



MAPEAMENTO ELEMENTAR POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X EM
ESFEROIDES DE LINHAGENS PROSTÁTICAS TUMORAIS SUPLEMENTADOS
COM ZINCO

Karolynne de Araujo Marins José Rocha

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador (es): Ricardo Tadeu Lopes
Roberta Gama Leitão

Rio de Janeiro
Maio de 2019

MAPEAMENTO ELEMENTAR POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X EM
ESFEROIDES DE LINHAGENS PROSTÁTICAS TUMORAIS SUPLEMENTADOS
COM ZINCO

Karolynne de Araujo Marins José Rocha

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

Roberta Gama Leitão, D.Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

Prof. Davi Ferreira de Oliveira, D.Sc.

Eliane Gouvêa de Oliveira Barros, D.Sc.

Prof. Antônio Palumbo Júnior, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MAIO DE 2019

Rocha, Karolynne de Araujo Marins José

Mapeamento Elementar por Microfluorescência de Raios X em Esferoides de Linhagens Prostáticas Tumorais Suplementados com Zinco / Karolynne de Araujo Marins José Rocha. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XIV, 96 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Roberta Gama Leitão

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 82-93.

1. Fluorescência de Raios X. 2. Câncer de Próstata. 3. Ferro. 4. Cobre. 5. Zinco. I. Lopes, Ricardo Tadeu *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

Aos meus pais Sônia e Ubiratan

Ao meu amado marido Thiago Rocha

As minhas filhas Helena e Valentina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu que este trabalho se desenvolvesse e que me trouxe sabedoria nos momentos difíceis.

Ao meu marido, Thiago Rocha, pelo apoio incondicional, por seu amor, por acreditar em meus objetivos e por sempre falar de mim com orgulho. Obrigada pelas inúmeras vezes que me acolheu e disse que tudo daria certo, esta vitória é nossa! Obrigada por todas as madrugadas em claro que me acompanhou, por toda a ajuda com softwares durante o desenvolvimento da tese, sem você não teria conseguido, e ainda, mas não menos importante, obrigada por todas as vezes que me trouxe uma refeição quentinha quando eu não percebia o tempo passar. Você é meu porto seguro, minha vida, meu melhor amigo, meu amor e agora papai das nossas filhas.

Às minhas filhas Helena e Valentina, que estão a caminho, e já fazem parte da minha história.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e caráter, pela educação que me deram e pelo apoio que sempre expressam quanto aos meus objetivos.

Ao professor Ricardo Tadeu Lopes, por sua orientação, auxílio para tornar este trabalho possível e toda a ajuda e compreensão durante o período mais importante da minha vida.

Ao professor Marcelino dos Anjos, pela atenção, apoio para elaboração desta tese e pelo exemplo de pesquisador.

A professora Roberta Leitão, pelos conhecimentos compartilhados e pelo o apoio durante todo este trabalho.

Ao professor Luiz Eurico Nasciutti, pelo fornecimento das amostras, pela possibilidade de utilizar as instalações do Laboratório de Interações Celulares (Labic) e pelo apoio a este trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) e do Labic.

A todos os amigos da Procuradoria Geral da UERJ, pelo apoio fundamental que permitiu que este trabalho se realizasse.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

MAPEAMENTO ELEMENTAR POR MICROFLUORÊSCENCIA DE RAIOS X EM
ESFEROIDES DE LINHAGENS PROSTÁTICAS TUMORAIS SUPLEMENTADOS
COM ZINCO

Karolynne de Araujo Marins José Rocha

Maio/2019

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Roberta Gama Leitão

Programa: Engenharia Nuclear

O câncer de próstata é uma doença altamente prevalente e, excetuando o câncer de pele não melanoma, ocupa o segundo lugar entre as neoplasias malignas que afetam homens em todo o mundo. Oligoelementos estão envolvidos em muitos processos celulares normais e patológicos. A microfluorescência de raios X (microXRF) é uma ferramenta avançada de alta resolução espacial, sensibilidade para a análise multielementar e não-destrutiva de elementos-traço. O objetivo deste estudo foi investigar a distribuição elementar em esferoides obtidos a partir de linhagens celulares prostáticas utilizando a microfluorescência de raios X (SR-microXRF): linhagem celular normal imortalizada (RWPE-1), linhagem de células tumorais dependentes de andrógeno (LNCaP) e linhagem de células tumorais independentes de andrógeno (DU145), após a suplementação com $ZnCl_2$. Estudos sugerem que o aumento do zinco na próstata pode ser uma estratégia terapêutica potencial. As medidas foram realizadas com uma geometria padrão de 45° de incidência, excitada por um feixe branco usando um pixel de $25\ \mu m$ e um tempo de aquisição de 300 ms / pixel na linha de luz XRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, Brasil). Os resultados da análise por SR-microXRF mostraram diferentes comportamentos de ferro, cobre e zinco em linhagens celulares normais e de tumor de próstata. Assim, nosso modelo pode representar uma ferramenta importante para entender o desenvolvimento e progressão desta doença.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ELEMENTARY MAPPING OF X-RAY MICROFLUORSCENCE IN
SPHEROIDS OF TUMOR PROSTATIC CELL LINES SUPPLEMENTED WITH
ZINC

Karolynne de Araujo Marins José Rocha

May/2019

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Roberta Gama Leitão

Department: Nuclear Engineering

Prostate cancer is a highly prevalent disease and, except for non-melanoma skin cancer, it ranks second among malignancies affecting men around the world. Trace elements are involved in many normal and pathological cellular processes. X-ray microfluorescence (microXRF) is an advanced high-spatial resolution tool, sensitivity for multielementar and non-destructive trace element analysis. The objective of this study was to investigate the elemental distribution in spheroids obtained from prostatic cell lines using X-ray microfluorescence (SR-microXRF): normal immortalized cell line (RWPE-1), androgen dependent tumor cell line (LNCaP) and androgen-independent tumor cell line (DU145), following supplementation with $ZnCl_2$. Studies suggest that increasing zinc in the prostate may be a potential therapeutic strategy. The measurements were performed with a standard 45° incidence geometry, excited by a white beam using a $25\ \mu m$ pixel and a 300 ms / pixel acquisition time in the XRF light line at the National Synchrotron Light Laboratory (Campinas, Brazil). The results of SR-microXRF analysis showed different iron, copper and zinc behaviors in normal and prostate tumor cell lines. Thus, our model may represent an important tool to understand the development and progression of this disease.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II.....	4
ESTADO DA ARTE	4
II.1. O Ferro.....	4
II.2. O Cobre	6
II.3. O Zinco	7
II.4. Análise de amostras biológicas utilizando microXRF	9
CAPÍTULO III	14
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	14
III.1. A Próstata.....	14
III.2 O Câncer de Próstata	16
III.2.1. O Escore de Gleason	19
III.2.2. A Progressão do Câncer de Próstata	20
III.2.3. O Estresse Oxidativo.....	23
III.3. O Papel do Zinco no Câncer de Próstata	25
III.4. A Cultura de Células.....	26
III.5. Cultura em Três Dimensões (3D)	27
III.6. Fluorescência de Raios X	28
III.7. Excitação dos Elementos	30
III.8. A Emissão de Fluorescência de Raios X	34
III.9. Intensidade Relativa das Linhas de Raios X Característicos.....	36
III.10. Quantificação por Fluorescência de Raios X (XRF)	37
III.11. Microfluorescência de Raios X (microXRF).....	40
III.12. Radiação Síncrotron.....	43

III.13. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).....	43
CAPÍTULO IV	45
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
IV.1. Obtenção e Preparação dos Esferoides Celulares.	45
IV.2. Análise por microXRF.....	47
CAPÍTULO V	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
V.1. Resultados da Análise dos Esferoides Celulares da Próstata através da μ XRF ..	52
V.2. Discussão dos Resultados da Análise por microXRF	75
CAPÍTULO VI.....	80
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO A Artigos publicados em periódicos com os resultados obtidos no trabalho de Doutorado	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Representação esquemática da localização anatômica da próstata. O esquema representa o corte sagital da pelve masculina. (Adaptado de American Cancer Society, https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html) ...	14
Figura 3.2 – Visão pósterio-lateral em 3D de uma próstata com aumento da Zona de Transição devido à HBP mostrando sua anatomia zonal com uma seção transversal (BOUYÉ et al., 2009).	15
Figura 3.3 – O câncer de próstata como modelo iterativo de dormência oncológica. (Adaptado de CREA et al., 2015).	22
Figura 3.4 – Esquemático do Estresse Oxidativo. (Adaptado de SILVA; JASIULIONIS, 2014).	24
Figura 3.5 - Esquemático do Efeito Fotoelétrico - (A) O fóton incidente chega ao átomo, (B) Um elétron de orbital mais interno é ejetado deixando uma vacância, (C) Um elétron de orbital mais energético ocupa a vacância emitindo fluorescência.	29
Figura 3.6 - Transições de níveis de energias (Adaptado de ANJOS, 2000).	35
Figura 3.7 - Representação esquemática do efeito Auger (Adaptado de https://www.eag.com/pt/resources/tutorials/auger-tutorial-theory/).	36
Figura 3.8 – Esquema simplificado da análise por microXRF (MELO JÚNIOR, 2007).	41
Figura 3.9 - Representação esquemática da obtenção de uma imagem.	42
Figura 3.10 – Foto Panorâmica do Anel.	44
Figura 4.1 – Esquemático de obtenção e preparação os esferoides. I – Pré-preparação: revestimento dos poços com agarose 1%. II – Tripsinização e Contagem de Células. III – Plaqueamento e Tratamento: onde são depositados 2×10^4 células e 200 μ L de meio por cada poço. IV – Arranjo na placa de 96 poços: a placa é tampada antes de ser colocada na estufa para proteção contra evaporação.	46
Figura 4.2 – Esquema experimental.	48
Figura 4.3 – Arranjo experimental (Adaptado de MERA et al., 2019).	49
Figura 5.1 – Espectro de ponto único de XRF de esferoide de células normais da próstata humana.	52
Figura 5.2 – Imagens da distribuição de Fe em esferoides RWPE-1 com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.	53

Figura 5.3 – Imagens da distribuição de Cu em esferoides RWPE-1 com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	54
Figura 5.4 – Imagens da distribuição de Zn em esferoides RWPE-1 com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	55
Figura 5.5 – Imagens da distribuição de Fe em esferoides LNCaP com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	56
Figura 5.6 – Imagens da distribuição de Cu em esferoides LNCaP com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	57
Figura 5.7 – Imagens da distribuição de Zn em esferoides LNCaP com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	58
Figura 5.8 – Imagens da distribuição de Fe em esferoides DU145 com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	59
Figura 5.9 – Imagens da distribuição de Cu em esferoides DU145 com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	60
Figura 5.10 – Imagens da distribuição de Zn em esferoides DU145 com tratamento de a) 0 μ M, b) 50 μ M, c) 100 μ M, d) 150 μ M, e) 200 μ M e f) 250 μ M.....	61
Figura 5.11 – Comparação da concentração (μ g/g) de Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares de RWPE-1 entre os tratamentos com ZnCl ₂	62
Figura 5.12 – Comparação da concentração (μ g/g) de Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares de LNCaP entre os tratamentos com ZnCl ₂	65
Figura 5.13 – Comparação da concentração (μ g/g) de Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares de DU145 entre os tratamentos com ZnCl ₂	67
Figura 5.14 – Comparação da concentração (μ g/g) de Fe nos esferoides submetidos ao tratamento de 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M e 250 μ M de ZnCl ₂ entre as linhagens celulares estudadas.	70
Figura 5.15 – Comparação da concentração (μ g/g) de Cu nos esferoides submetidos ao tratamento de 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M e 250 μ M de ZnCl ₂ entre as linhagens celulares estudadas.	72
Figura 5.16 – Comparação da concentração (μ g/g) de Zn nos esferoides submetidos ao tratamento de 0 μ M de ZnCl ₂ entre as linhagens celulares estudadas.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições experimentais.....	48
Tabela 2 - Dimensão, matriz e número de espectros das amostras de RWPE-1.	49
Tabela 3 - Dimensão, matriz e número de espectros das amostras de LNCaP.....	50
Tabela 4 - Dimensão, matriz e número de espectros das amostras de DU145.....	51
Tabela 5 - Comparação entre os resultados experimentais e os valores de referência da amostra certificada: NIST - Standard Reference Material 1577b (Fígado Bovino).....	62
Tabela 6 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro da linhagem RWPE-1.	63
Tabela 7 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cobre da linhagem RWPE-1.	63
Tabela 8 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zinco da linhagem RWPE-1.....	64
Tabela 9 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro da linhagem LNCaP.....	65
Tabela 10 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cu da linhagem LNCaP.....	66
Tabela 11 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zn da linhagem LNCaP.....	66
Tabela 12 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe da linhagem DU145.....	68
Tabela 13 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cu da linhagem DU145.....	68
Tabela 14 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zn da linhagem DU145.	69
Tabela 15 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e DU145 nos esferoides submetidos aos tratamentos de ZnCl_2	71
Tabela 16 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cu entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e DU145 nos esferoides submetidos aos tratamentos de ZnCl_2	73
Tabela 17 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zn entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e DU145 nos esferoides submetidos aos tratamentos de ZnCl_2	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

ATP	Trifosfato De Adenosina
CMV	Citomegalovírus
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CSCs	Células-Tronco Cancerosas
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
DCCs	Células-Tronco Cancerosas Competentes em Termos De Dormência
DICs	Células-Tronco Cancerosas que Sofrem Grandes Mutações
D-pen	D-penicillamina
DU145	Linhagem Celular Tumoral da Prostática Independente de Andrógeno
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
HA	Hidroxiapatita
hCTR1	Transportador Transmembrana de Cobre
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HPV	Human Papiloma Virus - Papilomavírus Humano
hZIP1	Transportador de Zinco Humano
Iarc	International Agency for Research on Cancer
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNCaP	Linhagem de Células Tumorais Prostáticas Dependentes de Andrógeno
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
NCI	National Cancer Institute
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
OH	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAP	Fosfatase Ácida da Próstata
PBS	Solução Tampão Fosfato
PC3	Linhagem Celular Tumoral da Prostática Independente de Andrógeno
PSA	Antígeno Específico da Próstata
RA	Receptor Androgênico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RWPE-1	Linhagem de Célula Epitelial da Próstata Transformado pelo HPV
SFB	Soro Fetal Bovino
SRμXRF	Microfluorescência de Raios X Síncrotron
TRAMP	Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate
ZIP1	Transportador de Absorção de Zinco

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Esta tese visa analisar a distribuição química elementar em linhagens celulares de tecido prostático humano normal, RWPE-1, e tumoral, LNCaP e DU145, em culturas tridimensionais através da técnica de microfluorescência de raios X, após a suplementação com Cloreto de Zinco ($ZnCl_2$) e suas possíveis implicações na patogênese dessa doença.

Baseado *World Cancer Report 2014 da International Agency for Research on Cancer (Iarc)*, da Organização Mundial da Saúde (OMS), é indubitável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde se espera, nas próximas décadas, que seu impacto na população represente 80% dos mais de 20 milhões de novos casos de câncer estimados até 2025 (INCA, 2016 e INCA, 2018).

A estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/Iarc, mostrou que ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer (exceto câncer de pele não melanoma) e 8,2 milhões de óbitos, sendo notório um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figurarão entre os principais. Vale mencionar que, o câncer de próstata é considerado o segundo tipo mais comum de câncer na população masculina em todo o mundo (INCA, 2016 e INCA, 2018).

A cultura celular é caracterizada por permitir a manutenção de células vivas em laboratório, independentemente do organismo que as originou. A utilização desta técnica possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula permitindo importantes avanços científicos no que se refere, por exemplo, a produção de vacinas e a biologia da célula tumoral (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011). Em um esforço

constante para produzir modelos *in vitro* cada vez mais pertinentes para estudos sobre o câncer, a importância de se estudar células cancerígenas em três dimensões (3D) é cada vez mais reconhecida. Os esferoides são conhecidos por simular micro tumores mais próximos da realidade do que as monocamadas e têm sido usados principalmente em estudos de resistência a radio e quimioterapia. De fato, os esferoides tumorais representam de forma bastante realista o crescimento tridimensional e a organização de tumores avasculares sólidos e, conseqüentemente, simulam com muito mais precisão as interações célula-célula e as condições micro ambientais encontradas nesses tumores, especialmente os gradientes de nutrientes e oxigênio (WEISWALD et al., 2010).

O ferro, um importante elemento traço, desempenha um papel vital no metabolismo do oxigênio, na captação de oxigênio e no transporte de elétrons nas mitocôndrias, no metabolismo energético, na função muscular e na hematopoese. Em pacientes com câncer, a homeostase do ferro frequentemente está distorcida (LUDWIG et al., 2015).

O cobre é um oligoelemento essencial que desempenha um papel central na bioquímica de todos os organismos vivos e seus níveis são aumentados no tecido tumoral de pacientes afetados pelo câncer de próstata (GUPTE; MUMPER, 2009; GOUGH et al., 2014 e LEITÃO et al., 2014). Concentrações de cobre aumentadas podem estar relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ao estresse oxidativo, que estão envolvidos no processo inicial do câncer, causando alterações no DNA (ANTONIADES et al., 2013).

O zinco é o segundo oligoelemento essencial mais abundante e tem vários papéis fisiológicos. A próstata humana normal tem uma capacidade incomum de acumular altos níveis de zinco; geralmente cerca de 10 vezes maior do que outros tecidos moles. Uma das mais persistentes características de malignidade da próstata é a perda da capacidade de acumular zinco (NISHIKAWA; MORI; HARA, 2017 e JOHNSON et al., 2010). Ele pode inibir o crescimento de células de carcinoma prostático humano, devido à indução de parada do ciclo celular e apoptose. A insuficiência de zinco tem sido associada com o desenvolvimento de muitos tumores, e, inversamente, o tratamento com zinco inibe o desenvolvimento do tumor. Assim, o zinco mostra forte atividade anti-proliferativa contra diferentes linhagens de células cancerosas humanas, incluindo células cancerosas da próstata. No entanto, o mecanismo pelo qual o zinco inibe as células cancerosas ainda não é bem compreendido (BANUDEVI et al., 2010).

A microfluorescência de raios X (microXRF) é frequentemente usada para avaliar a composição matricial do material. Uma das vantagens da técnica é o dano térmico desprezível na amostra, considerando que, uma vez que menos energia é depositada, esses danos e problemas associados à perda de elementos voláteis e às alterações químicas são evitados. Uma fonte de síncrotron fornece um tamanho de ponto submicrométrico com fluxo de fótons muito alto, de modo que a amostra é rastreada por varredura através de um feixe de raios X focado, e o sinal de XRF emitido de cada ponto é coletado e analisado. Esta técnica permite a resolução subcelular de múltiplos elementos e foi aplicada a numerosas amostras orgânicas e inorgânicas (LANKOSZ et al., 2004, RAK et al., 2014 e SALES et al., 2012).

O objetivo principal desta tese foi através da técnica de microfluorescência de raios X com radiação Síncrotron obter a distribuição de Ferro, Cobre e Zinco em amostras de esferoides de células prostáticas humanas estabelecidos a partir das linhagens: RWPE-1 (normal) e LNCaP (tumoral andrógeno dependente) e DU145 (tumoral andrógeno independente) após tratamento com $ZnCl_2$.

Os objetivos específicos foram:

- a) Obter os mapas bidimensionais dos elementos químicos Ferro, Cobre e Zinco em cada tipo de linhagem celular;
- b) Avaliar a influência do tratamento com Cloreto de Zinco nas concentrações intracelulares dos elementos químicos Ferro, Cobre e Zinco em cada um dos esferoides analisados.

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

II.1. O Ferro.

O ferro é essencial para as funções fisiológicas normais nos seres humanos, como parte integrante de muitas proteínas e enzimas. Também desempenha um papel vital na regulação do crescimento celular e na diferenciação celular. A sobrecarga de ferro está associada a várias doenças crônicas, como doenças cardíacas, câncer, diabetes e controle regulatório imunológico defeituoso (BANAS et al., 2010).

O metabolismo do ferro desempenha um papel significativo no crescimento de células cancerosas, na angiogênese e na metástase. A ferroportina é uma proteína transmembrana que transporta ferro do interior para o exterior das células e é o único exportador de ferro mamífero conhecido até o momento (XUE et al., 2015).

Qualquer nível não regulado de Fe^{2+} tem o potencial de catalisar e gerar radicais hidroxila a partir de superóxido e peróxido de hidrogênio via Reação de Fenton. Os radicais hidroxila altamente reativos subsequentemente causam peroxidação lipídica e degradação de outras macromoléculas, levando a dano celular ou morte. O ferro também contribui para o desenvolvimento da doença, funcionando como um nutriente para as células microbianas e neoplásicas. O ferro promove a inflamação e aumenta o crescimento das células cancerígenas. O papel do Fe na estimulação da angiogênese também tem sido sugerido (BANAS et al., 2010).

Grotto (2008) abordou os diversos aspectos relacionados a cinética do ferro, descrevendo as proteínas e mediadores nela envolvidos e, ainda, como é feita a regulação intracelular e sistêmica do ferro que visa a manutenção de uma quantidade ótima de ferro para o metabolismo das células e, em especial, para uma perfeita hematopoiese.

Banas et al. (2010) observaram níveis mais elevados de Fe nos tecidos prostáticos malignos em relação aos tecidos não cancerosos e que as concentrações deste elemento aumentaram com o avanço do estágio do câncer: cerca de 3 vezes para os graus 2 e 3 de Gleason. O maior nível foi observado para o grupo grau 4 de Gleason (quase 6 vezes).

Foy et al. (2011) propuseram que altas doses de nano partículas de óxido de ferro podem ser usadas como um tratamento para o câncer, gerando um ataque oxidativo contra o câncer. Esta proposta pode ser recebida com resistência considerando a controvérsia em

torno do ferro no campo do câncer. O ferro, em seu estado elementar, pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), através da reação de Fenton, que podem causar ou prevenir o câncer. As células tumorais são comumente expostas a condições de estresse, e o estresse oxidativo crônico é um dos mecanismos pelos quais a transformação maligna ocorre. No entanto, a alta demanda por ferro pelas células cancerígenas leva a abordagens terapêuticas contraditórias: a privação de ferro ou a superdosagem são ambas possíveis terapias contra o câncer.

Ludwig et al. (2015) fizeram um breve resumo sobre a fisiopatologia do metabolismo do ferro com particular ênfase no câncer. Além disso, as evidências disponíveis para suplementação de ferro em pacientes com deficiência funcional de ferro foram revisadas.

Xue et al. (2015) examinaram os níveis de expressão da ferroportina nas linhagens celulares PC3, DU145 e LNCaP do câncer da próstata, na linhagem celular normal da próstata RWPE-1 e em amostras de tecido em diferentes estádios de diferenciação de carcinoma prostático e hiperplasia prostática. O estudo também investigou o papel da expressão da proteína ferroportina no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata. Em comparação com as células normais da próstata RWPE-1, a expressão da proteína ferroportina foi significativamente menor nas células PC3, DU145 e LNCAP. Em comparação com os tecidos da hiperplasia prostática benigna, a expressão da proteína ferroportina foi significativamente reduzida nos tecidos do câncer de próstata. No geral, os níveis de expressão de ferroportina nos tecidos de câncer de próstata foram menores do que nos tecidos normais da próstata, o que pode fornecer informações clínicas valiosas para o diagnóstico e previsão da progressão da doença no câncer de próstata e pode indicar um potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer de próstata regulando o metabolismo do ferro.

II.2. O Cobre

No nível molecular, o cobre pode contribuir para a progressão do câncer através de vários mecanismos, incluindo danos celulares mediados pelo estresse oxidativo ou a estimulação da angiogênese (GUPTE; MUMPER, 2009).

Para células normais, altos níveis de cobre são tóxicos; nas células tumorais, níveis aumentados deste metal podem ser encontrados. O mecanismo que permite que as células doentes proliferem em altos níveis de cobre pode ser importante para entender a progressão e o desenvolvimento do câncer. As células tumorais não podem crescer mais de 1-2 mm de diâmetro sem angiogênese, que fornece oxigênio e nutrientes ao tumor, e as células cancerosas desenvolveram formas de sintetizar seus próprios estimuladores angiogênicos (GOUGH et al., 2014). Assim, os mecanismos pelos quais as células cancerosas podem regular sua resistência a níveis aumentados de cobre dentro do microambiente tumoral são de grande importância para o desenvolvimento da doença (ANTONIADES et al., 2013).

Alguns possíveis mecanismos pelos quais o estresse oxidativo induzido pelo cobre interfere no processo de carcinogênese são mutações no DNA (expressão gênica), nas mitocôndrias (DNA e membrana interna) ou alterações nos fosfolipídios de membrana (ANTONIADES et al., 2013).

Gupte e Mumper (2009) discutiram o direcionamento do cobre elevado (tanto em níveis séricos quanto tumorais) e os níveis de estresse oxidativo no câncer com o auxílio de um quelante de cobre, D-penicilamina (D-pen), para um tratamento em potencial do câncer.

Antoniades et al. (2013) hipotetizaram que a terapia de quelação de cobre poderia ser uma estratégia anticâncer possível. Em particular, terapias que reduzem os níveis plasmáticos de cobre possuem propriedades anticancerígenas devido a: aumento da apoptose de células cancerosas, inibição de angiogênese ou mesmo da troca angiogênica, redução da degradação da matriz extracelular e disseminação de câncer e inibição da propagação de micro metástases.

Gough et al. (2014) examinaram o papel desempenhado pela proteína precursora de amiloide (PPA) em atenuar a inibição do crescimento induzida por cobre da linhagem celular de câncer de próstata (DU145).

Denoyer et al. (2015) buscaram estabelecer se as concentrações de cobre aumentam em tecidos prostáticos cancerosos, e em soros, em pacientes ao longo da

progressão da doença e concluíram que a natureza heterogênea das concentrações de cobre nos tecidos prostáticos cancerosos sugere que um pequeno subgrupo de pacientes pode responder a tratamentos que visam o cobre intratumoral elevado. Portanto, tais abordagens provavelmente exigiriam estratégias de tratamento personalizadas.

Já em 2016, Denoyer et al. analisaram os níveis intracelulares de cobre no câncer de próstata, avaliados *in vitro* e através da progressão da doença em camundongos *transgenic adenocarcinoma mouse prostate* (TRAMP) e os resultados forneceram uma base para a atividade farmacológica dos ionóforos de cobre, sugerindo que eles são passíveis de correção para o tratamento de pacientes com câncer de próstata.

II.3. O Zinco

O zinco é um constituinte importante do fluido prostático e é conhecido por desempenhar um papel no desenvolvimento e funcionamento normal da próstata. Tecidos normais da próstata de indivíduos saudáveis acumulam os níveis mais altos de zinco no corpo. Na célula epitelial da próstata, o alto acúmulo de zinco celular desempenha uma função especializada necessária para que essas células realizem as principais funções fisiológicas de produção e secreção de citrato. Células prostáticas malignas que se desenvolvem na zona periférica da glândula não contêm os altos níveis de zinco que caracterizam a secreção normal células epiteliais. Estudos mostram consistentemente que os níveis de zinco no tecido prostático maligno são 62% -75% inferiores do que no tecido normal da próstata. No entanto, as vias que levam a um menor acúmulo de zinco em as células epiteliais tumorais da próstata são pouco compreendidas (CHRISTUDOSS et al., 2011).

Apesar de o zinco ser um importante fator para muitas enzimas e proteínas celulares e ser essencial para a função normal de todas as células, apenas recentemente começou-se a compreender os mecanismos de absorção do zinco celular por células de mamíferos. A existência de um processo de transporte rápido de zinco tem sido relatada para as linhagens tumorais de células da próstata humanas, LNCaP e PC-3 (FRANKLIN et al. 2015).

O zinco atua como cofator para importantes enzimas que contribuem para o bom funcionamento do sistema de defesa antioxidante. Além disso, este mineral protege as células contra o dano oxidativo, pois atua na estabilização de membranas, inibe a enzima

nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), uma enzima pró-oxidante, e induz a síntese de metalotioneína. A metalotioneína está envolvida na redução de radicais hidroxila (OH) e no sequestro de espécies reativas de oxigênio produzidas sob condições de estresse (MARREIRO et al., 2017).

Johnson et al. (2010), relataram um novo método diferencial de coloração de Zn, que se correlaciona com vários estágios do desenvolvimento do câncer de próstata *in situ*, e a expressão de um transportador de Zn humano (hZIP1).

Christudoss et al. (2011), estimaram e compararam os níveis de zinco no tecido da próstata, plasma e urina obtidos de pacientes diagnosticados com HPB ou carcinoma prostático e concluíram que no carcinoma da próstata, a média de zinco no tecido diminuiu em 83% em comparação com o tecido normal. Na HPB, houve uma diminuição de 61% na média de zinco em comparação com os tecidos normais. No plasma de pacientes com câncer de próstata, o Zinco mostrou uma diminuição de 27% em relação aos controles e 18% de redução em relação à HBP. Na urina, a razão zinco / creatinina foi significativamente aumentada para 53% em pacientes com câncer de próstata, e um aumento significativo foi observado na HPB em comparação com indivíduos normais.

Franklin (2014), caracterizou o câncer da próstata como uma doença maligna "ZIP1 deficiente" e um tratamento ionóforo de zinco (por exemplo, Clioquinol) para aumentar os níveis de zinco foi considerado. Esse estudo analisou novos dados experimentais que mostraram que o Clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-quinolinol) que é um ionóforo (molécula solúvel em lipídios, usualmente sintetizada por microrganismos para transportar íons através da bicamada lipídica da membrana celular), suprimiu a malignidade da próstata, o experimento consistiu no emprego da linhagem celular PC3 para determinar se o clioquinol iria aumentar a absorção e acumulação de zinco e, se assim fosse, isto iria resultar na inibição da proliferação. Os resultados mostraram aumento do acúmulo de zinco que resultou na inibição da proliferação celular. Estas considerações evidenciam que uma abordagem de tratamento com zinco para câncer de próstata deve ser realizada com pesquisas adicionais, levando a futuros ensaios clínicos.

Franklin et al. (2015), apresentaram provas convincentes de que hZIP1 é um transportador funcional importante e responsável pela rápida absorção e acumulação de zinco fisiologicamente eficaz em células da próstata, e sugerem um mecanismo de transporte de zinco celular. Os resultados demonstraram que as células que super expressam hZIP1 tiveram taxas de crescimento mais lentas do que o controle citomegalovírus (CMV). Também foi demonstrada uma correlação entre o aumento da

expressão de hZIP1 e os efeitos celulares da absorção e acumulação de zinco. A acumulação de zinco em células resultou em apoptose mitocondrial. Portanto, a relação negativa entre a super expressão da proteína de transporte de zinco e o crescimento das células é consistente com um aumento na acumulação de zinco mediada por hZIP1.

NISHIKAWA, MORI e HARA (2017) analisaram o gene relativo expressão de 14 ZIPs diferentes em células-tronco / precursoras neurais murinos e células diferenciadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real. A expressão de ZIP4 e de ZIP12 aumentou drasticamente, enquanto a de ZIP8 diminuiu claramente após diferenciação de células-tronco.

II.4. Análise de amostras biológicas utilizando microXRF

A análise de fluorescência de raios X (XRF) é uma técnica multielementar de alta precisão e acurácia com alta sensibilidade para detecção de elementos traços. A técnica é particularmente útil para aplicações em muitos campos da ciência, pesquisa e controle de qualidade. A espectrometria XRF tem sido amplamente utilizada para estudar a composição elementar de amostras biomédicas. Portanto, esta técnica tem inúmeras aplicações em biologia e medicina (SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, 2012).

Uma vantagem importante da técnica microfluorescência de Raios X (μ XRF) é que o feixe primário pode ser focado para um tamanho muito pequeno, o que permite a análise de pequenas características estruturais. Uma vez que menos energia é depositada na amostra, como resultado da excitação dos raios X em relação a partículas de elétrons ou fontes de excitação carregadas, danos térmicos para as amostras e os problemas associados à perda de elementos voláteis e alterações químicas são evitados (LANKOSZ et al., 2004).

A análise elementar precisa é de crescente importância em muitas áreas de investigação científica. Na literatura é possível encontrar uma vasta gama de aplicações desta técnica analítica. Ao longo dos últimos anos, observou-se um crescente interesse na utilização de microXRF em investigações médicas. Isso resulta do fato de que este método permite a investigação de mudanças na composição elementar no nível de uma única célula, isto é particularmente importante tendo em vista que os processos bioquímicos normais e patológicos seguem uma micro e submicro escala. Além disso, há fortes evidências de que metais ou íons metálicos selecionados estão intimamente associados com a etiologia ou manifestação de muitas doenças. A análise elementar

quantitativa de tecidos patologicamente alterados pode lançar alguma luz sobre os processos que conduzem à degeneração e atrofia celular (CHWIEJ et al., 2005).

Banas et al. (2010) aplicaram a técnica de emissão de fluorescência de raios X por radiação síncrotron para análise quantitativa dos elementos Mn, Fe, Cu e Zn. Os resultados parecem interessantes à luz da determinação das alterações nas concentrações de oligoelementos como um potencial marcador diagnóstico e seu envolvimento etiológico nos diferentes estágios das doenças da próstata.

Sales et al. (2012), analisaram a qualidade do osso para interpretar observações clínicas quanto a saúde óssea. A avaliação do conteúdo mineral foi realizada por mapeamentos bidimensionais de concentrações de cálcio, zinco e estrôncio através da técnica de μ XRF, em amostras de osso das vértebras lombares L3 e L4 de ratos Wistar, divididos em grupos de controle e de envelhecimento. O mapa bidimensional mostrou que o cálcio teve uma pequena variação na comparação entre estes dois grupos. Também foi possível notar, que a distribuição deste elemento foi homogênea nos dois grupos, no entanto, os elementos zinco e estrôncio mostraram-se distribuídos de forma heterogênea e as concentrações destes minerais foram baixas no grupo de envelhecimento quando comparada ao controle. Assim, esses autores concluíram que a redução destes dois elementos pode levar a certa fragilidade na região trabecular e que os ossos, nesta condição, são mais susceptíveis a fraturas.

Gasperini et al. (2011) investigaram a distribuição mineral de osso em amostras com nano hidroxiapatita (HA) e em esferas HA, especialmente a distribuição espacial na microarquitetura óssea. A hidroxiapatita é um constituinte natural dos ossos e constitui de 30 a 70 % da massa dos ossos e dos dentes; a hidroxiapatita sintética é amplamente utilizada em próteses ortopédicas e implantes dentais (SOUZA, 2011). O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição elementar do Cálcio. Os resultados revelaram uma maior área óssea recém-formada nos materiais não sintetizados e grupos controle, e a técnica utilizada mostrou que a quantidade de cálcio do osso novo era consistente tanto com o osso maduro quanto com as esferas HA. Em conclusão, os achados sugeriram que os biomateriais à base de HA são biocompatíveis, promovem a osteocondução e favorecem a reparação óssea.

Cardoso et al. (2011) caracterizaram o estado pluripotente de células tronco através da análise da distribuição de elementos traço usando técnica de μ XRF. Detectaram os elementos P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu e Zn. O Cl não foi considerado no estudo, tendo em vista que seu comportamento não seguiu um padrão. Os

elementos, Cr e Mn também não foram considerados devido aos seus níveis de distribuição muito baixos.

Rak et al. (2014) utilizaram a técnica de μ XRF para criar mapas de distribuição quantitativa dos elementos P, S, K e Ca em amostras fúngicas. Distribuições de elementos no tipo selvagem fungos refletem aspectos biológicos já conhecidos ou esperados de outros tipos de análise; no entanto, a aplicação de raios X e imagem de fluorescência (XRF) revelou aspectos do gene, fenótipos de deleção, que não estavam disponíveis anteriormente.

Uo; Wada; Sugiyama (2015) apresentaram um esboço de um aparelho de XRF e suas aplicações de XRF para tecidos dentais duros e moles. Foi observada uma correlação positiva entre Zn, S e Pb concentrações nos dentes e o nível de poluição no ambiente. Além disso, as concentrações de Zn e Pb nos dentes dos fumantes foram significativamente maiores do que as dos não-fumantes.

Lu et al. (2015) utilizaram microfluorescência de raios X baseada em radiação síncrotron (SR-microXRF) para caracterizar as distribuições de cálcio e zinco na zona de fibrocartilagem do complexo patela-patelar do tendão de coelho (PPTC) e concluíram que existe uma distribuição diferencial de cálcio e zinco na zona de fibrocartilagem do PPTC.

Surowka et al. (2015) realizaram uma tentativa preliminar de desvendar alguns dos mecanismos associados à idade e responsáveis pelo metabolismo de alguns elementos redox-ativos e redox-inativos em idosos. Para isso, amostras de tecidos de substância nigra, extraídas de 37 indivíduos que morreram sem qualquer sinal de neurodegeneração, foram submetidas a estudos espectroscópicos usando fluorescência de raios X baseada em radiação síncrotron. Concluíram que nos neurônios, Fe tende a diminuir, enquanto Cu, Zn e Ca se acumulam à medida que o indivíduo envelhece.

Leitão et al. (2015) investigaram a distribuição de Zn em esferoides benignos da próstata (HPB) e câncer de próstata (DU145) e analisaram as diferentes respostas ao tratamento com Zinco usando a microfluorescência de raios X (SR-microXRF). Os resultados mostraram uma distribuição não uniforme de Zn em todos os esferoides analisados. A resposta diferencial dos esferoides de células DU145 e HPB ao zinco sugere que existem diferentes mecanismos de acumulação de Zn em células tumorais, sejam elas benignas ou malignas.

Hachmöller et al. (2016) analisaram um espécime de biópsia hepática de um paciente com doença de Wilson por meio de espectroscopia de microfluorescência de raios X (microXRF) para determinar sua distribuição elementar. Mapas de distribuição

de elementos adicionais ao cobre e ferro como zinco e manganês foram obtidos devido a uma maior sensibilidade da técnica. Além disso, a espectroscopia de absorção de raios X foi realizada para identificar os estados de oxidação do cobre na doença de Wilson.

Al-ebraheem et al. (2016) utilizaram a Microfluorescência de raios X com Radiação Síncrotron (SR-microXRF) para medir as concentrações de manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn) em regiões de substância cinzenta e substância branca em roedores *Shaker* e seus controles *Long Evans* de mesma idade no cerebelo e na medula espinhal e concluíram que a sensibilidade da técnica é suficiente para discriminar entre as distribuições elementares de matéria cinzenta e branca das secções do cérebro e medula espinhal nos dois grupos.

Sartore et al. (2017), analisaram organoides cerebrais derivados de células-tronco pluripotentes humanas por fluorescência de raios X com radiação síncrotron para medir micronutrientes biologicamente valiosos incorporados e distribuídos no cérebro em desenvolvimento *in vitro*. As descobertas indicaram que a inclusão elementar em organoides é consistente com o tecido cerebral humano e envolve P, S, K, Ca, Fe e Zn e lançaram luz sobre quais oligoelementos são importantes durante o desenvolvimento do cérebro humano.

Epaule et al. (2017) avaliaram a capacidade da técnica de SR-microXRF para detectar drogas em nanomedicamentos sem adicionar nenhum marcador, realizando o mapeamento de sua distribuição em tecidos e quantificação local dos fármacos carregados em nanomedicamentos. Concluíram que a análise por microXRF baseada em radiação síncrotron foi sensível o suficiente para detectar e mapear a distribuição de uma droga aprisionada em nanomedicina. E que a análise quantitativa local é possível com um elemento tecidual como referência, ou sem quantitativamente, se a referência do tecido não for homogênea.

Wróbel et al. (2017) propuseram um esquema de cálculo baseado em imagens combinadas de microfluorescência de raios X (microXRF) e de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) para determinar as distribuições de frações de massa elementares corrigidas de tecidos de rato comumente analisados: rim, fígado e baço. Os resultados da análise de TXRF de grandes secções de tecido digerido juntamente com os valores médios de massas elementares por unidade de área obtidos com microXRF foram utilizados para determinar as massas médias por unidade de área das amostras. Concluíram que essa nova abordagem pode ser usada para produzir contraste elementar

em uma variedade de espécimes biológicos, onde as variações locais na densidade ou espessura da amostra não são mais o problema.

Rocha et al. (2017) investigaram a viabilidade celular através do ensaio colorimétrico de citotoxicidade (MTT) e o comportamento das linhagens celulares de próstata humana obtidas do epitélio normal (RWPE-1) e tumoral (DU145), em culturas esferoides tridimensionais após suplementação com $ZnCl_2$ por 24 e 48 horas usando SR-microXRF. Concluíram que a técnica de microXRF pode ser usada como uma ferramenta importante para entender o mecanismo da perda da capacidade de capturar o zinco pelas células do câncer de próstata.

Sales et al. (2018) empregaram a microfluorescência de raios X (microXRF) e a difração de raios X (XRD) para avaliar o grau de desmineralização em osso cortical bovino. Os resultados da XRD mostraram que o EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) com alta concentração teve um impacto maior na cristalinidade das amostras causando um dano severo.

Portanto, é notório que a técnica de fluorescência de raios X em suas diversas variantes é ideal para fornecer informações acerca das condições elementares intracelulares, com alta resolução espacial e sensibilidade.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

III.1. A Próstata

A próstata é uma glândula do tamanho aproximado ao de uma noz, localizada na porção inferior do abdômen, sob a bexiga e em frente ao reto. Os hormônios masculinos são responsáveis pelo crescimento da próstata. A próstata cresce até que o homem atinja a idade adulta e, em seguida, permanece aproximadamente o mesmo tamanho, enquanto hormônios masculinos são produzidos. Ela envolve a porção inicial da uretra, tubo pelo qual a urina armazenada na bexiga é eliminada, e produz parte do sêmen, líquido espesso que contém os espermatozoides, liberados durante o ato sexual (BANAS et al., 2010 e FUSCALDI, 2012). Segue na figura 3.1 representação de corte sagital da pelve masculina.

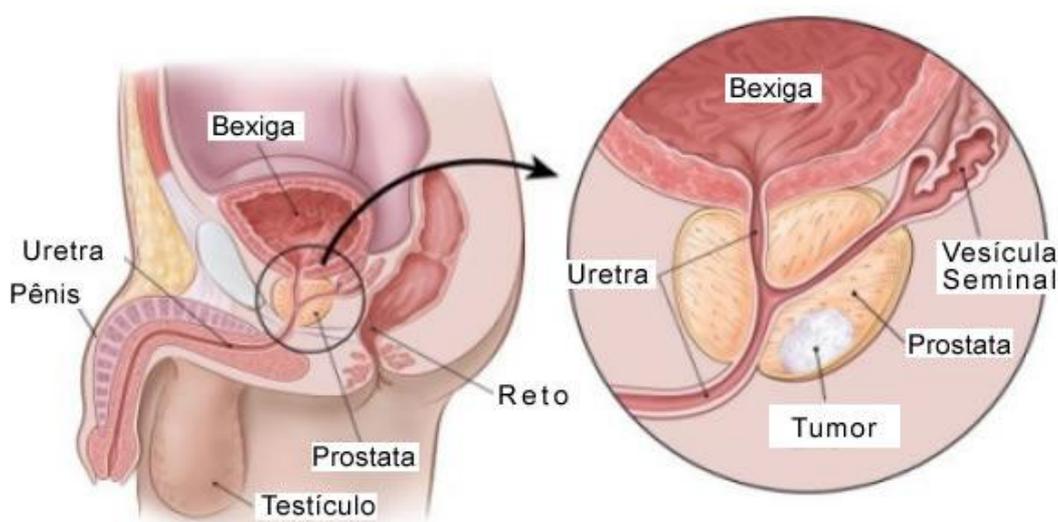


Figura 3.1 – Representação esquemática da localização anatômica da próstata. O esquema representa o corte sagital da pelve masculina. (Adaptado de American Cancer Society, <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html>)

O histotipo mais frequente, que representa cerca de 80% de todos os cânceres da próstata, é o adenocarcinoma da próstata que surge a partir das células epiteliais secretoras da zona periférica. A próstata normal pode ser dividida em três partes: a zona periférica

que representa os 70% da glândula, a zona central (cerca de 25%) e a zona de transição (5%), conforme figura 3.2. O fluido prostático é produzido principalmente a partir das células da zona periférica. Cerca de 90% da malignidade da próstata surge desta parte da glândula, enquanto cerca de 10% tem origem na zona de transição (VELLA et al., 2017).

A próstata é responsável pela produção e armazenamento do líquido prostático, um fluido incolor com pH médio de 6,6 que contribui com uma série de proteínas e elementos químicos que aparentemente não são essenciais para a fertilização, mas que podem otimizar as condições deste processo. A maior parte deste citrato é formada pelas células epiteliais secretoras prostáticas, a partir de ácido aspártico e glicose. Assim, as altas concentrações dentro da glândula decorrem, em parte, de um mecanismo de regulação intrínseco de suas mitocôndrias que impede a oxidação do composto quando ele é formado, portanto sua taxa de síntese excede a taxa de oxidação. Outro elemento encontrado em grande quantidade no líquido seminal é o zinco, que assim como o citrato é secretado primariamente pela próstata, sendo a glândula o local do organismo onde há a maior concentração do íon (OLIVEIRA, 2013).

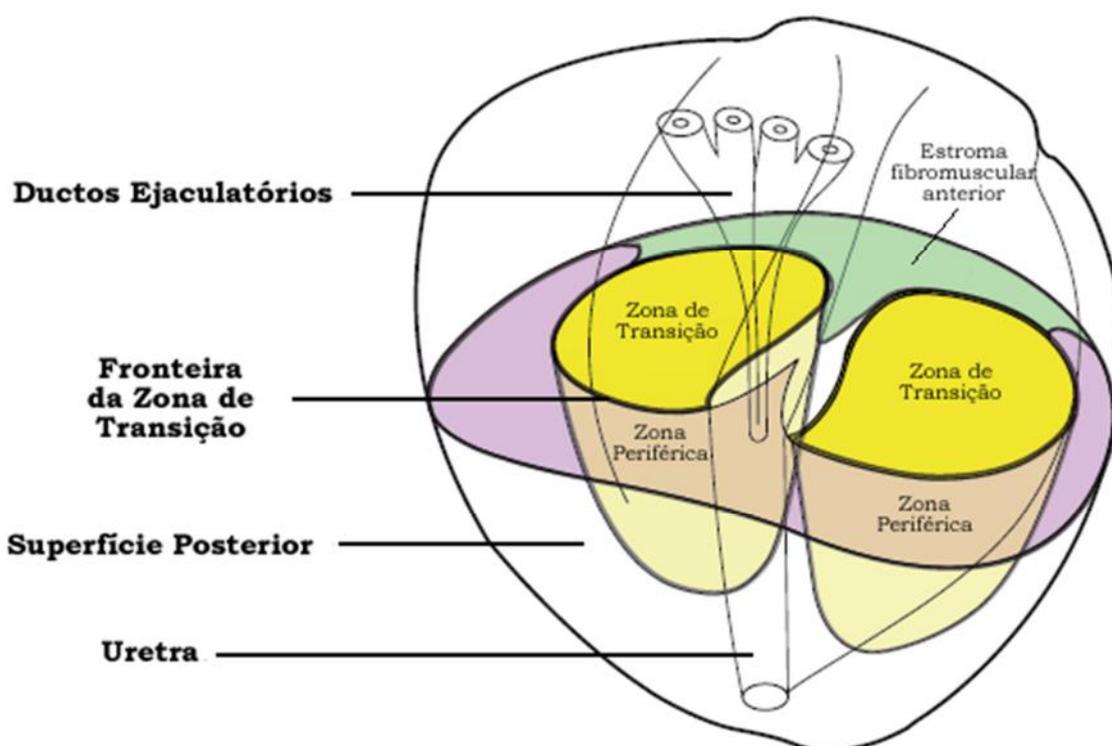


Figura 3.2 – Visão pósterolateral em 3D de uma próstata com aumento da Zona de Transição devido à HBP mostrando sua anatomia zonal com uma seção transversal (BOUYÉ et al., 2009).

A principal função da próstata é a alta produção e secreção de citrato que é efetuada devido à acumulação única de zinco pelas células epiteliais da próstata. A reação chave responsável por esta acumulação de citrato é a atividade mitocondrial limitante da enzima m-aconitase que exclusivamente minimiza a oxidação de citrato em células da próstata. Esta atividade resulta dos efeitos inibitórios de zinco sobre a enzima. Isto evita a oxidação de citrato através do ciclo de Krebs, de modo que ele se acumula para secreção como um componente principal de fluido prostático. Portanto, o citrato é um produto final do metabolismo intermediário, em células da próstata. Em praticamente todas as outras células de mamíferos, o citrato é um intermediário crítico que é oxidado através do ciclo de Krebs para a produção de trifosfato de adenosina (ATP). A inibição da m-aconitase é letal para a maioria das células de mamíferos, por conseguinte, a ligação de zinco citrato é única para estas células da próstata (FRANKLIN et al., 2015).

Em relação aos fatores de risco para o câncer de próstata, o avanço da idade compreende um fator de risco bem estabelecido, tendo em vista que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam após os 50 anos (HOWLADER et al., 2017). O histórico familiar em primeiro grau apresenta associação positiva para aumento no risco de desenvolvimento dessa neoplasia (CHAN; STAMPFER; GIOVANNUCCI, 1998; STEWART et al., 2014), assim como a cor de pele/etnia são relevantes na etiologia desse tipo de câncer (CHAN; STAMPFER; GIOVANNUCCI, 1998; HOWLADER et al., 2017; NAKANDI et al., 2013). Outras associações controversas estão descritas na literatura, como hormônios sexuais (HOWLADER et al., 2017; STEWART; WILD, 2014), etilismo (STEWART; WILD, 2014), padrões dietéticos e obesidade (HERNANDEZ et al., 2009; STEWART; WILD, 2014; SUTCLIFFE; COLDITZ, 2013).

III.2 O Câncer de Próstata

O câncer de próstata ocorre quando as células da próstata crescem e se multiplicam incontrolavelmente. A massa do tumor nodular invade os tecidos circundantes e, eventualmente, se espalha para os gânglios linfáticos, ossos esqueléticos e outras regiões do corpo. Embora vários tipos de células sejam encontrados na próstata, mais de 99% dos cânceres de próstata se desenvolvem a partir das células glandulares e, portanto, são descritos como adenocarcinoma (BANAS et al., 2010).

Em nível molecular, o desenvolvimento e a progressão do câncer de próstata são caracterizados pela atividade anormal de várias vias, dentro das células da próstata e no tecido circundante, envolvidas na apoptose, na sinalização do receptor de andrógeno (RA), na transdução de sinal, na regulação do ciclo celular, na adesão e coesão celular e na angiogênese. Além disso, numerosos estudos epidemiológicos, experimentais e clínicos forneceram evidências de apoio de que o estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento do câncer de próstata (CZAPLA-MASZTAFIAK et al., 2015).

O câncer de próstata atinge principalmente homens acima de 50 anos de idade, no entanto, a etiologia do carcinoma prostático permanece desconhecida. A ocorrência da neoplasia possui aspectos singulares e fatores de risco específicos, além da idade tais como: a etnia (esse tumor é cerca de 1,6 vezes mais comum em homens negros, quando comparados aos brancos) e a predisposição genética, em que a história familiar de pai ou irmão que teve câncer de próstata antes dos 60 anos aumenta de 3 a 10 vezes a chance de desenvolver a doença em relação à população em geral. No câncer ocorrem alterações bioquímicas e enzimáticas marcantes, a adenosina e os nucleotídeos da adenina possuem papel importante na fisiologia desta doença. (BATTISTI et al., 2010 e FRIESTINO et al., 2013).

A HPB e o Câncer de Próstata são doenças comuns em homens mais velhos, e inclusive, ambas as doenças podem coexistir como documentado em espécimes cirúrgicos e autópsias. O risco de um homem desenvolver HPB tem sido relatado como sendo de 50% na sua sexta década de vida e aumenta para 70% em sua sétima década de vida. Cerca de 30.000 mortes devido ao câncer de próstata são previstos para 2014, perdendo apenas para o câncer de pulmão e brônquios. Nesta combinação, tanto HPB quanto o câncer de próstata tem um grande impacto na morbidade e mortalidade em milhões de homens. Estima-se que em cerca de 80% dos casos, o adenocarcinoma da próstata surge a partir do epitélio, nas células localizadas na zona periférica da próstata, ao passo que HPB surge quase em todos os casos a partir da zona de transição (AL-KHALIL et al., 2015).

O antígeno específico da próstata (PSA) é um marcador de tumor usado para triagem em conjunto com o exame retal. A detecção do aumento do PSA aumenta acentuadamente a sobrevida do câncer de próstata, em parte devido ao sobrediagnóstico de tumores em estágio inicial (VELLA et al., 2017).

O diagnóstico histopatológico do câncer de próstata somente confirma o diagnóstico final em 67% dos casos, enquanto 33% são diagnosticados com as outras

modalidades. A detecção precoce e o tratamento em homens assintomáticos podem reduzir a taxa de mortalidade e melhorar a qualidade de vida. O rastreio de marcadores como o PSA e a fosfatase ácida da próstata (PAP), um marcador tumoral produzido pelos lisossomas das células epiteliais da próstata, possibilitam a detecção e tratamento da doença numa fase anterior (SARWAR et al., 2017).

Em pacientes com HBP, os níveis de PSA podem aumentar em 2-3 vezes em relação ao normal. A principal limitação para o uso de PSA, como um biomarcador de câncer de próstata, é que a maioria dos homens sofre de HBP e prostatite à medida que envelhecem, o que aumenta os níveis séricos de PSA. Portanto, o PSA sozinho não pode ser usado como um biomarcador para detecção do câncer. Os níveis elevados de PSA não indicam câncer, mas quanto maior o nível de PSA, maior a chance de ter câncer. Os níveis de PAP são elevados em 60% dos homens com PCa com metástases. No entanto, o nível de PAP no soro é normal ou ligeiramente alto quando o carcinoma permanece localizado na glândula da próstata e é elevado em algumas condições benignas, como HBP e osteoporose (SARWAR et al., 2017).

Para o Brasil, estimam-se 68.220 casos novos de câncer de próstata para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 66,12 casos novos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens em todas as Regiões do país, com 96,85/100 mil na Região Sul, 69,83/100 mil Região na Sudeste, 66,75/100 mil na Região Centro-Oeste, 56,17/100 mil na Região Nordeste e 29,41/100 mil na Região Norte (INCA, 2018).

Segundo INCA (2018), a taxa de incidência global, em 2012, foi 31,1/100 mil, sendo mais elevada em países desenvolvidos, como Austrália, Nova Zelândia, América do Norte, e países da Europa Ocidental e Norte, podendo variar mais do que 25 vezes frente aos países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2013, 2015). Isso pode ser atribuído, em parte, às estratégias de rastreamento, realização do teste antígeno prostático específico (PSA) e subsequente biópsia, uma vez que possibilita a identificação de pequenos tumores, latentes ou em fases iniciais de crescimento (FERLAY et al., 2013 e FORMAN et al., 2014). No entanto, taxas aumentadas são observadas também em certas Regiões menos desenvolvidas, como o Caribe, países da América do Sul e da África. A incidência dessa neoplasia apresenta tendência de queda segundo informações do *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos, cuja taxa ajustada por idade, para o período entre 1999 e 2013, foi de 126,5/100 mil, sendo estimada uma redução de 7,9%

quando comparado ao período anterior (JEMAL et al., 2017). Para o ano de 2017, nos Estados Unidos, são esperados 161.360 casos novos em homens (HOWLADER et al., 2017).

Em relação à mortalidade, as estimativas mundiais do projeto Globocan, da Iarc, da Organização Mundial da Saúde (OMS), apontaram 307 mil mortes, para o ano de 2012; e a taxa de mortalidade global, para o mesmo ano, de 7,8/100 mil, representando 6,6% do número total de mortes masculinas (FERLAY et al., 2013, 2015 e STEWART; WILD, 2014). A diferença observada entre as taxas, segundo a distribuição geográfica, variou entre 3 e 30 por 100 mil óbitos. Contudo, a relação é inversa; ou seja, maiores taxas de mortalidade foram observadas em países de baixa renda quando comparados aos de alta renda (NAKANDI et al., 2013). A tendência da mortalidade por esse tipo de câncer se apresenta em declínio em quase todas as Regiões do mundo (FERLAY et al., 2013), sendo identificada queda de 3,4%, no período 2010-2014, nos Estados Unidos (FORMAN et al., 2014). Por se tratar de uma neoplasia com bom prognóstico, a probabilidade de sobrevida em cinco anos é encontrada acima de 80%, variando em função de fatores clínicos, genéticos, socioeconômicos e ambientais (HOWLADER et al., 2017).

III.2.1. O Escore de Gleason

Descrições mais detalhadas de cânceres foram dadas por patologistas, os tecidos da próstata foram classificados usando uma nova ferramenta – Escore de Gleason. Este sistema é baseado nos padrões arquiteturais das glândulas cancerosas observadas pelo patologista sob o microscópio, ou seja, de acordo com a classificação de Gleason, até que ponto as células do câncer se assemelham a células normais. As células que se parecem com tecido glandular normal com algumas células cancerígenas no revestimento são denominadas "cânceres bem diferenciados", Escore de Gleason (1 ou 2), crescem lentamente e levam muito tempo para se tornar clinicamente significativo. Células que parecem muito pouco com glândulas normais, apresentando-se como folhas de células cancerosas compactas são denominadas "cânceres pouco diferenciados" Escore 4 ou 5 de Gleason, esses tumores são, frequentemente, muito agressivos. E as células que formam múltiplos pequenos espaços glandulares são chamadas de "cânceres moderadamente bem diferenciados" Escore 3 de Gleason. É inquestionável que a classificação de Gleason fornece informações muito valiosas em termos de classificação do câncer de próstata, mas uma limitação dessa técnica é a disparidade entre a arquitetura do tecido e seu status

bioquímico. Entender o que exatamente acontece quando o câncer de próstata começa a crescer parece ser muito importante e também pode ajudar na seleção de opções confiáveis de tratamento e ajudar a salvar a vida de muitos homens (BANAS et al., 2010).

III.2.2. A Progressão do Câncer de Próstata

O câncer de próstata tem inicialmente uma taxa de crescimento lenta, e os estágios iniciais são caracterizados pela sensibilidade aos andrógenos e pela capacidade de responder à privação androgênica (castração química ou cirúrgica). No entanto, fases posteriores são caracterizadas pela invasão dos órgãos adjacentes e disseminação metastática predominantemente para os linfonodos e ossos, juntamente com a falta de resposta à supressão androgênica (resistência à castração) e resistência virtual às outras terapias disponíveis (VELLA et al., 2017).

A terapia de privação androgênica tem sido o tratamento primário para o câncer de próstata usado para suprimir a atividade transcricional do receptor androgênico (RA) desde a década de 1940. No entanto, uma proporção de 1/3 dos pacientes recai dentro de uma média de 2 a 3 anos com a doença geralmente mais agressiva que é atualmente definida como PCa resistente à castração (CRPC) (YU et al., 2017).

Relatórios recentes sugerem que o receptor de andrógeno (RA) desempenha um papel crítico tanto no desenvolvimento de câncer de próstata dependente de andrógeno quanto no independente de andrógeno. O receptor de andrógeno é um fator de transcrição dependente de ligante, pertence à superfamília dos receptores de hormônios esteroides nucleares e um mediador crucial para a atividade androgênica, reside principalmente no citoplasma como uma forma inativa e forma um complexo com proteína de choque térmico. Após a ligação do andrógeno, RA forma um homodímero e é ativado, move-se para o núcleo, liga-se ao elemento de resposta ao androgênio e regula a transcrição de muitos genes-alvo. Esses genes são ativados no câncer de próstata e associados à sua progressão. O RA pode ser ativado através de citocinas ou vias de fatores de crescimento em estágio independente de andrógenos para promover a sobrevivência das células cancerígenas. Para tratar o câncer de próstata, uma estratégia usada atualmente, que combina a produção de bloqueio de ambos os andrógenos e receptores de andrógenos, é mais eficaz em comparação com o esgotamento androgênico (KONG et al., 2011).

Segundo Crea et al. (2015), as células-tronco cancerosas (CSC) têm sido implicadas como as sementes de resistência ao tratamento e metástase, que são as

características mais mortais de uma neoplasia. No entanto, uma definição inequívoca do fenótipo CSC ainda está faltando. Uma característica comum das células-tronco normais e aberrantes é sua capacidade de entrar em um estado latente prolongado. Dessa maneira, no estudo, foi proposta uma definição unificada de células-tronco cancerosas (CSCs) competentes em termos de dormência (DCCs) como a subpopulação neoplástica que pode alternar plasticamente períodos de dormência e crescimento rápido. Nesse sentido, vale mencionar que mutações irreversíveis no DNA dificilmente podem explicar esse comportamento versátil e, com base em evidências emergentes, foi proposto que a dormência do câncer pode ser impulsionada pela natureza flexível do inter-genoma epigenético / não codificante.

Dois paradigmas de iniciação e progressão de tumores estão sendo debatidos atualmente: os modelos de "evolução clonal" e CSC. As duas teorias não são mutuamente exclusivas, uma vez que, em diferentes neoplasias e em diferentes estágios da mesma doença, um mecanismo pode ser mais explicativo do que o outro (CREA et al., 2015).

Resumidamente, o modelo evolutivo clonal postula que todas as células cancerígenas têm a capacidade de se transformar em uma célula tumorigênica. Segundo essa teoria, o câncer é um processo evolutivo decorrente do acúmulo estocástico e da seleção de alterações genéticas. Alternativamente, o modelo CSC postula que os tumores são organizados em uma hierarquia com os CSCs no ápice. Os CSCs possuem características únicas, como capacidade de auto renovação a longo prazo, multipotência e resistência à apoptose. Por essa razão, as CSCs foram propostas como sementes de disseminação metastática e resistência ao tratamento. É concebível que as CSCs sejam responsáveis pelas duas características fundamentais das neoplasias (resistência à morte celular e invasão / metástase). A dormência do câncer é um mecanismo chave para resistência ao tratamento e formação da metástase. No cenário clínico, a dormência do câncer foi definida como o período de tempo durante o qual células tumorais únicas, ou populações de células tumorais, permanecem indetectáveis até o surgimento da doença clinicamente evidente. A importância clínica da dormência do câncer é destacada pelo seu papel fundamental no prognóstico dos pacientes. Uma das principais causas de mortalidade do paciente é a recidiva metastática que pode ocorrer décadas após a remoção do tumor primário (CREA et al., 2015).

Crea et al. (2015) propuseram o câncer de próstata como modelo iterativo de dormência oncológica, conforme a figura 3.3, onde em (A) O curso clínico do câncer de próstata é caracterizado por ciclos progressivamente mais curtos de tratamento-

dormência-recidiva. A duração do período de dormência é baseada na evidência clínica de sobrevida livre de progressão após prostatectomia (1), terapia de privação de andrógeno (2) e tratamento com docetaxel, uma droga quimioterápica usada para tratar diversos tipos de câncer (3). Uma taxa de mutação aumentada (linha vermelha) correlaciona-se com períodos de dormência mais curtos. Em (B) foi proposto que as fases iniciais da progressão do tumor são caracterizadas por uma organização hierárquica com algumas células-tronco cancerosas competentes em dormência (CSCs) (DCCs) (círculos rosados) que impulsionam a propagação em longo prazo e ocasionalmente iniciam fases dormentes (círculos brancos). Células cancerígenas diferenciadas (azul) não possuem potencial tumorigênico e de dormência. À medida que as alterações genéticas se acumulam, os DCCs perdem progressivamente seu potencial de dormência (círculos laranja). Os tumores mais avançados quase exclusivamente compreendem CSCs altamente mutantes, inoperantes e com capacidade de mutação, as chamadas DICs que são CSCs que sofrem grandes mutações e, portanto, perderam a capacidade de iniciar uma fase inativa (círculo vermelho) e que alimentam o crescimento descontrolado.

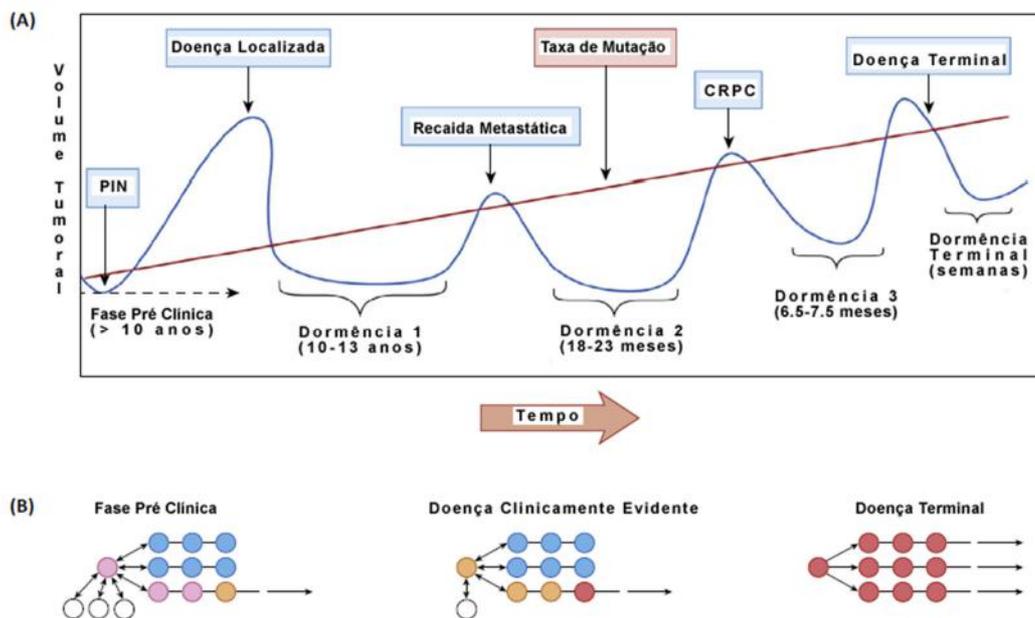


Figura 3.3 – O câncer de próstata como modelo iterativo de dormência oncológica. (Adaptado de CREA et al., 2015).

A terapia personalizada do câncer é cada vez mais reconhecida como a próxima geração de abordagens terapêuticas. Está bem estabelecido que os tumores exibem

substancial heterogeneidade em seu tipo, local e estágio. Mesmo pacientes com o mesmo tipo de doença podem apresentar de tumores bastante diferentes. Assim, para escolher uma terapia eficiente, é preciso lidar com a vasta complexidade da biologia do tumor. No entanto, a maioria das informações genéticas atuais é pouco traduzida em termos de tratamento clínico, como resultado da falta de medicamentos direcionados a genes-chave específicos. Além disso, a heterogeneidade tumoral maciça frequentemente desafia o mapeamento da representação tumoral pós-biópsia, uma vez que há grande diversidade na informação genética obtida a partir de diferentes biópsias do mesmo tumor. Devido a essa grande complexidade do câncer, existe atualmente uma grande necessidade de desenvolver ferramentas preditivas de desempenho de medicamentos com relevância clínica. Portanto, modelos experimentais confiáveis que preveem a funcionalidade celular global de maneira fisiologicamente relevante são de alto valor (SHOVAL et al., 2017).

III.2.3. O Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo, frequentemente encontrado em malignidades, leva a danos contínuos de constituintes celulares e, finalmente, de células com impacto potencial em todo o organismo (CZAPLA-MASZTAFIAK et al., 2015).

Espécies reativas, que incluem principalmente espécies reativas de oxigênio (EROs), são produtos gerados como consequência de reações metabólicas nas mitocôndrias de células eucarióticas. O oxigênio durante o transporte de elétrons na mitocôndria pode ser reduzido parcialmente gerando EROs, tais como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-). Ao ocorrer a perda do equilíbrio entre produção e eliminação de EROs, o que é chamado de estresse oxidativo, podem ocorrer danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas, conforme esquemático da figura 3.4. Além de fragmentação do DNA, as EROs podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

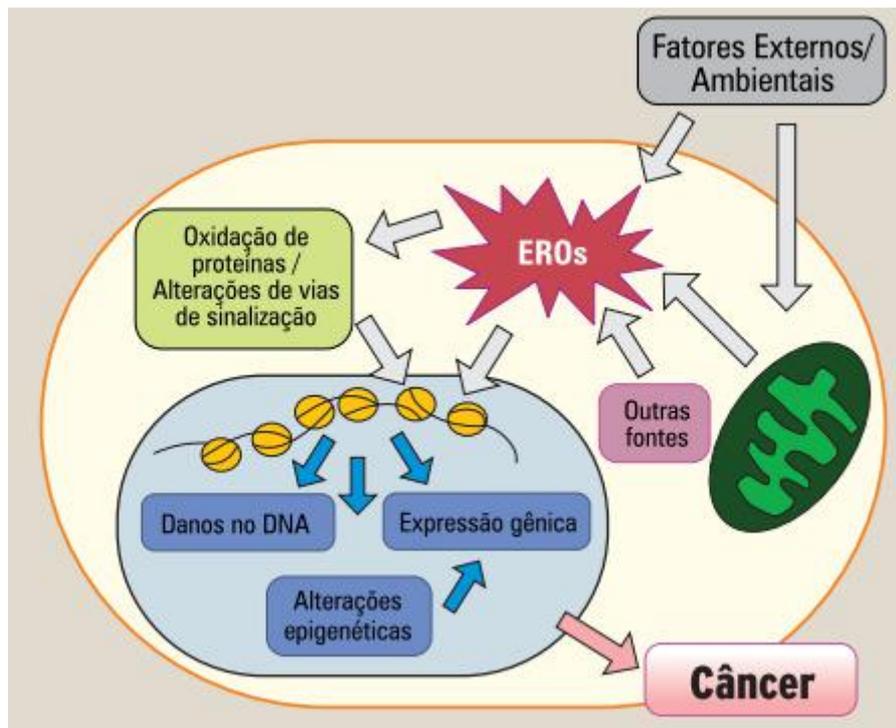


Figura 3.4 – Esquemático do Estresse Oxidativo. (Adaptado de SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Nas células normais, concentrações de baixo nível destes compostos são necessárias para a transdução de sinal antes da sua eliminação. No entanto, as células cancerosas, que exibem um metabolismo acelerado, exigem altas concentrações de EROs para manter sua alta taxa de proliferação. Diferentes formas de desenvolver a resistência a EROs incluem a execução de vias alternativas, que podem evitar grandes acumulações de EROs sem comprometer a demanda de energia requerida pelas células cancerígenas. As implicações para a regulação de EROs são altamente significativas para a terapia do câncer, porque os medicamentos radio e quimioterápicos comumente usados influenciam o resultado do tumor através da modulação de EROs (SOSA et al., 2013).

Portanto, traçando um paralelo entre a concentração de elementos traços e o estresse oxidativo, podemos dizer resumidamente, que a alta concentração de cobre intracelular promove o estresse oxidativo através da produção de EROs e este mecanismo está diretamente relacionado ao processo de malignidade das células. O ferro promove a inflamação e aumenta o crescimento das células cancerígenas, pois também pode gerar EROs e a alta demanda por ferro pelas células cancerígenas, torna este elemento contraditório em abordagens terapêuticas. O zinco, por sua vez, induz a síntese de metalotioneínas, proteínas eficazes na redução de radicais hidroxila e sequestro de EROs produzidas em situações estressantes, como diabetes tipo 2, obesidade e câncer.

III.3. O Papel do Zinco no Câncer de Próstata

A função fisiológica da glândula prostática normal é a acumulação de níveis muito elevados de zinco e citrato. Estes componentes desempenham um papel essencial na reprodução. As células epiteliais luminiais da próstata foram adaptadas para acomodar os níveis de zinco intracelulares que seriam tóxicos para outras células. Acumulação de citrato e zinco estão relacionados pelo fato de o mecanismo celular para a acumulação de citrato envolve a inibição da atividade de m-aconitase devido ao nível elevado de zinco intra-mitochondrial. Acumulação de zinco pelas células epiteliais é alcançada através da atividade de proteínas transportadoras de zinco, que são membros da família de transportadores ZIP. As proteínas ZIP são codificadas por genes relacionados SLC39. A hZIP1, é um membro da família ZIP e tem sido relatada como sendo a principal transportadora de absorção de zinco em células da próstata. Uma vez na mitocôndria, o zinco inibe a oxidação do citrato terminal pelas células da próstata. Contudo, o efeito do zinco sobre a proliferação e função de células epiteliais da próstata ainda não foi estabelecido (FRANKLIN et al., 2015).

No câncer de próstata, as células malignas exibem um silenciamento do gene ZIP1 acompanhada de uma depleção de zinco celular. Devido a isso, ZIP1 foi considerada um gene supressor de tumor no câncer da próstata. Além das células da próstata, os efeitos supressores do tumor de zinco, foram também identificados em outros tipos de tumores (FRANKLIN; COSTELLO, 2007).

A ZIP1 foi identificada como uma importante transportadora para acumulação de zinco em células da próstata, e é uma candidata lógica para a causa da incapacidade da célula neoplásica a acumular zinco. Correspondentemente, as glândulas malignas exibem também uma depleção de zinco celular. Assim, ZIP1 pode ser um gene supressor de tumor no câncer da próstata. Assim, evidências recentes sugerem que a regulação negativa da expressão hZIP1 e perda de função desse transportador resulta na perda de acumulação de zinco, o que leva a uma diminuição da inibição de m-aconitase e oxidação do terminal. (FRANKLIN et al., 2015).

III.4. A Cultura de Células

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Em 1951, George Gey cultivou células de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem HeLa, utilizada até hoje em todo o mundo. O fato de que tumores humanos poderiam dar origem a células contínuas em linhagem aumentou o interesse pelo cultivo de tecidos. O avanço na cultura de células ocorreu, em grande parte, por intermédio dos experimentos de Hayflick e Moorhead, em 1961, considerados clássicos, nos quais eles utilizaram células de vida finita. Em 1962, Nakamura e colaboradores, no Japão, estabeleceram a linhagem VERO, oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecusaethiops*). Essa célula é uma das poucas, na atualidade, aprovadas para uso em produção de vacinas pela OMS, o que a torna um excelente modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas. Atualmente, a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*, seu uso se estende à medicina, pois células em cultivo têm importante papel no tratamento de doenças degenerativas (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa (ALVES; GUIMARÃES, 2010 e LEITÃO, 2013).

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à presença de suas características genóticas e fenóticas (ALVES; GUIMARÃES, 2010 e LEITÃO, 2013).

A linhagem celular é formada à medida que a cultura primária é repicada e as células com uma maior capacidade de proliferação predominam na garrafa de cultivo. Essas células ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem

alta proliferação. A linhagem celular é muito utilizada em pesquisa, pois pode ser mantida em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original. Muitas linhagens celulares podem ser propagadas sem perder suas características por até oitenta passagens, além de serem euploides, ou seja, possuem um número de cromossomos múltiplo do número original da espécie (LEITÃO, 2013)

III.5. Cultura em Três Dimensões (3D)

Leighton em 1951 já percebia as limitações do cultivo em monocamadas, pois este sistema de cultivo não reproduz a arquitetura do tecido *in vivo* e não prevê a toxicidade órgão-específica e, além disso, não prevê a sinalização mecânica e bioquímica e a comunicação célula-célula são perdidas (MAZZOLENI et al., 2009, PAMPALONI; STELZER, 2009).

Células cultivadas como modelos 3D exibem características que estão mais próximas das complexas condições *in vivo* (VINCI et al., 2012). Os modelos de cultura 3D provaram ser mais realistas para traduzir os resultados do estudo para aplicações *in vivo*. Embora as linhagens de células forneçam um excelente material de estudo homogêneo, cultivá-las como modelos 3D induzem as células a comportarem-se de uma maneira que é um passo mais próximo das condições naturais. Sabe-se também que os requisitos ideais de condição 3D variam entre os tipos de células e as características de células em culturas 3D diferem de acordo com seus tipos (RAVI et al., 2014).

Alguns aspectos da cultura 3D:

- a) Redução de custos;
- b) Inadequação de determinados modelos animais para a compreensão de vias de sinalização de células humanas;
- c) Aspectos bioéticos relacionados ao uso de animais;
- d) Em determinadas condições, resultados obtidos em cultura 2D mostram-se muito distantes dos organismos analisados exigindo uma gradual substituição deste modelo por culturas 3D (AMARAL, 2010).

Sistemas tridimensionais de cultura são de crescente interesse na pesquisa do câncer, uma vez que a arquitetura do tecido e a matriz extracelular influenciam significativamente as respostas das células tumorais aos sinais microambientais. Alguns estudos destacaram diferenças significativas entre culturas bidimensionais e tridimensionais, com o último refletindo melhor o microambiente tumoral *in vitro* em termos de heterogeneidade celular, gradientes de nutrientes e oxigênio, interações de célula celular, deposição de matriz e perfis de expressão gênica (VINCI et al., 2012).

Estudos mostram que a organização 3D de células revela mais visões novas e inesperadas no mecanismo de tumorigênese e pode representar um componente integral nos estudos de câncer *in vitro*. A utilidade das culturas de células 3D para a pesquisa do câncer inclui abordagens de vias de sinalização, expressão e interações com componentes da matriz extracelular, comunicação celular, diferenças nas taxas de proliferação celular e padrões (LEE et al., 2007; MAZZOLENI et al., 2009; RAVI et al., 2014).

Pesquisas sobre câncer envolvendo estudos sobre biomarcadores, invasão, metástase e angiogênese tumoral têm sido amplamente realizadas (RAVI et al., 2014).

III.6. Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X está associada à emissão de radiação eletromagnética devido às transições de elétrons entre diferentes orbitais. Este fenômeno está relacionado ao modelo quântico da estrutura atômica. Na teoria quântica, o elétron é representado por uma função de onda $\psi(x, y, z)$. O quadrado do módulo da função de onda do elétron $|\psi|^2$ dá a probabilidade de se encontrar o elétron numa certa região do espaço próximo do núcleo (EISBERG e RESNIK, 1988). Esta região é conhecida como o orbital, e representa a região do espaço, onde se tem grande probabilidade de encontrar um determinado elétron. Segundo este modelo, enquanto o elétron permanece num orbital, ele não ganha e nem perde energia. Quando ocorre um salto quântico, o elétron faz uma transição entre dois estados diferentes. Como estados diferentes estão associados a energias diferentes, os saltos quânticos são acompanhados com a emissão de radiação eletromagnética. Os elétrons são caracterizados pelos seus estados quânticos, e a estes estados quânticos estão associados quatro números quânticos: o número quântico principal n (é um número positivo inteiro); o número quântico orbital l (pode ter qualquer valor inteiro entre 0 e $n-1$); o número quântico magnético m (pode ter $2l + 1$ valores inteiros possíveis entre $-l$

e +1) e o número quântico spin s (pode assumir apenas os valores $+1/2$ e $-1/2$) (COSTA, 2003).

A técnica de Fluorescência de Raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem uma amostra (KLOCKENKAMPER, 1996).

No processo de interação, efeito fotoelétrico, pode ocorrer à ionização dos elementos, e como consequência, os elementos (átomos) emitem linhas espectrais com energias características cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra. A figura 3.5 mostra o processo do efeito fotoelétrico.

Quando um elemento de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons dos seus orbitais e, como consequência, elétrons dos níveis mais afastados podem realizar um salto quântico para preencher a vacância produzida. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios X de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, de modo resumido, a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X (LACHANCE e CLAISSE, 1995).

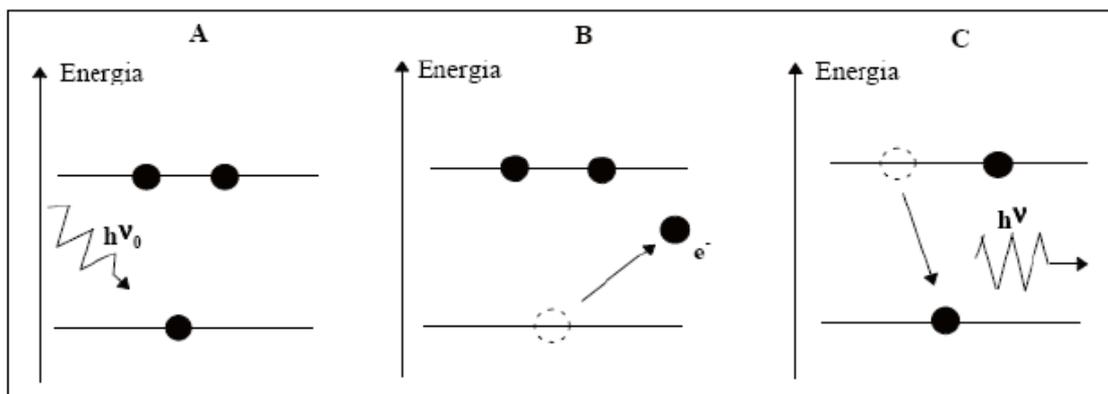


Figura 3.5 - Esquemático do Efeito Fotoelétrico - (A) O fóton incidente chega ao átomo, (B) Um elétron de orbital mais interno é ejetado deixando uma vacância, (C) Um elétron de orbital mais energético ocupa a vacância emitindo fluorescência.

III.7. Excitação dos Elementos

Para provocar a emissão dos raios X característicos dos elementos que constituem uma determinada amostra, a excitação pode ser feita de várias maneiras: excitação por partículas aceleradas como elétrons, prótons, partículas alfas e íons ou usando radiação eletromagnética como radiação gama ou raios X.

Para haver produção de raios X característicos há necessidade de se retirar elétrons mais fortemente ligados, ou seja, aqueles localizados nos níveis mais internos dos átomos como, por exemplo, na camada K. Para que isto ocorra, a energia mínima necessária deve ser superior à energia de ligação do elétron nesse nível, denominada energia de ligação eletrônica ou energia corte de absorção.

Esta energia de ligação eletrônica pode ser calculada de modo aproximado, aplicando-se a teoria atômica de Bohr para o átomo de hidrogênio e átomos hidrogenoides. Desse modo, a equação (1) permite o cálculo aproximado dessa energia para os elétrons das camadas K e L dos átomos de um elemento (NASCIMENTO FILHO, 2009).

$$E = \frac{me^4(Z-b)^2}{8\epsilon_0^2 h^2 n^2} \quad (1)$$

Onde:

E = energia de ligação eletrônica (J);

m = massa de repouso do elétron = $9,11 \cdot 10^{-31}$ kg;

e = carga elétrica do elétron = $1,60 \cdot 10^{-19}$ C;

Z = número atômico do elemento emissor dos raios X;

b = constante de Moseley, com valores iguais a 1,00 e 7,40, para níveis K e L, respectivamente;

ϵ_0 = permissividade elétrica no vácuo = $8,85 \cdot 10^{-12} \frac{\text{CN}}{\text{m}^2}$;

h = constante de Planck = $6,6310^{-34}$ J.s; e

$n = n^\circ$ quântico principal do nível eletrônico ($n = 1$ para o nível K, $n = 2$ para o nível L, etc).

Substituindo-se na equação (1) os valores das constantes no sistema internacional de unidades, a energia de ligação (em joules) é dada por:

$$E = 2,18 \cdot 10^{18} \frac{(Z - b)^2}{n^2} \quad (2)$$

É possível observar que nesta equação a energia de ligação para um determinado nível de energia é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico Z do elemento. Assim, para retirar elétrons do nível K dos elementos Al, Fe e Te, por exemplo, de números atômicos 13, 26 e 52, respectivamente, são necessários 1,56, 7,11 e 31,81 keV e 0,074, 0,723 e 4,61 keV para o nível L.

Para que a transição entre dois estados quânticos ocorra é necessário que um elétron seja ejetado do átomo. Logo, a energia da radiação que excita o átomo, deve ser igual ou superior à energia de ligação do elétron ao átomo, no caso no exemplo anterior, EK. De forma análoga, para que elétrons da camada L sejam ejetados, gerando o espectro de energia das linhas L, a energia de radiação incidente deve ser igual ou superior às energias de ligação, neste caso chamadas de EL1, EL2 e EL3. Em espectrometria de raios X, sabe-se que os estados quânticos estão associados a níveis de energias. Estes níveis de energia não dependem apenas dos dois números quânticos n e l , mas também de outro número quântico j , que representa a soma vetorial de l e s , com a restrição que j não pode ser negativo.

$$j = l + s \quad (3)$$

Assim, j somente assumirá os seguintes valores:

$$j = l \pm \frac{1}{2} \quad (4)$$

Quando l assumir valor zero, $j = \frac{1}{2}$. Se l for igual a 1, $j = \frac{1}{2}$ e $j = \frac{3}{2}$; e sucessivamente para todos os valores de l . O número máximo de elétrons em um subnível é dado por:

$$n_{e.} = 2j + 1 \quad (5)$$

Para ilustrar a produção de um espectro de raios X supomos que um elétron do nível K seja inicialmente removido do átomo. Na primeira etapa do processo de desexcitação, um elétron do nível L, pode realizar um salto quântico para preencher a vacância. Isto produz uma vacância no nível L, que poderá ser preenchida por um elétron no nível M, deixando uma vacância no nível M que por sua vez será preenchida por um elétron do nível N. O efeito resultante, de cada etapa, é a passagem de uma vacância para um menor nível energético.

Quando a vacância atinge o nível de mais baixa energia (banda de valência), ela é preenchida por outro elétron qualquer, livre, no material. Deste modo, o átomo fica novamente neutro e no estado fundamental.

Cada transição entre estados quânticos constitui uma perda de energia, resultando na emissão de raios X, com uma energia característica bem definida para cada elemento. Estes fótons formam o chamado espectro de raios X característicos. O Quadro 1 mostra, esquematicamente, os estados quânticos com seus respectivos níveis e subníveis associados.

A energia dos fótons emitidos será igual à diferença entre os dois estados quânticos envolvidos. Por exemplo: a transição entre um elétron do subnível L_3 para o nível K, resulta na emissão de fótons chamada K- L_3 . A energia deste fóton é expressa como:

$$E_{K-M_3} = E_K - E_{M_3} \quad (6)$$

Todos esses fótons representam as emissões da linha ou série K. As emissões das linhas L são semelhantes, neste caso os elétrons dos níveis M, N, ..., etc. preenchem as vacâncias no nível L, o conjunto dessas emissões representa as linhas L ou série L.

Nível	Subnível	Números quânticos			Número máximo de Elétrons
		n	l	j	
K		1	0	1/2	2
L	L ₁	2	0	1/2	2
	L ₂	2	1	1/2	2
	L ₃	2	1	3/2	4
M	M ₁	3	0	1/2	2
	M ₂	3	1	1/2	2
	M ₃	3	1	3/2	4
	M ₄	3	2	3/2	4
	M ₅	3	2	5/2	6
N	N ₁	4	0	1/2	2
	N ₂	4	1	1/2	2
	N ₃	4	1	3/2	4
	N ₄	4	2	3/2	4
	N ₅	4	2	5/2	6
	N ₆	4	3	5/2	6
	N ₇	4	3	7/2	8

Quadro 1 – Os níveis e subníveis de energias de K a N

No entanto, nem todas as transições entre estados quânticos ocorrem, uma vez que existem transições proibidas (EISBERG e RESNIK, 1988). Existem as seguintes regras de seleção para a variação dos números quânticos:

$$\begin{pmatrix} \Delta l = \pm 1 \\ \Delta j = 0, \pm 1 \end{pmatrix} \quad (7)$$

São permitidas apenas as transições que estão de acordo com as regras representadas pela equação 7. O nível L, por exemplo, possui três subníveis L₁, L₂ e L₃. Apenas as transições K-L₂ e K-L₃ ocorrem. A transição K-L₁ é proibida ($\Delta l = 0$ e $\Delta j = 0$).

As transições entre estados quânticos são representadas em termos de um diagrama de níveis de energia. O quadro 1 mostra, esquematicamente, os principais níveis até n = 4.

III.8. A Emissão de Fluorescência de Raios X

A fração da radiação incidente que leva a emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada por uma probabilidade de excitação que é produto de três outras probabilidades (LACHANCE e CLAISSE, 1995), conforme a equação 8. A figura 3.6 mostra as transições de níveis de energias.

$$P_{E_i} = P_{nível} \cdot P_{linha} \cdot P_{fluorescência} \quad (8)$$

Onde:

$P_{nível}$ é a probabilidade que a radiação incidente retire elétrons de um dado estado quântico;

P_{linha} é a probabilidade que uma determinada linha seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado da camada K, podemos ter as seguintes transições na camada L : K-L₂ e L-L₃;

$P_{fluorescência}$ é a probabilidade de ocorrer à emissão de fluorescência de raios X ao invés do elétron Auger. Este elétron é liberado do átomo com uma energia igual à diferença entre a energia do fóton absorvido e a energia de ligação do elétron. Uma importante consequência na emissão de elétrons Auger é o fato de que o número de raios X característicos produzidos é menor do que o esperado.

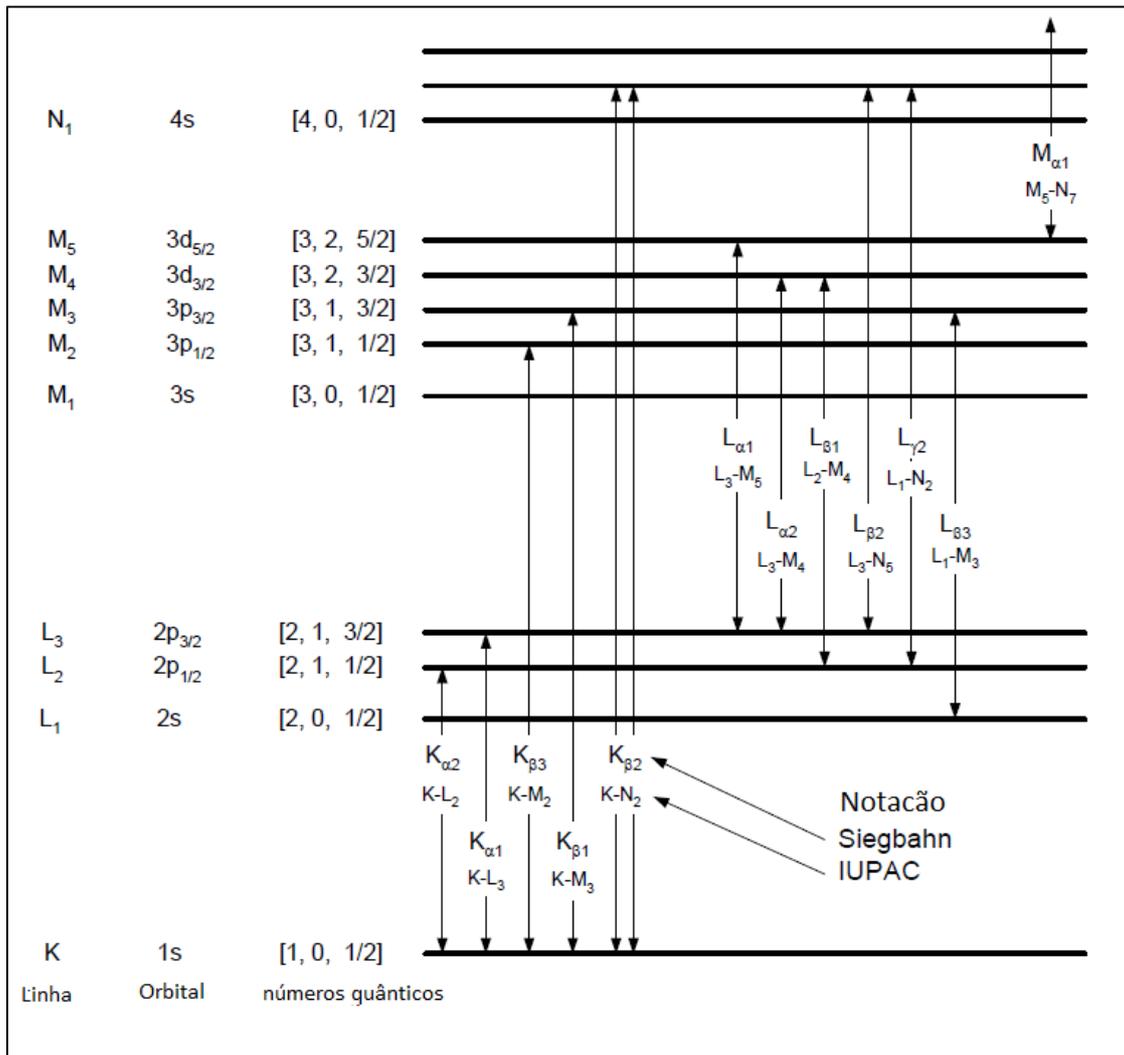


Figura 3.6 - Transições de níveis de energias (Adaptado de ANJOS, 2000).

O rendimento de fluorescência ω é definido como a probabilidade para que o fóton produzido seja liberado do átomo sem ser reabsorvido gerando um elétron Auger. Assim, ω pode ser representado como:

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (9)$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (10)$$

Onde:

n_s é o número de fótons produzidos com fluorescência de raios X;

n_p é o número de fótons que são produzidos devido às vacâncias nos níveis e subníveis atômicos;

n_A é o número de fótons que são reabsorvidos dentro do átomo.

A figura 3.7 representa esquematicamente o efeito Auger para um modelo clássico do elemento magnésio (Mg).

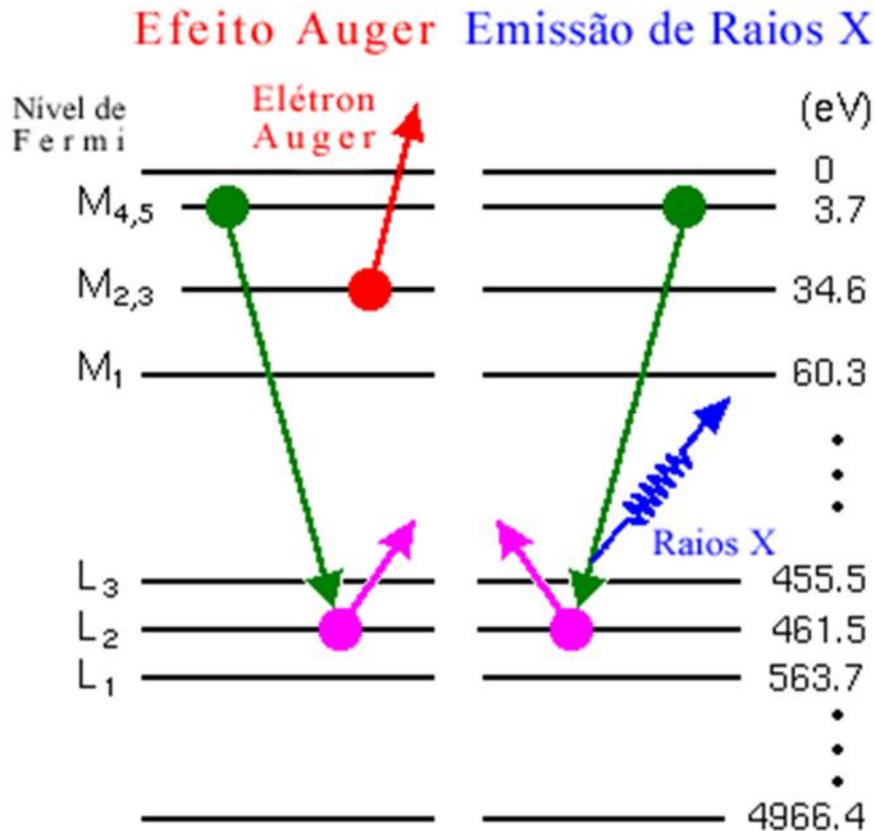


Figura 3.7 - Representação esquemática do efeito Auger (Adaptado de <https://www.eag.com/pt/resources/tutorials/auger-tutorial-theory/>).

Podemos definir, então, o rendimento de fluorescência como o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em uma dada camada.

III.9. Intensidade Relativa das Linhas de Raios X Característicos

A intensidade relativa entre a linha específica e as outras linhas na série fornecem a probabilidade para que uma determinada linha específica seja emitida dentro de uma série. Assim, a probabilidade que a linha K-L_{2,3}, seja emitida em relação as outras linhas K é dada pelo fator:

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{k-L_{2,3}}}{\sum I_{todasasinhask}} \quad (11)$$

Experimentalmente a Linha K-L_{2,3} é, aproximadamente, duas vezes mais intensa que a linha K-L₂. A intensidade relativa para linha K-L_{2,3} é dada por:

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{k-L_{2,3}}}{I_{k-L_{2,3}} + I_{k-M_3}} \quad (12)$$

Podem-se desprezar as intensidades das demais linhas que são muito pequenas. A probabilidade de emissão da série L₃-M_{4,5} em relação as outras linhas é:

$$f_{L_3-M_{4,5}} = \frac{I_{L-M_{4,5}}}{\sum I_{todasasinhaskL}} \quad (13)$$

III.10. Quantificação por Fluorescência de Raios X (XRF)

Para a análise quantitativa por XRF é necessário relacionar as intensidades fluorescentes dos elementos medidos na amostra com suas respectivas concentrações (VAN GRIEKEN, et al., 2002). O método dos parâmetros fundamentais se baseia-se na teoria que permite calcular a intensidade da radiação fluorescente, originária de uma amostra de composição conhecida. As equações utilizadas geralmente consideram tanto a fluorescência primária quanto a secundária (realce) (VRIES; VREBOS, 1993). A equação que descreve a intensidade da radiação fluorescente em função da composição do espécime, da configuração do espectrômetro e do espectro incidente é a equação 14:

$$I_i(J(\lambda)) = \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{edge,i}} [P_i(\lambda) + \sum_j S_{ij}(\lambda, \lambda_j)] d\lambda \quad (14)$$

Onde:

$J(\lambda)$ a intensidade do espectro incidente no comprimento de onda λ ;

$P_i(\lambda)$ é a contribuição da fluorescência primária causada por fótons incidentes com comprimento de onda λ .

$S_{i,j}$ é a contribuição da fluorescência secundária (realce) por fótons de características λ_j que foram excitadas por fótons primários λ .

A soma 34 é sobre todos os elementos j que possuem linhas características que podem excitar o analito i . Para cada um desses elementos j , todas as linhas características devem ser consideradas. Isto é bastante simples se nenhuma das linhas L ou M do elemento j puderem excitar o analito. Nesse caso, apenas as linhas K_α e K_β devem ser consideradas. Se as linhas L de um elemento j são suficientemente energéticas para melhorar o analito, o grande número de linhas L tornaria o cálculo muito demorado. Portanto, a maioria dos programas considera apenas de três a cinco linhas L para cada elemento. Um raciocínio semelhante vale para as linhas M (VRIES; VREBOS, 1993).

A aplicação do método de parâmetros fundamentais para análise de amostras consiste em duas etapas: calibração e análise.

a) Calibração

A equação dos parâmetros fundamentais é usada para prever a intensidade das linhas características para uma composição idêntica à do padrão usado. Se mais de uma amostra padrão for usada, os cálculos serão repetidos para cada um dos padrões. Os cálculos são realizados usando a geometria apropriada e os parâmetros que determinam o espectro do tubo correspondentes aos usados no espectrômetro para as medições. As intensidades previstas teoricamente são então ligadas às medidas efetivamente medidas. Se apenas uma amostra padrão for usada, a razão entre a intensidade medida e a intensidade calculada é calculada. Se mais de um padrão for utilizado, as intensidades líquidas obtidas a partir das medições são plotadas em relação às intensidades calculadas e uma linha reta pode ser determinada para cada linha característica medida (VRIES; VREBOS, 1993).

A inclinação de tal linha é o fator de proporcionalidade entre as intensidades previstas e medidas. Em geral, essa relação será determinada com mais precisão se mais padrões forem usados (VRIES; VREBOS, 1993).

Um caso especial de calibração ocorre quando se usam elementos puros como padrões. Dividindo cada uma das intensidades medidas do elemento puro correspondente, obtém-se a intensidade relativa. Essa intensidade relativa pode ser calculada diretamente por alguns programas de parâmetros fundamentais. De fato, alguns programas usam equações que expressam a intensidade da radiação característica diretamente em termos de intensidade relativa. A intensidade relativa é assim definida como a intensidade da amostra, dividida pela intensidade do correspondente elemento puro (ou composto, se a concentração do analito for definida na concentração do composto), sob condições idênticas para excitação e detecção (VRIES; VREBOS, 1993).

Basicamente, a função de calibração, que é determinada usando as intensidades medidas dos padrões e as intensidades calculadas, contabiliza apenas fatores relacionados ao instrumento. Os efeitos matriciais são contabilizados usando a teoria física descrita na equação do parâmetro fundamental (VRIES; VREBOS, 1993).

b) Análise

Passo 1. Para cada amostra desconhecida, é feita uma primeira estimativa da composição.

Passo 2. Para esta estimativa da composição, as intensidades teóricas são calculadas.

Estes são convertidos em intensidades medidas, usando os dados de calibração, de modo que esses dois conjuntos de intensidades para o mesmo espécime possam ser comparados.

Etapa 3. A próxima estimativa da composição é obtida com base na diferença entre as intensidades medida e calculada.

Etapa 4. O processo, começando na Etapa 2, é agora repetido até que a convergência seja obtida.

Diferentes critérios de convergência existem. O cálculo pode ser rescindido se um dos seguintes critérios for satisfeito para todos os elementos (compostos) em questão:

1. As intensidades, calculadas no Passo 2, não mudam de um passo para o outro, por mais do que um nível presente.

2. As intensidades, calculadas no Passo 2, concordam, dentro de um nível pré-definido, com as intensidades medidas

3. As composições, calculadas no Passo 3, não mudam de um passo para o outro em mais do que um nível presente (por exemplo, 0.0005 ou 0.0001 em fração de peso).

O uso de bons padrões (semelhante a amostra desconhecida) quase sempre levará a resultados mais precisos, em comparação com uma situação em que os padrões utilizados têm uma composição amplamente diferente daquela do desconhecido. Isso ocorre porque a maioria das incertezas, causadas por imprecisões nas constantes físicas, é cancelada. O grau de similaridade entre padrões e amostra desconhecida tem um efeito importante na precisão da análise (VRIES; VREBOS, 1993).

III.11. Microfluorescência de Raios X (microXRF)

A Microfluorescência de raios X (microXRF) é uma variante da XRF diferenciando-se principalmente nas dimensões e geometria do feixe. É baseada na excitação localizada de uma área microscopicamente pequena (na ordem de μm) na superfície de uma amostra, fornecendo informações da distribuição espacial de elementos majoritários e minoritários no material de estudo, conforme esquema da figura 3.8. Por esse motivo a microXRF é uma técnica bastante atrativa para a análise local e para o mapeamento elementar em vários tipos de materiais (BERNASCONI et al., 1994).

O mapeamento elementar é realizado dividindo-se a área a ser analisada em pixels, e em cada pixel, obtém-se um espectro de fluorescência de raios X (PRINS et al., 1984).

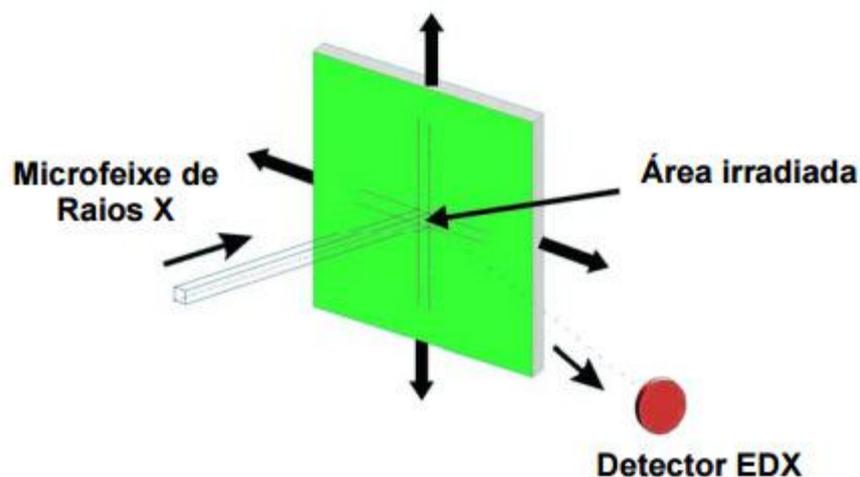


Figura 3.8 – Esquema simplificado da análise por microXRF (MELO JÚNIOR, 2007).

Três tipos de informações podem ser obtidas através da aplicação da microXRF:

- a) Informação pontual - Fornece uma rápida comparação de materiais heterogêneos através da análise de apenas uma área da amostra;
- b) Perfil - É uma análise sequencial de vários pixels (áreas) alinhados ou verticalmente ou horizontalmente que fornece informação a respeito da homogeneidade da amostra;
- c) Mapas elementares - É uma combinação de vários perfis que possui uma matriz com linhas e colunas que permite analisar a composição de uma superfície inteira (HAVRILLA,1997). Fornece imagens coloridas onde às variações das cores mostram as diferentes intensidades relativas do elemento químico presente da amostra (LEITÃO, 2013).

Um esquema da obtenção de uma imagem de μ XRF é representado na figura 3.9.

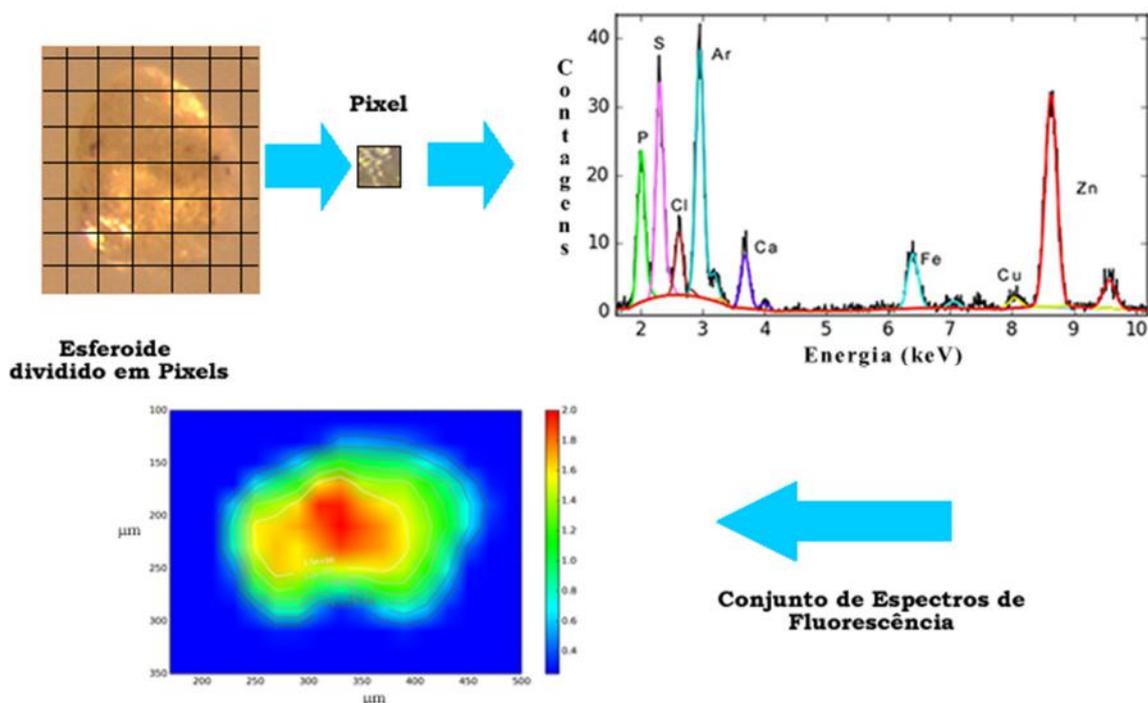


Figura 3.9 - Representação esquemática da obtenção de uma imagem.

Conforme observa-se na Figura 3.9, no processo de obtenção de uma imagem de μ XRF, a amostra é dividida em pixels, cada um desses pixels ao ser atingido pelo feixe incidente emite fótons de fluorescência e dá origem a um espectro de fluorescência de Raios X, onde as energias dos elementos constituintes da amostra são características e suas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra. As imagens foram obtidas através do software PyMca[®] versão 5.0.2.

A microXRF é um poderoso método para análise em amostras biológicas, tendo as seguintes vantagens: limite de detecção baixo ($0,01 \mu\text{g g}^{-1}$), pequeno dano térmico e as medidas podem ser realizadas no ar (EKTESSABI *et al.*, 1999).

O uso de raios X como fonte de excitação para a radiação característica tem algumas vantagens em relação a outras fontes (elétrons e partículas pesadas carregadas): baixa energia de dissipação e praticamente nenhum dano térmico na amostra (PRINS, 1984).

A utilização de radiação síncrotron em microXRF permite maior sensibilidade para a análise de concentrações muito baixas e possibilita estudar amostras menores (da ordem de μm) de modo que seria impossível através do uso de outras fontes. A microfluorescência de raios X com radiação síncrotron (SR-microXRF) é uma ferramenta muito poderosa na análise elementar ao nível de micrômetros (JANSSENS *et al.*, 2000).

III.12. Radiação Síncrotron

A luz síncrotron é uma fonte de luz brilhante que os cientistas podem usar para reunir informações sobre as propriedades estruturais e químicas dos materiais em nível molecular.

Um síncrotron produz luz usando poderosos eletroímãs e ondas de radiofrequência para acelerar os elétrons quase à velocidade da luz em um anel de armazenamento. Este anel é um polígono, feito de secções retas inclinadas em conjunto com ímãs de flexão. À medida que o elétron passa através de cada ímã, perde energia, sob a forma de luz altamente concentrada (KLOCKENKAMPER et al., 2015).

Esta luz, composta por diferentes espectros de luz tais como infravermelho, ultravioleta e raios X, pode, então, ser canalizada para fora da parede do anel de armazenamento para as estações experimentais (linhas de luz) onde os pesquisadores escolhem o comprimento de onda desejado para estudar suas amostras.

Este instrumento pode ser usado para sondar a matéria e analisar uma variedade de processos físicos, químicos, geológicos e biológicos.

A utilização de uma fonte de radiação síncrotron permite alcançar limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo de raios X de alta potência (KLOCKENKAMPER et al., 2015, CASTRO, 2001).

III.13. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado em Campinas, S.P., (LNLS) opera a única fonte de Luz Síncrotron da América Latina. Projetado e construído com tecnologia brasileira, o LNLS foi inaugurado em 1997, com instalações abertas para a comunidade científica e empresarial em todo o país e no exterior, tem como objetivo fomentar o desenvolvimento científico e tecnológico, colocando ao alcance de pesquisadores do Brasil e do exterior infraestrutura de luz síncrotron, microscópios eletrônicos de alta resolução, microscópios de varredura de ponta e espectrômetros de ressonância magnética nuclear. A fonte de luz síncrotron de segunda geração, chamada UVX, possui hoje 17 estações experimentais, chamadas linhas de luz, que permitem a execução de experimentos em diversas técnicas de análise microscópica da matéria usando radiação infravermelha, ultravioleta e raios X. O LNLS está neste momento construindo o Sirius, uma fonte de luz síncrotron de quarta geração, planejada para ser

uma das mais avançadas do mundo. Sirius será a maior e mais complexa infraestrutura científica já construída no País, planejada para colocar o Brasil na liderança mundial de geração de luz síncrotron.

A nova fonte de luz síncrotron é projetada para ter o maior brilho dentre todos os equipamentos na sua classe de energia e comportar até 40 linhas de luz. Sirius abrirá novas perspectivas de pesquisa em áreas como ciência dos materiais, nanotecnologia, biotecnologia, ciências ambientais e muitas outras (LNLS, 2019).

O LNLS faz parte do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), com outros três laboratórios: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e de Nanotecnologia (LNNano). O Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) é uma organização social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações sob Contrato de Gestão (LNLS, 2019).

A figura 3.10 mostra uma panorâmica do anel e a disposição da linha de XRF no LNLS.



Figura 3.10 – Foto Panorâmica do Anel.

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Obtenção e Preparação dos Esferoides Celulares.

Os esferoides celulares foram estabelecidos a partir das linhagens prostáticas humanas: RWPE-1, LNCaP e DU145.

A linhagem não tumoral de células normais imortalizadas, RWPE-1, foi obtida a partir da imortalização de uma cultura primária de epitélio prostático sadio, não tumoral, de indivíduo adulto de 54 anos, por pesquisadores da Universidade Estadual do Michigan, do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América. Após a obtenção desta cultura primária, foi realizado procedimento de engenharia celular para a imortalização e obtenção da linhagem, com o uso de cópia simples do vírus do papiloma humano (HPV – *humanpapilloma vírus*) (MOROZ, 2013). A linhagem de células dependentes de andrógeno, LNCaP, é derivada da metástase do linfonodo supra clavicular esquerdo de um homem caucasiano de 50 anos de idade em 1977. E a linhagem de células independentes de andrógeno, DU145, foi obtida a partir de metástase do sistema nervoso central.

As linhagens celulares foram mantidas rotineiramente em meios de cultura (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular) apropriados, RPMI (Roswell Park Memorial Institute) com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), para as linhagens tumorais, e Queratinócito – SFM (KSF9), para as células de linhagem RWPE-1. A cultura foi mantida em estufa, à 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂.

A figura 4.1 representa o esquemático de obtenção e preparação os esferoides.

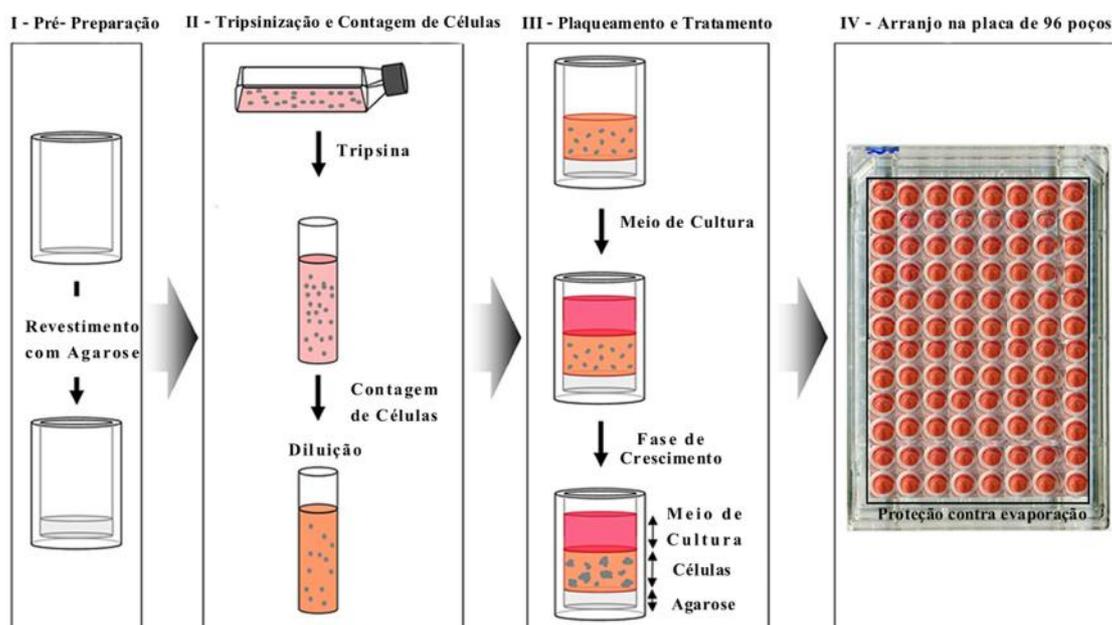


Figura 4.1 – Esquemático de obtenção e preparação os esferoides. I – Pré-preparação: revestimento dos poços com agarose 1%. II – Tripsinização e Contagem de Células. III – Plaqueamento e Tratamento: onde são depositados 2×10^4 células e $200 \mu\text{L}$ de meio por cada poço. IV – Arranjo na placa de 96 poços: a placa é tampada antes de ser colocada na estufa para proteção contra evaporação.

Na Figura 4.1 é observada a cultura dos esferoides. As células foram cultivadas em placas contendo 96 poços com fundo em U, de diâmetro 0,5 cm, previamente recobertos por uma película de gel agarose 1%, utilizado para evitar a aderência das células no fundo do poço (I - Pré - Preparação). Em (II) ocorre a tripsinização, com o uso da enzima tripsina, onde o objetivo é liberar as células do suporte sólido onde elas se encontram e dissocia-las entre si, após esta dissociação a tripsina é diluída em meio de cultura para, em seguida, a contagem das células ser efetuada. A cultura foi estabelecida a partir de 2×10^4 células e $200 \mu\text{L}$ de meio por cada poço (III). As células foram mantidas em estufa, à 37°C , em uma atmosfera de 5% de CO_2 . O tempo suficiente para formação dos esferoides foi de dois a quatro dias de cultivo.

Após 12 dias em cultura, os esferoides receberam os tratamentos com cloreto de zinco durante um período de 24 horas.

As soluções para o tratamento foram obtidas utilizando os meios de cultura adequados, RPMI com 10% SFB, para as células de tumorais, e Queratinócito – SFM (KSF9), para as células de linhagem RWPE-1, suplementados com soluções de cloreto de zinco (ZnCl_2). Os esferoides foram suplementados com 6 diferentes concentrações de cloreto de zinco: 0, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ e $250 \mu\text{M}$.

Para a análise por μ XRF, após os 12 dias de cultura e o período do tratamento (24 horas), os esferoides foram fixados em paraformaldeído 4,0% por 30 minutos, em seguida lavados 3 vezes com solução tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,4 a 4°C e ao final colocados em PBS até o momento da análise. No momento da análise os esferoides foram lavados com Milli-Q e depositados em filme ultralene de 4 μ m de espessura e em seguida postos para secar a temperatura ambiente.

IV.2. Análise por microXRF

As análises foram realizadas na linha D09B - XRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) através da técnica de Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (SR-microXRF). As amostras foram posicionadas em um suporte situado a 45° em relação ao detector e ao feixe, incidente, ou seja, posicionamento 45°/45°. O plano de imagem das amostras possui acurácia de 0,5 μ m com os três eixos (X, Y, Z) controlados através de um motor de passo.

As amostras foram excitadas utilizando um feixe branco com 25 μ m de extensão na vertical e 12 μ m na horizontal logrado por um sistema de microfoco KB. O tamanho do passo foi de 25 μ m em ambas as direções e o tempo de aquisição foi de 300 ms/pixel.

Para a detecção dos raios X característicos emitidos por cada pixel foi utilizado um detector Silicon Drift com resolução de 165 eV em 5,9 keV posicionado a 90° com relação ao feixe incidente. Nenhum método de correção de absorção foi necessário, uma vez que as amostras são consideradas finas (SCOFIELD, 1974 e SALEM; PANOSSIAN; KRAUSE, 1974). A tabela 1 mostra as condições experimentais e as figuras 4.2 e 4.3 mostram o arranjo experimental.

Para a quantificação foram analisadas, sob as mesmas condições experimentais, as amostras de referência certificadas monoelementares de filme fino fornecidas pela MicroMatter, EUA, onde foi possível definir o fluxo de fótons apropriado para que a fração de massa do elemento analisado fosse igual a 1,0 g/g. Após este procedimento um modelo para cada espessura de amostra foi criado utilizando o fluxo de fótons adequado.

A metodologia foi validada através da análise de uma amostra certificada de fígado bovino (NIST- 1577b) que foi analisada sob as mesmas condições dos esferoides.

Tabela 1 - Condições experimentais

Condições experimentais	
Feixe:	BRANCO
Geometria:	45°/45°
Câmara 1:	2x1
Absorvedor	45 µm Al no feixe incidente
Distância amostra - detector:	22 mm
Distância fonte- amostra:	20 cm
Detector de raios X:	Silicon Drift com resolução de 165 eV em 5,9 keV
Detector A	Câmara de ionização
Tempo	300 ms/pixel
Colimação do feixe - sistema de microfoco KB:	25 x 12 µm
Tamanho do passo	25 µm
Área do Detector	0,07 cm ²

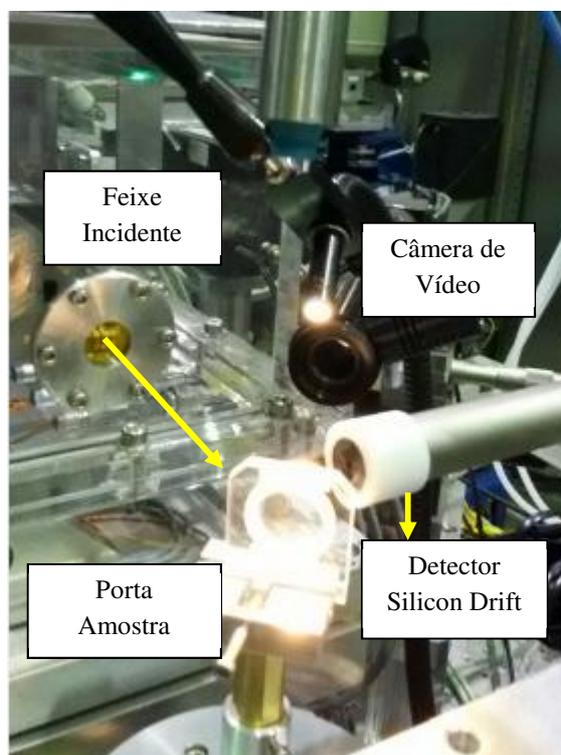


Figura 4.2 – Esquema experimental.

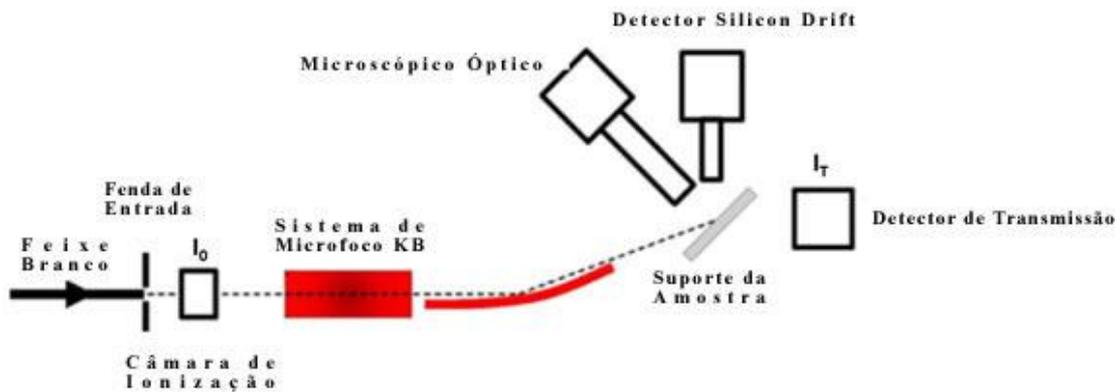


Figura 4.3 – Arranjo experimental (Adaptado de MERA et al., 2019).

As tabelas 2, 3 e 4 mostram a dimensão, matriz e o número de espectros de cada uma das amostras das linhagens celulares RWPE-1, LNCaP e DU145, respectivamente, onde h é a altura, l a largura, L é quantidade de linhas e C a quantidade de colunas.

Tabela 2 - Dimensão, matriz e número de espectros das amostras de RWPE-1.

Amostra	Dimensão $h \times l$ (mm)	Matriz ($L \times C$)	Espectros
Controle_S01	1,2 x 1,22	49 x 50	2450
Controle_S02	0,75 x 0,95	31 x 39	1209
Controle_S03	1,05 x 1,20	43 x 49	2107
Tratamento 1_S01	0,95 x 0,80	39 x 33	1287
Tratamento 1_S02	0,85 x 1,1	35 x 45	1575
Tratamento 1_S03	0,85 x 1,1	35 x 45	1575
Tratamento 2_S01	0,85 x 0,65	35 x 27	945
Tratamento 2_S02	0,45 x 0,65	19 x 27	513
Tratamento 2_S03	1,25 x 1,55	51 x 63	3213
Tratamento 3_S01	1,10 x 1,05	45 x 43	1935
Tratamento 3_S02	1,15 x 1,25	47 x 51	2397
Tratamento 3_S03	0,70 x 1,0	29 x 41	1189
Tratamento 4_S01	0,72 x 0,70	30 x 29	870
Tratamento 4_S02	0,50 x 0,70	21 x 29	609
Tratamento 4_S03	0,60 x 0,80	25 x 33	825
Tratamento 5_S01	0,60 x 0,70	25 x 29	725
Tratamento 5_S02	0,55 x 0,90	23 x 37	851
Tratamento 5_S03	0,90 x 1,35	37 x 55	2035

Tabela 3 - Dimensão, matriz e número de espectros das amostras de LNCaP.

Amostra	Dimensão h x l (mm)	Matriz (L x C)	Espectros
Controle_S01	0,55 x 0,55	23 x 23	529
Controle_S02	0,55 x 0,75	23 x 31	713
Controle_S03	0,80 x 1,05	33 x 43	1419
Tratamento 1_S01	0,75 x 1,25	31 x 51	1581
Tratamento 1_S02	0,75 x 0,90	31 x 37	1147
Tratamento 1_S03	0,85 x 1,05	35 x 43	1505
Tratamento 2_S01	0,65 x 0,90	27 x 37	999
Tratamento 2_S02	0,90 x 1,80	37 x 73	2701
Tratamento 2_S03	0,90 x 1,20	37 x 49	1813
Tratamento 3_S01	1,40 x 1,45	57 x 59	3363
Tratamento 3_S02	0,50 x 0,50	21 x 21	441
Tratamento 3_S03	0,55 x 1,00	23 x 41	943
Tratamento 4_S01	1,35 x 1,30	55 x 53	2915
Tratamento 4_S02	1,35 x 1,50	55 x 61	3355
Tratamento 4_S03	1,45 x 1,35	59 x 55	3245
Tratamento 5_S01	1,35 x 1,40	55 x 57	3135
Tratamento 5_S02	1,35 x 1,40	55 x 57	3135
Tratamento 5_S03	0,40 x 0,50	17 x 21	357

Tabela 4 - Dimensão, matriz e número de espectros das amostras de DU145.

Amostra	Dimensão h x l (mm)	Matriz (L x C)	Espectros
Controle_S01	0,95 x 0,90	39 x 37	1443
Controle_S02	0,75 x 0,90	31 x 37	1147
Controle_S03	0,70 x 0,70	29 x 29	841
Tratamento 1_S01	0,85 x 0,95	35 x 39	1365
Tratamento 1_S02	0,70 x 0,75	29 x 31	899
Tratamento 1_S03	0,75 x 0,90	31 x 37	1147
Tratamento 2_S01	0,70 x 1,00	29 x 41	1189
Tratamento 2_S02	0,75 x 0,75	31 x 31	961
Tratamento 2_S03	0,60 x 0,65	25 x 27	675
Tratamento 3_S01	0,75 x 0,75	31 x 31	961
Tratamento 3_S02	0,60 x 0,60	25 x 25	625
Tratamento 3_S03	0,55 x 0,80	23 x 33	759
Tratamento 4_S01	0,50 x 0,60	21 x 25	525
Tratamento 4_S02	0,70 x 0,75	29 x 31	899
Tratamento 4_S03	0,70 x 0,75	29 x 31	899
Tratamento 5_S01	0,75 x 0,70	31 x 29	899
Tratamento 5_S02	0,60 x 0,75	25 x 31	775
Tratamento 5_S03	0,75 x 0,75	31 x 31	961

Para a análise da distribuição elementar por microXRF foram utilizados 3 esferoides de cada tratamento e de cada linhagem celular. Os dados de concentrações obtidos a partir do Pymca[®] foram analisados através do software GraphPad Prism 6. O PyMca[®] é um software que pode ser baixado gratuitamente para aplicações não comerciais e foi desenvolvido no *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF). O programa é capaz de resolver a maioria das necessidades relacionadas a fluorescência de raios X e permite o processamento interativo e em lote de grandes conjuntos de dados (SOLÉ et al., 2007).

Para investigar a presença de valores extremos, foi utilizado o teste ROUT e, após a aplicação do teste, os outliers foram excluídos. O teste estatístico utilizado para comparação entre as medianas dos tratamentos de cada linhagem celular, assim como a comparação entre as linhagens foi o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%.

Em todos os mapas bidimensionais, as concentrações de Fe, Cu e Zn foram normalizadas pelo valor máximo do controle (0 µM).

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Resultados da Análise dos Esferoides Celulares da Próstata através da μ XRF

A figura 5.1 ilustra o espectro de XRF de um esferoide de células de próstata. Foi possível detectar segundo as condições experimentais descritas no CAPÍTULO IV, os elementos: Ar, P, S, Cl, Ca, Fe, Cu e Zn.

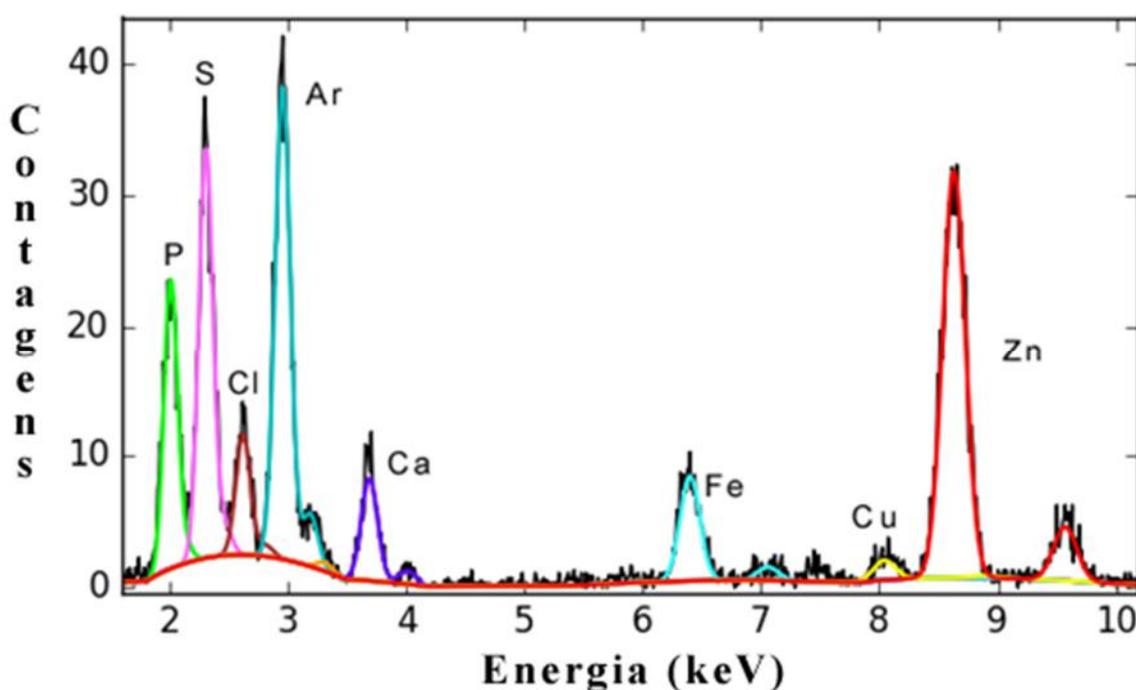


Figura 5.1 – Espectro de ponto único de XRF de esferoide de células normais da próstata humana.

Observa-se que elemento Ar está presente no espectro, tendo em vista que o experimento foi realizado em atmosfera normal e a atmosfera possui aproximadamente 1,0 % de Ar. Apesar dos elementos P, S, Cl, Ar, Ca, Fe, Cu e Zn terem sido detectados apenas o Ferro, Cobre e Zinco são de interesse neste estudo, como justificado no capítulo I.

A seguir, na figura 5.2, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Ferro nos esferoides da linhagem RWPE-1 suplementados com 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M e 250 μ M de Cloreto de Zinco.

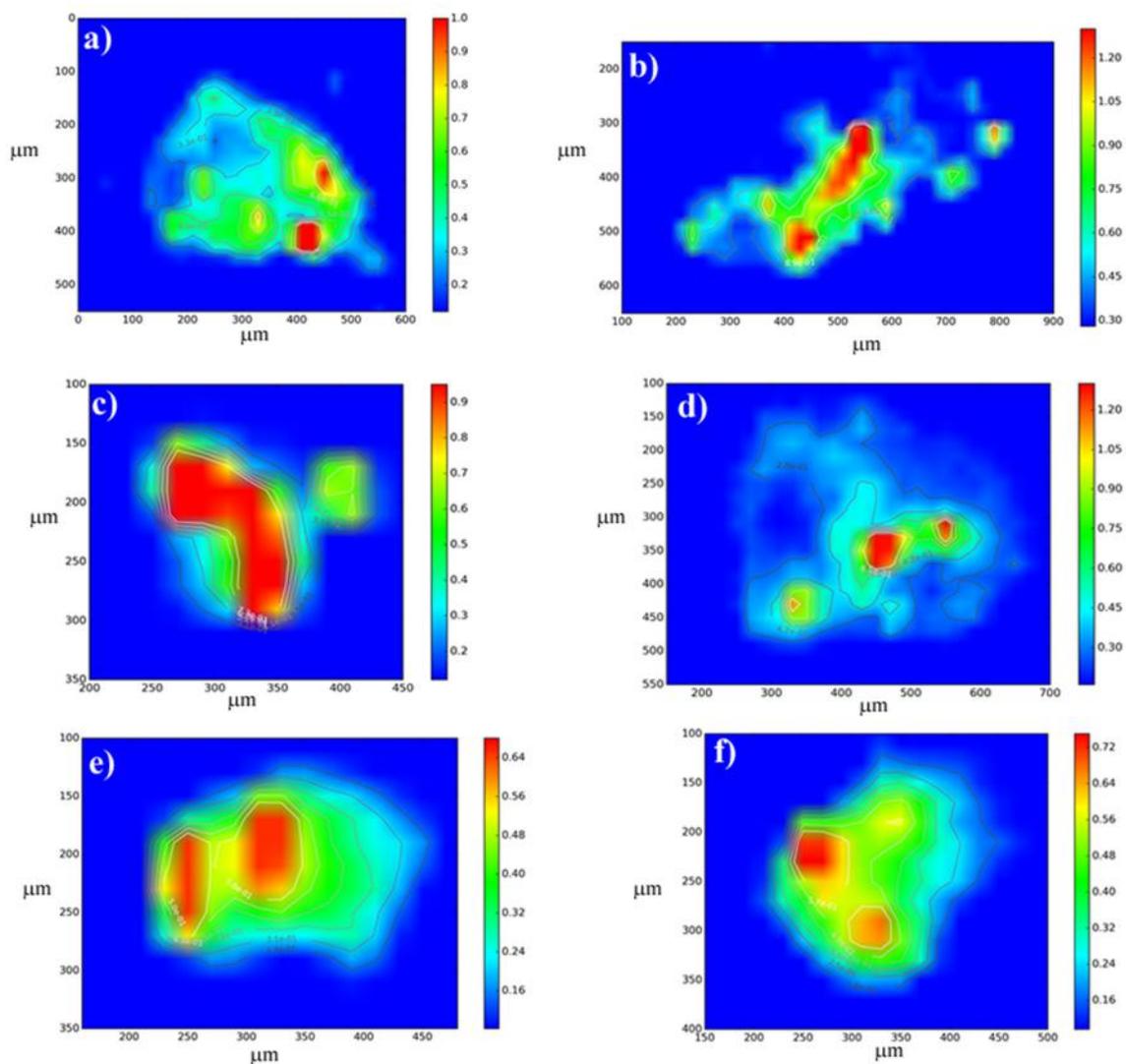


Figura 5.2 – Imagens da distribuição de Fe em esferoides RWPE-1 com tratamento de a) 0 μM , b) 50 μM , c) 100 μM , d) 150 μM , e) 200 μM e f) 250 μM .

Em prosseguimento, nas figuras 5.3, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Cobre nos esferoides da linhagem RWPE-1 suplementados com 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

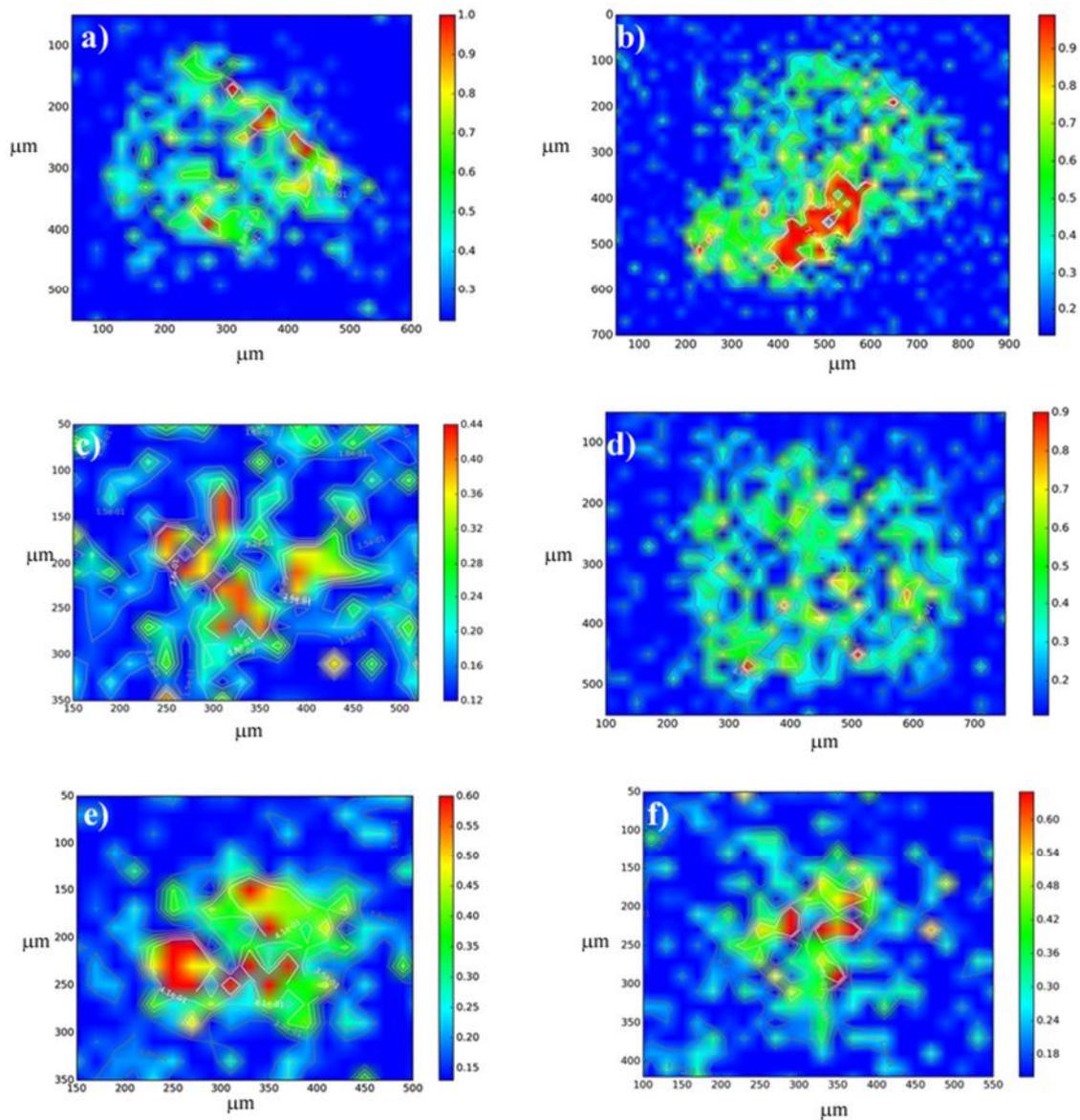


Figura 5.3 – Imagens da distribuição de Cu em esferoides RWPE-1 com tratamento de a) 0 μM, b) 50 μM, c) 100 μM, d) 150 μM, e) 200 μM e f) 250 μM.

Em prosseguimento, na figura 5.4, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Zinco nos esferoides da linhagem RWPE-1 suplementados com 0 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

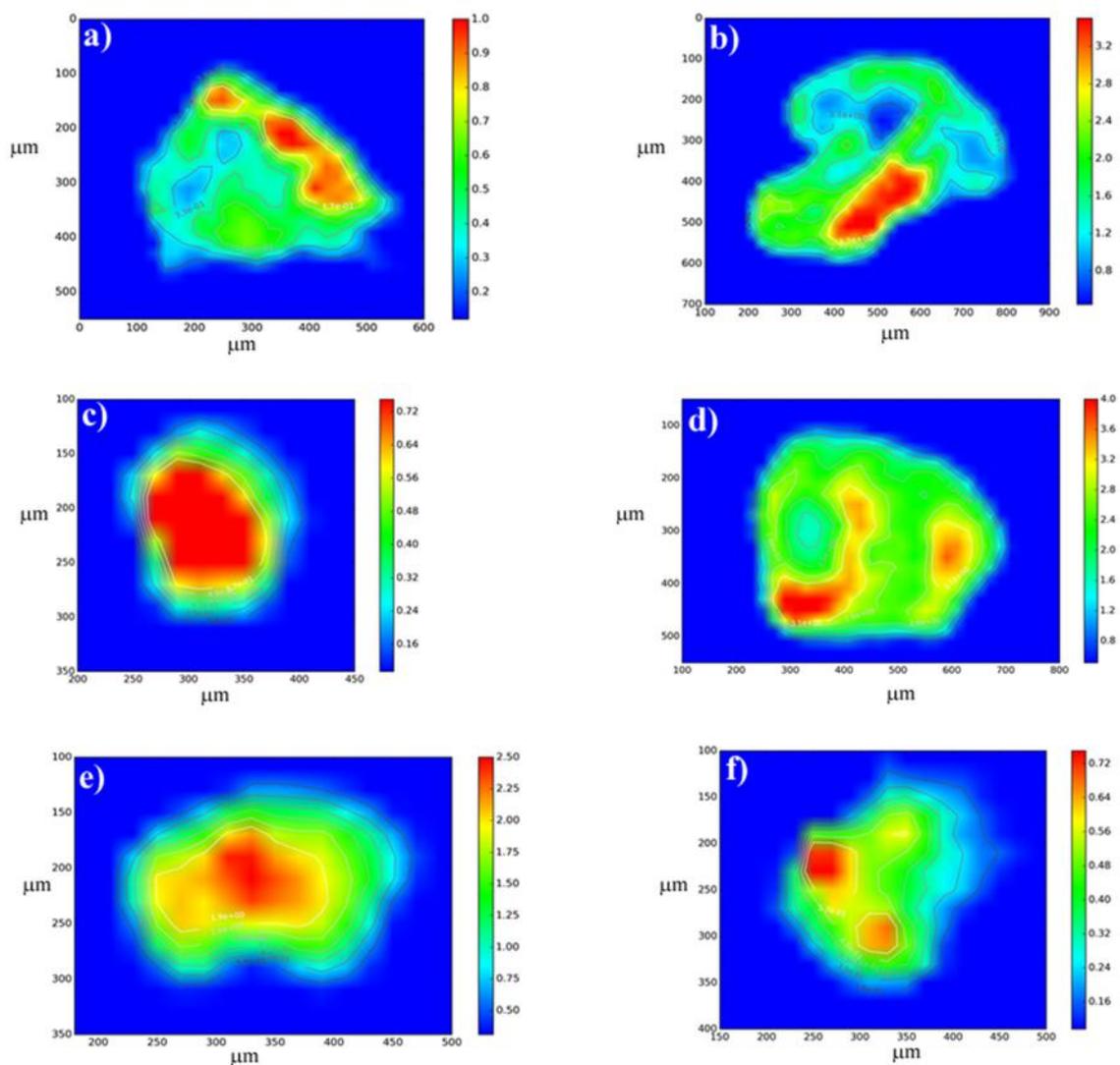


Figura 5.4 – Imagens da distribuição de Zn em esferoides RWPE-1 com tratamento de a) 0 μM , b) 50 μM , c) 100 μM , d) 150 μM , e) 200 μM e f) 250 μM .

Analisando a figuras 5.2 a 5.4, pode-se observar que apenas alguns esferoides de RWPE-1 mantiveram a forma esférica. Quanto a concentração dos elementos analisados é possível notar que houve um acúmulo de Ferro concentrado em algumas regiões dos esferoides, porém este acúmulo parece não ter relação com a quantidade de Cloreto de Zinco utilizada nos tratamentos, porém nos tratamentos de 200 μM e 250 μM é notório que a concentração de Ferro é melhor distribuída pela extensão do esferoide. Quanto a concentração de Cobre, percebe-se que o acúmulo deste elemento é mais pontual pela extensão dos esferoides. Quanto ao Zinco, apesar do notório acúmulo, observa-se um comportamento heterogêneo quando se compara os esferoides, ou seja, pelos mapas

bidimensionais não é possível notar uma relação de causa e efeito entre a distribuição do Zinco e os tratamentos aplicados.

Em prosseguimento, na figura 5.5, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Ferro nos esferoides da linhagem LNCaP suplementados com 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

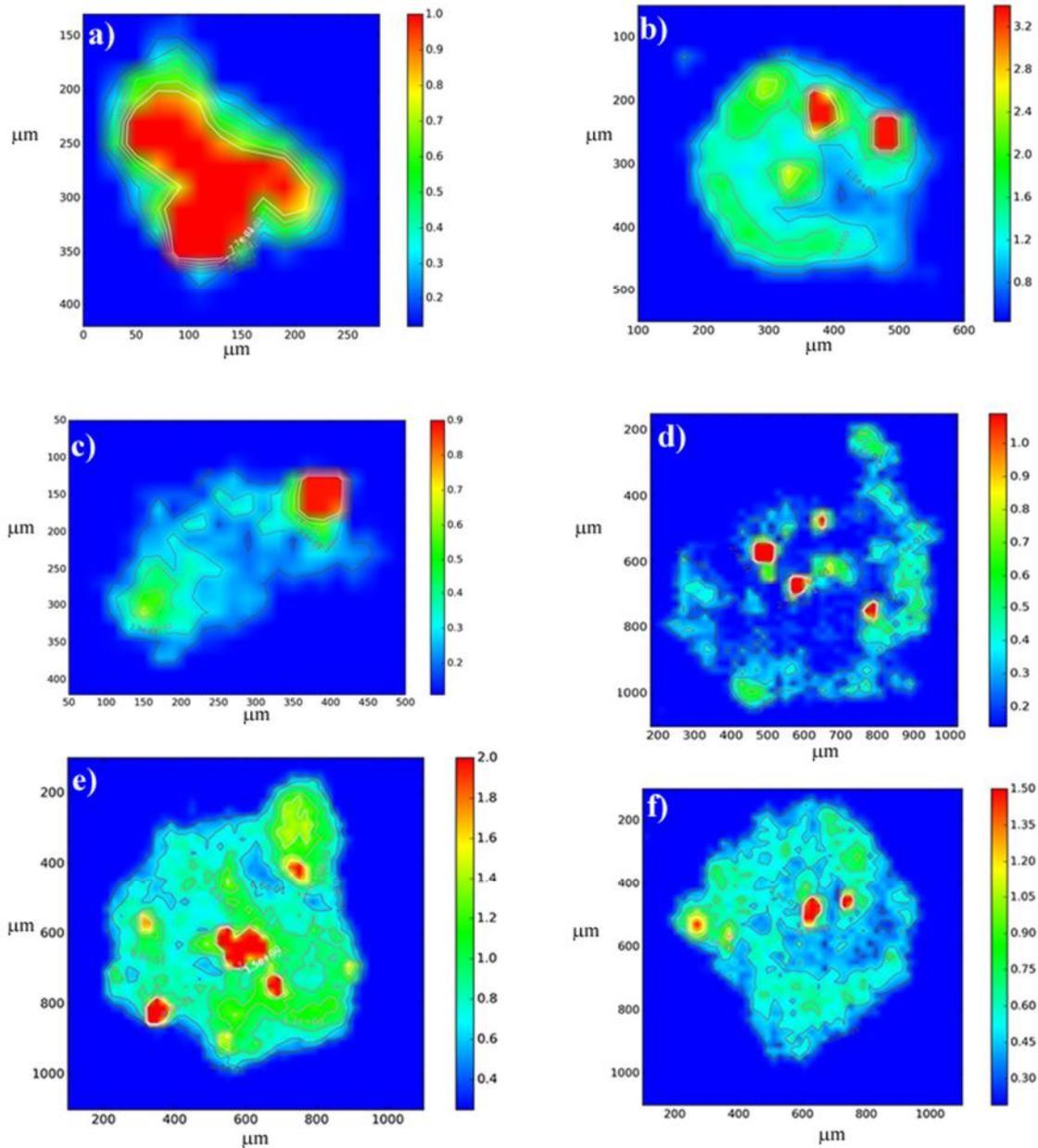


Figura 5.5 – Imagens da distribuição de Fe em esferoides LNCaP com tratamento de a) 0 μM , b) 50 μM , c) 100 μM , d) 150 μM , e) 200 μM e f) 250 μM .

Em prosseguimento, na figura 5.6, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Cobre nos esferoides da linhagem LNCaP suplementados com 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

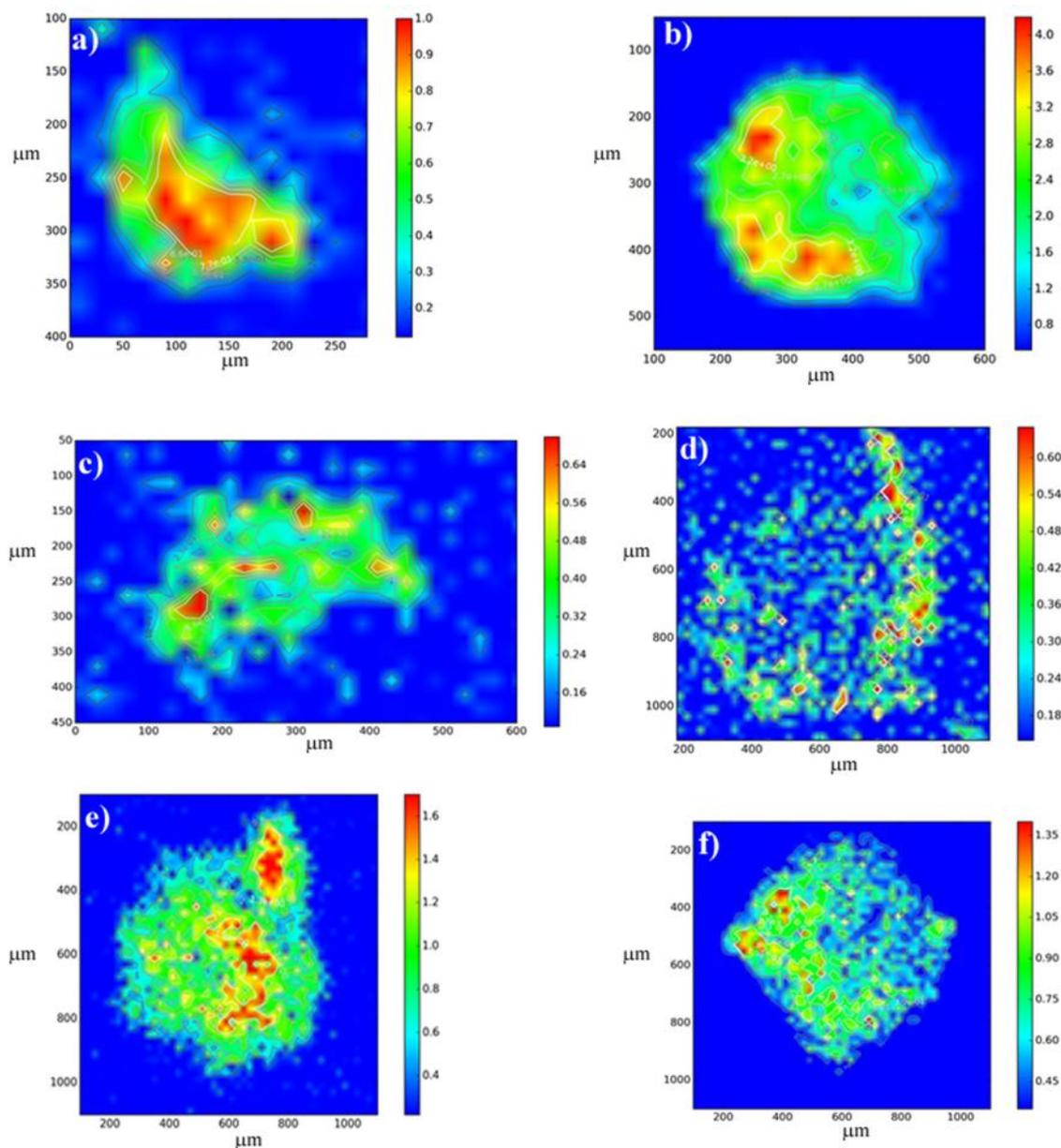


Figura 5.6 – Imagens da distribuição de Cu em esferoides LNCaP com tratamento de a) 0 μM , b) 50 μM , c) 100 μM , d) 150 μM , e) 200 μM e f) 250 μM .

Em prosseguimento, na figura 5.7, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Zinco nos esferoides da linhagem LNCaP suplementados com 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

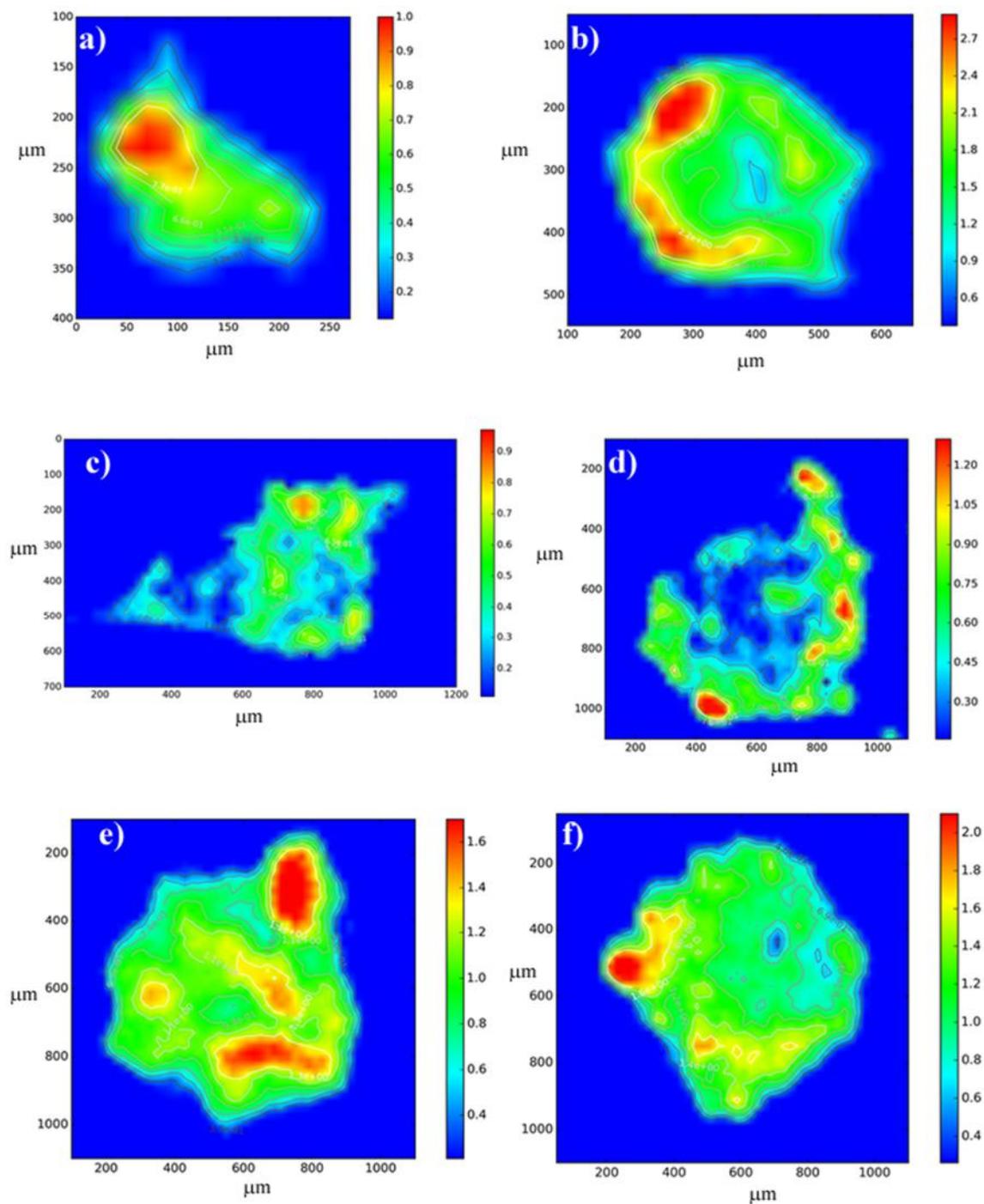


Figura 5.7 – Imagens da distribuição de Zn em esferoides LNCaP com tratamento de a) 0 μM, b) 50 μM, c) 100 μM, d) 150 μM, e) 200 μM e f) 250 μM.

Observando as figuras 5.5 a 5.7, nota-se que os esferoides da linhagem celular LNCaP não adquiriram forma esférica. Quanto ao acúmulo de Ferro, nota-se que no controle e o no tratamento de 50 μM ocorreu uma distribuição mais regular pelo esferoide, enquanto nos outros tratamentos o acúmulo foi mais pontual em determinadas regiões. Quanto ao acúmulo do Cobre, nota-se que também no controle e tratamento de 50 μM o

acúmulo é maior do que nos demais tratamentos, com destaque para o tratamento de 150 μM . Quanto ao acúmulo de Zinco, é notório que algumas regiões estão bem mais intensas, porém a localização dessa região não ocorreu de forma uniforme quando comparamos os esferoides submetidos às diferentes concentrações de tratamento.

Em prosseguimento, na figura 5.8, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Ferro nos esferoides da linhagem DU145 suplementados com 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

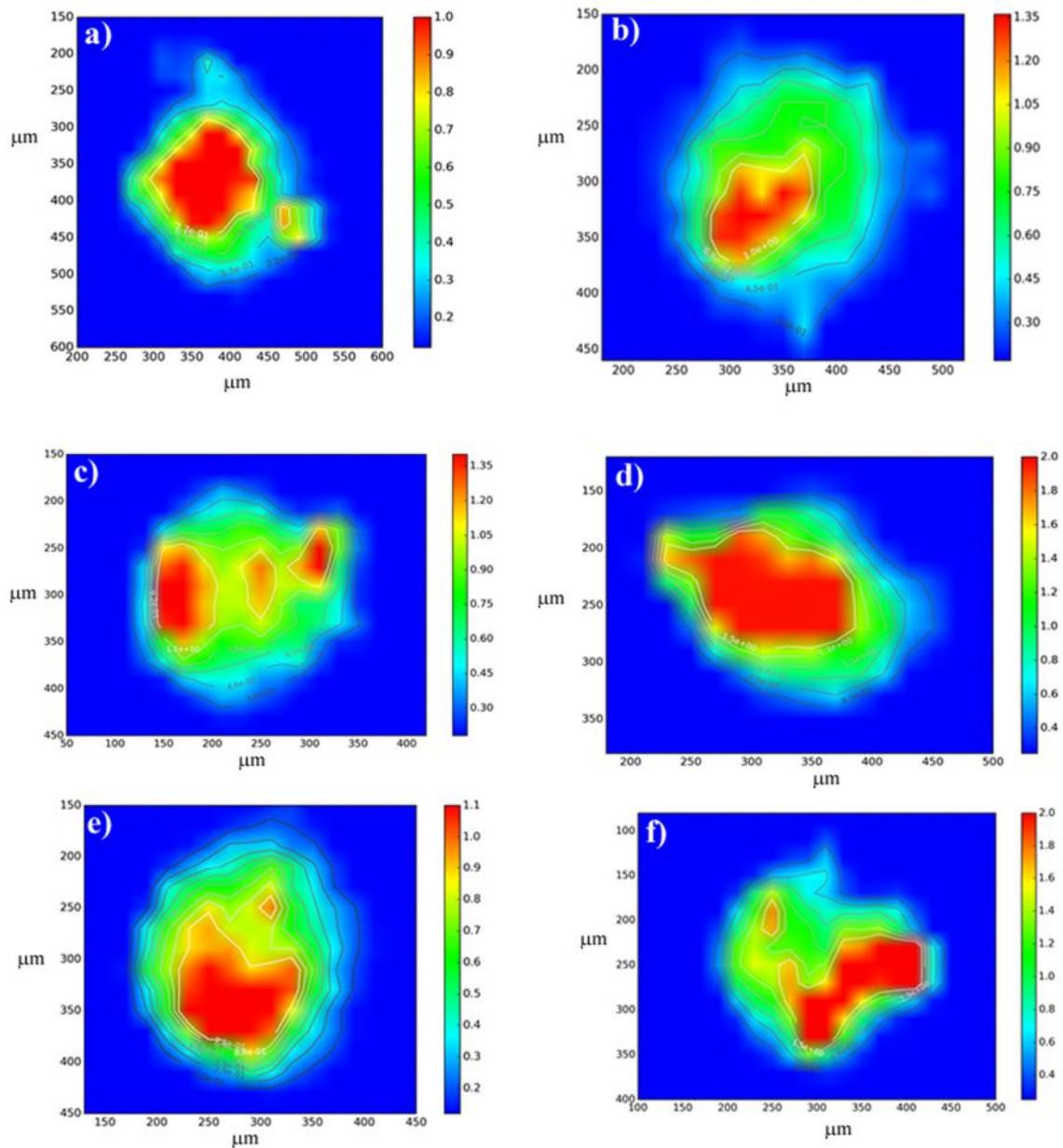


Figura 5.8 – Imagens da distribuição de Fe em esferoides DU145 com tratamento de a) 0 μM , b) 50 μM , c) 100 μM , d) 150 μM , e) 200 μM e f) 250 μM .

Em prosseguimento, na figura 5.9, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Cobre nos esferoides da linhagem DU145 suplementados com 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

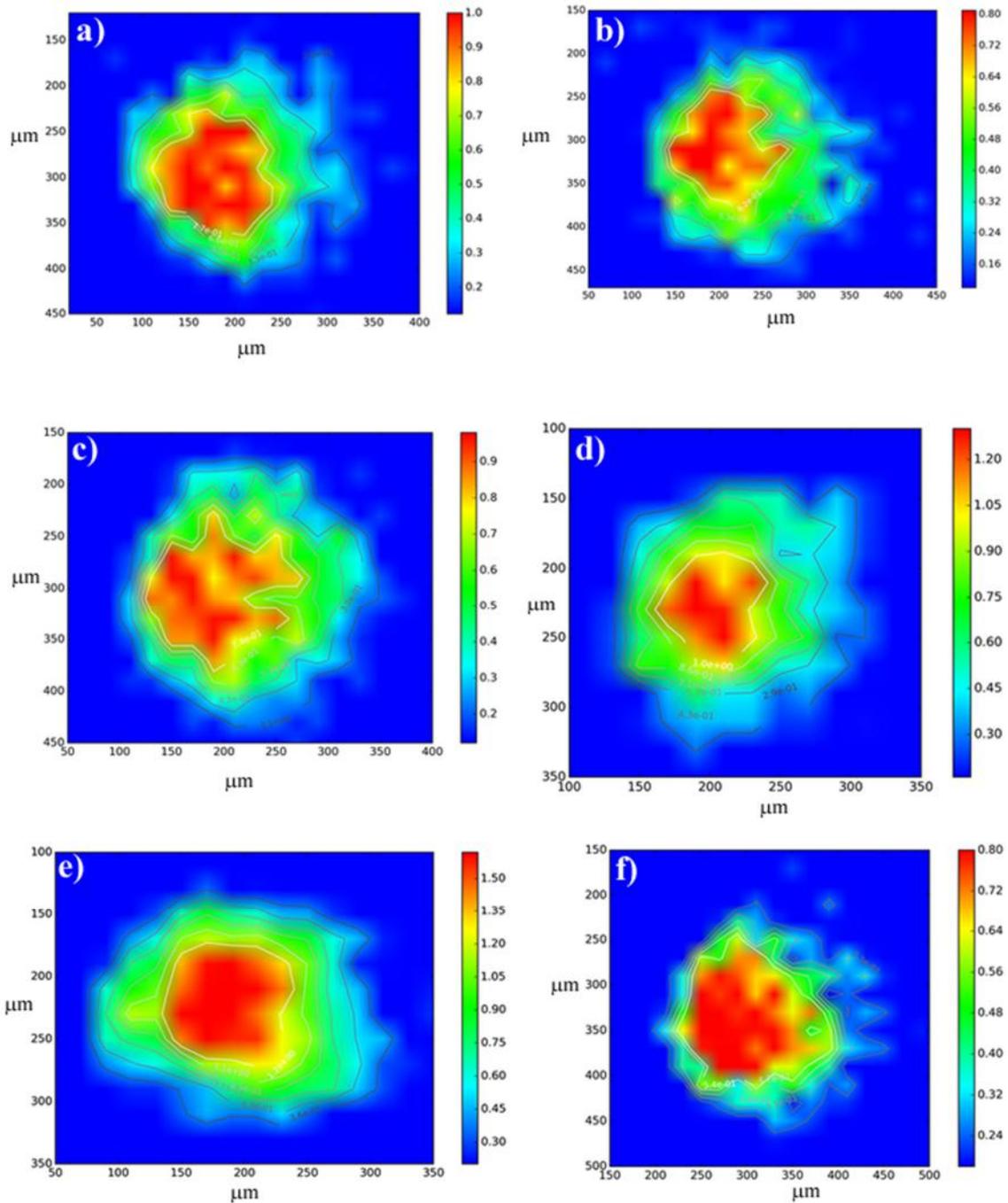


Figura 5.9 – Imagens da distribuição de Cu em esferoides DU145 com tratamento de a) 0 μM , b) 50 μM , c) 100 μM , d) 150 μM , e) 200 μM e f) 250 μM .

Em prosseguimento, na figura 5.10, temos as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da concentração de Zinco nos esferoides da linhagem DU145

suplementados com 0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM e 250 μM de Cloreto de Zinco.

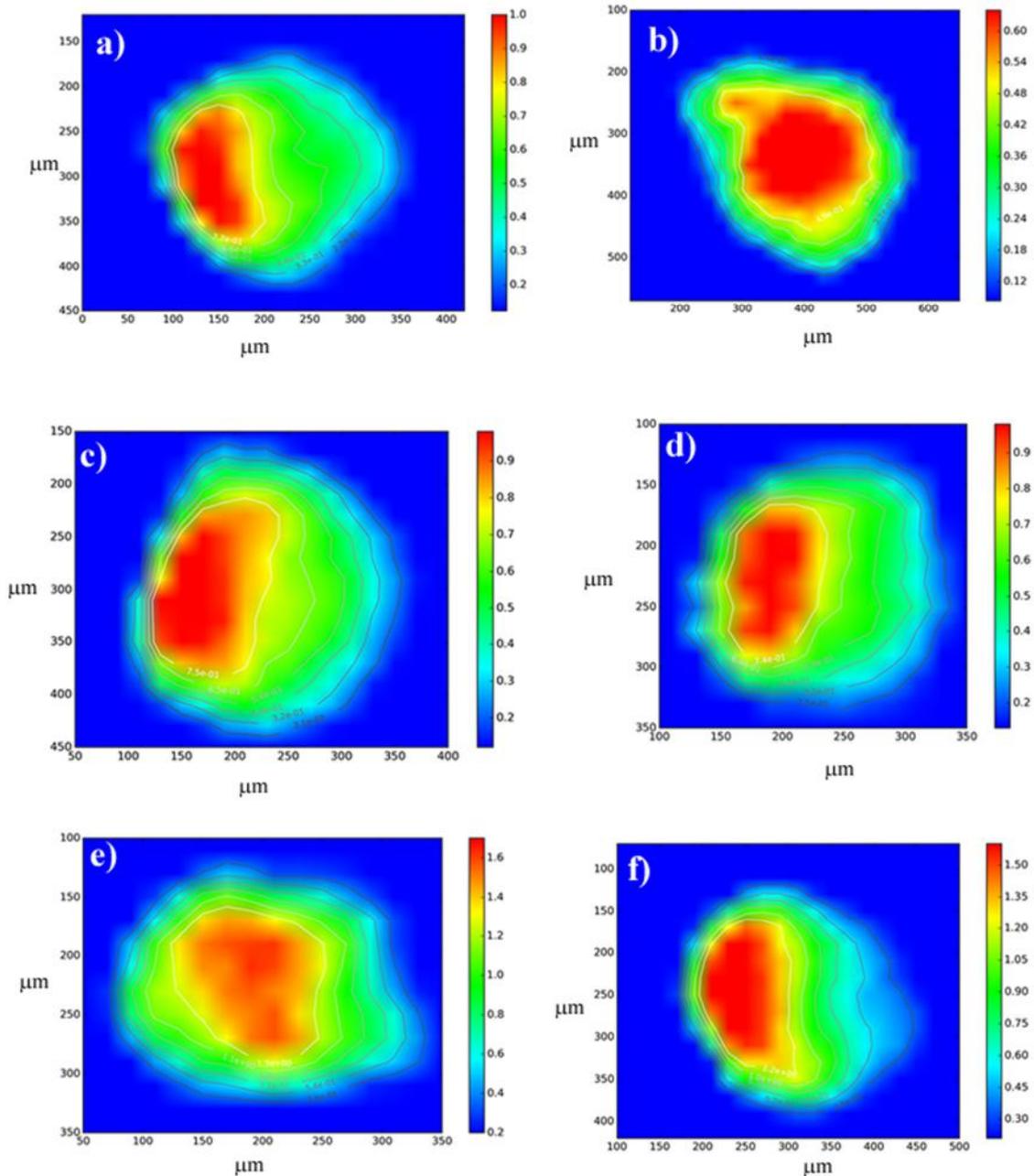


Figura 5.10 – Imagens da distribuição de Zn em esferoides DU145 com tratamento de a) 0 μM , b) 50 μM , c) 100 μM , d) 150 μM , e) 200 μM e f) 250 μM .

Analisando as figuras 5.8 a 5.10, pode-se notar que continua ocorrendo acúmulo de Ferro e Zinco, porém através dos mapas não é possível comparar os resultados entre os diferentes tipos de linhagens celulares. No entanto, é possível observar o grande aumento na concentração do Cobre nesta linhagem celular tumoral.

A Tabela 5 apresenta a média das concentrações medidas por microXRF, os valores certificados, o desvio relativo e o erro relativo. O erro relativo varia de 3% a 10%, o que significa que os resultados obtidos estão de acordo com os valores certificados.

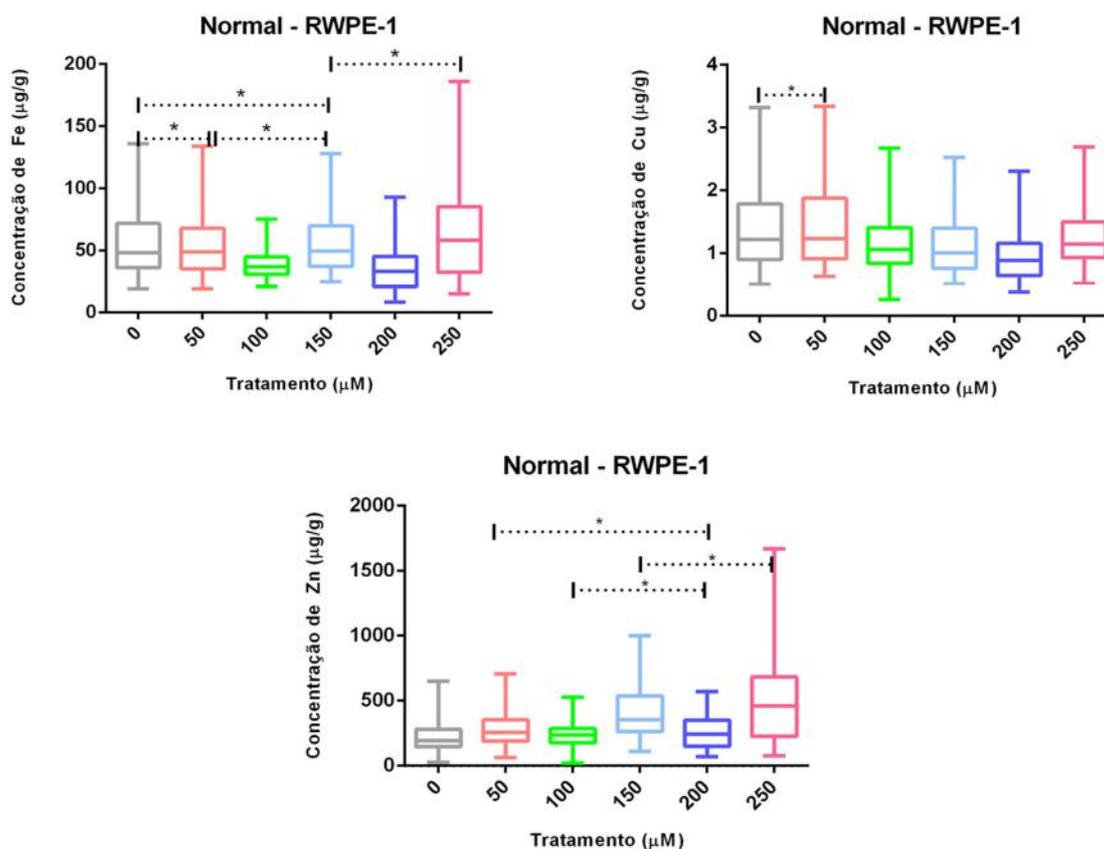
Tabela 5 - Comparação entre os resultados experimentais e os valores de referência da amostra certificada: NIST - Standard Reference Material 1577b (Fígado Bovino).

Elemento	μXRF^a ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Valor Certificado ^b ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Erro Relativo (%)
Fe	165 ± 5	184 ± 15	10
Cu	172 ± 4	160 ± 8	8
Zn	131 ± 3	127 ± 16	3

a Média \pm desvio-padrão relativo.

b Média \pm erro sistemático.

A figura 5.11 mostra os gráficos referentes às comparações da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro, Cobre e Zinco nos esferoides celulares de RWPE-1 para cada tratamento. As tabelas 6, 7 e 8 mostram o valor de P para cada comparação.



* Não significativos

Figura 5.11 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares de RWPE-1 entre os tratamentos com ZnCl_2 .

Tabela 6 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro da linhagem RWPE-1.

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Não	> 0.9999
Controle x 100 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 150 μM	Não	0.2300
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Sim	0.0374
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Não	0.1072
50 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 250 μM	Sim	0.0164
100 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 200 μM	Sim	0.0088
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 250 μM	Não	> 0.9999
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

Tabela 7 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cobre da linhagem RWPE-1.

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Não	0.1130
Controle x 100 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Sim	0.0019
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Sim	0.0011
100 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

Tabela 8 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zinco da linhagem RWPE-1

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 100 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 200 μM	Não	0.1014
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 200 μM	Não	0.1371
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 250 μM	Não	> 0.9999
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

De acordo com a Figura 5.11, observa-se que os resultados da concentração de ferro e zinco não seguem um padrão em relação ao tratamento com cloreto de zinco. A concentração ($\mu\text{g/g}$) do cobre não segue um padrão em relação ao tratamento com cloreto de zinco, porém as medianas das concentrações permanecem menores em todos os tratamentos quando comparadas às medianas do grupo controle.

A figura 5.12 mostra os gráficos referentes às comparações da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro, Cobre e Zinco nos esferoides celulares de LNCaP para cada tratamento. As tabelas 9, 10 e 11 mostram o valor de P para cada comparação.

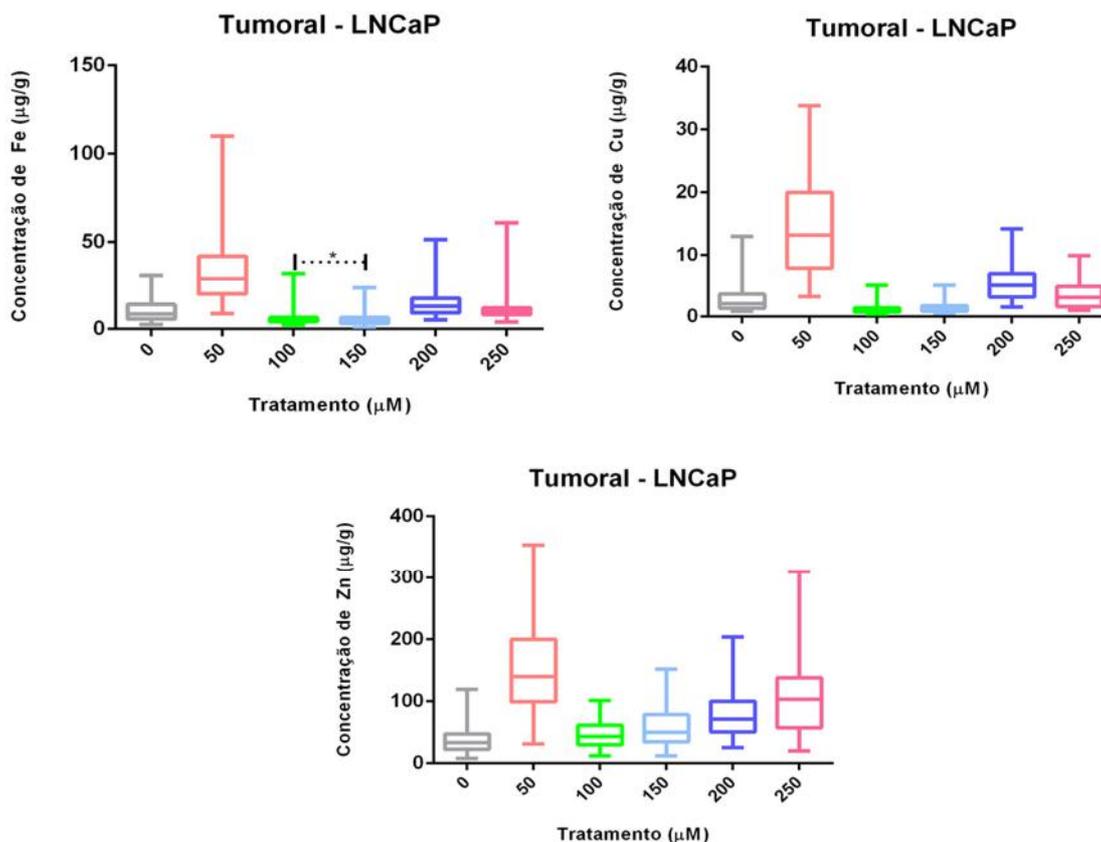


Figura 5.12 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares de LNCaP entre os tratamentos com ZnCl_2 .

Tabela 9 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro da linhagem LNCaP.

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 100 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Sim	0.0089
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Sim	> 0.9999
100 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

Tabela 10 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cu da linhagem LNCaP.

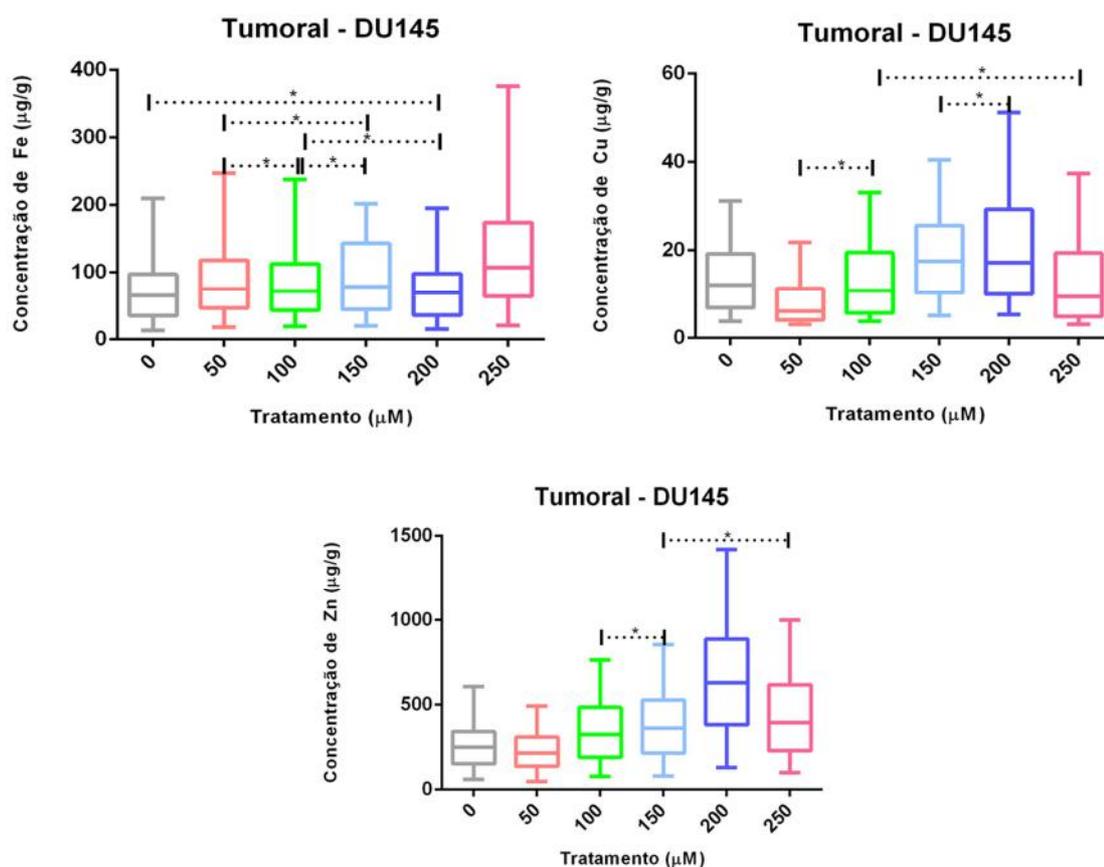
Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 100 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

Tabela 11 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zn da linhagem LNCaP.

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 100 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

De acordo com a Figura 5.12, observa-se que os resultados da concentração de ferro dos esferoides obtidos a partir da linhagem LNCaP não seguem um padrão em relação ao tratamento com cloreto de zinco, porém nota-se que a mediana do tratamento de 50 μM destaca-se das demais. Nota-se também um aumento na concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cobre nos tratamentos de 50 μM e, os tratamentos de 100 μM e 150 μM mantiveram suas medianas abaixo do controle. Observa-se que há um aumento significativo na concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zinco no tratamento de 50 μM e após há um grande declínio no tratamento de 100 μM e a partir deste tratamento ocorre um aumento progressivo e discreto da mediana da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zinco, conforme aumenta-se a concentração de Cloreto de Zinco.

A figura 5.13 mostra os gráficos referentes às comparações da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro, Cobre e Zinco nos esferoides celulares de DU145 para cada tratamento. As tabelas 12, 13 e 14 mostram o valor de P para cada comparação.



* Não significativos

Figura 5.13 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares de DU145 entre os tratamentos com ZnCl_2 .

Tabela 12 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe da linhagem DU145.

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Sim	0.0001
Controle x 100 μM	Sim	0.0265
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Não	> 0.9999
Controle x 250 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 100 μM	Não	0.8560
50 μM x 150 μM	Não	> 0.9999
50 μM x 200 μM	Sim	0.0054
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Não	0.1740
100 μM x 200 μM	Não	0.2569
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	0.0005
150 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

Tabela 13 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cu da linhagem DU145.

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 100 μM	Não	> 0.9999
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Não	0.0055
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 250 μM	Não	0.5924
150 μM x 200 μM	Não	> 0.9999
150 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

Tabela 14 – Comparação do Controle com Tratamentos e entre Tratamentos para concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zn da linhagem DU145.

Comparações	Significante?	Valor de P
Controle x 50 μM	Sim	0.0074
Controle x 100 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 150 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 200 μM	Sim	< 0.0001
Controle x 250 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 100 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 150 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
50 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 150 μM	Não	0.4412
100 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
100 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 200 μM	Sim	< 0.0001
150 μM x 250 μM	Não	0.3383
200 μM x 250 μM	Sim	< 0.0001

A Figura 5.13, mostra que a concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ferro na célula tumoral DU145 aumentou nos tratamentos de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 250 μM , nota-se que há um declínio na concentração ($\mu\text{g/g}$) de cobre nas células tumorais DU145 no tratamento de 50 μM , e nos tratamentos de 150 μM e 200 μM há um aumento quando comparado ao controle, e um novo declínio nos tratamentos de 100 μM e 250 μM . As maiores concentrações ($\mu\text{g/g}$) são observadas nos tratamentos de 150 μM e 200 μM . Quanto ao zinco, observa-se que há um aumento na concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zinco a partir do tratamento de 100 μM comparado ao controle, também se observou que não houve diferença significativa na concentração do zinco entre os tratamentos de 100 μM e 150 μM e 150 μM e 250 μM .

Nas figuras a seguir, 5.14, 5.15 e 5.16, compara-se as linhagens celulares em cada tratamento para cada oligoelemento estudado, a fim de verificar como a progressão do câncer influencia no comportamento desses elementos e qual o papel dos tratamentos efetuados nesta progressão. As tabelas 15, 16 e 17 mostram o valor de P para cada comparação.

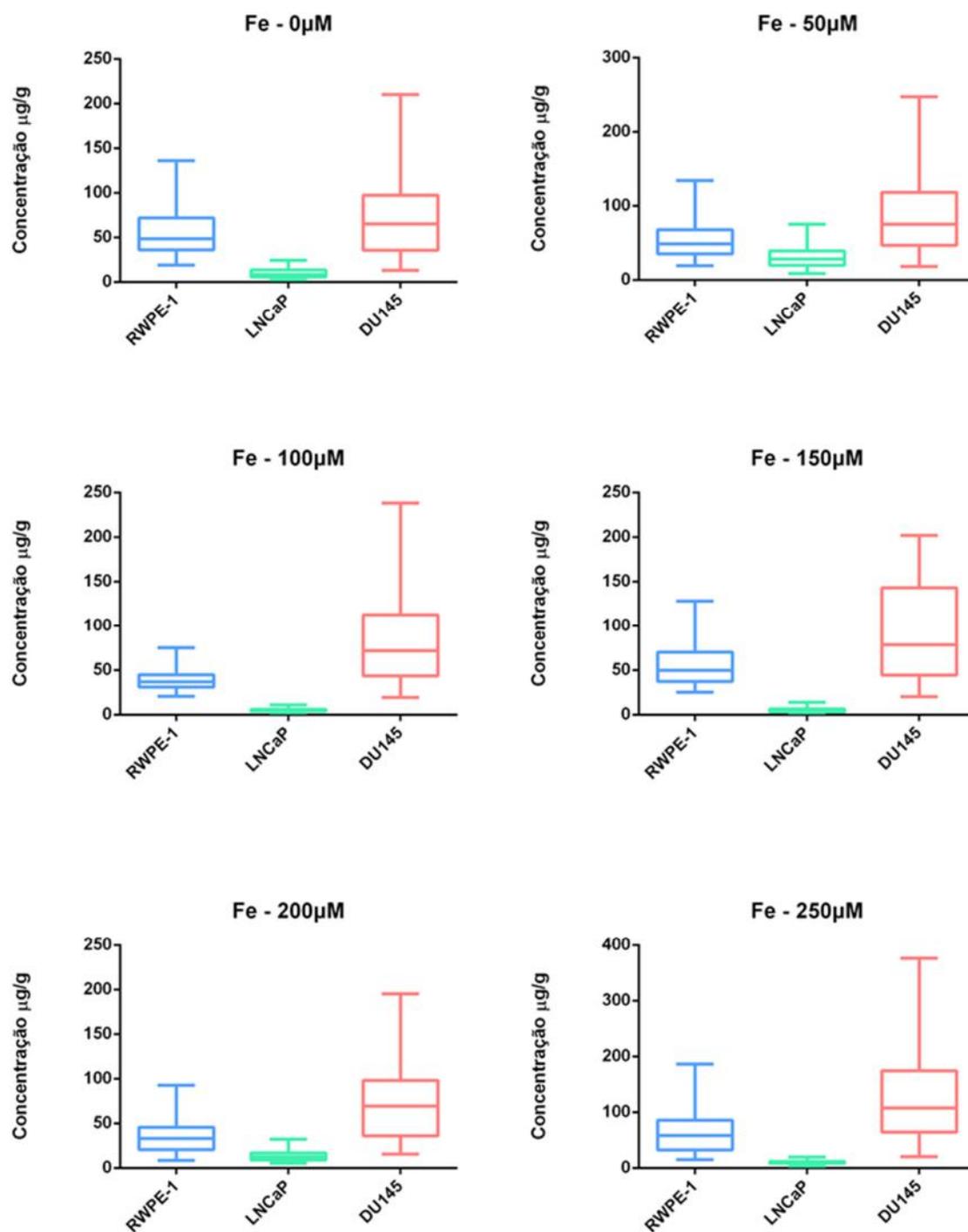


Figura 5.14 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe nos esferoides submetidos ao tratamento de $0 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ e $250 \mu\text{M}$ de ZnCl_2 entre as linhagens celulares estudadas.

Tabela 15 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Fe entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e DU145 nos esferoides submetidos aos tratamentos de ZnCl_2 .

Tratamento	Comparações	Significante?	Valor de P
0 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
0 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	0.0002
0 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
50 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
50 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
50 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
100 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
100 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
100 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
150 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
150 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
150 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
200 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
200 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
200 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
250 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
250 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
250 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001

Observa-se na figura 5.14 que, em geral, as células de LNCaP acumulam menos Ferro do que as células normais, enquanto que as células de DU145 são as que mais acumulam este elemento traço, porém é importante observar que houve aumento nas medianas de acordo com o aumento da concentração de Cloreto de Zinco.

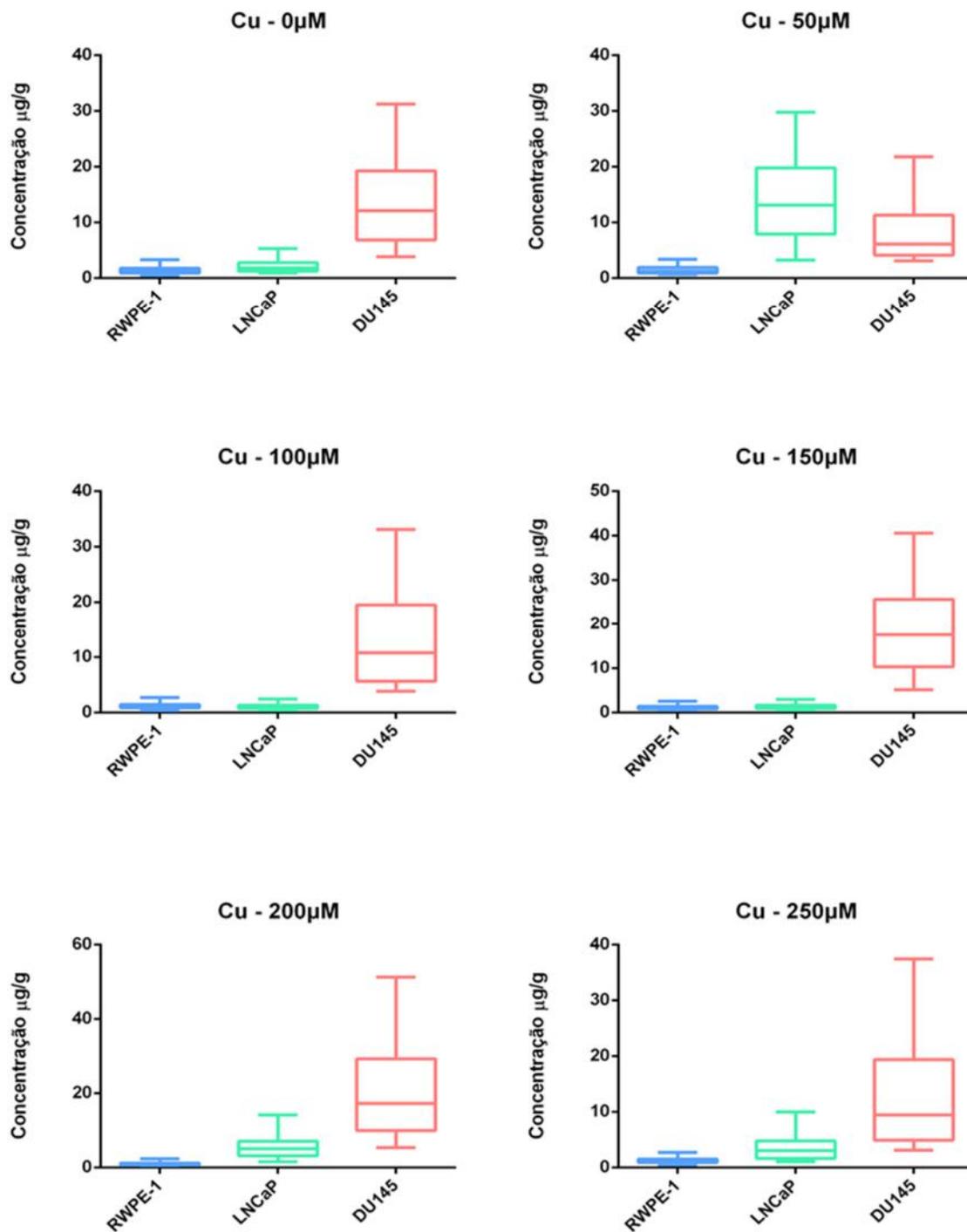


Figura 5.15 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cu nos esferoides submetidos ao tratamento de $0 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ e $250 \mu\text{M}$ de ZnCl_2 entre as linhagens celulares estudadas.

Tabela 16 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Cu entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e DU145 nos esferoides submetidos aos tratamentos de ZnCl_2 .

Tratamento	Comparações	Significante?	Valor de P
0 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
0 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
0 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
50 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
50 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
50 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
100 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
100 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
100 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
150 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
150 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
150 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
200 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
200 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
200 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
250 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
250 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
250 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001

Observa-se na figura 5.15 que os esferoides de LNCaP e RWPE-1, acumulam uma concentração baixa de Cobre, exceto no tratamento de 50 μM , tendo em vista que ocorre um acúmulo em células LNCaP e uma redução na mediana de DU145, enquanto nas células de DU145 o acúmulo deste elemento traço é bastante expressivo, nota-se ainda que, de forma geral, o comportamento das linhagens celulares permaneceu o mesmo durante os tratamentos com Cloreto de Zinco. No entanto, é importante destacar que apesar da linhagem DU145 acumular concentração significativa de Cobre, no tratamento de 50 μM houve uma redução da mediana deste elemento traço e no tratamento de 200 μM houve um aumento nesta mediana.

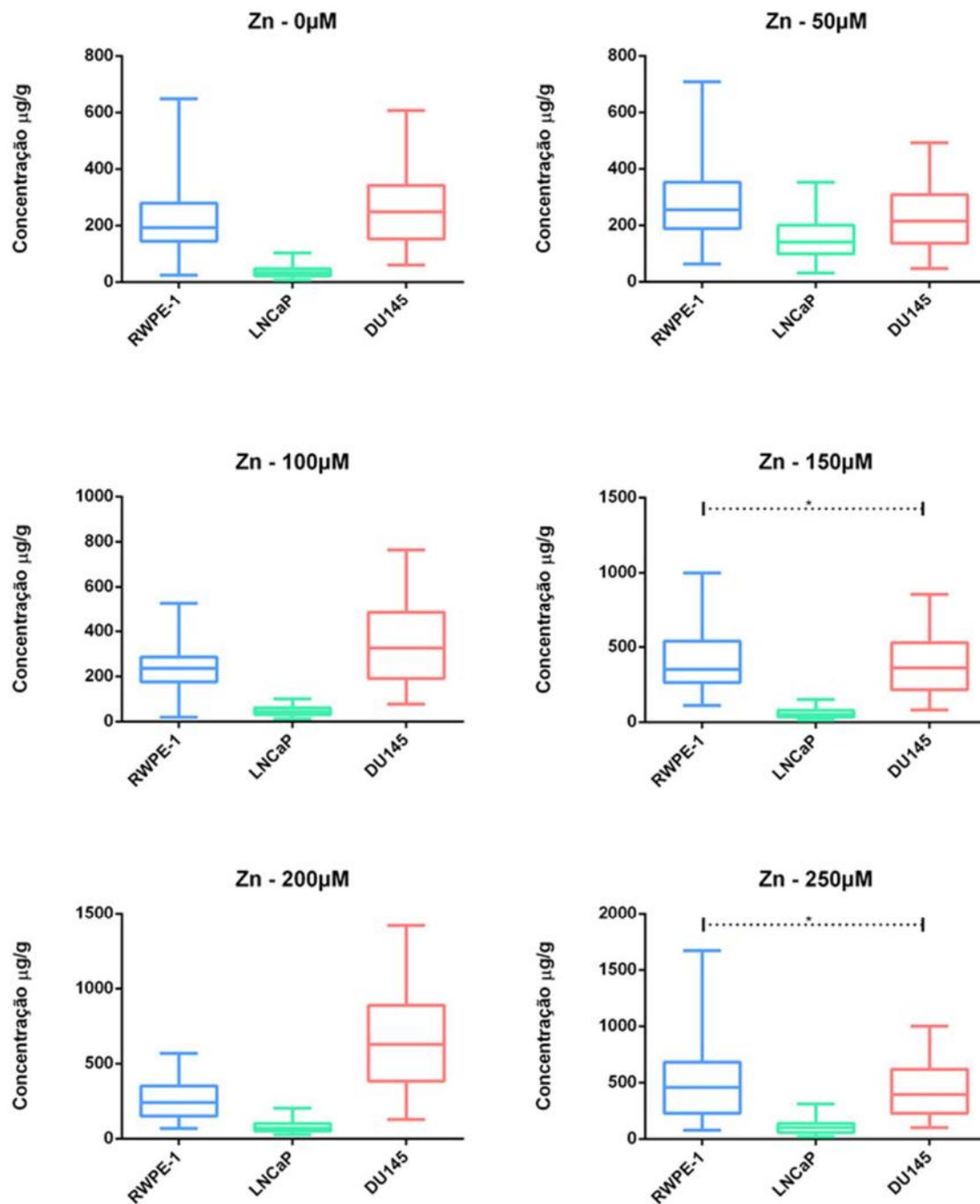


Figura 5.16 – Comparação da concentração (µg/g) de Zn nos esferoides submetidos ao tratamento de 0 µM de ZnCl₂ entre as linhagens celulares estudadas.

Tabela 17 – Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Zn entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e DU145 nos esferoides submetidos aos tratamentos de ZnCl_2 .

Tratamento	Comparações	Significante?	Valor de P
0 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
0 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
0 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
50 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
50 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
50 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
100 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
100 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
100 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
150 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
150 μM	RWPE-1 x. DU145	Não	0.1935
150 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
200 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
200 μM	RWPE-1 x. DU145	Sim	< 0.0001
200 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001
250 μM	RWPE-1 x. LNCaP	Sim	< 0.0001
250 μM	RWPE-1 x. DU145	Não	> 0.9999
250 μM	LNCaP x. DU145	Sim	< 0.0001

Observa-se na figura 5.16 resultados interessantes, a iniciar pelo controle, tendo em vista que as medianas das linhagens RWPE-1 e DU145 são próximas, enquanto na mediana de LNCaP há uma queda acentuada comparada a linhagem normal. Nota-se ainda, que o tratamento de 50 μM foi o único capaz de aumentar a mediana de LNCaP, no tratamento de 100 μM e 200 μM a mediana da concentração de Zn aumenta na linhagem DU145. O tratamento de 150 μM e 250 μM foram os únicos capazes de aumentar a mediana da concentração de Zn na linhagem RWPE-1.

V.2. Discussão dos Resultados da Análise por microXRF

A análise dos dados obtidos através da técnica de μXRF nos permitiu verificar que quanto a concentração de ferro, as células de LNCaP acumularam menos ferro do que as células normais, enquanto que as células de DU145 são as que mais acumularam este elemento traço (Figura 5.14). Pôde-se observar, ainda que, nas células normais, o cloreto

de Zinco não influenciou na concentração de ferro intracelular, exceto pelo tratamento de 200 μM , onde ocorreu uma queda na mediana da concentração, nos esferoides obtidos a partir da linhagem LNCaP não seguiram um padrão em relação ao tratamento com cloreto de zinco (Figura 5.12). Nas células tumorais DU145 (Figura 5.13), os tratamentos de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 250 μM aumentaram significativamente a concentração de ferro. O Ferro é um elemento traço controverso, o que leva a abordagens terapêuticas contraditórias: a privação de ferro ou a superdosagem, que levaria a um ataque oxidativo contra o câncer, são ambas possíveis terapias contra o câncer (FOY et al., 2011). Células malignas exibem frequentemente uma necessidade aumentada de Fe, e proteínas envolvidas na regulação de Fe são frequentemente desreguladas em cânceres e desempenham um papel significativo durante o processo tumoral (VELLA et al., 2017). A ferroportina, uma proteína transportadora transmembrana que governa o fluxo de Fe da célula pode ser reduzida em células de câncer de próstata, e seu decremento intracelular está associado à diminuição da diferenciação de células de câncer de próstata e aumento do grau de malignidade (XUE et al., 2015). Acredita-se que a diminuição dos níveis de expressão de ferroportina nas células cancerígenas, reduzindo a exportação de Fe intracelular e causando sobrecarga de Fe intracelular, ativa EROs e conseqüente o dano ao DNA, favorecendo a tumorigênese e / ou a promoção tumoral (XUE et al., 2015). A contradição em torno do Ferro foi refletida neste estudo, tendo em vista que nas células de câncer menos agressivo, LNCaP, houve uma diminuição da concentração de ferro quando submetidas aos tratamentos e comparadas a linhagem de células normal, porém nas células com características de câncer mais agressivo, DU145, todos os tratamentos aumentaram a concentração de ferro.

Quanto ao cobre observou-se que sua concentração em células normais foi próxima a mediana do controle (Figura 5.11), ou seja, os tratamentos com cloreto de zinco não influenciaram a metabolização deste elemento traço, portanto a fisiologia celular permaneceu praticamente inalterada. Para a célula tumoral LNCaP (Figura 5.12) notou-se um aumento na concentração de cobre no tratamento de 50 μM e os tratamentos de 100 μM e 150 μM mantiveram suas medianas abaixo do controle. Para a célula tumoral DU145 (Figura 5.13) o resultado interessante foi observado no tratamento de 50 μM , onde a mediana da concentração do cobre, que sabe-se estar aumentada em tecidos tumorais, diminuiu em relação ao controle. Nos tratamentos de 150 μM e 200 μM há um aumento quando comparado ao controle, e um novo declínio nos tratamentos de 100 μM

e 250 μM . As maiores concentrações foram observadas nos tratamentos de 150 μM e 200 μM . Entre as linhagens estudadas é importante destacar o acúmulo deste metal em células de câncer mais agressivo, DU145, e ainda, que o tratamento com cloreto de zinco manteve as medianas próximas a do controle para essas células, ressalta-se que a célula tumoral LNCaP não sofre o mesmo acúmulo deste oligoelemento, dessa maneira, pode-se dizer que o acúmulo deste metal, considerado tóxico às células normais está diretamente ligado a progressão da doença. O cobre é um mineral necessário para o bom funcionamento dos muitos sistemas enzimáticos e a ruptura da homeostase do cobre está associada a várias doenças, incluindo câncer e distúrbios crônicos. E está envolvido em processos de vitais, com um papel essencial nas reações de crescimento e de desenvolvimento. É também importante para a função de várias enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo energético, respiração e síntese de DNA. O Cu catalisa diversas reações que levam à produção de EROs, portanto regular com precisão a sua homeostase é necessário para garantir o fornecimento adequado desse elemento sem gerar efeitos tóxicos dentro a célula (VELLA et al., 2017). No câncer, o estresse oxidativo está envolvido no processo de iniciação, por causar alterações no DNA, que podem ser permanentemente incorporadas ao genoma após um período de tempo ainda desconhecido (ANTONIADES et al., 2013).

Para o zinco, observou-se que o tratamento não teve influência significativa para as células normais, porém para as células tumorais LNCaP observou-se que o tratamento foi capaz de aumentar progressivamente a concentração de zinco quando comparado ao controle, destaca-se ainda o tratamento de 50 μM onde ocorreu um aumento significativo da concentração de zinco, oligoelemento este de extrema importância para a próstata. Ressalta-se que por se tratar de células que representam o estágio inicial de câncer prostático, este resultado é bastante interessante. Para as células tumorais DU145 observou-se que ocorreu um aumento na concentração de zinco a partir do tratamento de 100 μM comparado ao controle. A comparação entre as linhagens trouxe resultados interessantes, a iniciar pelo controle, tendo em vista que as medianas das linhagens RWPE-1 e DU145 foram próximas, enquanto a mediana de LNCaP é inferior comparada a linhagem normal. O tratamento de 50 μM foi o único que aumentou a mediana de LNCaP e os tratamentos de 150 μM e 250 μM foram os únicos que aumentaram a mediana da concentração de zinco na linhagem RWPE-1. Uma importante função da próstata humana é produzir altos níveis de Zn e citrato, importantes constituintes do fluido

prostático. As células epiteliais localizadas na zona periférica da glândula são especializadas no acúmulo de Zn e na secreção de citrato. A importação de zinco é regulada pela ZIP1, uma proteína transportadora, localizada na membrana celular basolateral e apical. Uma vez que o zinco intracelular total é principalmente determinado pela sua absorção a partir do fluido extracelular, é essencial que as células tenham transportadores ZIP1 funcionalmente ativos. A expressão de ZIP1 é alta em células normais da próstata, enquanto é regulada negativamente em células de câncer de próstata devido ao silenciamento epigenético de ZIP1 (ZOU et al., 2011, FRANKLIN et al., 2003 e VELLA et al., 2017). Além disso, o zinco é um componente estrutural da enzima superóxido dismutase presente no citoplasma das células, esta enzima promove a conversão de dois radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, reduzindo a toxicidade das EROs, pois converte espécies altamente reativas em espécies menos nocivas. Portanto, manter concentrações adequadas de zinco nos compartimentos celulares é essencial para o bom funcionamento do sistema de defesa antioxidante (MARREIRO et al., 2017).

O estudo dos mecanismos que levam as células tumorais da próstata a perderem a capacidade de acumular zinco, a acumularem cobre em níveis que seriam tóxicos a células normais e o entendimento do contraditório papel do ferro são de extrema importância para o entendimento desta patogênese. O tratamento com cloreto de zinco influenciou no comportamento das células da próstata, quanto a absorção de ferro, cobre e zinco. Ressalta-se que entre as linhagens estudadas, manteve as concentrações de cobre baixas em células normais e em células de câncer menos agressivo, porém não foi capaz de diminuir a concentração deste metal em células de câncer mais agressivo (DU145). Contudo, apesar de não ser capaz de diminuir a concentração de cobre em células de DU145, o tratamento não aumentou as concentrações nas células normais e de LNCaP, ou seja, o tratamento não está tornando o ambiente intracelular tóxico para estes tipos celulares; quanto ao ferro, houve um comportamento não linear, tendo em vista que em alguns tratamentos aumentou as medianas das concentrações e em outros diminuiu as mesmas. Considerando que o papel do ferro ainda é controverso na literatura, este pode ser um resultado interessante; quanto ao zinco observou-se que em células normais somente o tratamento de 250 μ M foi capaz de aumentar a concentração de zinco intracelular, dessa maneira, os tratamentos tem pouca influência em células normais, o que é interessante, pois a concentração de zinco em células epiteliais normais da próstata

já se encontra em níveis ótimos. Nas células tumorais observa-se que os tratamentos com menores concentrações não influenciaram em células de câncer mais agressivo, porém aumentaram a concentração do Zn em células de câncer menos agressivo, e tratamentos com maiores concentrações de cloreto de zinco foram capazes de aumentar o acúmulo de zinco em células de câncer mais agressivo. Estes resultados são importantes, tendo em vista que as células de câncer menos agressivo são dependentes de andrógeno enquanto que as de câncer mais agressivo são independentes, pois os comportamentos estudados podem estar diretamente ligados a dependência androgênica que, por sua vez, está diretamente relacionado com a progressão da tumorigênese. Os resultados desse estudo sugerem que o zinco pode atuar tanto na prevenção quanto no controle de câncer prostático

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

Neste trabalho a técnica de microfluorescência de raios X com radiação Síncrotron (μ SRXRF) foi utilizada para analisar esferoides de células tumorais prostáticas, linhagens LNCaP e DU145 e de células normais, linhagem RPWE-1, suplementadas com diferentes concentrações de cloreto de Zinco.

As medidas foram realizadas na linha de luz XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), sendo capaz de detectar os elementos: P, Ar, S, Cl, Ca, Fe, Cu e Zn.

Para análise de cultura celular tridimensional, a técnica de microfluorescência mostrou-se eficiente. Neste estudo, a concentração de ferro nas células tumorais DU145 aumentou a partir do tratamento de 50 μ M de cloreto de zinco, enquanto que nas células tumorais LNCaP não houve um padrão de comportamento quanto às concentrações deste elemento. O cloreto de zinco não influenciou na concentração de ferro intracelular, para células normais, exceto pelo tratamento de 200 μ M, onde ocorreu uma queda na mediana da concentração. Entre os grupos estudados, pode-se observar que as células de LNCaP acumularam menos ferro do que as células normais, enquanto que as células de DU145 são as que mais acumulam este metal.

Pôde-se notar ainda que, inicialmente, o tratamento com cloreto de zinco auxiliou na redução da concentração de cobre nas células de DU145, mas os últimos tratamentos ajudaram a aumentar a concentração deste metal. Nas células tumorais LNCaP houve um aumento na concentração de cobre no tratamento de 50 μ M e uma redução nos tratamentos de 100 μ M e 150 μ M. Nas células normais, o cloreto de zinco não influenciou na metabolização do cobre, tendo em vista que, a concentração permaneceu menor em todos os tratamentos quando comparada ao controle.

Para células tumorais LNCaP observou-se que o tratamento foi capaz de aumentar progressivamente a concentração de zinco e nas células tumorais DU145 observou-se que ocorreu um aumento na concentração de zinco a partir do tratamento de 100 μ M comparado ao controle.

Tendo em vista o comportamento diferente que foi exibido por cobre, ferro e zinco em linhagens celulares normais e de tumor de próstata, nosso modelo pode representar uma ferramenta importante para entender o desenvolvimento e progressão desta doença através da redução da concentração do cobre, da controversa relação o ferro e o câncer e

o aumento do acúmulo de zinco intracelular, elementos de grande importância em processos metabólicos que sofrem sérias alterações em pacientes enfermos.

O desdobramento deste estudo poderá guiar outros estudos *in vitro* e ensaios clínicos para estabelecer o possível uso terapêutico do zinco sobre o câncer prostático

São sugestões de trabalhos futuros:

1. Realizar testes biológicos a fim de verificar o comportamento do transportador de zinco ZIP1 e das proteínas transportadoras transmembrana de ferro e cobre, ferroportina e hCTR1, respectivamente, com o tratamento com Zn;
2. Realizar testes biológicos que verifiquem proliferação e morte celular após o tratamento com Zn;
3. Realizar análise por microXRF dos esferoides seccionados;
4. Utilizar tratamentos com Zn em intervalos de concentração menores;
5. Suplementar com outros metais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-EBRAHEEM, A. et al., “Transition metal distribution in the brain and spinal cord of a dysmyelinated rodent model.”, *Aip Conference Proceedings*, v. 1764, n .1, pp.1-12, 2016. DOI: 10.1063/1.4961139.

AL-KHALIL, S. et al., “Interactions between benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer in large prostates: a retrospective data review.”, *Int Urol Nephrol*, v. 48, n. 2, pp. 1-7, 2015. DOI: 10.1007/s11255-015-1146-2.

ALMEIDA, D. S., 2019, *Análise Multielementar Usando Técnicas de XRF em Cérebros de Camundongos Suíços Utilizando o Modelo Experimental da Doença de Alzheimer Induzida por Oligômeros B-Amiloide*. Tese D.Sc - COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ALVES, E. A., GUIMARÃES, A. C. R., MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G., AMENDOEIRA, M. R. R., 2010, *Cultivo celular*. In: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

AMARAL, J. B., 2010, *Células MCF-7 com Modelo 3D no Estudo do Câncer de Mama Humano*. Tese D.Sc, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

ANJOS, M. J., 2000, *Análises de Solos Agrícolas por Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia*. Tese D.Sc - COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ANTONIADES, V. et al., “Is copper chelation an effective anti-angiogenic strategy for cancer treatment?”, *Medical Hypotheses*, v. 81, n. 6, pp.1159-1163, 2013. DOI: 10.1016/j.mehy.2013.09.035.

BANAS, A. et al., “Correlation of concentrations of selected trace elements with Gleason grade of prostate tissues.”, *Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry*, v. 15, n. 7, pp.1147-1155, 2010. DOI:10.1007/s00775-010-0675-5.

BANUDEVI, S. et al., “Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells.”, *Clinica Chimica Acta*, v. 411, n. 3, pp.172-178, 2010. DOI: 10.1016/j.cca.2009.10.023.

BATTISTI, V. et al., “Determinação da Atividade das Enzimas que Degradam Nucleotídeos da Adenina em Pacientes com Câncer de Próstata”. *Revista Contexto & Saúde*, v. 10, n. 9, pp.92-95, 2010.

BECKHOFF, B., KANNIGIEBER, B., LANGHOFF N., et al., *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*, Berlin, Springer, 2006.

BERNASCONI, G., HASELBERGER, N., MARKOWICZ, A., “Applications of a capillary based X-ray microfluorescence system.”, *Nuclear Instruments and Methods B*, v. 86, n. 3, pp. 333-338, 1994.

BOUYÉ, S. et al., “Transition zone and anterior stromal prostate cancers: Zone of origin and intraprostatic patterns of spread at histopathology.”, *The Prostate*, v. 69, n. 1, pp.105-113, 2009. DOI: 10.1002/pros.20859.

CARDOSO, S. C. et al., “Synchrotron Radiation X-Ray Microfluorescence Reveals Polarized Distribution of Atomic Elements during Differentiation of Pluripotent Stem Cells.”, *Plos One*, v. 6, n. 12, pp.1-10, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0029244.

CASTRO, A. R. B., “Synchrotron Light and its Applications.”, *Physicae 2*, v. 2, n. 2, pp. 31-41, 2001.

CHAN, J. M.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. L. “What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology”, *Seminars in cancer biology*, v. 8, n. 4, pp. 263-273, 1998.

CHEN, X. et al., “Zinc sensitizes prostate cancer cells to sorafenib and regulates the expression of Livin.” *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, v. 45, n. 5, pp.353-358, 2013. DOI: 10.1093/abbs/gmt017.

CHRISTUDOSS, P. et al., "Zinc status of patients with benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma.", *Indian Journal Of Urology*, v. 27, n. 1, pp.14-18, 2011. DOI: 10.4103/0970-1591.78405.

CHWIEJ, J. et al., "Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy.", *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 60, n. 12, pp.1531-1537, 2005. DOI: 10.1016/j.sab.2005.10.002.

COSTA, A.C.M., 2003, *Análise da Poluição Ambiental Produzida por Metais Pesados em Águas Superficiais da Baía de Sepetiba usando SRTXRF*.2003. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

COSTELLO, L.C., FRANKLIN, R.B., FENG, P., "Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer.", *Mitochondrion*, v. 5, n. 3, pp. 143–53, 2005.

COSTELLO, L. C. et al., "Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model.", *Cancer Biology & Therapy*, v. 12, n. 12, pp.1078-1084, 2011. DOI: 10.4161/cbt.12.12.18367.

CREA, F. et al., "The epigenetic/noncoding origin of tumor dormancy.", *Trends in Molecular Medicine*, v. 21, n. 4, pp.206-211, 2015. DOI: 10.1016/j.molmed.2015.02.005.

CZAPLA-MASZTAFIAK, J. et al., "Investigating the Distribution of Chemical Forms of Sulfur in Prostate Cancer Tissue Using X-ray Absorption Spectroscopy.", *Applied Spectroscopy*, v. 70, n. 2, pp.264-271, 2015. DOI: 10.1177/0003702815620128.

DENOYER, D. et al., "Copper as a target for prostate cancer therapeutics: copper-ionophore pharmacology and altering syst.", *Oncotarget*, v. 7, n.24, pp. 37064-37080, 2016.

EISBERG, R.; RESNICK, R., 1988, *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*. Rio de Janeiro.

EKTESSABI, A., YOSHIDA, A., TAKADA K., “Distribution of iron in a single neuron of patients with Parkinson's disease”, *X-Ray Spectrometry*, v. 28, n. 6, pp. 456-461, 1999.

EPAULE, Céline et al., “X-ray microfluorescence for biodistribution studies of nanomedicines.”, *International Journal Of Pharmaceutics*, v. 531, n. 1, pp.343-349, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.106.

FERLAY, J. et al., “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.”, *International Journal Of Cancer*, v. 136, n. 5, pp.359-386, 2014. DOI: 10.1002/ijc.29210.

FORMAN, D. et al., “Cancer Incidence in five continents.”, *IARC Scientific Publications* v. 10, n . 164, 2014.

FOY, S. P. et al., “Oh the irony: Iron as a cancer cause or cure?”, *Biomaterials*, v. 32, n. 35, pp.9155-9158, 2011.DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.047.

FRANKLIN, R. B., COSTELLO, L. C., “Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers.”, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, v. 463, n. 2, pp.211-217, 2007. DOI: 10.1016/j.abb.2007.02.033.

FRANKLIN, R. B., COSTELLO, L. C., “Evidence that Human Prostate Cancer is a ZIP1-Deficient Malignancy that could be Effectively Treated with a Zinc Ionophore (Clioquinol) Approach.”, *Chemotherapy (los Angel)*, v. 04, n. 3, pp.1-27, 2014. DOI: 10.4172/2167-7700.1000152.

FRANKLIN, R. B. et al., “Human ZIP1 is a major zinc uptake transporter for the accumulation of zinc in prostate cells.”, *J Inorg Biochem*, v. 96, n. 1 pp.435-442, 2015.

FRANKLIN, R. B. et al., “Zinc And Zinc Transporters In Normal Prostate Function And The Pathogenesis Of Prostate Cancer.”, *Front Biosci*, v. 10, n. 1, pp.2230-2239, jun. 2005.

FRIESTINO, J. K. O. et al., “Mortalidade Por Câncer De Próstata No Brasil: Contexto Histórico E Perspectivas. ”, *Revista Baiana de Saúde Pública*, v. 37, n. 3, pp.688-701, 2013.

FUSCALDI, L. L., 2012, *EMPREGO DO PEPTÍDEO ^{99m}Tc-HYNIC-?Ala-Bombesina(7-14) NA IDENTIFICAÇÃO DE TUMOR DE PRÓSTATA DA LINHAGEM LNCaP EM MODELO EXPERIMENTAL*. Tese D.Sc., Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

GASPERINI, F. M. et al., “Bone-nanohydroxyapatite spheres interface evaluation by synchrotron radiation X-ray microfluorescence.”, *X-ray Spectrometry*, v. 41, n. 1, pp.6-11, 2011. DOI: 10.1002/xrs.1376.

GOUGH, M. et al., “The E1 copper binding domain of full-length amyloid precursor protein mitigates copper-induced growth inhibition in brain metastatic prostate cancer DU145 cells.”, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 453, n. 4, pp.741-747, 2014. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.10.004.

GROTTO, H. Z. W., “Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. ”, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 30, n. 5, pp.390-397, 2008. DOI: 10.1590/s1516-84842008000500012.

GUPTE, A., MUMPER, R. J., “Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment.”, *Cancer Treatment Reviews*, v. 35, n. 1, pp.32-46, 2009. DOI: 10.1016/j.ctrv.2008.07.004.

HACHMÖLLER, O. et al., “Elemental bioimaging and speciation analysis for the investigation of Wilson's disease using μ XRF and XANES.”, *Metallomics*, v. 8, n. 7, pp.648-653, 2016. DOI: 10.1039/c6mt00001k.

HAVRILLA, G. J., “Applications of X-ray microfluorescence to material analysis”, *X-Ray Spectrometry*, v.26, pp. 364-373, 1997.

HOWLADER, N. et al., *SEER Cancer Statistics Review*, National Cancer Institute, 2017. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/>. Acesso em: 1 ago. 2017.

INCA. *Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

INCA. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 03 maio 2018.

JANSSENS, K., VITTIGLIO, G., DERAEDT, I., et al., “Use of microscopic XRF for non-destructive analysis in Art and Archaeometry.”, *X-Ray Spectrometry*, v. 29, n. 1, pp.73-91, 2000.

JANSSENS, K.H.A., ADAMS, F.C.V., RINDBY, A., *Microscopic X-ray Fluorescence Analysis*, John Wiley and Sons, Chichester, 2000

JEMAL, A. et al., “Annual Report to the Nation on the Status of Cancer.”, *Journal of the National Cancer Institute*, v. 109, n. 9, pp. 1-22, 2017.

JOHNSON, L. A. et al., “Differential zinc accumulation and expression of human zinc transporter 1 (hZIP1) in prostate glands.”, *Methods*, v. 52, n. 4, pp.316-321, 2010. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.08.004.

KLOCKENKAMPER, R., VON BOHLEN, A., “Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence: a Review.”, *X-ray Spectrometry*. v. 25, n. 4, pp. 156-162, 1996.

KLOCKENKAMPER, R., VON BOHLEN., A., *Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods*, 2 ed., Wiley, New York, 2015.

KONG, L. et al., “The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis.”, *Biomaterials*, v. 32, n. 27, pp.6515-6522, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.032.

LACHANCE, G. R., CLAISSE, F., 1995, *Quantitative X-ray fluorescence analysis: theory and application*. New York: John Willey & Sons.

LANKOSZ, M. et al., “Research in quantitative microscopic X-ray fluorescence analysis.”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 59, n. 10, pp. 1517-1521, 2003.

LEE, G. et al., “Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells.”, *Nature Methods*, v. 4, n. 4, pp.359-365, 2007. DOI: 10.1038/nmeth1015.

LEITÃO, C. C. G., 2009, *Estudo de Doenças Hematológicas Usando a Técnica de Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LEITÃO, R. G. et al., “Study of the differential response to zinc of prostate cell spheroids using the synchrotron radiation X-ray microfluorescence technique.”, *X-ray Spectrometry*, v. 44, n. 4, pp.204-208, 2015. DOI: 10.1002/xrs.2601.

LEITÃO, R. G., 2013, *Distribuição Elementar Química Em Esferoides Celulares De Prostata Usando Microfluorescência De Raios X*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LEITÃO, R.G. et al., “Elemental concentration analysis in prostate tissues using total reflection X-ray fluorescence.”, *Radiation Physics And Chemistry*, v. 95, pp.62-64, 2014. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2012.12.044.

LU, H. et al., “Characterization of calcium and zinc spatial distributions at the fibrocartilage zone of bone–tendon junction by synchrotron radiation-based micro X-ray fluorescence analysis combined with backscattered electron imaging.” *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 111, pp.15-22, 2015. DOI: 10.1016/j.sab.2015.06.001.

LUDWIG, H. et al., “Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients.”, *Wiener Klinische Wochenschrift*, v. 127, n. 23, pp.907-919, 2015. DOI: 10.1007/s00508-015-0842-3.

MARREIRO, D. et al., “Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms.”, *Antioxidants*, v. 6, n.2, pp.1-9, 2017. DOI: 10.3390/antiox6020024.

MARZO, A M. et al., “Inflammation in prostate carcinogenesis.”, *Nature Reviews Cancer*, v. 7, n. 4, pp.256-269, 2007. DOI: 10.1038/nrc2090.

MAZZOLENI, G., DI LORENZO, D., STEIMBERG, N., “Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?” *Genes & Nutrition*, v. 4, pp. 13-22, 2009.

MELO JÚNIOR, A.S., 2007, *Análise quantitativa do material particulado na região de campinas através das técnicas de microfluorescência de raios x e reflexão total usando radiação síncrotron*. Tese de D.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

MERA, M.F. et al., “SR induced micro-XRF for studying the spatial distribution of Pb in plants used for soil phytoremediation.”, *Radiation Physics And Chemistry*, v. 154, p.69-73, 2019. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2018.05.001.

MOROZ, A., 2013, *Efeitos Da Finasterida Sobre Culturas De Células Epiteliais Prostáticas Normais E Tumorais Em Diferentes Sistemas In Vitro*. Tese de D.Sc., Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

NAKANDI, H. et al., “Knowledge, attitudes and practices of Ugandan men regarding prostate cancer.”, *African Journal of Urology*, v. 19, n. 4, pp. 165-170, 2013.

NASCIMENTO FILHO, V. F., 2009, *Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF)*. São Paulo.

NATIVIDAD, S., HOLGUIN, A., GONAZALEZ, G., 2011, “XRF Laboratory Report”,

NISHIKAWA, M., MORI, H., HARA, M., “Analysis of ZIP (Zrt-, Irt-related protein) transporter gene expression in murine neural stem/progenitor cells.”, *Environmental Toxicology And Pharmacology*, v. 53, pp.81-88, 2017. DOI: 10.1016/j.etap.2017.05.008.

OLIVEIRA, E. G., 2013, *Estudo da interação de células tumorais prostáticas humanas DU145 com o microambiente cerebral*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

PAMPALONI, F., STELZER, E. H. K., “Three-dimensional cell cultures in toxicology”, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 26, pp. 129-150, 2009.

PEREIRA, M.O., 2003, *Análise de Metais Pesados em Água e Sedimento de Fundo do Rio Paraíba do Sul por Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PRINS, M., “Trace elements analysis and element mapping by scanning X-Ray fluorescence at Daresbury SRS”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 27, pp 324-328, 1984.

RAK, M. et al., “X-ray microfluorescence (μ XRF) imaging of *Aspergillus nidulans* cell wall mutants reveals biochemical changes due to gene deletions.”, *Anal Bioanal Chem*, v. 406, n. 12, pp.2809-2816, 2014. DOI: 10.1007/s00216-014-7726-7.

RAVI, M. et al., “3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications.”, *Journal Of Cellular Physiology*, v. 230, n. 1, pp.16-26, 2014. DOI: 10.1002/jcp.24683.

ROCHA, K.M.J. et al., “Zinc distribution in human prostate carcinoma cell line using synchrotron X-ray microfluorescence.”, *X-ray Spectrometry*, v. 46, n. 5, pp.403-411, 2017. DOI: 10.1002/xrs.2787.

ROSA, J.E.P., 2019, *Estudo da Distribuição de Ferro, Cobre e Zinco usando Microfluorescência de Raios X em cultura 3D de Células de Neuroblastoma Humano Suplementadas com Cloreto de Zinco*. Tese de D.Sc., Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SALES, E. et al., “Bone quality analysis using X-ray microtomography and microfluorescence.”, *Applied Radiation And Isotopes*, v. 70, n. 7, pp.1272-1276, 2012. DOI: 10.1016/j.apradiso.2011.11.050.

SALES, E. et al., “Chemical induced demineralization study in cortical bone.”, *Journal Of Instrumentation*, v. 13, n. 5, pp.1-6, 2018. DOI: 10.1088/1748-0221/13/05/c05010.

SALEM, S.I., PANOSSIAN, S.L., KRAUSE, R.A., “Experimental K and L relative x-ray emission rates.”, *Atomic Data And Nuclear Data Tables*, v. 14, n. 2, pp.91-109, 1974. DOI: 10.1016/s0092-640x(74)80017-3.

SARTORE, R. C. et al., “Trace elements during primordial plexiform network formation in human cerebral organoids.”, *Peerj*, v. 5, pp.1-28, 2017. DOI: 10.7717/peerj.2927.

SCOFIELD, J H., “Relativistic hartree-slater values for K and L X-ray emission rates.”, *Atomic Data And Nuclear Data Tables*, v. 14, n. 2, p p.121-137,1974. DOI: 10.1016/s0092-640x(74)80019-7.

SILVA, C. T., JASIULIONIS, M. G., “Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. ”, *Ciência e Cultura*, [s.l.], v. 66, n. 1, pp.38-42, 2014. DOI: 10.21800/s0009-67252014000100015.

SIMABUCO, S. M. *Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF). Descrição da Produção Científica, Faculdade de Engenharia Civil, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 2000.*

SHOVAL, H. et al., “Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids.”, *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, pp.1-11, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-10699-y.

SOLÉ, V. A., PAPILLON, E., COTTEM., *et al.*, “A multiplatform code for the analysis of energy dispersive X-ray fluorescence spectra”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 62. n. 1, pp. 63-68, 2007.

SOSA, V. et al., "Oxidative stress and cancer: An overview.", *Ageing Research Reviews*, v. 12, n. 1, pp.376-390, 2013. DOI: 10.1016/j.arr.2012.10.004.

SOUZA, P.S., 2011, *Sítios Preferenciais de Substituição de Cd e Sr em Hidroxiapatita: Previsão Teórica Baseada em Métodos de Ligação Forte, Hückel Estendido*. Dissertação de M.Sc., Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

STEWART, B. W.; WILD, C. P., *World Cancer Report: 2014*. IARC, 2014.

SUROWKA, A. D. et al, "Synchrotron radiation based X-ray fluorescence shows changes in the elemental composition of the human substantia nigra in aged brains.", *Metallomics*, v. 7, n. 11, pp.1522-1531, 2015. DOI: 10.1039/c5mt00154d.

SUTCLIFFE, S.; COLDITZ, G. A. "Prostate cancer: is it time to expand the research focus to early-life exposures?", *Nature Reviews*, v. 13, n. 3, p. 208-518, 2013.

SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., "Sample thickness considerations for quantitative X-ray fluorescence analysis of the soft and skeletal tissues of the human body - theoretical evaluation and experimental validation.", *X-ray Spectrometry*, v. 41, n. 5, pp.328-337, 2012. DOI: 10.1002/xrs.2407.

UO, M., WADA, T., SUGIYAMA, T., "Applications of X-ray fluorescence analysis (XRF) to dental and medical specimens.", *Japanese Dental Science Review*, v. 51, n. 1, pp.2-9, 2015. DOI: 10.1016/j.jdsr.2014.07.001.

VAN GRIEKEN, R., MARKOWICZ A., 2002, *Handbook of X-ray Spectrometry*, 2 Ed. New York, Basel.

VELLA, V. et al., "Recent views of heavy metals as possible risk factors and potential preventive and therapeutic agents in prostate cancer.", *Molecular And Cellular Endocrinology*, v. 457, pp.57-72, 2017. DOI: 10.1016/j.mce.2016.10.020.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. “The role of the prostate in male fertility, health and disease.”, *Nature reviews. Urology*, v. 13, n. 7, pp. 379–86, 2016.

VINCI, M. et al., “Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation.”, *Bmc Biology*, v. 10, n. 1, p.1-20, 2012. DOI: 0.1186/1741-7007-10-29.

VRIES, J.L., VREBOS, B.A.R., 1993, *Handbook of x-ray spectrometry: Methods and techniques*. 1 ed. New York, Marcel Dekker

WEISWALD, L. B. et al., “In situ protein expression in tumour spheres: development of an immunostaining protocol for confocal microscopy.”, *Bmc Cancer*, v. 10, n. 1, pp.1-11, 2010. DOI: 10.1186/1471-2407-10-106.

WRÓBEL, P. M. et al., “Combined micro-XRF and TXRF methodology for quantitative elemental imaging of tissue samples.”, *Talanta*, v. 162, pp.654-659, 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.10.043.

XUE, D. et al., “Decreased expression of ferroportin in prostate cancer.”, *Oncology Letters*, v. 10, n. 2, pp.913-916, 2015. DOI: 10.3892/ol.2015.3363.

YU, P. et al., “Androgen-independent LNCaP cells are a subline of LNCaP cells with a more aggressive phenotype and androgen suppresses their growth by inducing cell cycle arrest at the G1 phase.”, *International Journal Of Molecular Medicine*, v. 40, n. 5, pp.1426-1434, 2017. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3125.

Zinc distribution in human prostate carcinoma cell line using synchrotron X-ray microfluorescence

K.M.J. Rocha,^a R.G. Leitão,^{a,b,*} E.G. Oliveira-Barros,^c M.A. Oliveira,^c C.G.L. Canellas,^b M.J. Anjos,^{a,b} L.E. Nasciutti^c and R.T. Lopes^a

Cancer is a worldwide public health problem, and its incidence in the world grew by 20% in the last decade. Zinc, an essential trace element, is involved in many cellular processes. Concerning prostate cancer, Zn could inhibit the growth of tumor cells, by inducing cell cycle arrest or apoptosis. X-ray microfluorescence (μ XRF) is an elemental analysis technique that allows mapping biologically important elements at a submillimeter scale, with high sensitivity and negligible damage to the sample. In this study, we investigated cell viability through colorimetric cytotoxicity assay (MTT) and the behavior of human prostate cell lines obtained from normal (RWPE-1) and tumorigenic (DU145) epithelium, in three-dimensional spheroid cultures after supplementation with ZnCl₂ for 24 and 48 h using synchrotron μ XRF. The measurements were performed at the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil). The results of μ XRF showed that Zn intensity decreased in the DU145 tumor cells independent of supplementation or treatment time, and in normal cells, the intensity increased with supplementation and treatment time. The MTT assay results showed no significant differences, which indicates that the cell viability did not change. Our results indicate that μ XRF can be used as an important tool to understand the mechanism of the loss of ability to capture zinc by prostate cancer cells. Copyright © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: X Ray; microfluorescence; synchrotron; cancer; zinc

Introduction

Prostate cancer is the sixth most common type of cancer in the world and the most prevalent in men, accounting for about 10% of all types of cancer. Its incidence rate is about six times higher in developed countries compared to developing countries.^{1,2} Zinc is an important element in several physiological and biochemical circumstances.^{3,4} The human prostate gland contains extremely high levels of zinc, which is due to the specialized zinc-accumulating acinar epithelial cells of the peripheral zone. These cells evolve in their unique capability to produce and secrete extremely high levels of citrate, which is achieved by the high cellular zinc level effects on the cell metabolism.^{5,6}

This element is involved in many cellular processes, either as a structural component of regulatory proteins or a catalytic part of enzymes. Zinc intracellular concentration is correlated with cell fate, that is, proliferation, differentiation or apoptosis. In humans, normal prostate epithelial cells accumulate higher levels of zinc (3 to 7 times) than cells of any other soft tissue of the body. Previous studies have shown that the accumulation of high levels of zinc in the prostate is associated with two main functions: citrate production and normal prostate growth. On the other hand, in prostate cancer, normal epithelial cells, which are zinc accumulators, are transformed into malignant cells, which do not accumulate zinc. Thus, the loss of the original capacity of the prostatic tissue to maintain normal intracellular levels of zinc can be an important factor in the development and progression of prostate cancer. So far, the exact mechanism underlying the low levels of zinc observed in prostate cancer has not been determined.^{3,4,7}

X-ray microfluorescence (μ XRF) technique is a method, based on localized excitation of a microscopically small (on the order of μ m) area of the sample that allows the investigation of changes in the elemental composition. This is particularly important in view of the fact that normal and pathological biochemical processes occur at the micro and submicron range.^{8,9} Synchrotron radiation (SR) generates quite strong X-rays (and other electromagnetic waves, such as ultra violet, visible, and infrared light). Its intensity is higher than laboratory X-ray sources by several orders of magnitude.¹⁰ Some of the properties of SR are high photon flux, natural collimation, polarization, and the possibility to select the energy of the primary photons, enabling sensitivities up to the femtomolar range and a high spatial resolution in the micrometer range.¹¹

The objectives of this study were to analyze the behavior of human prostate cell lines isolated from normal (RWPE-1) and tumorigenic (DU145) epithelium, in three-dimensional spheroid cultures after supplementation with zinc chloride in the following concentrations 0, 50, 100, 150, 200, and 250 μ M, for 24 and 48 h through μ XRF technique. As well as to analyze cell viability through colorimetric cytotoxicity assay (MTT), to understand why the tumor cells lose their ability to accumulate zinc.

* Correspondence to: Leildo Roberto, Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Email: leildo@lnf.ufjr.br

^a Nuclear Intermentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, 21911-442, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil



Microbeam X-ray fluorescence mapping of Cu and Fe in human prostatic carcinoma cell lines using synchrotron radiation

K. M. J. Rocha^a, R. G. Leitão^b, E. G. Oliveira-Barros^c, M. A. Oliveira^c,
C. G. L. Canellas^b, M. J. Anjos^b, L. E. Nasciutti^c, R. T. Lopes^a.

^a Nuclear Instrumentation Laboratory/Federal University of Rio de Janeiro/21941-450, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
Brazil

^b Physics Institute/State University of Rio de Janeiro/20550-900, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Institute of Biomedical Sciences/Federal University of Rio de Janeiro/21044-020, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
Brazil

e-mail: kjose@nuclear.ufjf.br

ABSTRACT

Cancer is a worldwide public health problem and prostate cancer continues to be one of the most common fatal cancers in men. Copper plays an important role in the aetiology and growth of tumours however, whether intratumoral copper is actually elevated in prostate cancer patients has not been established. Iron, an important trace element, plays a vital function in oxygen metabolism, oxygen uptake, and electron transport in mitochondria, energy metabolism, muscle function, and hematopoiesis. The X-ray microfluorescence technique (μ XRF) is a rapid and non-destructive method of elemental analysis that provides useful elemental information about samples without causing damage or requiring extra sample preparations. This study investigated the behavior of cells in spheroids of human prostate cells, tumour cell line (DU145) and normal cell line (RWPE-1), after supplementation with zinc chloride by 24 hours using synchrotron X-ray microfluorescence (μ SRXRF). The measurements were performed with a standard geometry of 45° of incidence, excited by a white beam using a pixel of $25 \mu\text{m}$ and a time of 300 ms/pixel at the XRF beamline at the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil). The results by SR μ XRF showed non-uniform Cu and Fe distributions in all the spheroids analyzed.

ISSN: 2319-0612

Accept Submission: 2018-12-12

Elemental distribution by synchrotron X-ray microfluorescence of prostate 3D cell culture.

K.M.J. Rocha¹, R.G. Leitão¹, E.G. Oliveira-Barros², M.A. Oliveira², C.G.L.
Canellas³, M.J. Anjos^{1,3}, L.E. Nasciutti², R.T. Lopes¹

¹Nuclear Instrumentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-942, Rio de
Janeiro, RJ, Brazil.

²Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

E-mail: kjose@nuclear.ufry.br.

Abstract: Prostate cancer is a highly prevalent disease and ranks second among malignant neoplasms that affect men around the world, behind lung cancer alone. Trace elements are very important and are involved in many cellular processes. The X-ray microfluorescence technique (microXRF) is an advanced tool of high spatial resolution, sensitivity, multielemental analysis and non-destructiveness for trace element study. This study aimed to investigate the elemental distribution in spheroids obtained through the following human prostate cell lines using synchrotron X-ray microfluorescence (microSRXRF): tumor cell line androgen independent (DU145), tumor cell line androgen dependent (LNCaP) and normal cell line (RWPE-1). The measurements were performed with a standard geometry of 45 ° of incidence, excited by a white beam using a pixel of 25 µm and an acquisition time of 300 ms/pixel at the XRF beamline at the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil). The microSRXRF results showed differences between groups in all elements analyzed and suggested that further studies should be performed to understand the relationship of these trace elements with the progression and development of the disease.

Keywords: X-Ray; Synchrotron; Cancer; Prostate; Trace Elements