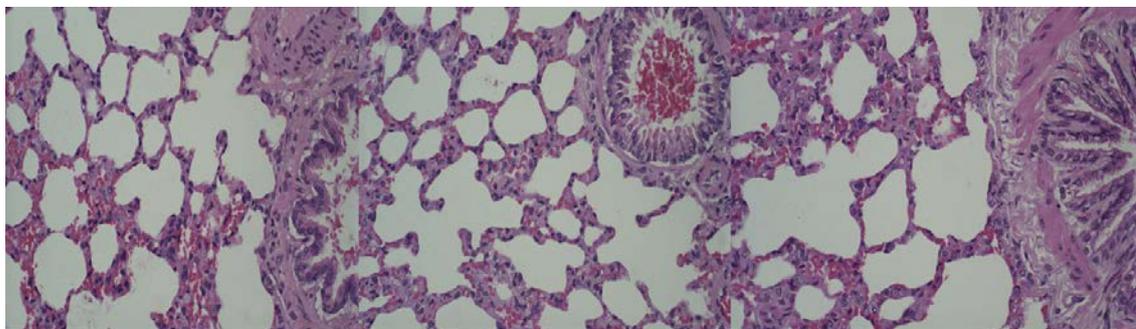
Control

04 days

07 days

FIGURE 5.4 - LUNG 400x SLIDES

Lung - 400x



Control

04 days

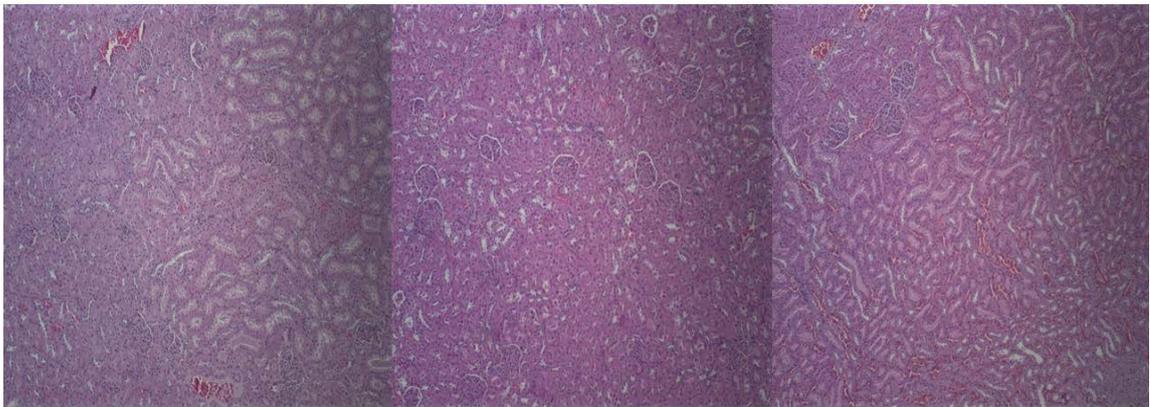
07 days

Fig.5.3 and Fig. 5.4 - Lung plaques of the irradiated group do not present changes such as inflammatory lymphomononuclear infiltrates, exudates, edema and thickening of the bronchial wall.

5.3.2.3 Kidney

FIGURE 5.5 - KIDNEY 100x SLIDES

Kidney - 100x



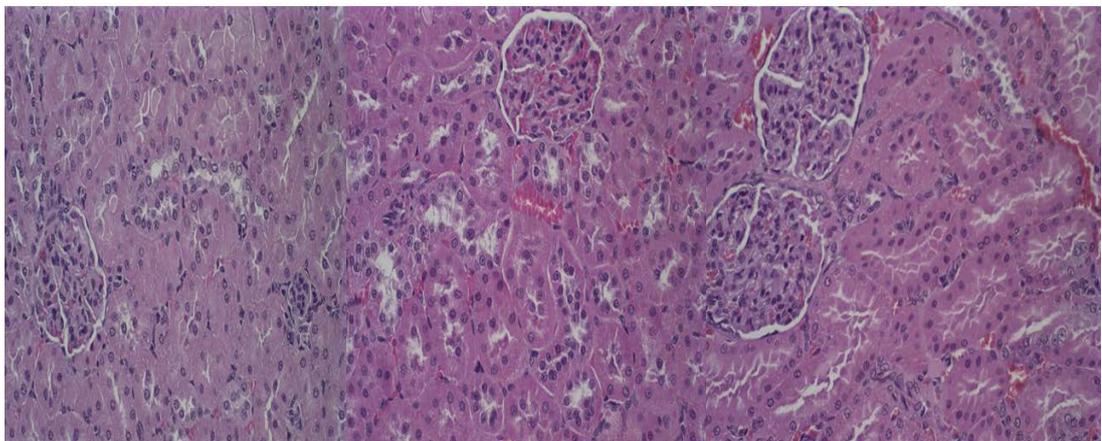
Control

04 days

07 days

FIGURE 5.6 - KIDNEY 400x SLIDES

Kidney - 400x



Control

04 days

07 days

Fig. 5.5 and Fig. 5.6: 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.

5.3.2.4 Liver

FIGURE 5.7 - LIVER 100x SLIDES

Liver - 100x



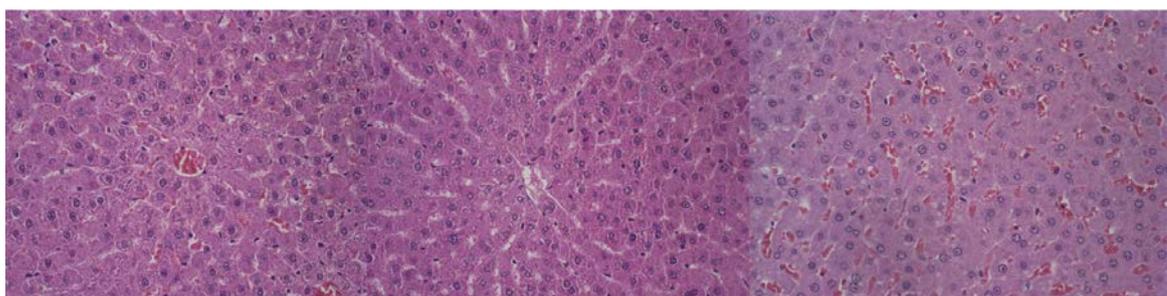
Control

04 days

07 days

FIGURE 5.8 - LIVER 400x SLIDES

Liver - 400x



Control

04 days

07 days

Fig 5.7 and Fig 5.8: 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.

5.3.2.5 Heart

FIGURE 5.9 - HEART 100X SLIDES

Heart - 100x

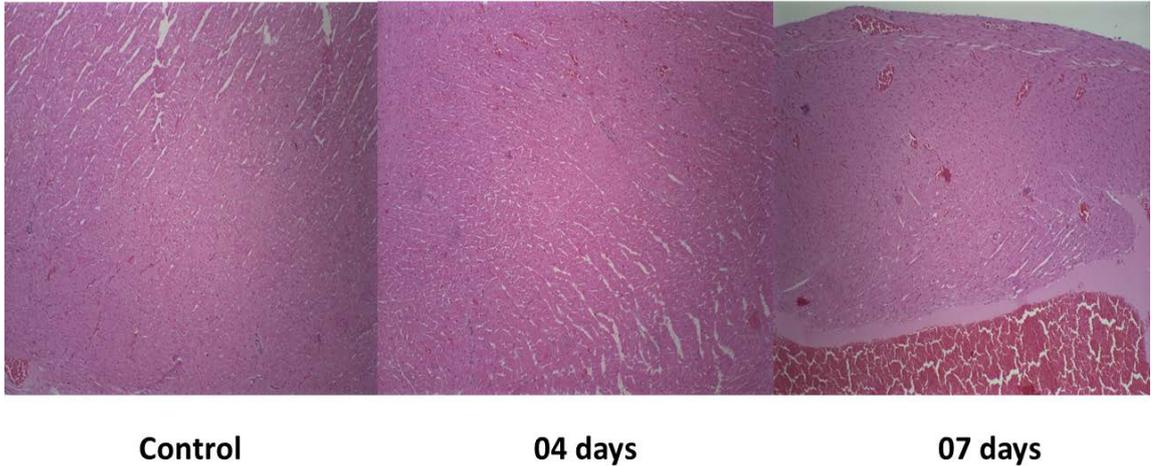


FIGURE 5.10 - HEART 400X SLIDES

Heart - 400x

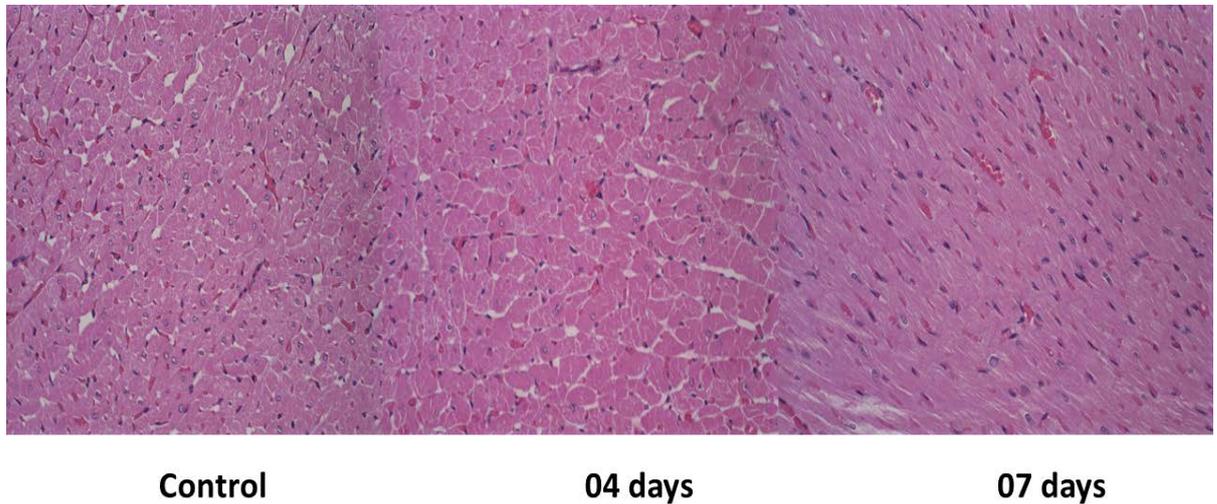


Fig 5.9 and Fig 5.10: Heart laminations of the irradiated group demonstrate preservation of skeletal striated muscle structure without the presence of myofibrillar degeneration, without areas of myofibrils necrosis and without areas of fibrosis.

5.4 Discussion

Ionizing radiation has enough energy to cause electronic excitation; ionization, causing the breakdown of chemical bonds in the biological molecules (DNA, lipids, proteins) of tissues (YOSHIMURA, 2009). Gamma rays are low radiations commonly used in RT that produce ionization with ROS (reactive oxygen species). Dose; Dose rate is essential in the analysis of absorbed energy in patients with RT. The clinical response to a deterministic effect is directly related to frequency; absorbed dose rate exceeding a dose limit relative to the sensitivity of the tissue exposed to the effect (KOLOMIYTSEVA et al., 2012). The results demonstrate that in the kinetics of time given, it is not possible to evaluate possible tissue damages and it is necessary to carry out a methodology capable of evaluating molecular metabolic alterations. Polyunsaturated fatty acids as well as the structural lipids of cell membranes are widely susceptible to damage caused by gamma irradiation. Lipid peroxidation is a cytotoxic event defined by successive oxidations of fatty acids and membranes. The by-products formed generate structural and functional damage to the cell membrane causing change in ionic flow (ACKERSTAFF et al., 2003) and metabolism. Thus, it is possible to identify some radioinduced changes such as changes in serum phospholipid (PL) levels, selective permeability alteration and cellular signaling and, finally, increased signaling to trigger apoptosis (WANG et al., 2009; KOLOMIYTSEVA et al., 2012; GABER, 2005).

5.5 Conclusion

The effects of ionizing radiation should be better identified and understood. Although there are no macroscopic and microscopic changes evident, it is necessary to go even deeper into the metabolic analysis techniques in order to understand the mechanisms that can alter the structures and the cellular function. Thus, in the radiotherapy treatments, the responses of the tissue countless times can go unnoticed or even appear long after the moment of exposure. Even with all concern about delineating tumor volume through conformational techniques, it is necessary to understand the mechanisms of metabolic alterations to minimize part of the side effects. In the near future, the possibility of biomarkers of toxicity in radiotherapy should be investigated to ensure greater safety and quality of life for the pacemaker.

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 master scholarship. Also, thanks to Luciana Gonçalves, statistician responsible for data analysis, Professor Geovanni Cassali from Pathology department from ICB/UFMG, Professor Patricia Massara from Morphology Department of ICB/UFMG. We are thankful to CNPq due to the REBRAT/SUS, 2013, project. We are thankful to the institutional support from CAPES, CNPq e FAPEMIG.

REFERENCES

- FORMAN, D; FERLAY, J. **World Cancer Report 2014**. The global; regional burden of cancer, Lyon, 2014. p.16-53.
- HALL, E. J; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist**. 7thed. Philadelphia, Ed. Lippincott Williams; Wilkins, 2012.
- EMICO, Okuno; YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das Radiações**. Oficina dos textos, 2^a ed. 2010.
- 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.
- 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.
- 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.
- HAMADA, Nobuyuki; FUJIMICHI, Yuki. **Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation; future prospects**. Journal of Radiation Research, 2014. p.629-640.
- BOLUS, Norman E. **Basic Review of Radiation Biology; Terminology**. J Nucl Med Technol 29(2): 2001. p.67–73.
- DEANGELIS, L. M; GUTIN, P. H; LEIBEL, S. A. **Murtin Dunitz Ltd. Interacranial tumors**. Dignosis; Treatment, 2002.
- RUBIN, P; D. M. GASH, J. T; HANSEN, D. F. Nelson; WILLIAMS, J. P. **Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation**. Radiother Oncol., 1994. p.51-60.
- SCHULTHEISS, T. E; STEPHENS, L. C. **Permanent radiation myelopathy**. Br J. Radiol., 1992, p.737-753.
- LEE, A. W. M; CHENG, L. O. C. **Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of late temporal lobe necrosis following radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma**. Clin. Radiol, 42: 1990. p.24-31.
- FAJARDO, L. F. **Morphology of radiation effects on normal tissues**. Principles; Practices of Radiation Oncology, 2nd Ed. New York: Lippincott,1992. p.114-123.

- GUNDERSON, Leonard L; TEPPER, Joel E. **Clinical radiation Oncology**. Elsevier, 2015.
- JAFAR, Behboud. **Investigation of Cobalt radiation on the Heart of Rat**. J. Basic. Appl. Sci. Res., 1(12) 2011. p.2932-2934.
- LEA, Marks. **Use of normal tissue complication probability models in the clinic**. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2010;76(3): S10-9
- HALPERIN, E. C et al. **Perez; Brandy's Principles; Practice of Radiation Oncology**. LWW. Sixth Edition.
- Yoshimura, E. M. **Física das Radiações: interação da radiação com a matéria**. Revista Brasileira de Física Médica, São Paulo, 2009.
- KOLOMIYTSEVA, I. K et al. **Nuclear; chromatin lipids: metabolism in normal; γ -irradiated rats**. Bioelectrochemistry, Vol. 58, Elsevier, Moscow, 2012. p.31-39.
- ACKERSTAFF, E et al. **Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells?** Journal of Cellular Biochemistry, Vol. 90, United States, 2003. p.525-533.
- 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.
- KOLOMIYTSEVA, I. K et al. **Nuclear; chromatin lipids: metabolism in normal; γ -irradiated rats**. Bioelectrochemistry, Vol. 58, Elsevier, Moscow, 2012. p.31-39.
- GABER, Mohamed. H. **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 – ALTERAÇÕES LIPÍDICAS EM TECIDO CEREBRAL EXPOSTO A RADIAÇÃO DE BAIXA LET

6.1 Introdução

O cérebro apresenta uma alta proporção de lipídios estruturais e metabólicos atuando na homeostase modulando a neurotransmissão, plasticidade sináptica, canais iônicos, expressão gênica e inflamação (HORROCKS, et al., 2004; BAZINET, et al., 2014; CERMENATI, et al., 2015). A regulação do lipidoma ainda está mal compreendida.

A identificação e a análise das interações com outras moléculas e demais metabólitos, permite compreender melhor a resposta celular frente aos estímulos externos. Assim, as modernas técnicas de espectrometria de massas permitem avaliar as inúmeras alterações quantitativas (intensidade) e qualitativas (conformacional, distribuição espacial e cinética de resposta). DESI-MS permite a formação de imagens permitindo definir áreas anatômicas de interesse pela distribuição das inúmeras classes de lipídios no tecido cerebral tais como ácidos graxos (FA- fatty acids), glicerofosfolipídios (GP), glicerolipídeos (GL), esfingolipídios (SP) e lipídios esteróis (ST) (Eberlin et al., 2011). Fosfolipídios, esfingolipídios e glicerolipídios podem ser detectados em tecidos como coração, rim e cérebro (MURPHY, et al., 2008; IFA, et al., 2010).

Lipídios cerebrais estão envolvidos nos processos de sinalização intracelular com implicações na neurotransmissão além de sua participação na proliferação celular, crescimento e neuroproteção (OSBORNE; MEUNIER, 2001). Além disso, existem receptores específicos que desencadeiam sinalização intracelular assemelhando-se a "neuropeptídeos", podendo ser denominados como "neurolipídios" constituindo, assim, uma nova classe de neurotransmissores no sistema nervoso (ANLIKER; CHUN, 2004). A biossíntese de neurolipídeos está relacionada ao metabolismo de fosfolípidos de membrana, controladas por enzimas específicas, principalmente fosfolipases (GAITS et al., 1997). 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).

As espécies reativas do oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) causam a peroxidação lipídica 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 tais como inibição da mitose e indução de apoptose (ACKERSTAFF et al., 2003; WANG et al., 2009). Ácidos graxos poli-insaturados e lipídios estruturais de membrana celular são amplamente suscetíveis aos danos da irradiação gama causando alteração da permeabilidade, sinalização celular e apoptose.

A espectrometria de massa pode detectar e analisar produtos de lipídios oxidados pela perda um grupo hidroperoxi ou hidroxil. Após um trauma de crânio (TBI) foi detectado um aumento de marcadores de peroxidação lipídica tais como F2-isoprostanos e malondialdeído, no tecido cerebral, líquido (CSF) e soro após TBI experimental e clínico (HOFFMAN et al., 1996; LEWEN et al., 2000; ROOF; HALL, 2000; BAZAN, 2006; TYURIN et al., 2000; KASPRZAK et al., 2001; BAYIR et al., 2002; SINGH et al., 2006; SEIFMAN et al., 2008). Fosfolípidos altamente abundantes, como o PC e fosfatidiletanolamina, não foram substratos para oxidação enquanto os menores fosfolípidos aniônicos eram substratos preferidos para oxidação (BAYIR et al., 2007; TYURIN et al., 2008).

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Principais reagentes

DESI

- Dimetilformamida (DMF);
- Acetonitrila (ACN);
- Metanol;
- Etanol ;
- Nitrogênio gás nebulizador (N₂).

Eutanásia

- Éter etílico;
- Cetamina a 5%;
- Xilazina a 2%;
- Água Deionizada (Milli-Q);
- Solvente apolar de cadeia longa (n-pentano, n-hexano ou n-heptano);
- Gelo seco (CO₂) ~5Kg.

Lâminas Histológicas

- Formaldeído 37-40% tamponado;
- Fosfato de Sódio Monobásico;
- Fosfato de Sódio Dibásico;
- Hematoxilina;
- Eosina solúvel em água;
- Álcool Etílico 70%, 80%, 90% e 100%;
- Alúmen de amônio ou potássio;
- Água destilada;
- Óxido vermelho de mercúrio;
- Ácido acético;
- Xilol;
- Parafina.

Lâminas criogênicas

- Tissue-Tek O.C.T.

6.2.2. Principais equipamentos

- EPI (01 óculos, 01 jaleco ou roupa de procedimento, 01 caixa de luvas de procedimento);
- Instrumentos Cirúrgicos (01 Hemostática, 02 pinças reta, 01 pinça dente de rato, 01 tesoura cirúrgica curvada ponta romba, 01 tesoura cirúrgica curava ponta fina, 01 tesoura cirúrgica reta ponta fina, 01 tesoura cirúrgica reta ponta romba, 01 alicate, 01 espátula curva);
- 01 cuba grande e rasa polipropileno para cirurgia dos animais ;
- Guilhotina;
- Balança de precisão analítica (pesagem dos órgãos);
- Balança comum (pesagem dos animais);
- Folhas de papel alumínio;
- 01 placa de petri;
- Zip-Lock pequeno (180 unidades);
- Caneta retroprojeter ponta porosa para identificação;
- 04 Beckeres (02 para a eutanásia e 02 para congelamento dos órgãos no isopor com gelo seco);
- 02 Seringas hipodérmicas de 1mL com 02 agulhas intramusculares 25x08mm;

- Caixa de isopor;
- 09 Caixas de polipropileno com grade e bebedouro para manutenção em biotério;
- Luvas de proteção (construção civil) para manipulação dos animais;
- Sacos plásticos de lixo comum;
- Sacos plásticos para descarte de produtos biológicos;
- Planilha impressa para registro do peso dos animais e dos órgãos para cada animal;
- Placa de Petri;
- Forno a 85°C;
- Sublimador com bomba de vácuo;
- Ultra Freezer -80°C;
- Criostato Leica CM-3050S;
- DESI-MS ThermoFisher Scientific Q exactive Orbitrap MS.

6.2.3 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar Hannover de 11 semanas, com massa variando entre 250 g e 300 ± 15 g adquiridos do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO). Para linearizar as variáveis foram utilizados animais da mesma linhagem, família, com mesmo peso e idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, sob condições constantes de temperatura, umidade e fotoperíodo de 12 horas, com livre acesso a alimentação e água. Todos os experimentos foram realizados com os animais sob anestesia geral induzida por injeção intramuscular de uma associação de cetamina 5% (0,2mL para cada 100g de peso corporal) e xilazina 2% (0,1mL para cada 100g de peso corporal) com relação em V/V Cetamina/Xilazina: 2:1, conforme os protocolos anestésicos sugeridos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal. Os experimentos com animais ocorreram mediante a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA - UFMG), (Protocolo número 339/2014– ANEXOS B, C e D).

6.2.4 Metodologia e procedimentos

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 foto período 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.

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.

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

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 retirada a pele da cabeça com a tesoura de ponta final, 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

Confecção das lâminas (Criomicrotomia)

Lâminas

-2 pinceis extrafino longo (01 sintético e 01 natural) e 01 pincel grosso

-Laminas para criostato descartável para corte histológico perfil alto 818 Leica

- 01 Tubo Tissue-Tek O.C.T
- Luvas de procedimento
- Laminas para histologia
- Sacos plásticos para descarte de material descartável e biológico
- Caixa de isopor com gelo seco (~5kg)
- Porta Lâminas 02 caixas de 50 lâminas J-Prolab
- Placas Poliméricas FlexiMass DST para MALDI

As seguintes etapas foram seguidas:

1. Foi congelado rapidamente todo o tecido em um freezer (-80°C) até a confecção das lâminas no criostato. Foi ajustado o micrótomo 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. 6.1 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 lâminas 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 6.1 - 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	❄	❄	

2. 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.
3. 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.
4. 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
5. Foi colocado algumas lâminas que seriam utilizadas dentro da câmara criostática já devidamente higienizadas para que estabeleçam um equilíbrio térmico com a câmara criostática.
6. Foi colocado o hemisfério cerebral seccionado desejado em cima do Tissue-Tek OCT até a sua completa solidificação
7. Foi colocado o disco da amostra no cabeçote e iniciado o shaving até se obter cortes uniforme e sem ranhuras.
8. 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.
9. 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 micro fraturas ou perda do corte (corte esfarelado).

10. 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.**
11. 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
12. 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.
13. 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
14. Identificou-se a lâmina e foi retornada para a caixa de lâminas
15. 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 controle/experimentais, do mesmo órgão eram trocadas. As lâminas foram limpas com papel toalha.

PROTOSCOLOS 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:

- Solvente: DMF:ACN (1:1)
 - Tensão aplicada no spray de 5kV
 - Taxa de fluxo de solvente de 3,5µl/min
 - Fluxo: (ul/s): 458,93
 - Resolução de 70.000
 - AGC Target: 5e⁶
 - Tempo máximo de injeção: 200 ms
 - Temperatura do capilar: 300°C
 - Pressão de 175 psi de gás nebulizador N₂
 - Full MS, modo íon negativo [M-H-]
 - Massas na faixa de m/z 200 – 1000
 - Ângulo incidência de 54° entre a fonte e a superfície do analito
 - S-Lens RF level: 100

Imagem Tecidual

Foi instalado os programas nas seguintes ordens:

- BIOMAP: o IDL foi instalado primeiro para depois ser instalado o Biomap

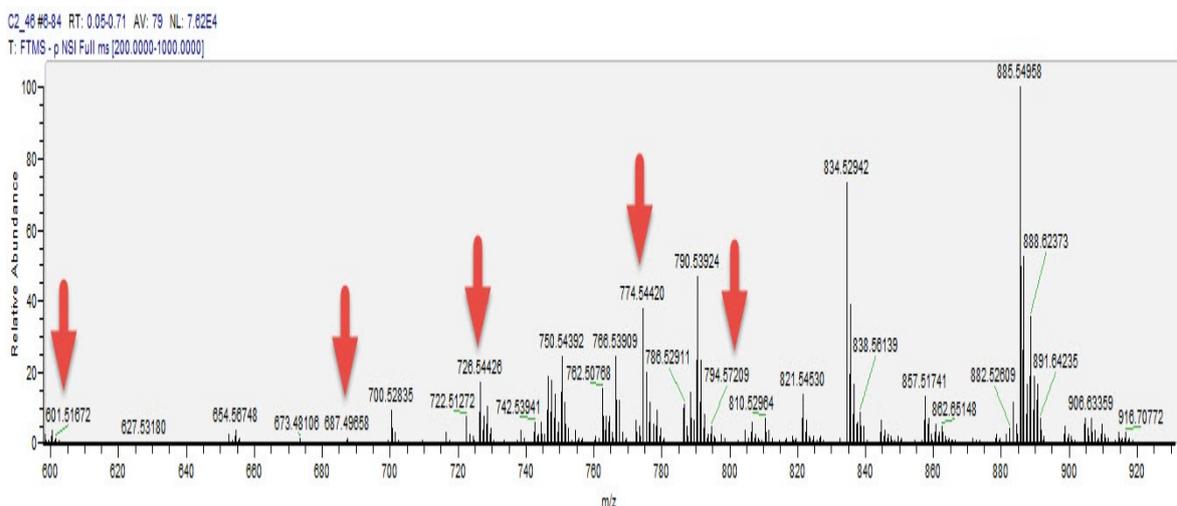
- Xcalibur: foi instalado o Foundation 3.0 primeiro para depois ser instalado o Xcalibur (o antivírus foi desabilitado para se evitar o travamento da instalação)
- Prosolia FireFly: foi realizado a instalação direta.

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

6.3 Resultados

Após a aquisição das imagens dos íons provenientes do tecido cerebral de ratos Wistar pode-se perceber alterações pertinentes entre o grupo controle e o irradiado. Teve-se o cuidado de avaliar as regiões centrais a fim de se estabelecer um padrão de comparação. Abaixo pode-se perceber o espectro gerado em um ponto pertencente a linha 46 do grupo controle, onde foram destacados alguns íons selecionados, conforme ilustra a Fig. 6.1 abaixo:

FIGURA 6.1 - ESPECTRO DO CONTROLE (C2)



A Fig. 6.1 mostra os principais íons constituintes e formadores do perfil lipídico cerebral. As setas indicam os íons selecionados com alterações mais significativas

Foram inúmeros íons com seus respectivos isômeros, isótopos e isotopólogos observados na análise. Diferenças sutis foram observados em vários íons, contudo, foi selecionado os principais íons marcadores, com diferenças substanciais na intensidade e na área topográfica expressa, sendo relacionados na Tab. 6.2 abaixo:

TABELA 6.2 - PRINCIPAIS LIPÍDIOS QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES ENTRE OS GRUPOS E ENTRE OS ANIMAIS IRRADIADOS

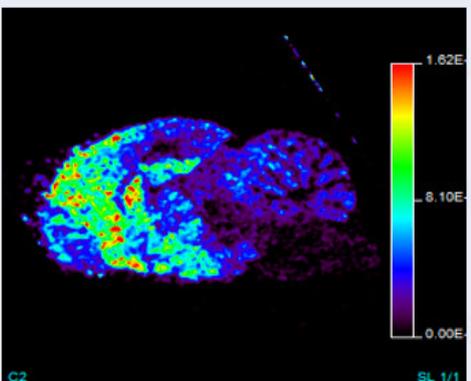
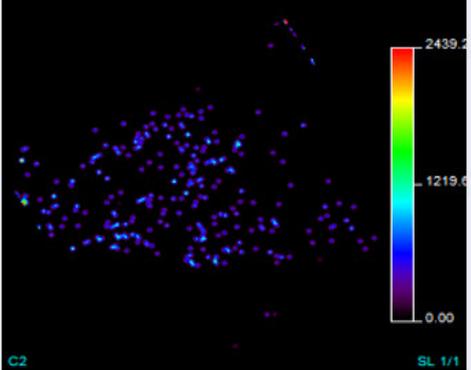
Ions marcadores (<i>m/z</i>)	
600.513	749.528
607.471	774.544
608.525	794.622
625.514	856.508
652.552	868.529
687.497	901.544
689.535	902.547
713.512	914.693
726.544	

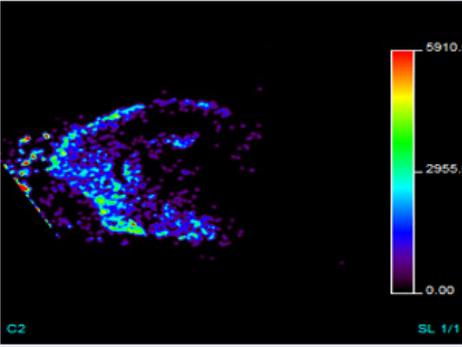
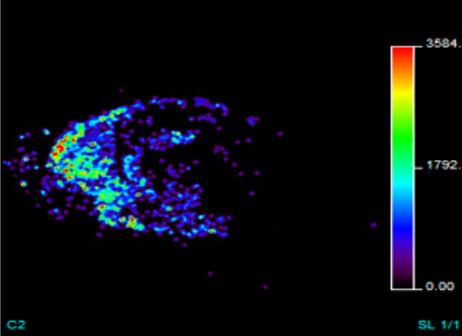
6.3.1 Análise da distribuição topográfica cerebral dos íons

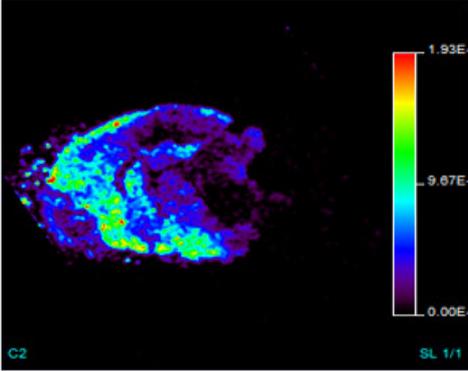
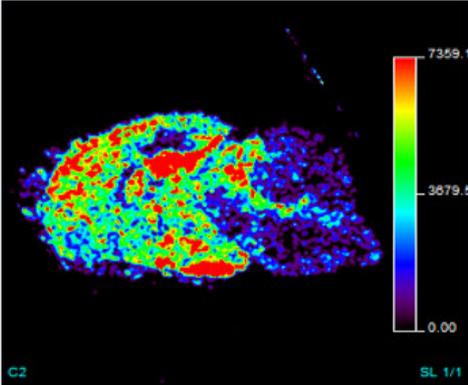
6.3.1.1 Análise da distribuição topográfica cerebral dos íons no controle

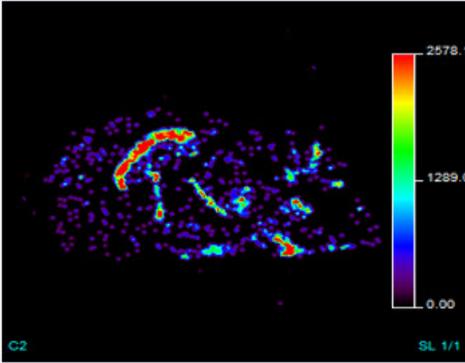
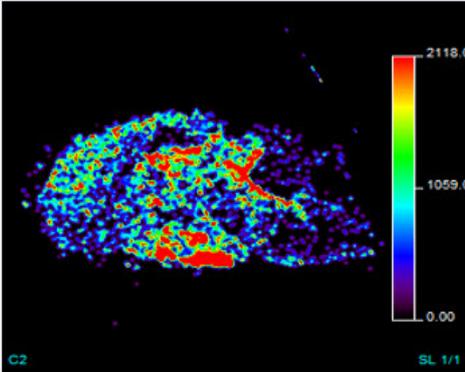
Os íons foram selecionados tendo por base as alterações nas distribuições regionais percebida pela intensidade dos íons nas imagens adquiridas. Para realizar a comparação entre o tecido cerebral controle e experimental com as respostas teciduais na respectiva cinética de tempo (24hr, 48hr, 96hr e 1 semana), as intensidades dos íons foram devidamente equalizadas para fins de comparação. A Tabela 6.3 demonstra as principais áreas regionais dos íons selecionados do grupo controle:

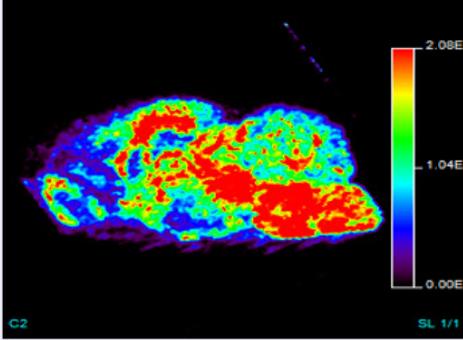
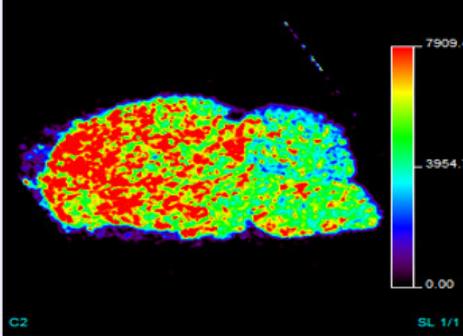
TABELA 6.3 - DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA CEREBRAL DOS IONS CONTROLE (C2)

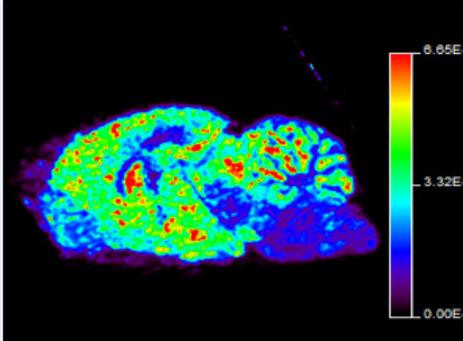
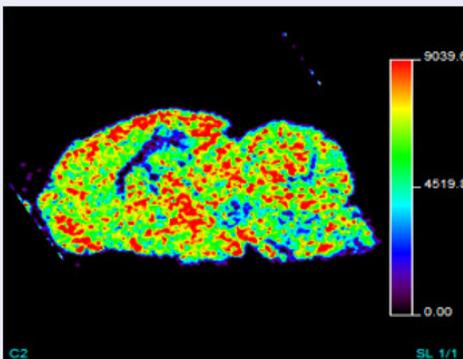
m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
600.513		Lipídio constituinte presente nas regiões olfatória, isocórtex, hipocampo, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)
607.471		Lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende bulbo olfatório, isocórtex, hipocampo, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)

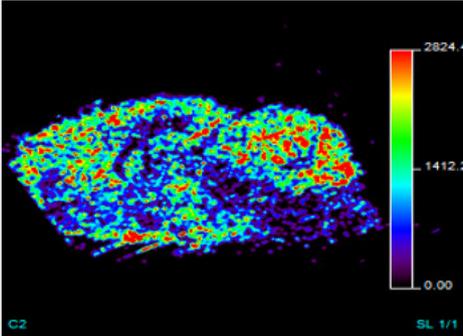
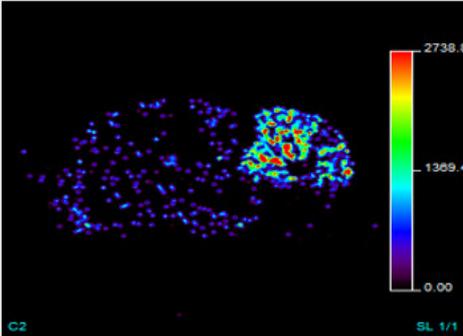
m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
608.525		Lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)
625.514		Lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex (giro orbital), núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)

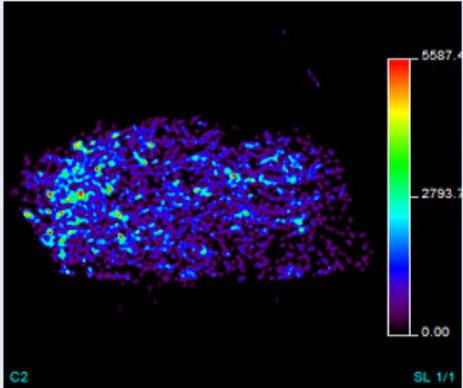
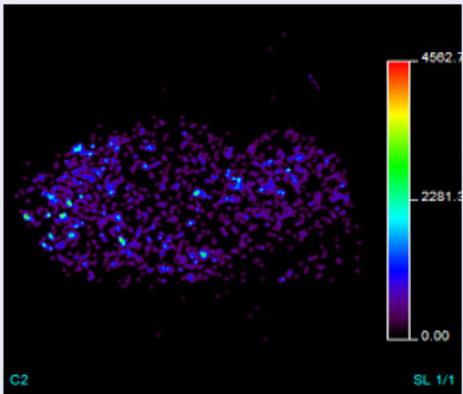
m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
652.552		Lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex, núcleos da base, área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme) e hipotálamo
687.497		Lipídio constituinte presente principalmente nas regiões do isocórtex, hipocampo, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme) e região do tálamo (hipotálamo em maior intensidade)

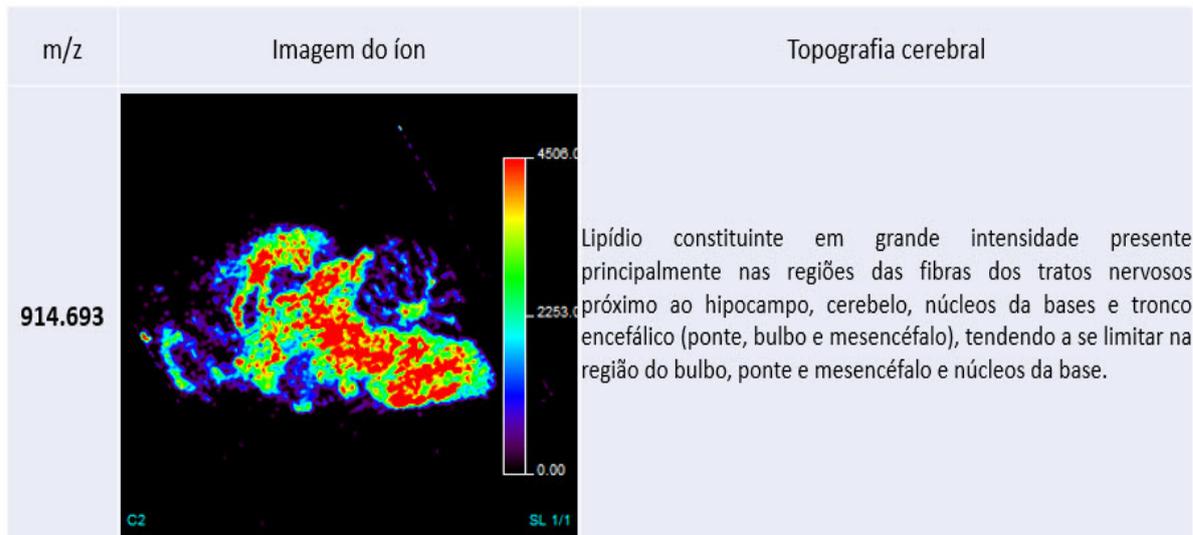
m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
689.535		Lipídio constituinte em grande intensidade presente principalmente nas regiões das fibras dos tratos nervosos próximo ao hipocampo, cerebelo, núcleos da bases e tronco encefálico (ponte, bulbo e mesencéfalo).
713.512		Lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex, hipocampo, núcleos da base, mesencéfalo (colículo superior sensorial e motor e colículo inferior), rombencéfalo que compreende a ponte (núcleo tegmental laterodorsal e substância pontinha cinzenta central) e o bulbo (núcleo vestibular medial)

m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
726.544		Lipídio constituinte presente principalmente nas regiões do isocórtex, hipocampo, mesencéfalo (toda a região central e colículo superiores sensorial e motor), ponte (núcleo tegmental reticular, núcleo reticular pontinho e complexo olivar superior) e bulbo (toda a região), região do tálamo (pontualmente na área superior, exceto hipotálamo), bulbo olfatório (externo a área granular), fibras do cerebello e núcleo do cerebello.
749.528		Lipídio constituinte presente principalmente em todo cérebro (área olfatória, isocórtex, área subcortical, núcleos da base, hipocampo), difusamente no tálamo e mesencéfalo e em algumas áreas do rombencéfalo e cerebello.

m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
774.544		Lipídio constituinte presente principalmente nos lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula), mesencéfalo (substância cinzenta periaquedutal), região retrohipocampal (subículo), núcleos da base difusamente (mais intenso no núcleo septal lateral caudal e rostral) e difusamente no isocórtex (área orbital frontal e somatomotora), tálamo e hipotálamo.
794.622		Lipídio constituinte presente principalmente em todo cérebro (área olfatória, isocórtex, área subcortical, núcleos da base, exceto hipocampo), difusamente no tálamo e pontualmente no hipotálamo, mesencéfalo e difusamente nos lóbulos cerebelares, ponte (núcleo tegmental laterodorsal e substância pontinha cinzenta central) e o bulbo (núcleo cuneiforme, núcleo do trato solitário, núcleo vestibular espinhal, núcleo vestibular medial).

m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
856.508		Lipídio constituinte presente principalmente em no isocórtex, núcleos da base – tubérculo olfatório, hipocampo, difusamente no tálamo/hipotálamo, mesencéfalo (substancia periaquedutal cinzenta) e difusamente nos lóbulos cerebelares.
868.529		Lipídio constituinte presente principalmente em nos lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula).

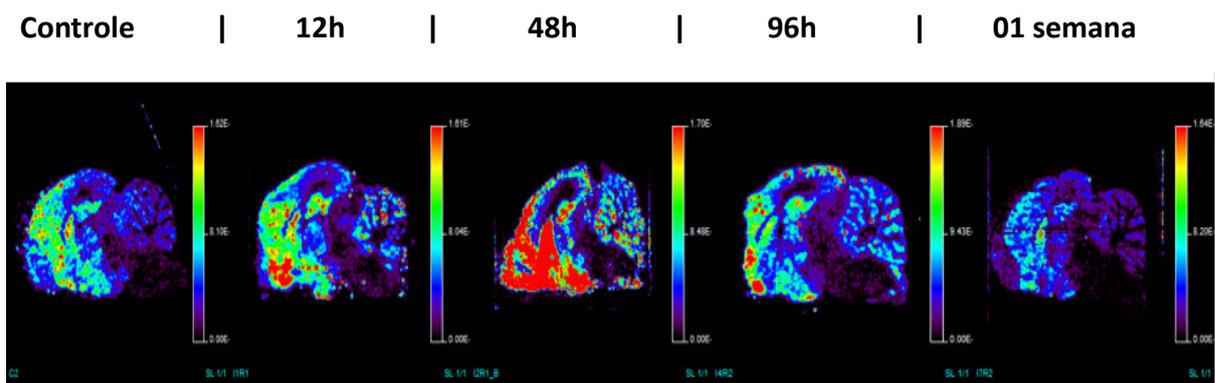
m/z	Imagem do íon	Topografia cerebral
901.544		Lipídio constituinte presente principalmente no isocórtex (área frontal orbital e área olfatória) com baixa intensidade.
902.547		Lipídio constituinte presente em baixa intensidade difusamente no encéfalo.



6.3.1.2 Análise da distribuição topográfica cerebral dos íons pós-irradiação em cinética temporal

As imagens selecionadas evidenciam os principais lipídios que sofreram alteração na intensidade e na sua distribuição após os tecidos sadios serem submetidos a exposição da radiação gama. Percebe-se as seguintes alterações vistas nos lipídios selecionados:

FIGURA 6.2 - ÍON 600.513



Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente nas regiões olfatória, isocórtex, hipocampo, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)

Alterações:

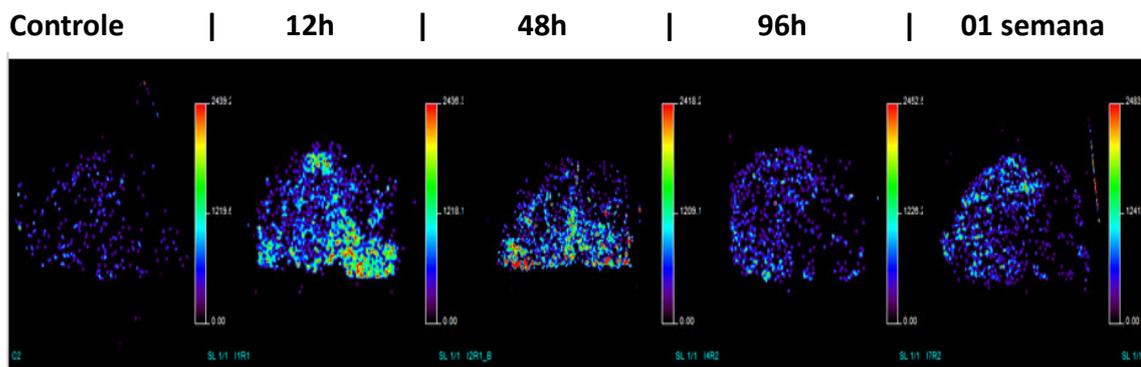
- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se um aumento da intensidade do sinal principalmente no hipocampo, área olfatória poupando a região central

correspondente a camada granular do bulbo olfatório, isocórtex principalmente no lobo frontal correspondente ao giro orbital e parte da área somatomotora superior.

Novas áreas: surgimento na área hipotalâmica, mesencéfalo (colículos superior sensorial e motor, colículo inferior e substância periaquedutal), rombencéfalo que compreende a ponte (núcleo tegmental laterodorsal e substância pontinha cinzenta central) e o bulbo (núcleo cuneiforme, núcleo do trato solitário, núcleo vestibular espinhal, núcleo vestibular medial, núcleo reticular lateral e núcleo reticular paragigantocelular)

- Irradiados 96hrs e 1 semana: diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios em todas as áreas supracitadas, inclusive com o desaparecimento por completo das novas áreas registradas

FIGURA 6.3 - ÍON 607.471

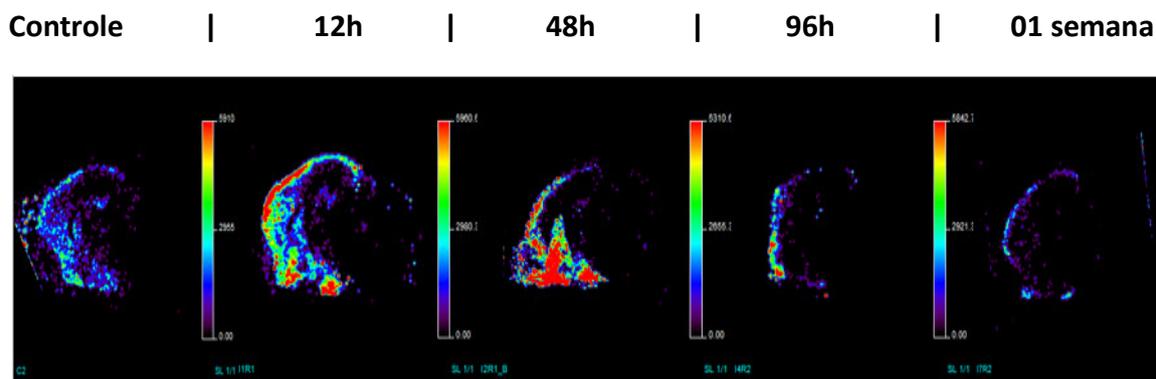


Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende bulbo olfatório, isocórtex, hipocampo, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se um aumento da intensidade do sinal principalmente no hipocampo (apenas para o 24hrs), área olfatória e no rombencéfalo (bulbo e ponte).
- Irradiados 96hrs e 1 semana: diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios e aumento de intensidade pontual na área hipocampal para o irradiado com 1 semana

FIGURA 6.4 - ÍON 608.525

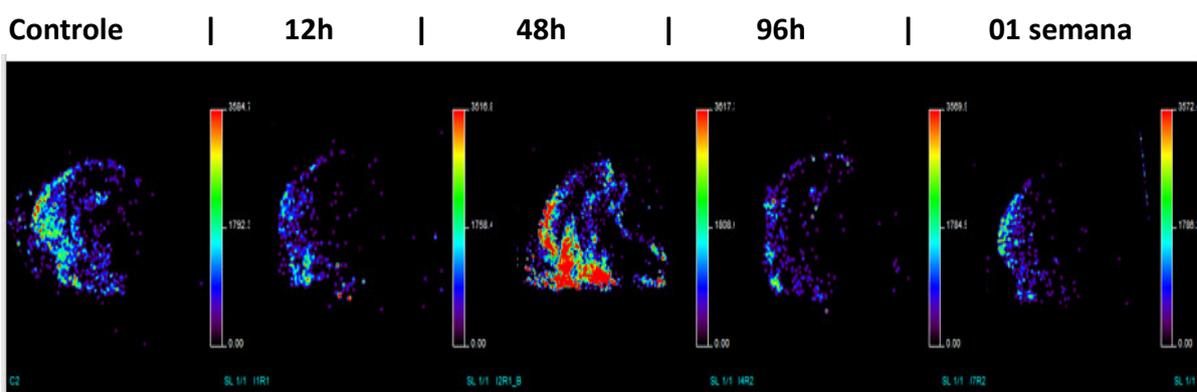


Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se um aumento da intensidade do sinal principalmente na área hipotalâmica, núcleos da base, na área somatomotora no isocórtex e pontualmente em algumas regiões na área olfatória.
- Irradiados 96hrs e 1 semana: diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios

FIGURA 6.5 - ÍON 625.514

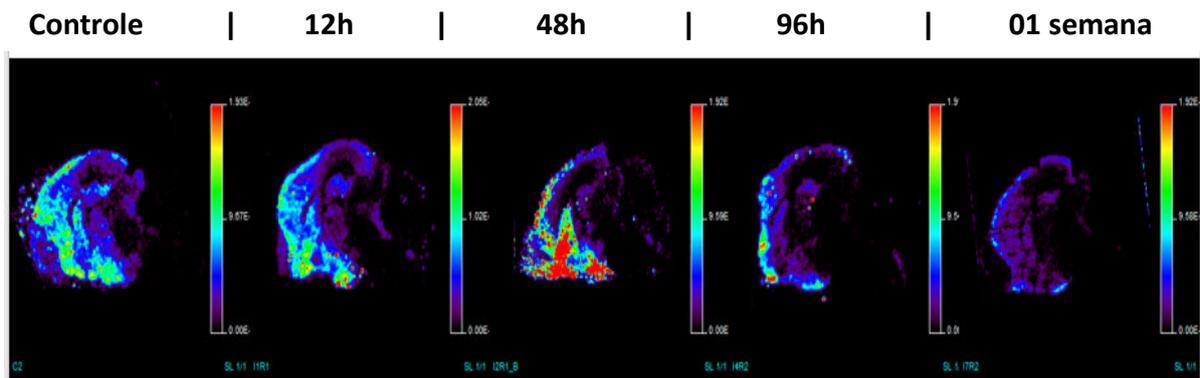


Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex (gi orbital), núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme)

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se um aumento da intensidade do sinal principalmente na área hipotalâmica, núcleos da base, na área somatomotora no isocórtex e pontualmente em algumas regiões na área olfatória.
- Irradiados 96hrs e 1 semana: diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios

FIGURA 6.6 - ÍON 652.552

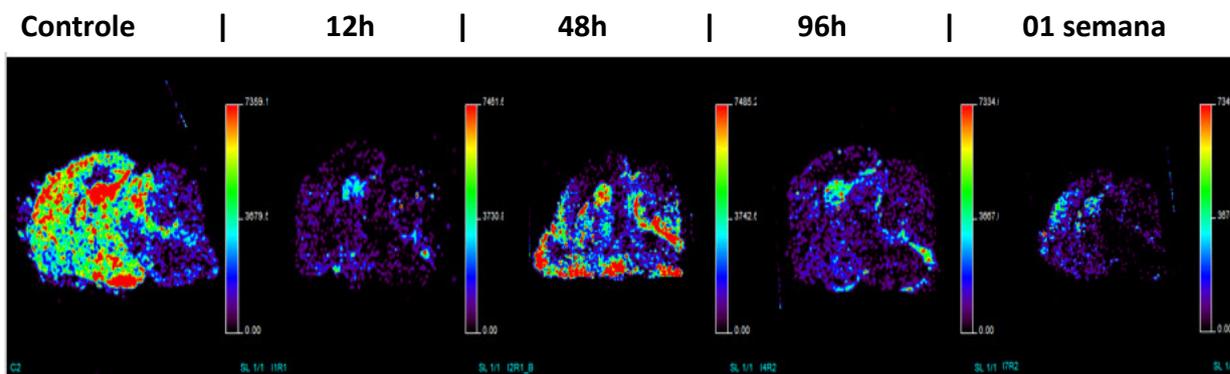


Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex, núcleos da base, área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme) e hipotálamo

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se um aumento da intensidade do sinal principalmente na área hipotalâmica, núcleos da base, na área somatomotora no isocórtex e pontualmente em algumas regiões na área olfatória.
- Irradiados 96hrs e 1 semana: diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios

FIGURA 6.7 - ÍON 687.497



Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente nas regiões do isocórtex, hipocampo, núcleos da base e área subcortical (claustró e núcleo endopiriforme) e região do tálamo (hipotálamo em maior intensidade)

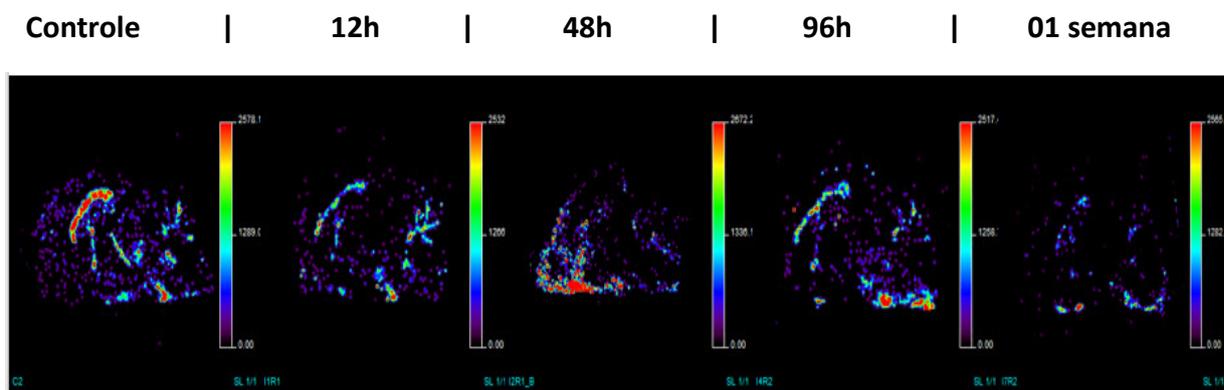
Alterações:

Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões ocorrendo até mesmo o seu desaparecimento por completo nas amostras com 24hrs. Já nas amostras de 48hrs verificou-se um aumento da intensidade do sinal incluindo novas regiões:

Novas áreas: principalmente no hipocampo, área olfatória poupando a região central correspondente a camada granular do bulbo olfatório, núcleos da base inferiormente (núcleo olfatório e globo pálido), mesencéfalo (colículo superior sensorial), rombencéfalo que compreende a ponte (núcleo tegmental laterodorsal e substância pontinha cinzenta central) e o bulbo (núcleo cuneiforme, núcleo do trato solitário, núcleo vestibular espinhal, núcleo vestibular medial)

- Irradiados 96hrs e 1 semana: diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios em todas as áreas supracitadas, inclusive com o desaparecimento por completo das novas áreas registradas. Amostras 96hrs ainda observou uma certa intensidade no hipocampo e bulbo (núcleo cuneiforme, núcleo do trato solitário, núcleo vestibular espinhal) e nas amostras 1 semana observou uma certa intensidade no hipocampo, isocórtex área somatomotora, e pontualmente na área olfatória.

FIGURA 6.8 - ÍON 689.535



Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte em grande intensidade presente principalmente nas regiões das fibras dos tratos nervosos próximo ao hipocampo, cerebelo, núcleos da bases e tronco encefálico (ponte, bulbo e mesencéfalo).

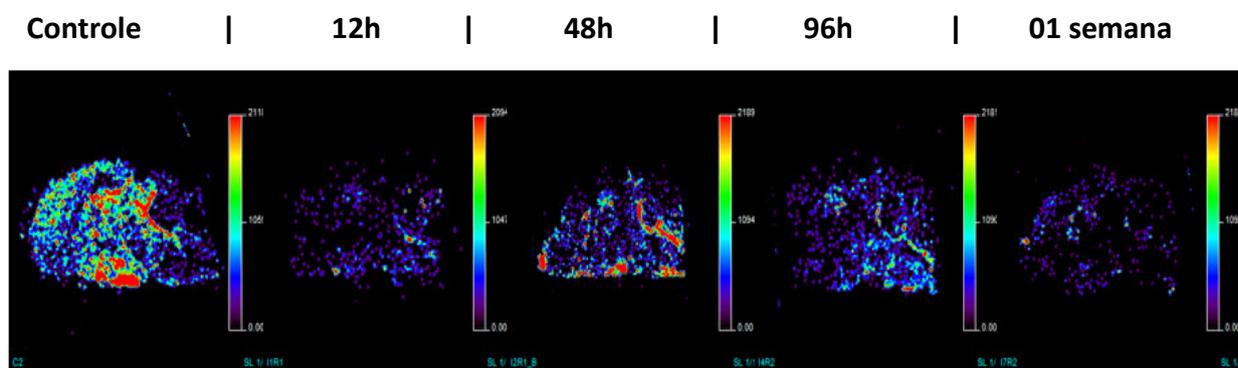
Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões ocorrendo até mesmo o seu desaparecimento por completo nas amostras com 24hrs. Já nas amostras de 48hrs verificou-se um aumento da intensidade do sinal incluindo novas regiões:

Novas áreas: principalmente área olfatória (núcleo olfatório anterior), núcleos da base inferiormente (núcleo olfatório e globo pálido) e hipotálamo.

- Irradiados 96hrs e 1 semana: Nas amostras 96hrs verificou-se uma diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios em todas as novas áreas supracitadas. Ainda se um aumento da intensidade na região das fibras próximas a ponte e na região do bulbo (núcleo reticular lateral e núcleo reticular paragigantocelular). Amostras 1 semana observou uma diminuição geral em todas as áreas acentuadamente permanecendo mais intenso pontualmente na área do núcleo da base (globo pálido).

FIGURA 6.9 - ÍON 713.512



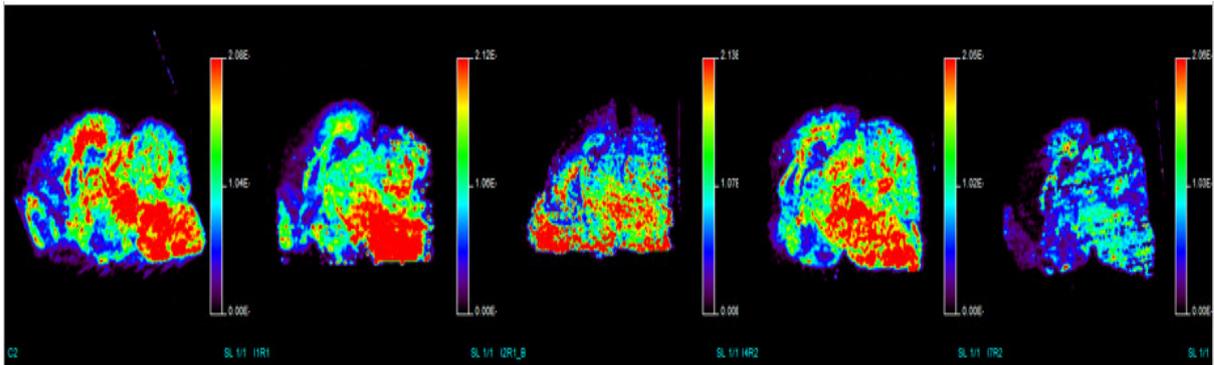
Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte em baixa intensidade disperso na região cerebral que compreende isocórtex, hipocampo, núcleos da base, mesencéfalo (colículos superior sensorial e motor e colículo inferior), rombencéfalo que compreende a ponte (núcleo tegmental laterodorsal e substância pontinha cinzenta central) e o bulbo (núcleo vestibular medial)

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: Nas amostras 24hrs verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões ocorrendo até mesmo o seu desaparecimento por completo permanecendo pontualmente na região do bulbo (núcleo vestibular medial). Já nas amostras de 48hrs verificou-se um aumento da intensidade do sinal nas regiões supracitadas, incluindo novas regiões.
Novas áreas: principalmente área olfatória, núcleos da base inferiormente (núcleo olfatório e globo pálido) e bulbo (núcleo reticular lateral e núcleo reticular paragigantocelular).
- Irradiados 96hrs e 1 semana: Amostras 96hrs diminuição da intensidade indicando uma diminuição dos lipídios com focos de intensidade maior nas áreas supracitadas da ponte e bulbo. Amostras 1 semana apresentando diminuição difusa do lipídio

FIGURA 6.10 - ÍON 726.544

Controle | 12h | 48h | 96h | 01 semana



Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente nas regiões do isocórtex, hipocampo, mesencéfalo (toda a região central e colículo superiores sensorial e motor), ponte (núcleo tegmental reticular, núcleo reticular pontinho e complexo olivar superior) e bulbo (toda a região), região do tálamo (pontualmente na área superior, exceto hipotálamo), bulbo olfatório (externo a área granular), fibras do cerebelo e núcleo do cerebelo.

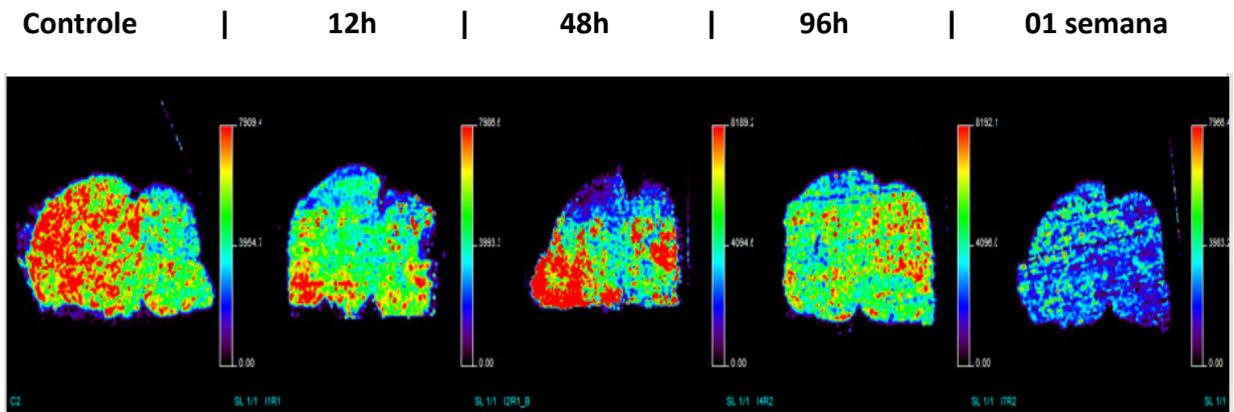
Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: Amostras de 24hrs verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões permanecendo apenas na região de ponte (núcleo tegmental reticular, núcleo reticular pontinho e complexo olivar superior) e bulbo (toda a região), e fibras do cerebelo e núcleo do cerebelo. Já nas amostras 48hrs verificou-se uma diminuição da intensidade ponte (núcleo tegmental reticular, núcleo reticular pontinho e complexo olivar superior) e bulbo (toda a região), e fibras do cerebelo e núcleo do cerebelo e o surgimento em novas áreas.

Novas áreas: principalmente área olfatória, núcleos da base inferiormente (núcleo olfatório e globo pálido), isocórtex, e área hipotalâmica.

- Irradiados 96hrs e 1 semana: Amostras 96hrs percebe-se um aumento da intensidade e a restauração dos lipídios nas mesmas áreas supracitadas do controle inclusive com o desaparecimento por completo das novas áreas registradas. Amostras 1 semana diminuição geral em todas as áreas.

FIGURA 6.11 - ÍON 749.528



Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente em todo cérebro (área olfatória, isocórtex, área subcortical, núcleos da base, hipocampo), difusamente no tálamo e mesencéfalo e em algumas áreas do rombencéfalo e cerebello.

Alterações:

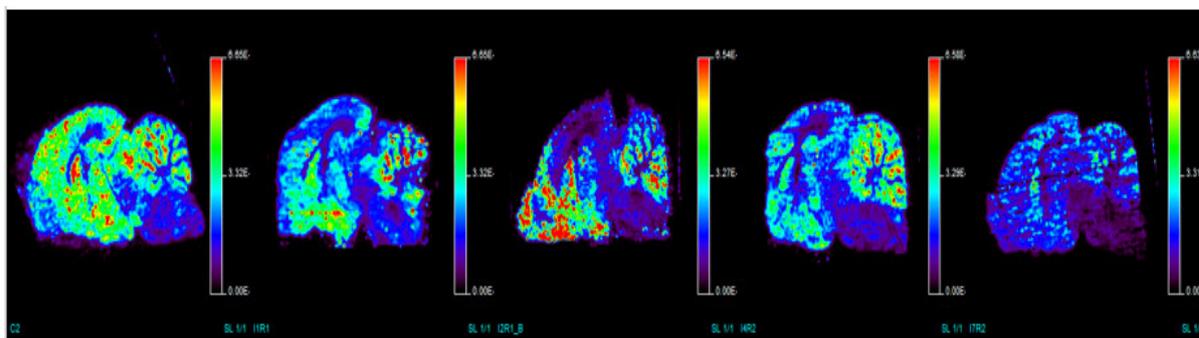
- Irradiados 24 e 48hrs: Amostras de 24hrs verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões permanecendo apenas na região da área olfatória, núcleos da base e hipotálamo e difusamente no rombencéfalo e cerebello e núcleo do cerebello. Já nas amostras 48hrs foi observado aumento da intensidade na área olfatória, núcleos da base, hipotálamo, mesencéfalo (colículo inferior)

Novas Áreas: região da úvula do cerebello e bulbo (núcleo vestibular medial, núcleo do trato solitário, núcleo dorsal moto do nervo vago, núcleo reticular intermediário).

- Irradiados 96hrs e 1 semana: Amostra 96hrs verificou-se uma diminuição na intensidade do sinal e um maior espalhamento principalmente em cerebello e bulbo (núcleo vestibular medial, núcleo do trato solitário, núcleo dorsal moto do nervo vago, núcleo reticular intermediário). Amostra 1 semana diminuição da intensidade do lipídio em todas as áreas.

FIGURA 6.12 - ÍON 774.544

Controle | 12h | 48h | 96h | 01 semana



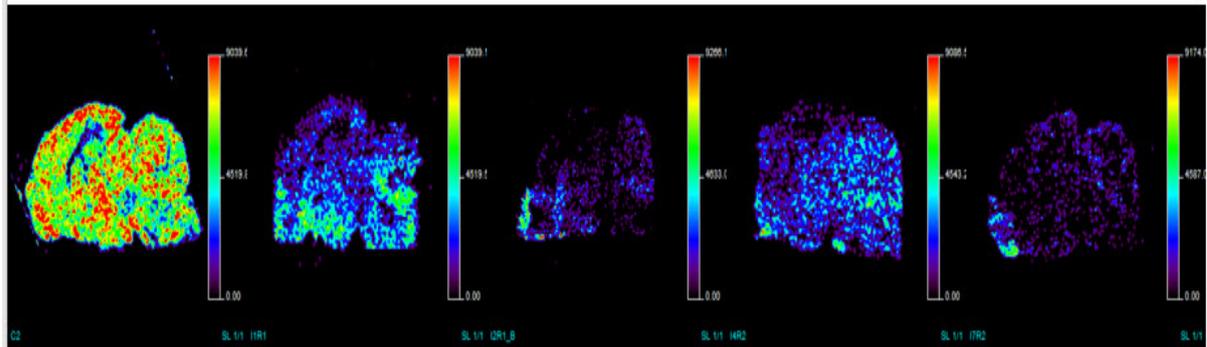
Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente nos lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula), mesencéfalo (substância cinzenta periaquedutal), região retrohipocampal (subículo), núcleos da base difusamente (mais intenso no núcleo septal lateral caudal e rostral) e difusamente no isocórtex (área orbital frontal e somatomotora), tálamo e hipotálamo.

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: Amostras de 24hrs verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões permanecendo apenas na região do hipotálamo, núcleos da base (núcleo accumbens), e nos lóbulos cerebelares. Já nas amostras 48hrs foi observado aumento da intensidade na área olfatória, núcleos da base (globo pálido, substancia inominada, núcleo accumbens, tubérculo olfatório), hipotálamo e nos lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula).
- Irradiados 96hrs e 1 semana: Amostra 96hrs verificou-se uma diminuição na intensidade do sinal mantendo a intensidade nos lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula). Amostra 1 semana diminuição da intensidade do lipídio em todas as áreas.

FIGURA 6.13 - ÍON 794.622

Controle | 12h | 48h | 96h | 01 semana

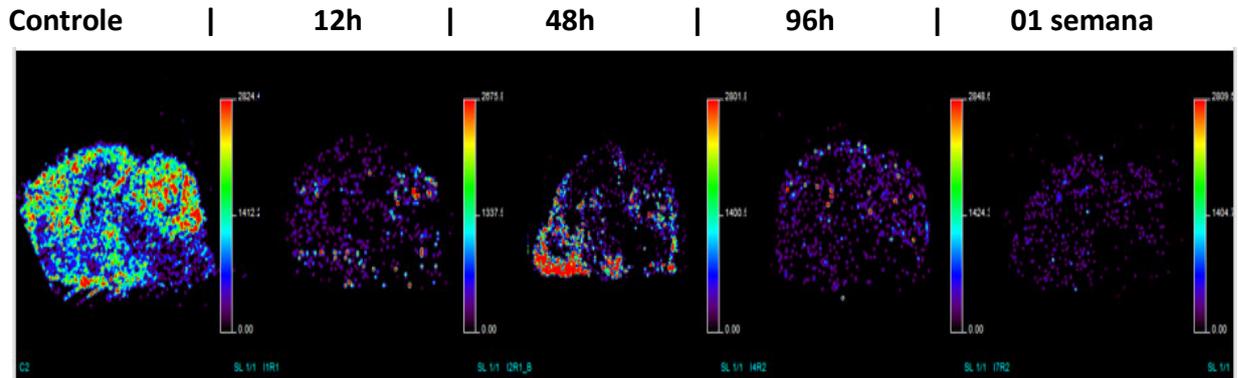


Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente em todo cérebro (área olfatória, isocórtex, área subcortical, núcleos da base, exceto hipocampo), difusamente no tálamo e pontualmente no hipotálamo, mesencéfalo e difusamente nos lóbulos cerebelares, ponte (núcleo tegmental laterodorsal e substância pontinha cinzenta central) e o bulbo (núcleo cuneiforme, núcleo do trato solitário, núcleo vestibular espinhal, núcleo vestibular medial).

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões para as duas amostras, mais pronunciadamente na amostra de 48hrs.
- Irradiados 96hrs e 1 semana: Amostra 96hrs verificou-se um discreto aumento difusamente na região cerebelar. Amostra 1 semana diminuição da intensidade do lipídio em todas as áreas com manutenção de um pequeno foco na área olfatória

FIGURA 6.14 - ÍON 856.508

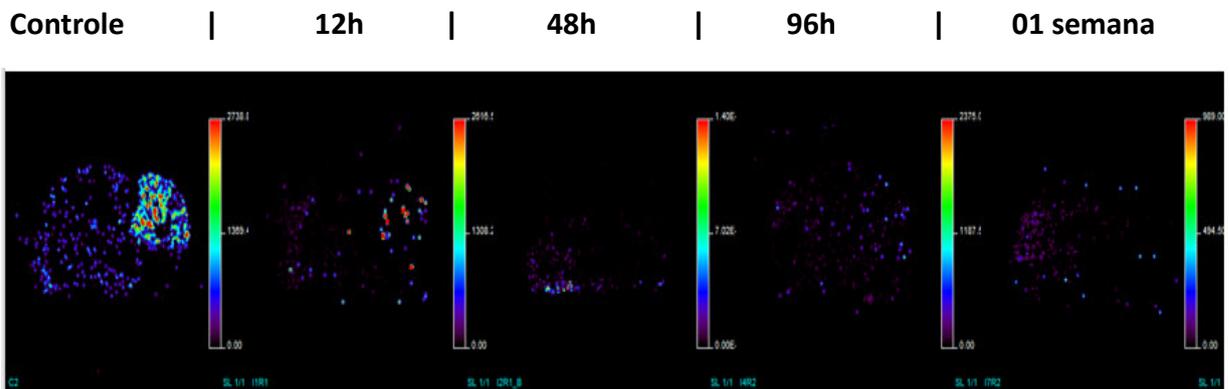


Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente em no isocórtex, núcleos da base – tubérculo olfatório, hipocampo, difusamente no tálamo/hipotálamo, mesencéfalo (substancia periaquedutal cinzenta) e difusamente nos lóbulos cerebelares.

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: Amostra 24hrs verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões. Já para a amostra de 48hrs houve um aumento de intensidade pronunciadamente na área olfatória, tubérculo olfatório e hipotálamo.
- Irradiados 96hrs e 1 semana: verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões para as duas amostras, mais pronunciadamente na amostra de 1 semana.

FIGURA 6.15 - ÍON 868.529

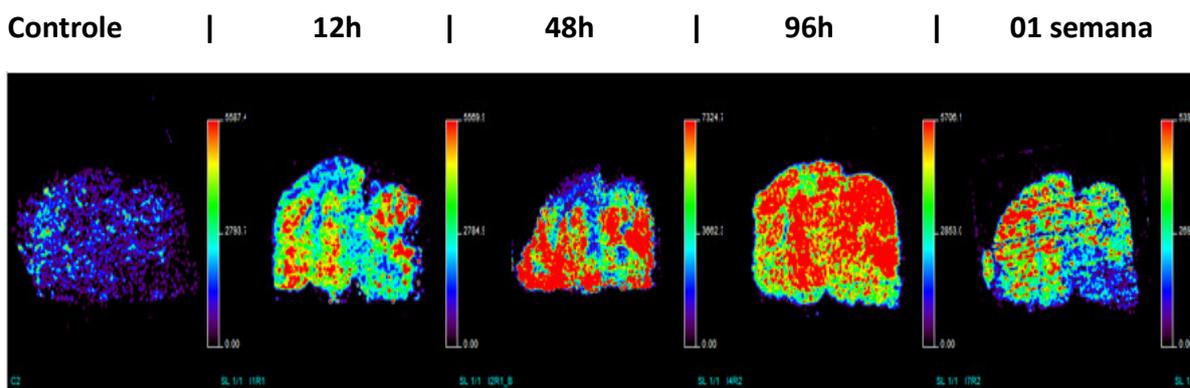


Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente em nos lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula).

Alterações:

- Irradiados 24, 48, 96hrs e 1 semana: verificou-se uma diminuição progressiva da intensidade desse lipídio em todas as regiões para as todas as amostras.

FIGURA 6.16 - ÍON 901.544



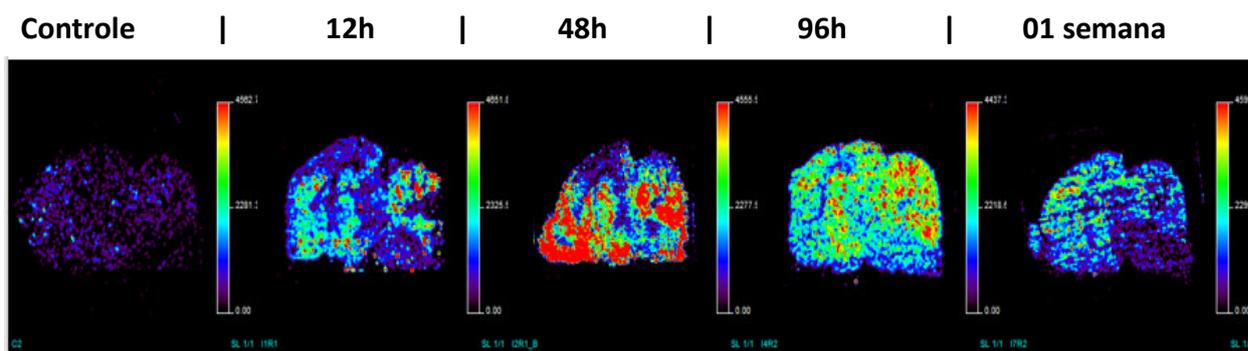
Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente principalmente no isocórtex (área frontal orbital e área olfatória) com baixa intensidade.

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: Amostra 24hrs verificou-se um aumento na intensidade do lipídio na área olfatória, isocórtex (área frontal orbital e área retroesplênica e hipocampo), tálamo e hipotálamo, lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula) e bulbo (núcleo vestibular espinhal, núcleo do trato solitário e núcleo cuneado). O aumento da intensidade ainda foi mais pertinente para a amostra 48hrs nas mesmas regiões supracitadas.
- Irradiados 96hrs e 1 semana: Amostra 96hrs verificou-se um aumento ainda maior na intensidade do lipídio na área olfatória, isocórtex (área somatomotora, área olfatória, área visual, área frontal orbital e área retroesplênica e hipocampo), tálamo e hipotálamo, mesencéfalo (colículos superiores sensoriais e motores, colículo inferior e substância periaquedutal cinzenta), lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula), ponte (núcleo tegmental laterodorsal e substância pontinha cinzenta central) e o bulbo (núcleo

cuneiforme, núcleo do trato solitário, núcleo vestibular espinhal, núcleo vestibular medial). Amostra 1 semana diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões permanecendo com intensidade no isocórtex (área somatomotora, área olfatória, área visual, área frontal orbital e área retrosplênica e hipocampo), núcleos da base e tálamo.

FIGURA 6.17 - ÍON 902.547



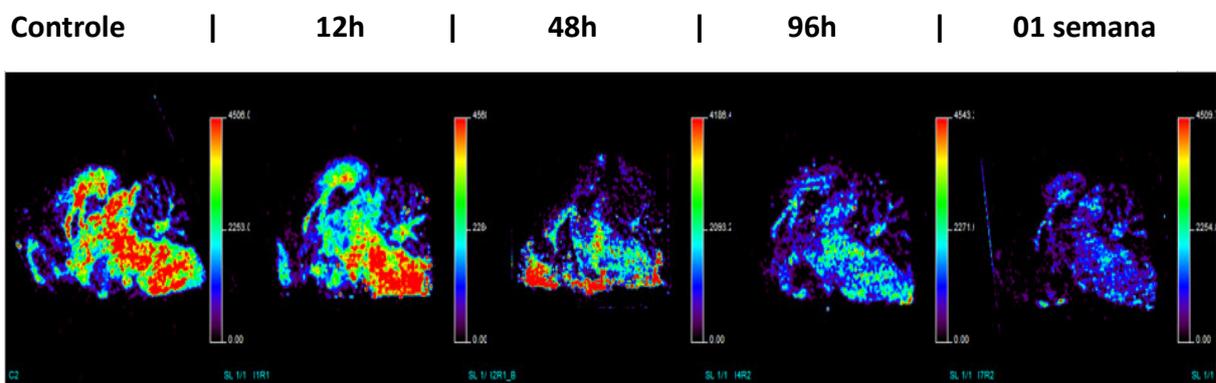
Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte presente em baixa intensidade difusamente no encéfalo.

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: Amostra 24hrs verificou-se um aumento na intensidade do lipídio na área olfatória, núcleos da base (tubérculo olfatório), tálamo e hipotálamo, lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula) e bulbo (núcleo vestibular espinhal, núcleo do trato solitário e núcleo cuneado). O aumento da intensidade ainda foi mais pertinente para a amostra 48hrs nas mesmas regiões supracitadas.
- Irradiados 96hrs e 1 semana: Amostra 96hrs verificou-se uma diminuição na intensidade do lipídio na área olfatória, tálamo e hipotálamo, mesencéfalo (colículos superiores sensoriais e motores, colículo inferior e substância periaquedutal cinzenta), lóbulos cerebelares (culmina, lóbulo central, declive, pirâmide e úvula) e o bulbo (núcleo cuneiforme, núcleo do trato solitário, núcleo vestibular espinhal, núcleo vestibular medial). Contudo houve aumento de intensidade no isocórtex (área somatomotora, área frontal orbital e área retrosplênica e hipocampo). Amostra 1 semana verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões permanecendo com

intensidade no isocórtex (área somatomotora, área frontal orbital e área retrosplênica e hipocampo), núcleos da base.

FIGURA 6.18 - ÍON 914.693



Distribuição espacial no controle: lipídio constituinte em grande intensidade presente principalmente nas regiões das fibras dos tratos nervosos próximo ao hipocampo, cerebelo, núcleos da bases e tronco encefálico (ponte, bulbo e mesencéfalo), tendendo a se limitar na região do bulbo, ponte e mesencéfalo e núcleos da base.

Alterações:

- Irradiados 24 e 48hrs: verificou-se uma diminuição abrupta na intensidade desse lipídio em todas as regiões, mas mantendo a intensidade principalmente na região de ponte, bulbo, tálamo e região retrohipocampal nas amostras com 24hrs. Já nas amostras de 48hrs verificou-se um aumento da intensidade do sinal incluindo novas regiões:

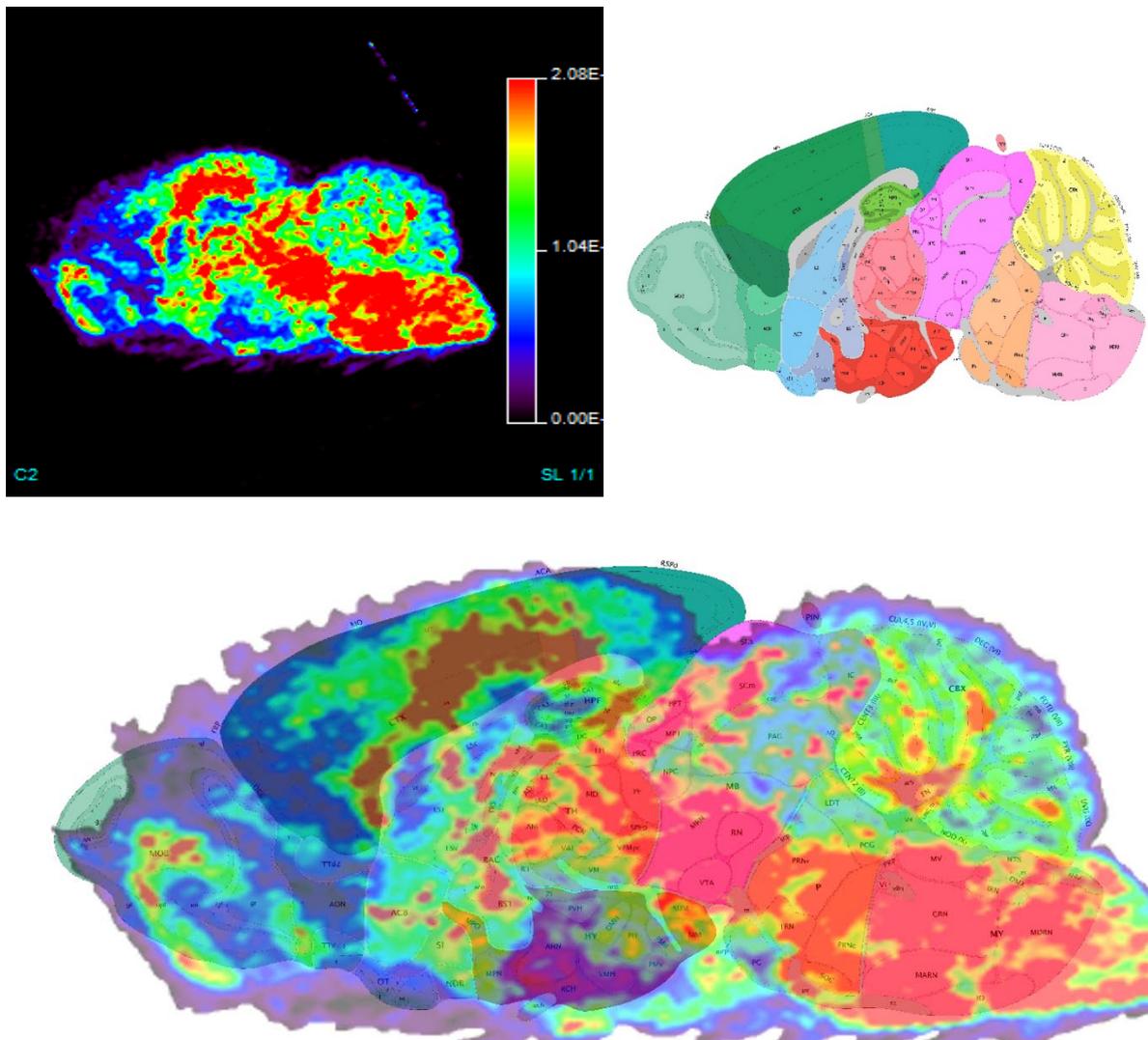
Novas áreas: principalmente área olfatória (núcleo olfatório anterior), núcleos da base inferiormente (núcleo olfatório e globo pálido), hipotálamo e bulbo (núcleo reticular lateral e núcleo reticular paragigantocelular).

- Irradiados 96hrs e 1 semana: Em ambas as amostras a diminuição da intensidade do sinal em todas as regiões supracitadas, incluindo as novas áreas. Parte dos lipídios se concentra no tronco encefálico, mas em baixa intensidade. Amostras 1 semana observou uma diminuição geral em todas as áreas acentuadamente.

6.4 Discussão

A obtenção das imagens permitiu observar a distribuição espacial de determinados lipídios em algumas regiões cerebrais especializadas e responsáveis por determinadas funções. Tomando-se por base a distribuição dos íons m/z 726,544 e m/z 774,544 foi realizado a superposição das imagens adquiridas do controle e redimensionadas para a mesma escala de tamanho das imagens neuroanatômicas, obtendo-se os seguintes resultados, conforme ilustram as Fig. 6.23 e 6.24 respectivamente, abaixo:

FIGURA 6.19 - ÁREAS DE DISTRIBUIÇÃO DO LIPÍDIO M/Z 726,544



As imagens demonstram que ocorre uma alteração na expressão de lipídios regionalmente e em sua intensidade. Dentre as hipóteses mais plausíveis que poderiam elucidar parte da resposta celular seriam:

- a) Lesões e ruptura na dupla fita de DNA, alterando a expressão e regulação metabólica;
- b) Alterações nos mecanismos regulatórios positivos/negativos de reparo celular;
- c) Oxidação de lipídios e fragmentação em sua estrutura.

Ao se realizar a identificação dos lipídios com as áreas de distribuição será possível a produção de um atlas neuroanatomico por espectrometria de massas facilitando o estudo e a compreensão de possíveis doenças neurodegenerativas.

A análise por espectrometria de massas apenas foi o ponto de partida que permitiu alavancar pesquisas clínicas para a avaliação das alterações moleculares decorrentes da exposição a radiação ionizante. 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 supranuclear progressiva e degeneração corticobasal (AFAQ, et al., 2013).

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES

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. O perfil lipídico ainda necessita ser mais bem avaliado por técnicas de massas sequencias MS/MS para que seja possível identificar as principais moléculas no perfil lipídico cerebral. A metabolômica da radiação necessita maiores estudos a fim de desvendar os mecanismos fisiológicos e moleculares radioinduzidos. Várias possibilidades foram apontadas tais como lesão direta do DNA, formação das ROS induzindo a ruptura das ligações intermoleculares do DNA, oxidação lipídica, alteração nos mecanismos sinalização para reparo celular e molecular e alterações micro estruturais intracelulares. Torna-se necessário aprofundar ainda mais nas rotas metabólicas e na identificação dos principais biomarcadores de injúria no tratamento radioterápico de neoplasias cerebrais. Assim, será possível em breve compreender melhor e intervir para minimizar os temidos déficits neurocognitivos que inevitavelmente causam lesões permanentes afetando diretamente na diminuição da qualidade de vida dos pacientes.

ANEXOS

ANEXO A

8 - AVALIAÇÕES EM ALTERAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM TECIDOS IRRADIADOS IN VIVO

8.1 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, 2013b).

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 $\text{OH}\bullet$, que irão mediar as reações químicas danosas aos componentes biológicos como a membrana celular, enzimas, proteínas e o próprio DNA (SOULE et al., 2007).

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 .

8.2 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.

8.3 Análise dos resultados

8.3.1 Exposição crônica

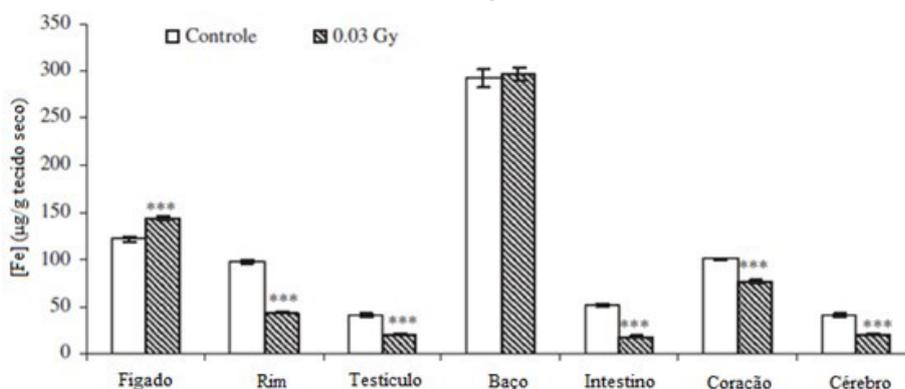
Na exposição crônica à radiação de baixa dosagem, a taxa de dose é definida como aquela em torno de (2 mSv. a 8 Sv.) ano^{-1} . Quando comparados com grupos controles, os dados de pesquisas com ratos demonstram um limiar de 8 Sv. ano^{-1} para nocividade induzida por radiação, considerando quatro parâmetros: 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 $2,5 \text{ mGy.h}^{-1}$), 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).

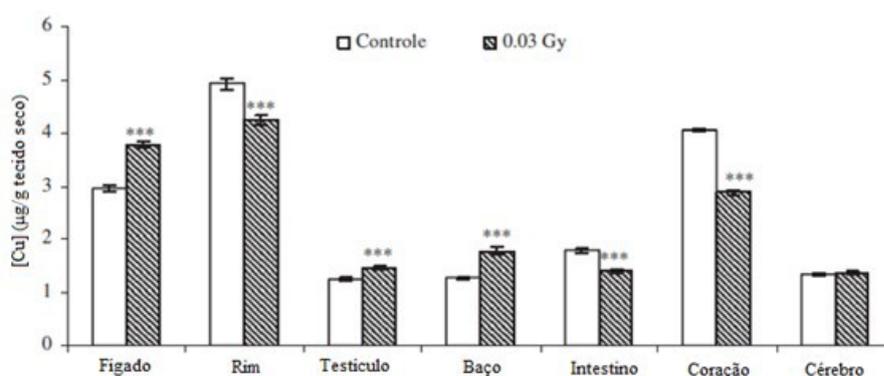
Apesar da baixa dosagem de radiação a que foram expostos, observou-se alterações nos níveis dos metais analisados. A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student e os resultados encontram-se nas Fig. 8.1, Fig. 8.2, Fig. 8.3 e Fig. 8.4 (*significativamente diferente do controle com $p \leq 0,05$; **significativamente diferente do controle com $p \leq 0,005$; ***significativamente diferente do controle com $p \leq 0,0005$) (HAWAS, 2013a).

FIGURA 8.1 - CONCENTRAÇÃO DE Fe NOS TECIDOS



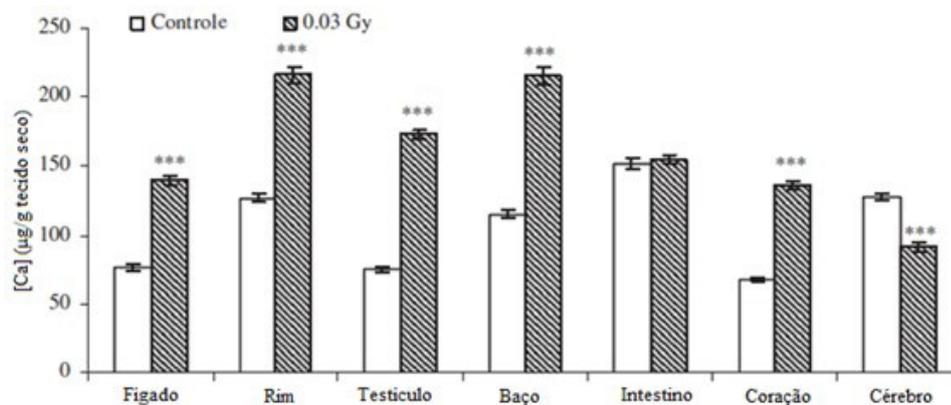
FONTE: Modificado de HAWAS, 2013a.

FIGURA 8.2 - CONCENTRAÇÃO DE Cu NOS TECIDOS



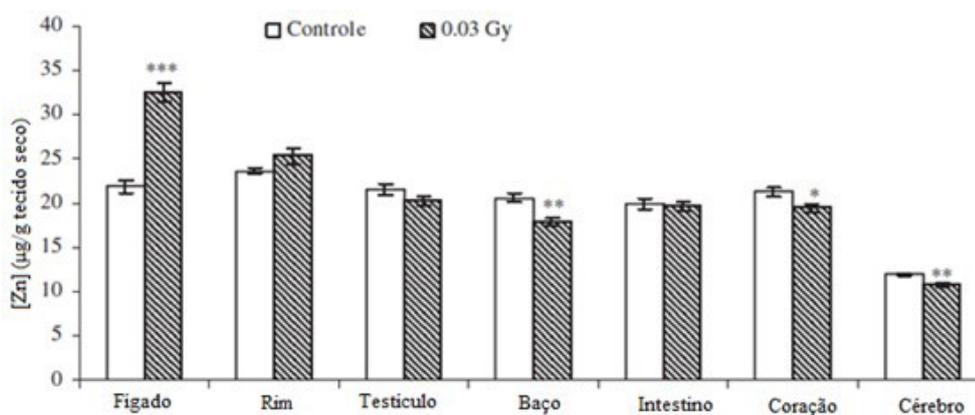
FONTE: Modificado de HAWAS, 2013a.

FIGURA 8.3 - CONCENTRAÇÃO DE Ca NOS TECIDOS



FONTE: Modificado de HAWAS, 2013a.

FIGURA 8.4 - 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 significantes. 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).

8.3.2 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 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. 8.1. A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student. Os resultados apresentados com valores p ≤ 0,05 foram considerados significantes (*significativamente diferente do controle com p ≤ 0,05) (SHABAN; HAWAS, 2008).

TABELA 8.1 - CONCENTRAÇÃO DE Fe, Cu E Zn NOS ÓRGÃOS

Órgãos	Grupos	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).

8.4 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



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 expira-se em 28/04/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 339 / 2014, related to the Project entitled "Protein Investigation 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 certificate 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 C



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.

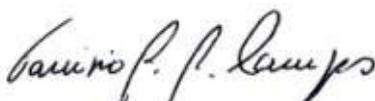
Caro(a) Senhor(a),

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 D



**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.

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.
- AEBI, S et al. **Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells.** Clin Cancer Res.1997;3(10). p.1763-67.
- AFAQ, A; SYED, R; BOMANJI, J. **PET/MRI: a new technology in the field of molecular imaging.** Br Med Bull. 2013;108:159-71. Review.
- AFZAL, Hussain et al. **Identification of novel inhibitors against Cyclin Dependent Kinase 9/Cyclin T1 complex as: Anti-cancer agente.** Saudi J Biol Sci. 2017. p.1229–1242.
- AGHI, M. K et al. **Long-term recurrence rates of atypical meningiomas after gross total resection with or without postoperative adjuvant radiation.** Neurosurgery. 2009. p.56–60. [PubMed: 19145156]
- AL-MEFTY, O et al. **The long-term side effects of Radiation therapy for benign brain tumors in adults.** J Neurosurg 73(4). 1990. p.502–512.
- AL-MEFTY O et al. **Radiation-induced meningiomas: Clinical, pathological, cytokinetic, and cytogenetic characteristics.** J Neurosurg 100(6): 2004. p.1002–1013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. <https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/about/types-of-brain-tumors.html>. Acesso em 10 dez 2017.
- ANDREWS, B. T; WILSON, C. B: **Suprasellar meningiomas: The effect of tumor location on postoperative visual outcome.** J Neurosurg 69(4): 1988. p.523–528.
- ANGOLINI, C. F et al. **Direct Protocol for Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture.** Anal Chem. v. 87, n. 13, 2015. p.6925-30.2015. ISSN 1520-6882 (Electronic)
- ANKER, J; SHRIEVE, C. **Basic Principles of Radiobiology Applied to Radiosurgery and Radiotherapy of Benign Skull Base Tumors.** Otolaryngol Clin N Am. 42:601-621, 2009
- ARGYLE, D. J; BLACKING, T. **From Viruses to Cancer Stem Cells: Dissecting the Pathways to Malignancy.** Vet J. 177(3): 2008. p.311-23.
- ARMSTRONG, G. T: **Long-term survivors of childhood central nervous system malignancies: The experience of the Childhood Cancer Survivor Study.** Eur J Paediatr Neurol 14: 2010. p.298–303.
- ATTANASIO, A. F et al. **Adult growth Hormone (GH)-deficient patients demonstrate heterogeneity between childhood onset and adult onset before and during human GH**

treatment. Adult Growth Hormone Deficiency Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 82:82– 88, 1997. p.82– 88.

Audi, A. H. G. **Wapstra** *Nucl. Phys A.* 595, 1995. p.409-480.

Audi, A. H. G. **Wapstra** *Nucl. Phys A.* 565, 1993. p.1-65.

BARNHOLTZ-SLOAN, J. S et al. **Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System.** *J Clin Oncol.* 22: 2004. p.2865–2872. [PubMed: 15254054]

BARTKE N et al. **Bioactive sphingolipids: Metabolism and function.** *Journal of Lipid Research*, Vol. 50(suppl.). United States, 2009. p.91- 96.

BASCHNAGEL, A. M et al. **Hearing preservation in patients with vestibular schwannoma treated with Gamma Knife surgery.** *J Neurosurg* 118(3): 2013. p.571–578.

BATCHELOR, T; LOEFFLER, J. S. **Primary CNS lymphoma.** *J Clin Oncol.* 2006.. p.1281–1288. [PubMed:16525183]

BAYIR, H; KAGAN, V. E; TYURINA, Y. Y; TYURIN, V; RUPPEL, R. A et al. **Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children.** *Pediatr. Res.* 51, 2002. p.571–578.

BAZAN, N. G. **The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling.** *Cell Mol. Neurobiol.* 26, 2006. p.901-913.

BAZINET, R. P; LAYE, S. **Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease.** *Nat Rev Neurosci.* 2014; 15(12):771–85. doi: 10.1038/nrn3820 PMID: 25387473

BECKER, W; MELLER, J. **The role of nuclear medicine in infection and inflammation.** *Lancet Infect Dis* 2001. p.326–333.

BENNET, R. V et al. **Imaging of biological tissues by desorption electrospray ionization mass spectrometry.** *J Vis Exp*, n. 77 2013. ISSN 1940-087X (Electronic)

BENTO, Ricardo Ferreira, et al. **Vestibular schwannoma: 825 cases from a 25-year experience.** *Int. Arch. Otorhinolaryngol.*, São Paulo - Brasil, v.16, n.4, Oct/Nov/December - 2012. p.466-475.

BHANDARE, N et al. **Ototoxicity after Radiotherapy for head and neck tumors.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67: 2007. p.469–479.

BODZON-KULAKOWSKA, A et al. **Desorption electrospray ionisation (DESI) for beginners--how to adjust settings for tissue imaging.** *Rapid Commun Mass Spectrom.* v. 28, n. 1, p.1-9, Jan 15 2014. ISSN 1097-0231 (Electronic)

BOUFFET E; BERNARD J. L et al. **M4 protocol for cerebellar medulloblastoma: supratentorial radiotherapy may not be avoided.** *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 1992;24. p.79-85.

BOWER, Jacquelyn, et al. **Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells.** *NPJ Breast Cancer* (2017) 3:9

BROWN, P. D; BUCKNER, J. C; UHM J. H et al. **The neurocognitive effects of radiation in adult low-grade glioma patients.** *Neuro Oncol* 5(3). 2003. p.161–167.

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, United States (2009). p.1079-1085.

CAMPBELL, B. A; JHAMB, A; MAGUIRE, J. A et al. **Meningiomas in 2009: Controversies and future challenges.** *Am J Clin Oncol* 32(1): 2009. p.73–85.

CAMPOS, S. X et al. **Influência da taxa de dose na degradação do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-d) por meio da radiação gama do cobalto-60.** *Eclética Química*, Vol 29(1): São Paulo, 2004. p.41-46.

CASTRO A; BERNIS C; VIGNERON S; LABBE J. C; LORCA T. **The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle.** *Oncogene* 2005 Jan 13;24(3). p.314-25

CECCARELLI, C; TRERÈ, D; SANTINI, D; TAFFURELLI, M; CHIECO, P; DERENZINI, M. **AgNORs in breast tumours.** *Micron*. 2000;31(2). p.143-49.

CERMENATI, G; MITRO, N; AUDANO, M et al. **Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology.** *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1851(1):51–60. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2014.08.011 PMID: 25150974 Effects of Long-Term SFA Enriched Diets on Brain Lipidome PLOS ONE DOI: 10.1371/journal.pone.0166964 December 1, 2016 17 / 21

CHAN, R. B; OLIVEIRA, T. G; CORTES, E. P; HONIG, L. S et al. **Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease.** *Biol Chem* 287: 2012. p.2678–88.

CHAO, S. H; FUJINAGA, K; MARION J. E; TAUBE, R; SAUSVILLE, E. A et al. **Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication.** *J. Biol. Chem*. 275 (37), 2000. p.28345–28348.

CHIHARA, Y; ITO, K; SUGASAWA, K et al: **Neurological complications after acoustic neurinoma radiosurgery: Revised risk factors based on long-term follow-up.** *Acta Otolaryngol Suppl* 559: 2007. p.65–70.

CHUGHTAI, K.; HEEREN, R. M. **Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis.** Chem Rev, v. 110, n. 5, May 12 2010. p.3237-77. ISSN 1520-6890 (Electronic)

COLE, R. B. **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals.**

COMBS S. E; SCHULZ-ERTNER D; THILMANN C; EDLER L. **Debus J. Fractionated stereotactic radiation therapy in the management of primary oligodendroglioma and oligoastrocytoma.** International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. 2005; 62(3). p.797–802.

COMBS S. E; WELZEL T; SCHULZ-ERTNER D et al. **Differences in clinical results after LINAC-based single-dose radiosurgery versus fractionated stereotactic radiotherapy for patients with vestibular schwannomas.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 76(1): 2010. p. 193-200.

CONSTINE LS; RUBIN P; WOOLF PD et al. **Hyperprolactinemia and hypothyroidism following cytotoxic therapy for central nervous system malignancies.** J Clin Oncol 5: 1987. p.1841–1851.

CONSTINE L. S; WOOLF P. D; CANN D et al. **Hypothalamic-pituitary dysfunction after radiation for brain tumors.** N Engl J Med 328: 1993. p.87-94.

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

CORREA, D. N et al. **Anti-theft device staining on banknotes detected by mass spectrometry imaging.** Forensic Sci Int, v. 260, Mar 2016. p.22-26. ISSN 1872-6283 (Electronic)

CROTTI, A. E. M; VESSECCHI, R; LOPES, J. L. C; LOPES, N. P. **Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular.** Quím Nova, v. 29, p.287, 2006.

CTCAE 2009. **National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Common terminology criteria for adverse events. 2009.** Version 4.0. <http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic.applications/ctc.htm>

DAMIANI, Durval. **Diagnostico Laboratorial da Puberdade Precoce.** Arq Bras Endocrinol Metab vol.46 no.1 São Paulo Aug. 2002

DASS, C. **Fundamental of contemporary mass spectrometry.** Jonhn Wiley & Sons ed. New Jersey, 2007.

DAVID, S. S; O'SHEA, V. L; KUNDU, S. **Base-excision repair of oxidative DNA damage.** Nature, v. 447, n. 7147, Jun 21, 2007. p.941-950.

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, 32 (2), 2009. p.51-61.

DERENZINI Ploton D. M. **Interphase nucleolar organizer regions in câncer cells.** Int Ver Exp Pathol.32:1991. p.150-92.

DEWIT, L; VAN DER SCHUEREN, E; ANG, K. K. **Low-grade astrocytoma in children treated by surgery and radiation therapy.** Acta Radiol 23: 1984. p.1-8

DI MAIO, Salvatore et al. **Novel targeted therapies in chordoma: an update.** Ther Clin Risk Manag. 11: 2015. p.873–883.

DIDCOCK, E; DAVIES, H. Á; DIDI, M et al. **Pubertal growth in young adult survivors of childhood leukemia.** J Clin Oncol 13: 1995. p.2503–2507.

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, Sep 15 2009. p. p.2883-9. ISSN 1873-376X (Electronic).

DOUW, L et al. **Cognitive and radiological effects of radiotherapy in patients with low-grade glioma: long-term follow-up.** Lancet Neurology. 8(9): 2009; p.810–8. [PubMed: 19665931]

DOUW L, K. M; FAGEL, S. S et al. **Cognitive and radiological effects of radiotherapy in patients with low-grade glioma: Long-term follow-up.** Lancet Neurol 8: 2009. p.810–818.

DUARTE, V; MULLER, J. G; BURROWS, C. J. **Insertion of dGMP and dAMP during in vitro DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine.** Nucleic Acids Res. 27: 1999. p.496–502. [PubMed: 9862971].

DUCHSTEIN, S; GADEMANN, G; PETERS, B: **Early and late effects of local high dose radiotherapy of the brain on memory and attention.** Strahlenther Onkol 179(7): 2003. p. 441–451.

DUXIN, Julien P; WALTER, Johannes C. **What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia?** Curr Opin Cell Biol. December; 2015: 37. p.49–60.

Estimativa 2016: **Incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2016. p.27-30.

EBERLIN, Livia S et al. **Non-Destructive, Histologically Compatible Tissue Imaging by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry.** Chembiochem. 2011 September 19; 12(14). p.2129–2132.

FERLAY, Jacques et al. **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E p.359-86.

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, Dec 2016. p.1944-1951, ISSN 1879-1123 (Electronic).

FIGUEIREDO, L. C; CORDEIRO, L. N; ARRUDA, A. P; CARVALHO, M. D. F; RIBEIRO E. M; COUTINHO, H. D. **Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares dos marcadores cutâneos.** Rev Bras de Canc. 49(3): 2003. p.179-83.

FLICKINGER, J. C et al. **Evolution in technique for vestibular schwannoma radiosurgery and effect on outcome.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 36(2): 1996. p,275–280.

FRAGA, C. G; SHIGENAGA, M. K; PARK, J. W; DEGAN, P et al. **Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organDNA and urine.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 87, n. 12, Jun, 1990. p.4533-4537.

FRENCH, T. W; STOKOL T; MEYER, D. **O Fígado.** In: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DE NICOLA, D. B. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos.** 3 ed. Med Vet: São Paulo, 2009. p.312-329.

GAITS, F; FOURCADE, O; LE BALLE, F et al. **FEBS Lett 410:** 1997. p.54–58.

GBD 2015 Risk Factors Collaborators. **Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.** Lancet 2016 Oct; 388 (10053). p.1659-1724.

GEMMEL, F; DUMAREY, N; WELLING, M. Future diagnostic agents. Semin Nucl Med 2009; 39:11–26.

GIARETTI, W; RAPALLO, A et al. **Specific K-ras2 mutations in human sporadic colorectal adenomas are associated with DNA near-diploid aneuploidy and inhibition of proliferation.** Am J Pathol. 153:1998. p.1201–9.

GOLDWEIN, J. W; LEAHY, J. M; PACKER, R. J; SUTTON, L. N et al. **Intracranial Ependymomas in children.** International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 19:1990. p.1497-1502.

GONDI, V; MEHTA, M; PUGH, S et al. **Memory preservation with conformal avoidance of the hippocampus during whole-brain radiotherapy (WBRT)for patients with brain metastases: Preliminary results of RTOG 0933.** Neuro-Oncol 15: [Abstract NC-012], 2013.

GONZALEZ, J; KUMAR, A. J, CONRAD, C. A et al. **Effect of bevacizumab on Radiation necrosis of the brain.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 67: 2007. p. 323–326.

GOTTLIEB, Maria Gabriela Valle et al. **Envelhecimento e Longevidade no Rio Grande do Sul: um perfil histórico, étnico e de morbi-mortalidade dos idosos.** Rev. Bras. Geriatr. Gerontol., Vol. 14(2): Rio de Janeiro, 2011. p.365-380.

GRAY, N; DETIVAUD, L; DOERIG, C; MEIJER, L. **ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases.** Curr. Med. Chem. 6 (9), 1999. p.859–875.

GUAN, X. L et al. **Non-targeted profiling of lipids during kainate-induced neuronal injury.** FASEB J 20: 2006. p.1152–61.

GUNDERSON, Leonard L; TEPPER, Joel E. **Clinical radiation Oncology.** Elsevier, Central Nervous System Tumors, 2015, Cap 23. p.419-425

GUPTA, K. **“Small round cell Tumor of the head and neck Region: A review”.** International Journal of Advanced Research and Development, Volume 2; Issue 3; May 2017; Page No. p.106-111.

HABRAND, I. L; AUSTIN-SEYMOUR, M; BIRNBAUM, S et al. **Neurovisual outcome following proton radiation therapy.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 16: 1989. p.1601– 1606.

HALL, E. J. **Radiobiology for the radiologist.** 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicais in Biology and Medicine.** 3ed, 1999. p.86-87.

HALPERIN, E. C et al. **Perez and Brandy’s Principles and Practice of Radiation Oncology.** LWW. Sixth Edition. Cap.35, p.649-676.

HARRABIL, Semi B et al. **Long term results after fractionated Stereotactic radiotherapy (FSRT) in patients with craniopharyngioma: maximal tumor control with minimal side effects.** Radiation Oncology, 9:203, 2014

HARRINGTON, E. A; FANIDI, A; EVAN, G. I. **Oncogenes and cell death.** Curr.Opin. Genet Dev. 4(1): 1994. p.120-29.

HEIDMAN, R. L; PACKER, R. J; ALBRIGHT, L. A; FREEMAN, C. R.; RORKE, L. B. **Tumors of the Central Nervous System.** In; Pizzo P.& Poplack M. D., Principles and Practice of Pediatric Oncology, Philadelphia, Third Edition. Ed Lippincott Company. p.633-697.

HEPPNER, P. A; SHEEHAN, J. P; STEINER, L. E. **Gamma knife surgery for low-grade gliomas.** Neurosurgery. 57(6):2005. p.1132–9. [PubMed: 16331161].

HETELEKIDIS, S; BARNES, P. D; TAO, M. L; FISCHER, E. G; SCHNEIDER, L; SCOTT, R. M; TARBELL, N. J. **20 years experience in childhood craniopharyngioma.** International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 27:1993. p. 189-195.

HIRSCH, J. F; SAINTE ROSE, C; PIERRE-KAHN, A. **Benign astrocytic and oligodendrocytic tumors of the cerebral hemispheres in children.** J Neurosurg 70: 1989. p.568–572.

HOCHBERG, F. H; MILLER, D. C. **Primary central nervous system lymphoma.** J Neurosurg. 68: 1988. p.835–853. [PubMed: 3286832].

HOFFMANN, E; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications.** 3rd ed. John Wiley & Sons Inc, London, 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 68, 133–136. 1996. Available at: <http://www.lipidmaps.org/>

HORROCKS, L. A; FAROOQUI, A. A. **Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function.** Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004; 70(4):361–72. doi: 10.1016/j.plefa.2003.12.011 PMID: 15041028

HUA, C; BASS, J. K; KHAN, R et al. **Hearing loss after radiotherapy for pediatric brain tumors: Effect of cochlear dose.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 72: 2008. p.892– 899.

HUGHES, E. N; SHILLITO, J; SALLAN, E. S; LOEFLER, J.S.; CASSADY, J.R.; TARBELL, N.J. **Medulloblastoma at the joint center for radiation therapy between 1968 and 1984. The influence of radiation dose on the patterns of failure and survival.** Cancer, 61:1988. p.1992-1998.

HUGHES, M. A et al. **Primary brain tumors treated with steroids and radiotherapy: Low CD4 counts and risk of infection.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 62: 2005. p.1423–1426.

IFA, Demian R; WU, Chunping; OUYANG, ZHENG; COOKS, R. Graham. **Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview.** TheAnalyst. 135 (4). Bibcode:2010Ana.135.669I. DOI:10.1039/b925257f. ISSN 1364-5528. 2010.

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.e 0163180, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic).

JELONEK, K et al. **Radiation-induced changes in serum lipidome of head and neck cancer patients.** *Int J Mol Sci*, v. 15, n. 4, Apr 17 2014. p. 6609-24, ISSN 1422-0067 (Electronic).

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).

JOHNSON, W. D et al. **Surgery and Radiotherapy: Principles of Delivering Radiation to Intracranial Tumors.** *Neurosurg Focus*. 2008.

KASPRZAK, H. A; WOZNIAK, A; DREWA, G et al. **Enhanced lipid peroxidation processes in patients after brain contusion.** *J. Neurotrauma* 18, 2001. p.793–797.

KHALED, H. M; BAHNASSI, A. A; ZEKRI, A. R et al. **Correlation between p53 mutations and HPV in bilharzial bladder cancer.** *Urol Oncol*. 2003;21(5). p.334–41.

KHAN, Faiz M et al. **The Physics of Radiation Therapy.** 5th edition, Philadelphia: Wolters KLUWER, Health, **Chapter 1**, 2014. p.06.

KIM, J. H; BROWN, S. L; JENROW, K. A; RYU, S. **Mechanisms of radiation-induced brain toxicity and implications for future clinical trials.** *Journal of Neuro-oncology*. 87(3): 2008. p.279–86. [PubMed: 18209952]

KLINE, L. B; KIM, J. Y. **Ceballos R: Radiation optic neuropathy.** *Ophthalmology* 92:1118. p.1126, 1985.

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

KORENKOV, A. I; IMHOF, H. G; BRANDNER, S et al. **Growth retardation and bilateral cataracts followed by anaplastic meningioma 23 years after high-dose cranial and whole-body irradiation for acute lymphoblastic leukemia: Case report and review of the literature.** *J Neurooncol* 74: 2005. p.195–199.

KREIL, W et al. **Long-term experience of gamma knife radiosurgery for benign skull base meningiomas.** *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*, Vol. 19(4): 2005. p.1021-6.

KUWANO, M et al. **Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance.** *Anticancer Drug Des*. 14(2): 1999. p.123-131.

LAGE, H; DIETEL, M. **Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance.** *J Cancer Res Clin Oncol*. 125(3): 1999. p.156-165.

LAM, S. M; WANG, Y; DUAN, X; WENK, M. R et al. **The brain lipidomes of subcortical ischemic vascular dementia and mixed dementia.** *Neurobiol Aging* 35: 2014. p. 2369–81.

LANORE, D; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena.** São Paulo: Roca, 2004.

- LEE, J. H; PAULL, T. T. **Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks.** *Oncogene* 26, 2007.
- LEWEN, A; MATZ, P; CHAN P. H. **Free radical pathways in CNS injury.** *J. Neurotrauma* 17, 2000. p.871–890.
- LI, L. H; HSIEH, H. Y; HSU, C. C. **Clinical Application of Ambient Ionization Mass Spectrometry.** *Mass Spectrom.* Tokyo. v. 6, n. Spec Iss, p. S0060, 2017. ISSN 2187-137X (Print).
- LIN, N. U; BELLON, J. R; WINER. **EP.CNS metastases in breast cancer.** *J Clin Oncol.* 22: 2004. p.3608– 3617. [PubMed: 15337811]
- LINSKEY, M. E; FLICKINGER, J. C; LUNSFORD, L. D. **Cranial nerve length predicts the risk of delayed facial and trigeminal neuropathies after acoustic tumor stereotactic radiosurgery.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25(2): 1993. p.227–233.
- LIOTTA, L. A; KHON, E. C. **The microenvironment of the tumour-host interface.** *Nature.* 2001. p.375-79.
- LITTMAN, P; ROSENSTOCK, J; GALE, G et al. **The somnolence syndrome in leukemic children following reduced daily dose fractions of cranial radiation.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10:1984. p.1851–1853.
- LOWE. L. G; GUENGERICH, F. P. **Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of dNTP insertion opposite 8-oxo-7,8-dihydroguanine by Escherichia coli Polymerases I exo- and II exo-.** *Biochemistry.* 1996; 35:9840–9849. [PubMed: 8703958]
- MAEHIRA, F; MIYAGI, I; ASATO, T et al. **Alterations of protein kinase C, 8-hydroxydeoxyguanosine, and K-ras oncogene in rat lungs exposed to passive smoking.** *Clin Chim Acta.* 1999; 289. p.133–44.
- MAHER, E. A; MCKEE, A. C. **Neoplasms of the central nervous system.** In: Skarin, AT.; Canellos, G. P, editors. *Atlas of Diagnostic Oncology.* 3. London, United Kingdom: Elsevier Science Ltd; 2003.
- MAO, Y; YU, C et al. **Mutations of human topoisomerase II alpha affecting multidrug resistance and sensitivity.** *Biochemistry.* 1999;38(33): 10793-10800.
- MATSUMOTO, K; TAKAHASHI, S; SATO, A et al. **Leukoencephalopathy in childhood hematopoietic neoplasm caused by moderate-dose methotrexate and prophylactic cranial radiotherapy—An MR analysis.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 1995. p.913–918,
- MCTYRE, Emory et al. **Whole brain radiotherapy for brain metastasis.** *Surg Neurol Int.* 4(Suppl 4): S236–S244. 2013.

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

MERCHANT, T. E; CONKLIN; H. M; WU S 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 27: 2009. p.3691–3697

MERCHANT, T. E; CONKLIN; H. M, WU, S et al. **Phase II trial of conformal Radiation therapy for pediatric low-grade glioma.** J Clin Oncol 27(22): 2009. p. 3598–3604.

MERCHANT, T. E; ROSE, S. R; BOSLEY, C et al. **Growth hormone secretion after conformal radiation therapy in pediatric patients with localized Brain tumors.** J Clin Oncol 29: 2011. p.4776–4780.

MINAMOTO, Toshinari, MAI, Masayoshi; RONAI, Ze'ev. **Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis.** Carcinogenesis, vol.20 no.4, 1999. p.519–527.

MINNITI, Giuseppe et al. **Target delineation and optimal radiosurgical dose for pituitary tumors.** Radiation Oncology (2016) 11:135

MINNITI, Giuseppe et al. **Radiation techniques for acromegaly.** Radiat Oncol. 2011; 6: 167.

MIRALBELL, R; BLEHER, A; HUGUENIN, P; RIES, G et al. **Pediatric medulloblastoma: Radiation treatment Tecchnique and patterns of failure.** International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 37(3): 1997. p.523-529

MONTE, Oscar et al. **Puberdade Precoce: Dilemas no Diagnóstico e Tratamento.** Arq Bras Endocrinol Metab vol.45 no.4 São Paulo Aug. 2001

MORRIS, J; DOBSON, J. **Oncologia em Pequenos Animais.** São Paulo: Roca. 2007, 300p.

MOURA, A. **Geologia económica dos metais básicos e dos metais ferrosos.** Coimbra: Palimage. 2016.

MULHERN, R. K; PALMER, S. L; MERCHANT, T. E et al. **Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma.** J Clin Oncol 23: 2005. p.5511–5519,

MURPHY, E. S; MERCHANT, T. E; WU, S et al. **Necrosis after craniospinal irradiation: Results from a prospective series of children with central nervous system embryonal tumors.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 83:e655–e660, 2012.

MURPHY, R. C, HANKIN J. A et al. **"Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry.** J. Lipid Res. 50 Suppl (Supplement): S317–22. DOI:10.1194/jlr.R800051-JLR200. PMC 2674737. PMID 19050313. 2008.

MURRAY, R. D; DARZY, K. H. GLEESON, H. K et al. **GH-deficient survivors of childhood cancer: GH replacement during adult life.** J Clin Endocrinol Metab 87: 2002. p.129–135.

MUTSAERS, A. J. **Chemotherapy: new uses for old drugs.** Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 37(6): 2007. p.1079-1090.

NABORS. Louis Burt et al. **Central Nervous System Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology.** J Natl Compr Canc Netw.; 11(9): 1114–1151. 2013

NAKABEPPU, Yusaku. **Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells.** Int. J. Mol. Sci. 2014, 15. p.12543-12557

NUTTING, C; BRADA, M; BRAZIL, L et al. **Radiotherapy in the treatment of benign meningioma of the skull base.** J Neurosurg 90(5): 1999. p.823–827.

O'SULLIVAN, C; JENKIN, D; DOHERTY, M. A; HOFFMAN, H. J; GREENBERG, M. L. **Spinal cord tumors in children: long-term results of combined surgical and radiation treatment.** Journal of Neurosurgery, 81: 1994. p.507-512.

OKUNO, Emico; YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das Radiações.** Oficina dos textos, 2ª ed. 2010

OKUNO, Emico. **Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia.** Estud. av. vol.27 no.77 São Paulo, 2013

OMAR, R; ALSHYKHLA, A; FLEMINGA, M; BURROWSA, C. **The guanine oxidation product 5-carboxamido-5-formamido-2-iminohydantoin induces mutations when bypassed by DNA polymerases and is a substrate for base excision repair.** Chem Res Toxicol. 28(9): 2015 September 21. p.1861–1871.

OSTROM, Q. T; GITTLEMAN, H; LIAO, P et al. **CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States 2007–2011.** Neuro Oncol. 2014; 14(suppl 4): iv1–iv3. [PubMed: 25304271]

PAOLONI, M. C; KHANNA, C. **Comparative oncology today.** Vet Clin North Am Small Anim Pract. 37(6): 2007. p.1023-32.

PARK, H et al. **Atypical meningioma: outcome, prognostic factors.** Int J Radiat Oncol Biol Phys, Vol. 75: S238, 2009

PARKIN, D. M et al. **Global cancer statistics 2002.** CA Cancer J Clin 55:74, 2005.

PARKIN, D. M et al. **Global cancer statistics in the year 2000.** *Lancet Oncol* 2:533, 2001.

PATCHELL, R. A. **The management of brain metastases.** *Cancer Treat Rev.* 29: 2003. p.533–540. [PubMed:14585263]

PAYNE, J. F; HUTCHINSON, A. K; HUBBARD, G. B et al. **Outcomes of cataract surgery following radiation treatment for retinoblastoma.** *J AAPOS* 13: 2009. p.454– 458 e453.

PEIFFER, A. M; LEYRER, C. M et al. **Neuroanatomical target theory as a predictive model for radiation-induced cognitive decline.** *Neurology* 80(8): 2013. p.747–753.

PEREIRA, K. S; ZUCCARI, D; CURY, P.M; CORDEIRO, J.A. **Apoptosis as a prognostic marker in canine mammary tumors.** *TUNEL.Braz J VeT Res Anim Sci.* 40(50):2003. p.359–65.

PRIMORAC, Ivana; MUSACCHIO, Andrea. **Panta rhei: The APC/C at steady state.** *J. Cell Biol.*, 2013, Vol. 201 No. 2 p.177–189.

PUATAWEEPONG, Putipun et al. **Clinical Outcomes of Intracranial Nonvestibular Schwannomas Treated with Linac-Based Stereotactic Radiosurgery and Radiotherapy.**

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

RODASKI, S; PIEKARZ, C. H. **Biologia do Câncer.** In: Daleck, C.R.; De Nardi, A. B.; Rodaski, S. *Oncologia em cães e gatos.* Roca: São Paulo; 2008. p.23-50.

ROGERS, Leland et al. **MENINGIOMAS: Knowledge Base, Treatment Outcomes, and Uncertainties: A RANO Review.** *J Neurosurg.* 122(1): 2015. p. 4–23.

IUPAC. **Subcommittee for Isotopic Abundance Measurements** by K.J.R. Rosman, P.D. P. *Taylor Pure Appl. Chem.* 71, 1999. p.1593-1607.

ROYBA, Ekaterina. **Evaluation of ATM heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells.** *Scientific Reports* |7: 5996 | DOI:10.1038/s41598-017-06393-8, 2017.

ROOF, R. L; HALL, E. D. **Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone.** *J. Neurotrauma* 17, 2000. p.367–388.

RUDÀ, R, MAGLIOLA, U; BERTERO, L et al. **Seizure control following radiotherapy in patients with diffuse gliomas: a retrospective study.** *Neuro-oncology.* 15(12): 2013. p.1739–49. [PubMed: 23897633]

SADETZKI, S; FLINT-RICHTER, P; BEN-TAL, T et al. **Radiation-induced meningioma: A descriptive study of 253 cases.** *J Neurosurg* 97(5): 2002. p.1078–1082.

SALVAJOLI, J. V et al. **Radioterapia em Oncologia**. Editora Atheneu, 2ª edição, São Paulo, 2013. p.427-457.

SCHMITT, C. A; LOWE, S. W. **Apoptosis and therapy**. J Pathol. 187(1): 1999. p.127-137.

SCHOUTEN, L. J; RUTTEN, J; HUVENEERS, H. A. **Twijnstra A. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma**. Cancer. 94: 2002. p.2698–2705. [PubMed: 12173339]

SCHULTE, R; BASHKIROV, V; LI, T; LIANG, Z; MUELLER, K; HEIMANN, J; JOHNSON, L. R; KEENEY, B; SADROZINSKI, H. F. W; SEIDEN, A et al. **Conceptual Design of a Proton Computed Tomography System for Applications in Proton Radiation Therapy**, IEEE Trans. Nuclear Science, 51, 2004. p866-872.

SEIFMAN, M. A; ADAMIDES, A. A; NGUYEN, P. N; VALLANCE, S. A; COOPER, D. J; KOSSMANN, T et al. **Endogenous melatonin increases in cerebrospinal fluid of patients after severe traumatic brain injury and correlates with oxidative stress and metabolic disarray**. J. Cereb. Blood Flow Metab. 28, 2008. p.684–696.

SETOU, M. **Imaging Mass Spectrometry - Protocols for Mass Microscopy**. 2010. 274 ISBN 978-4-431-09424-1

SHERR, C. J. **Cancer cell cycles**. Science. 274(5293): 1996. p.1672-677.

SHIBUTANI, S; TAKESHITA, M. **Grollman AP.Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG**. Nature. 349: 1991. p.431–434. [PubMed: 1992344]

SHILOH, Y; ZIV, Y. **The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more**. Nat Rev Mol Cell Biol (2013) 14:197–210.10.1038/nrm3546

SILBER, J. H; RADCLIFFE, J; PECKHAM, V et al. **Whole-brain irradiation and decline in intelligence: The influence of dose and age on IQ score**. J Clin Oncol 10: 1992. p. 1390–1396,

SINGH, I. N; SULLIVAN, P. G; DENG, Y; MBYE, L. H; HALL E. D. **Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy**. J. Cereb. Blood Flow Metab. 26, 2006. p.1407–1418.

SKOOG. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 9th ed Chapter 29,2014. p.802 – 817

SILVA, Bárbara et al. **Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos**. Quim. Nova, Vol. 32, No. 2: 2009. p.453-462.

STAFFORD, S. L; POLLOCK, B. E; FOOTE, R. L et al. **Meningioma radiosurgery: Tumor control, outcomes, and complications among 190 consecutive patients.** Neurosurgery 49(5): 2001. 1029–1037, discussion 1037–1038.

STEENKEN, S; JOVANOVIĆ, S. V. **How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.** J Am Chem Soc. 119:1997. p.617–8.

STEWART, S. E; COHEN, D. G. **Central Nervous System Tumors in children.** Seminars in Oncology Nursing, 14 (1): 1998. p.34-72.

STRENGER, V; SOVINZ, P; LACKNER, H et al. **Intracerebral cavernous hemangioma after cranial irradiation in childhood. Incidence and risk factors.** Strahlenther Onkol 184: 2008. p.276–280.

STROJAN, P; POPOVIĆ, M; JEREB, B. **Secondary intracranial meningiomas after high-dose cranial irradiation: Report of five cases and review of the literature.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 48(1): 2000. p.65–73.

STUPP, R; MASON, W. P et al. **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.** N Engl J Med.2005;352(10). p.987-96.

SULLI, G; DI MICCO, R; D'ADDA DI FAGAGNA, F. **Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer.** Nat. Rev. Cancer 12, 2012. p.709–720.

SURAWICZ, T. S et al. **Descriptive epidemiology of primary brain and CNS Tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994.** Neuro Oncol. 1:1999. p.14-25 [PubMed: 11554386]

SURMA-AHO, O; NIEMELÄ, M; VILKKI, J; KOURI, M et al. **Adverse long-term effects of brain radiotherapy in adult low-grade glioma patients.** Neurology. 56(10):2001. p.1285–90. [PubMed: 11376174]

SUZUKI, M; KINO, K; MIYAZAWA, H. **Selectivity of bases incorporated opposite oxidative guanine damages by DNA polymerases.** Radiat Biol Res Commun. 47: 2012. p.137–164. (Japanese).

TYURIN, V. A; TYURINA, Y. Y; BORISENKO, G. G; SOKOLOVA, T. V; RITOV, V. B et al. **Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates.** J. Neurochem. 75, 2000. p.2178–2189

UHRHAMMER, Nancy; BAY, Jacques-Olivier; PERLMAN, Susan; GATTI, Richard A. **Ataxia-Telangiectasia and variants**. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 6(4):2002. p.313-22.

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

Van NIEUWENHUIZEN, D; KLEIN, M; STALPERS, L. J et al. **Differential effect of surgery and radiotherapy on neurocognitive functioning and healthrelated quality of life in WHO grade I meningioma patients**. J Neurooncol 84(3): 2007. p.271–278.

WALLNER, K. E; GALICICH, J. H; KROL, G et al. **Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma**. Int J Radiat Oncol Biol Phys 16: 1989. p.1405–1409.

WANG, L. W; SHIAU, C. Y; CHUNG, W. Y; WU, H. M; GUO, W. Y; LIU, K. D et al. **Gamma Knife surgery for low-grade astrocytomas: evaluation of long-term outcome based on a 10-year experience**. Journal of Neurosurgery. 105 (Suppl):2006. p.127–32.

WATSON, James et al. **Molecular Biology of The Cell**. 5. ed. New York: Artmed, 2010. 1601 p.

WEINBERG, R. A. **The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes**. Ann N Y Acad Sci.1995. p.331-38.

WHO. Cancer. **Ficha técnica, fevereiro de 2017**, acessado em 12/09/2017 em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>

World cancer report 2014 acessado em 28/10/2017 em <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>

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

YANG, I; SUGHRUE, M. E; HAN, S. J et al. **Facial nerve preservation after vestibular schwannoma Gamma Knife radiosurgery**. J Neurooncol 93(1):2009. p,41–48.

YOMO, S; CARRON, R; THOMASSIN, J. M et al. **Longitudinal analysis of hearing before and after radiosurgery for vestibular schwannoma**. J Neurosurg 117(5):2012. p.877–885.

YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das Radiações: interação da radiação com a matéria**. Revista Brasileira de Física Médica, Vol 3(1):2009. p.57-67.