



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Física Armando Dias Tavares

Gabriel da Cruz Ferreira

**Análise multielementar usando microfluorescência de raios X em culturas
3D de células de neuroblastoma humano**

Rio de Janeiro
2019

**Análise multielementar usando microfluorescência de raios X em culturas
3D de células de neuroblastoma humano**

Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa de
Pós-Graduação em Física, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcelino José dos Anjos

Coorientadora: Dr^a. Roberta Gama Leitão

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/ REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/D

F383 Ferreira, Gabriel Cruz.
Análise multielementar usando microfluorescência de raios X em cultura 3D de células de neuroblastoma humano / Gabriel Cruz Ferreira. - 2019.
76 f.: il.

Orientador: Marcelino José dos Anjos.
Coorientadora: Roberta Gama Leitão.
Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Física Armando Dias Tavares.

1. Fluorescência de raio X - Teses. 2. Cultura de células - Teses. 3. Câncer - Tratamento - Teses. 4. Física médica - Teses. I. Anjos, Marcelino José dos. II. Leitão, Roberta Gama. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Física Armando Dias Tavares. IV. Título

CDU 535.372

Bibliotecária: Denise da Silva Gayer CRB7/5069

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Gabriel da Cruz Ferreira

Análise multielementar usando microfluorescência de raios X em culturas 3D de células de neuroblastoma humano

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Física, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 09 de Agosto de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelino José dos Anjos (orientador)
Instituto de Física Armando Dias Tavares - UERJ

Dr^a. Roberta Gama Leitão (coorientadora)
Universidade Nova de Lisboa

Prof^a. Dr^a. Catarine Canellas Gondim Leitão
Instituto de Física Armando Dias Tavares - UERJ

Prof^a. Dr^a. Célia Yelimar Palmero Quintana
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Joaquim Teixeira de Assis.
Instituto de Física Armando Dias Tavares - UERJ

Prof. Dr. Davi Ferreira de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2019

DEDICATÓRIA

*Às gerações posteriores a minha.
Que consigam realizar as mudanças que,
arduamente, ainda tentamos realizar.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao suporte que minha família, Eliana e Bernardo, me deram durante todo esse trajeto até aqui. Inicialmente durante a graduação sanduíche em Coimbra, e agora durante a pós-graduação na UERJ.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos de longa data (ETERNAMENTE), que muito me aturaram a fazer elogios, críticas e reclamações durante essa trajetória. Em especial, minha amiga e companheira Lays, a qual representa, também, parte do meu sucesso.

Ao meu orientador, Marcelino dos Anjos que me acolheu na UERJ bem como me deu quase todo o conhecimento que possuo da técnica envolvida.

À minha coorientadora, Roberta Gama Leitão que me forneceu conhecimento de uma área a qual eu jamais tive instrução: Ciências biológicas. Agradeço à paciência dessa transmissão do conhecimento, bem como toda a ajuda nas análises e protocolos biológicos.

Agradecer também aos colegas do CCS que me ajudaram durante a produção dos esferoides celulares de uma área de conhecimento que, nunca antes havia tido contato. Em especial ao Professor Luiz Eurico que possibilitou a parceria e a técnica de laboratório Maria Aparecida. Bem como a ajuda, mesmo que a distância, da professora Célia.

Aos colegas do LIETA que muito me fizeram crescer academicamente e à banca examinadora pela aceitação do convite e pelo tempo gasto para opinar sobre esta dissertação: Profa. Catarine Canellas, Prof. Davi Ferreira, Profa. Célia Palmero, Prof. Joaquim Teixeira.

De maneira geral, muitas pessoas contribuíram para a execução deste trabalho, realizado em instituição pública e de qualidade, que ainda resiste aos descasos que este país tem feito à ciência, tecnologia e educação. Seguimos na luta pelo direito que nos foi conferido, #uerjresiste.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FAPERJ, CNPq e FINEP pelo financiamento ao longo dessa pesquisa.

À essa força que permeia o universo, que talvez por falta de um nome melhor, chamamos de Deus.

RESUMO

FERREIRA, G. C. *Análise multielementar usando microfluorescência de raios X em culturas 3D de células de neuroblastoma humano*. 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física Armando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O neuroblastoma (NB) é uma neoplasia maligna no sistema nervoso que ocorre exclusivamente na infância e nos primeiros anos de vida. O NB acomete cerca de 8 % a 10 % dos casos de neoplasias em crianças, onde mais de 50 % dos casos apresentam doença metastática generalizada no momento do diagnóstico. Os elementos químicos são extremamente importantes no funcionamento de processos celulares, como reações metabólicas e expressões gênicas. A técnica de microfluorescência de raios X (microXRF) tem sido amplamente empregada em análises de amostras biológicas por ser uma técnica não destrutiva, produzir dano térmico quase desprezível e permitir a análise de diversos elementos simultaneamente. O objetivo deste estudo foram obter as concentrações elementares presentes em esferoides de linhagens celulares de neuroblastoma humano (SH-SY5Y e SK-N-BE (2)). Além disso, determinar os limites de detecção do sistema de microXRF e analisar as distribuições espaciais (mapas bidimensionais) dos elementos presentes nas amostras comparando as linhagens tumorais de NB. Os esferoides celulares foram formados a partir de cultura celular em placa de 96 poços utilizando meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB durante 5 dias de incubação. A análise por microXRF foi realizada através do espectrômetro M4 Tornado (Bruker Nano GmbH), sendo possível a detecção dos seguintes elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn. A partir de uma amostra certificada foi possível calcular o limite de detecção do sistema, estando este entre $0,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ (para cobre e zinco) até $7,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ (para fósforo). Os mapas bidimensionais dos elementos químicos mostraram distribuições não uniformes para todos os elementos e esferoides analisados. Além disso, os resultados obtidos através da quantificação mostraram que os valores obtidos para as concentrações elementares variaram desde valores mínimos de $1,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ até $3,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ para o elemento Zn e valores mínimos de $1064,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ até $2413,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ para o elemento P, respectivamente para as linhagens SK-N-BE (2) e SH-SY5Y. Os resultados apresentaram grande dispersão devido a heterogeneidade dos esferoides celulares. Os resultados mostraram através do teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5 % que as linhagens celulares apresentam diferenças significativas.

Palavras-chave: Microfluorescência de raios X. Neuroblastoma. Cultura celular em 3D. Elementos traços.

ABSTRACT

FERREIRA, G. C. *Multielemental analysis using X-ray microfluorescence in 3D cultures of human neuroblastoma cells*. 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física Armando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Neuroblastoma (NB) is a malignancy neoplasm in the nervous system that almost exclusively occurs during infancy and early childhood. NB is responsible for 8% to 10% of cases of cancer in children. More than 50% of the diagnosed cases have generalized metastatic disease at the time of diagnosis. Trace elements are extremely important in the functioning of cellular processes, including metabolic reactions and gene expressions. The Micro X-ray fluorescence (microXRF) technique has been widely used in biological sample analysis because it is a non-destructive technique, does not produce thermal damage and allows the analysis of several elements simultaneously. The objectives of this study were to obtain the elemental composition and elemental concentration presents in human neuroblastoma (SH-SY5Y and SK-N-BE (2)). In addition, determine the limits detection of the microXRF system and analyze the spatial distributions (bidimensional maps) of the elements presents in samples comparing the NB tumor lines. Cellular spheroids were grown from 96-well plate culture cell using DMEM culture medium supplemented with 10% SFB for 5 days incubation. The microXRF spectra were obtained through the M4 Tornado spectrometer (Bruker Nano GmbH), being possible to detect the following elements: P, S, K, Cl, Ca, Fe, Cu and Zn. From a certified sample it was possible to calculate the limit detection of the system. The limit detection of the system ranged from $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (for copper and zinc) to $7.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (for phosphorus). The bidimensional maps of the chemical elements obtained showed non-uniform distributions for all elements and spheroids analyzed. In addition, the results obtained through quantification showed that the values obtained for the elementary concentrations showed great dispersion due to the heterogeneity of the cellular spheroids. The results showed through the nonparametric Mann-Whitney test with a significance level of 5% that the cell lines present significant differences.

Key words: Micro X-ray fluorescence. Neuroblastoma. 3D culture cells. Trace elements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da XRF	30
Figura 2 -	Diagrama de níveis eletrônicos e principais transições de raios X	33
Figura 3 -	Esquema de área irradiada para análise por microXRF	35
Figura 4 -	Processo para obtenção da imagem	36
Figura 5 -	Placa contendo 96 poços com fundo U	39
Figura 6 -	a) Esferoide SH-SY5Y, 6 dias incubação e 5000 células iniciais	39
	b) Esferoide SK-N-BE (2), 5 dias de incubação e 5000 células iniciais	39
Figura 7 -	Representação esquemática do processo de plaqueamento e formação do esferoide celular	40
Figura 8 -	Interface de comunicação do arranjo experimental	41
Figura 9 -	a) Vista interna do M4 Tornado com suporte de PVC e as amostras	42
	b) Fotografia ampliada com suporte PVC, ultralene e micropipeta	42
Figura 10 -	a) Imagem obtida com aumento de 100X através do M4 Tornado	43
	b) Imagem com as demarcações utilizadas para cálculo de concentração elementar	46
Figura 11 -	a) Espectro de XRF com filtro de Al 12,5 μm e tempo de aquisição de 100s nas condições experimentais citadas	46
	b) Espectro de XRF com filtro de Al 630 μm e tempo de aquisição de 250 s nas condições experimentais citadas	46
Figura 12 -	Fotos dos esferoides SH-SY5Y obtidas através do M4 Tornado, ampliação 100x	47
Figura 13 -	Figura 13: Fotos dos esferoides SK-N-BE (2) obtidas através do M4 Tornado, ampliação 100x	47
Figura 14 -	Uso de filtros de Al com diferentes espessuras	48
Figura 15 -	Distribuição elementar bidimensional para o esferoide da linhagem SH-SY5Y	49
Figura 16 -	Distribuição elementar bidimensional para o esferoide da linhagem SK-N-BE (2)	50
Figura 17 -	Espectro dos elementos químicos presentes na amostra certificada	53
Figura 18 -	Comparação entre valores obtidos por XRF (linha azul) e valores certificados (linha vermelha)	53

Figura 19 -	Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de P, S e K nos esferoides celulares neuroblastoma humano	56
Figura 20 -	Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ca, Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares neuroblastoma humano	56
Figura 21 -	Geometria para a análise quantitativa da fluorescência de raios X	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições experimentais para as análises de microXRF	42
Tabela 2 -	Concentração elementar de cada esferoide da linhagem SH-SY5Y usando microXRF	54
Tabela 3 -	Concentração elementar de cada esferoide da linhagem SK-N-BE (2) usando microXRF	55
Tabela 4 -	Comparação da concentração elementar ($\mu\text{g/g}$) entre as linhagens SH-SY5Y e SK-N-BE (2) usando o teste não paramétrico Mann-Whitney	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS	Centro de Ciências de Saúde
CT51	<i>N</i> -(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl) propan-2-yl)-2-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl) acetamide
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
keV	Quilo-elétron-volts
kV	Quilovolts
LABIC	Laboratório de Interações Celulares
LIETA	Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas
mA	Mili-ampère
MicroXRF	Microfluorescência de raios X
N2A	Neuro-2A
SDD	Silicon Drift Detector
SFB	Soro Fetal Bovino
SR-microXRF	Microfluorescência de raios X por radiação Síncrotron
SRXRF	Fluorescência de raios X por radiação Síncrotron
TXRF	Fluorescência de raios X por reflexão total
XRF	Fluorescência de Raios X

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	ESTADO DA ARTE	15
1.1	Elementos químicos em células neurais	15
1.2	Análises de amostras biológicas por MicroXRF	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1	Breve história do câncer	22
2.2	Neuroblastoma	23
2.3	Elementos químicos em células neurais	24
2.4	Cultura de células em 3D	28
2.5	Fluorescência de Raios X	29
2.5.1	<u>Emissão de raios X característicos</u>	31
2.5.2	<u>Limite Mínimo Detectável (LMD)</u>	34
2.6	A Microfluorescência de Raios X	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Cultura de células e esferoides celulares	38
3.2	Análise por microXRF	40
4	APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS	45
4.1	Análise dos esferoides celulares através da microXRF	45
4.1.1	<u>Análise qualitativa dos mapas bidimensionais</u>	47
4.1.2	<u>Validação do Sistema</u>	52
4.1.3	<u>Análise quantitativa</u>	54
	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A – Análise quantitativa em fluorescência de raios X	71
	ANEXO B – Trabalhos publicados	76

INTRODUÇÃO

A estimativa mundial mostra que ocorreram 14,1 milhões de casos novos (com exceção do câncer de pele não melanoma) de câncer e 8,2 milhões de óbitos em 2012, sendo o câncer um problema de saúde pública mundial (FERLAY et al., 2012). Nos países desenvolvidos, assim como no Brasil, o câncer representa a primeira causa de morte (cerca de 8% do total) por doença entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos (INCA, 2018).

O câncer infanto-juvenil corresponde a uma proliferação descontrolada de células anormais e que pode ocorrer em qualquer local do organismo. O neuroblastoma (NB), é a terceira neoplasia maligna mais comum na infância e adolescência, e acomete cerca de 8% a 10% dos casos de neoplasias em crianças (um caso a cada sete mil nascidos vivos). O NB é uma neoplasia derivada do sistema nervoso simpático e tem comportamento clínico heterogêneo em pacientes com até 10 anos de idade (INCA, 2018) onde mais de 50% dos casos apresentam doença metastática generalizada no momento do diagnóstico (LUO et al., 2018).

Os elementos traços são elementos químicos que desempenham importantes funções nos processos celulares, podendo influenciar na saúde humana. A ideia de que esses elementos estão relacionados a doenças neurológicas e diversos tipos de cânceres não é recente.

Elementos como Fe e Zn desenvolvem funções importantes, participando como cofatores na síntese de DNA e possuem importante papel estrutural em diversas metaloproteínas durante o funcionamento celular. Estudos apontam que alterações nas concentrações de Zn viabilizam a morte celular, bem como o estresse oxidativo (CIPRIANO, 2014). Concentrações de S e K estão correlacionados na síntese proteica durante o desenvolvimento do cérebro (SARTORE, et al., 2017).

A técnica analítica utilizada neste estudo foi a Microfluorescência de Raios X (MicroXRF). Esta técnica possui vasta aplicabilidade nos ramos biológicos, arqueológicos, industrial e ambientais. A MicroXRF permite executar análises qualitativas e quantitativas da composição química de forma não-destrutiva. Além disso, é uma técnica multielementar onde todos os elementos podem ser avaliados simultaneamente (PESSANHA, et al., 2015). As principais vantagens desta técnica são

apresentar dano térmico desprezível, resolução espacial da ordem de micrômetros e, na maioria dos casos, não ser necessário qualquer processo de preparação de amostra.

O estudo a partir da técnica de cultura celular *in vitro* permite o manuseio de células vivas em laboratório, tornando-se uma importante ferramenta nas análises de amostras biológicas. A utilização desta técnica fornece informações acerca da distribuição celular, bem como de mecanismos de resposta celulares como por exemplo, antibióticos, implementando grandes avanços tecnológicos nas áreas de biologia molecular e biomedicina.

A cultura de células em 3-dimensões (3D) derivou-se inicialmente da cultura de células comumente utilizadas (células em monocamada). O arranjo em 3D permite que células explorem as 3 dimensões do espaço, aumentando assim as interações com o ambiente e entre as células. Quando crescidas neste sistema, as células formam estruturas denominadas de esferoides multicelulares (AMARAL, 2010).

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é analisar a distribuição de elementos químicos e as suas concentrações em cultura 3D de linhagens de neuroblastoma humano SH-SY5Y e SK-N-BE (2) usando mapeamento por microXRF.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

1. Obter as composições elementares nos esferoides formados a partir das linhagens celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y e SK-N-BE (2),
2. Obter as distribuições espaciais (mapas bidimensionais) dos elementos detectados nos esferoides celulares das linhagens de neuroblastoma SH-SY5Y, SK-N-BE (2);
3. Determinar os limites de detecção do sistema de microXRF para as amostras analisadas,
4. Obter as concentrações elementares nas linhagens dos esferoides estudados,
5. Comparar as concentrações e distribuições das linhagens tumorais de neuroblastoma.

O desenvolvimento deste trabalho foi dividido em capítulos, com os seguintes tópicos:

- a) Capítulo 1: Estado da Arte;
- b) Capítulo 2: Fundamento teórico e justificativa;
- c) Capítulo 3: Materiais e metodologia utilizados no desenvolvimento do trabalho;
- d) Capítulo 4: Apresentação e análise dos resultados obtidos;
- e) Capítulo 5: Conclusões, sugestões e considerações finais;
- f) Anexo A: Análise quantitativa em fluorescência de raios X;
- g) Anexo B: Trabalhos publicados.

1. ESTADO DA ARTE

1.1. Elementos químicos em células neurais

O estudo da relação entre as concentrações dos elementos traço em células, bem como as influências que as mesmas podem desempenhar durante o desenvolvimento das células neurais é crescente no ramo de pesquisa, visto que os elementos químicos possuem relações com diversas patologias.

White et al. (2004), investigaram as relações substancialmente elevadas entre concentrações extracelulares de metais de transição, como cobre e ferro, em cultura de células neuronais. Aumentos na capacidade redox extracelular podem gerar radicais livres neurotóxicos a partir da redução de Cu (II) ou Fe (III), resultando em morte celular neuronal. A toxicidade envolveu a geração de Cu (I) e H₂O₂, enquanto outros metais vestigiais, como o Fe isoladamente não induziram neurotoxicidades, podendo assim o Fe apenas exacerbar a toxicidade redutora do Cu aumentando a geração de radicais livres. Além disso, o estudo evidenciou que baixos níveis de Fe inibiram a toxicidade da redução de Cu (II).

Gulyani et al. (2009) avaliaram a relação entre alterações funcionais nos níveis de adenosina em resposta a baixos níveis de ferro em células de neuroblastoma SH-SY5Y em monocamada e em modelos de roedores. A adenosina é um metabólito endógeno liberado por uma ampla variedade de células quando o estado metabólico está comprometido, especialmente quando há desregulação entre atividade metabólica e suprimento de oxigênio (STONE et al. 2007). Assim, para Gulyani et al. (2009), níveis baixos de ferro resultam em uma significativa elevação da proteína A_{2A}R a nível celular podendo desempenhar um papel vital na etiologia e patologia de diversos distúrbios neurológicos.

Bishop et al. (2011) apresentaram um estudo comparando a capacidade de diferentes tipos de células em acumular *non-transferrin bound iron* (NTBI), além de examinar as consequências do ferro para a viabilidade celular. O ferro desempenha diversas funções essenciais nas células cerebrais em processos de produção de energia, mielinização e síntese de neurotransmissores. Algumas dessas funções utilizam a capacidade redox do ferro. Entretanto, em níveis elevados, o ferro pode-se tornar citotóxico. Os resultados mostraram que neurônios, astrócitos e micróglia possuem

capacidade de acumular NTBI em diferentes quantidades. Relatou-se que os altos acúmulos de ferro não alteraram a viabilidade celular como também não promoveram morte celular, sugerindo assim que estas células possuam certa resistência à toxicidade induzida pelo ferro.

Em um estudo, Souza (2012), relatara a essencialidade do Zn em diversas funções no sistema nervoso central (SNC). Em algumas regiões do cérebro existe Zn na sua forma iônica livre, especificamente nas vesículas sinápticas de neurônios glutamatérgicos. Durante a atividade sináptica o Zn atua como modulador neuronal dos receptores glutamatérgicos destes neurônios, impactando em diversos processos fisiológicos e patológicos. Souza conclui que as células da linhagem N2A são mais suscetíveis a toxicidade de Zn de H_2O_2 , como também que o pré-tratamento com Zn não apresenta efeito sinérgico quando as células são expostas a H_2O_2 .

Cunha (2012) analisou a influência do silenciamento gênico pós-transcricional do canal de potássio dependente de voltagem hEag1 em células de glioblastoma. O Eag1 possui papel essencial na manutenção celular bem como é um potencializador da proliferação celular na carcinogênese. A superexpressão do hEag1 geralmente não está associado ao evento desencadeador da tumorigênese, mas durante a evolução tumoral do glioma. De maneira geral, este estudo evidenciou que o silenciamento do hEag1 reduziu a viabilidade celular de gliomas.

No estudo realizado por Chowanadisai (2013) foi relatado que o gene *slc39a12*, também conhecido como ZIP12 é essencial no funcionamento de cérebros adultos e de camundongo. A diminuição de ZIP12, que está relacionado com a diferenciação neuronal, leva ao surgimento de neuritos defeituosos em células de neurônio primárias diferenciadas de neuroblastoma, Neuro-2A. Uriu-Adams (2010) já havia reportado que a deficiência de Zn está associada a um risco aumentado de defeitos dos tubos neurais. Assim propuseram que o *slc39a12* é um gene candidato para defeitos no sistema nervoso durante o desenvolvimento pré-natal. Assim, Uriu-Adams (2010) sugere ainda que a prevenção da deficiência de Zn, através da suplementação dietética durante a gravidez, poderia reduzir os riscos de defeitos do tubo neural e má formações congênitas em indivíduos com polimorfismos ZIP12.

Em um estudo *in vitro* Hagemeyer et al. (2015) investigaram os possíveis efeitos do desequilíbrio de metais de transição (essenciais e não essenciais) em sinapses glutamatérgicas em culturas primárias de neurônios do hipocampo de fetos de ratos. O aumento da concentração de Zn geralmente regula a expressão global de ZnT-1,

explicitando que a suplementação do meio com Zn é suficiente para resgatar a maioria dos efeitos causados pela exposição a metais tóxicos. Há indícios de que a adição de Zn poderia restaurar parcialmente a saúde celular e a perda sináptica em células neurais. Foi relatado que mesmo em concentrações elevadas de FeCl₂ (até 400µM) não ocorreram alterações morfológicas e forte resistência a toxicidade induzida. De forma comparativa, quando as células são expostas ao MgCl₂, aumentaram-se o número de dendritos e sinapses, além de algumas alterações morfológicas. Em contrapartida, a exposição ao CuCl₂ levou a morte celular em uma forma dose-dependente, e a uma redução significativa das sinapses, em concordância com a redução da viabilidade celular. Além disso, o estudo analisou a expressão sináptica do ZnT-1, que foi sensível aos perfis de metais traços relatados.

Deloncle et al. (2016) a partir da cultura de células de neuroblastoma SH-SY-5Y apresentaram resultados da relação entre os efeitos de metaloproteínas de Cu contra os efeitos deletérios dos radicais livres. Os resultados sugeriram que o Cu é capaz de fornecer proteção contra a morte neuronal induzida por radicais livre. Nesse estudo, quando ocorreu a substituição do Cu por Mn este potencial efeito protetor desapareceu. Assim, alterações na homeostase do Cu no cérebro pode promover processos oxidativos que podem estar relacionadas com doenças neurodegenerativas.

Poluceno (2016) avaliou o efeito neuroprotetor da guanosina e da ativação dos canais potássio de grande condutância (canais de BK) em cultura primária de astrócitos hipocampais em ratos Wistar submetidos à toxicidade glutamatérgica. Em alguns casos quando há excesso do neurotransmissor glutamato nas fendas sinápticas pode ocorrer o processo de excitotoxicidade glutamatérgica. Foram adicionados o ativador de canal BK *NS1619* (10 µM) e guanosina (100 µM). Os resultados mostraram que não ocorreu toxicidade glutamatérgica nem redução da viabilidade celular. Entretanto, o glutamato induziu aumento na produção de EROs e a ativação dos canais BK foi capaz de reverter este efeito.

Em outro estudo, Beltrán-García et al. (2017) analisaram *in vitro* a correlação entre doenças neurodegenerativas e o acúmulo de ferro, estresse oxidativo e a desregulação dos sinais de cálcio. A nível celular, o acúmulo de ferro aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de neuroblastoma, os quais ativa vias de sinalização sensíveis ao redox. (Salvador et al., 2011). As espécies reativas afetam funções envolvidas na sinalização de cálcio, conseqüentemente com o acúmulo de ferro neuronal aumenta-se a geração de sinais de cálcio, que, se não controlada, pode

ocasionar morte de células neuronais. De maneira geral, em células de neuroblastoma o CT51 exibiu reversibilidade dos limites de ferro, distribuição para mitocôndria e citoplasma e proteção contra danos oxidativos. Assim, concluíram que o CT51 possui potencial para funcionar como controlador de ferro intracelular bem como agente protetor contra danos oxidativos, contribuindo para a melhor compreensão da progressão da morte celular neuronal e neurodegeneração mediada por ferro.

1.2. Análises de amostras biológicas por MicroXRF

A microfluorescência de Raios X é uma técnica analítica multielementar baseada na excitação de uma amostra, geralmente na ordem de micrômetros, através de uma fonte de radiação, permitindo analisar a concentração e a distribuição dos elementos (GRZEGORZ et al., 2014). A energia depositada pelo feixe incidente na amostra não produz dano térmico e não produz alterações químicas estruturais, podendo ser caracterizada como uma técnica não destrutiva e, com isso é amplamente utilizada para análises de amostras biológicas.

O mapeamento através da microXRF permite uma imagem bidimensional da distribuição de diferentes elementos químicos em uma amostra não homogênea com detectabilidade, geralmente, em μgg^{-1} . A utilização de óptica policapilar reduz a dimensão do feixe e, assim, melhora a resolução espacial (HUA-WEI et al., 2013). Deste modo, nos últimos anos a técnica de microXRF tem sido amplamente utilizada por diversos grupos de pesquisa para análise de amostras biológicas.

Exemplo da aplicabilidade biológica da microXRF pode ser encontrado no trabalho de Hua-Wei et al. (2013) que utilizaram a técnica para determinar a mudança da concentração, distribuição e estado químico do zinco na parede intestinal utilizando diferentes fontes de Zn pela técnica de alças intestinais ligadas *in situ* em frangos de corte.

Em Leitão (2013), estudou a distribuição química elementar em tecido de próstata normais e em esferoides derivados de células de próstata humana com câncer de próstata (CaP) e de hiperplasia benigna (HPB) analisando as diferenças na resposta ao tratamento com zinco através da microfluorescência de raios X por radiação Síncrotron. Assim foi visto que as distribuições dos elementos encontrados são heterogêneas. Além disso, no mesmo estudo foi demonstrado que após o tratamento com diferentes concentrações de ZnCl_2 , os esferoides de HPB tiveram aumento na

intensidade de Zn, a qual diferiu significativamente do grupo controle. No esferoide celular de CaP ocorreu aumento na intensidade de Zn com suplementação de 75 μM e redução para tratamentos com 100 μM e 150 μM comparado ao grupo controle apresentando diferença significativa entre os grupos.

Grzegorz et al. (2014) também compararam as distribuições elementares através da fluorescência de raios X por radiação Síncrotron (SRXRF) em três regiões distintas de válvulas aórticas humanas calcificadas e o acúmulo de lipídeos como marcadores da degeneração da válvula aórtica. As válvulas cardíacas calcificadas apresentam desequilíbrios significativos no conteúdo tecidual de elementos essenciais como cálcio, fósforo, ferro, zinco e cobre. Os resultados mostraram mapas bidimensionais e espectros que puderam ser comparados com colorações histológicas em secções da válvula aórtica para provar a localização topográfica, colocalização dos elementos examinados e dos lipídios.

Da mesma forma Paulsen et al. (2014) utilizaram a técnica de SRXRF para comparar os níveis de elementos traço em células progenitoras neurais (NPCs) derivadas de dois clones de linhagens de células-tronco pluripotentes induzidas de um paciente esquizofrênico resistente a clopazina e dois grupos controle. O estudo apresentou resultados convincentes sobre níveis elevados de potássio e zinco em NPCs esquizofrênicos, que após tratamento com medicação adjuvante, mostraram redução aos níveis normais de potássio e zinco.

Nessa mesma temática, a distribuição espacial de cálcio e zinco na zona de fibrocartilagem BTJ (*bone-tendon joint*), foi analisada por Lu et al. (2015) utilizando a microfluorescência de raios X por radiação Síncrotron (SR-microXRF). A zona de transição desempenha importante papel na relaxação e na transferência de carga entre o tendão e o osso. O estudo evidenciou o aumento do teor de cálcio dentro da fibrocartilagem calcificada, bem como uma transição abrupta, ao invés de um gradiente, da quantidade de cálcio em regiões não calcificadas em relação as fibrocartilagens calcificadas. Além disso, foi relatado altos níveis de zinco não calcificadas, em relação as fibrocartilagens calcificadas. De maneira geral, o estudo apresentou pela primeira vez, distribuições espaciais de cálcio e zinco na zona de fibrocartilagem de patela de coelho.

Como uma contribuição para otimizar a aplicabilidade das técnicas, Wróbel et al. (2016) propuseram uma metodologia para determinar as distribuições de fração de

massa em tecidos de ratos, rim, fígado e baço a partir das imagens quantitativas combinadas de TXRF (Fluorescência de Raios X por reflexão total) e microXRF.

Do mesmo modo Epaulé et al. (2017) fizeram suas contribuições para esta área de estudo utilizando cortes histológicos. Mostraram que, mesmo sem marcadores ou sem preparação prévia da amostra, a análise de microXRF baseada em radiação Síncrotron é eficaz para detectar e mapear baixas concentrações de drogas a base de platina em tecidos de ratos, como Zn, Pt, Fe, Cu, Cr, Mn, K, após injeção em doses farmacêuticas relevantes.

Rocha (2016) analisou o comportamento celular em esferoides de células tumorais prostáticas (DU145) e em células prostáticas normais (RWPE-1) com suplementação de cloreto de zinco através da microfluorescência de raios X por radiação Síncrotron. O estudo mostrou que embora tenha ocorrido variações significativas nas concentrações de zinco após o tratamento nos períodos de 24 horas e 48 horas, a viabilidade celular não foi alterada independente do tratamento, e, portanto, que não ocorreu apoptose celular.

Em Al-sandaqchi et al. (2018) analisaram os níveis de elementos em células endoteliais microvasculares (ECs) cerebrais humanas infectadas com *Toxoplasma gondii* (T. gondii) através de um sistema de microscopia de fluorescência de raios X por radiação síncrotron (SR-microXRF). O método permitiu a quantificação das concentrações de Zn e Ca em amostras infectadas e nos grupos controle com resolução espacial sub micrométrica. O estudo concluiu que há correlação entre a infecção de T. gondii e o aumento dos níveis intracelulares de Zn, Fe, Mn e Cu nas ECs, bem como o aumento da expressão de isoformas MT1.

Além dos estudos *in vitro* ou em modelos animais anteriormente mencionados, trabalhos de natureza semelhante foram realizados a partir de material humano, tal como mostra o estudo de Naidu et al. (2019). Esse grupo apresentou um estudo utilizando SRXRF analisando níveis significativamente elevados de Fe, Cu e Pb e níveis significativamente menores de Ti, Cr, Mn, Co, Zn e Br em soro sanguíneo de pacientes com câncer de mama em relação a grupos saudáveis. Níveis elevados de Fe, Cu e Pb podem promover danos celulares por meio da EROs. Além disso, mecanismos patológicos afetados pelas mudanças nas concentrações de oligoelementos podem influenciar no processo carcinogênico. Concluíram através dos resultados que poderia ser adotado uma abordagem terapêutica através de suplementação de drogas apropriadas baseadas em metais. De grande significado ainda o fato de, segundo os autores, esses

resultados poderem ser usados como ferramenta diagnóstica prospectiva através da análise de oligoelementos em soro sanguíneo de pacientes com câncer de mama.

Em Rosa (2019), avaliou a distribuição elementar e a concentração de elementos traços como ferro, cobre e zinco em culturas *in vitro* 3D de esferoides celulares da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y após tratamento com diferentes concentrações de $ZnCl_2$ através da técnica de microXRF. Os resultados mostraram que as concentrações de Fe, Cu e Zn sofreram variações nas concentrações dos elementos após tratamento. Os resultados do ensaio de MTT não apresentaram variações significativas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo será apresentada a fundamentação teórica associada à técnica de cultivo de células e da fluorescência de Raios X, bem como uma breve história do câncer e de elementos químicos em neuroblastoma.

2.1 Breve história do câncer

O câncer é a segunda causa de morte no mundo ficando atrás somente, das doenças cardiovasculares. Cerca de 50 % dos homens e 33 % das mulheres nos Estados Unidos vão desenvolver câncer durante suas vidas (EHRMAN, 2017).

O câncer se inicia quando as células de uma parte do corpo começam a crescer sem controle. Existem muitos tipos de câncer, mas todos começam por causa do crescimento descontrolado de células anormais. Alguns tipos de células cancerígenas podem, por vezes, migrar para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou através dos vasos linfáticos, onde começam se multiplicar. Geralmente, as células cancerosas se desenvolvem a partir de células normais devido ao dano do DNA. Na maioria das vezes, quando o DNA é danificado o corpo é capaz de repará-lo, no caso de células cancerosas o DNA não é reparado (SUDHAKAR, 2009).

Os seres humanos e outros animais sempre tiveram câncer ao longo da história. Portanto, não é surpresa que desde o início as pessoas tenham escrito sobre o câncer. Algumas das primeiras evidências sobre o câncer são encontradas entre tumores ósseos fossilizados, múmias humanas no Egito antigo e em manuscritos antigos. Crescimentos sugestivos de câncer ósseo chamado de osteossarcoma foram observados em múmias (EHRMAN, 2017).

Nossa descrição mais antiga do câncer (embora a palavra câncer não tenha sido usada) foi descoberta no Egito e remonta a cerca de 3000 a.C. É chamado de Papiro Edwin Smith e é uma cópia de parte de um antigo livro egípcio sobre cirurgia do trauma. Ele descreve 8 casos de tumores ou úlceras na mama que foram removidos por cauterização com uma ferramenta chamada de perfuratriz. A escrita diz sobre a doença: "Não há tratamento" (EHRMAN, 2017).

A origem da palavra câncer é creditada ao médico grego Hipócrates (460-370 a.C.), que é considerado o “pai da medicina”. Hipócrates usou os termos carcinoma para

descrever tumores não formadores de úlcera e formadores de úlcera. Em grego, essas palavras se referem a um caranguejo, muito provavelmente aplicado à doença, porque as projeções de um dedo, semelhantes a um câncer, evocavam a forma de um caranguejo. Galeno (130-200 d.C.), outro médico grego, usou a palavra *oncos* (inchaço em grego) para descrever tumores. Embora a analogia do caranguejo de Hipócrates ainda seja usada para descrever tumores malignos, o termo de Galeno é agora usado como parte do nome de especialistas em câncer – oncologistas (SUDHAKAR, 2009).

2.2. Neuroblastoma

O neuroblastoma (NB) é o tumor sólido extracraniano mais comum na infância e adolescência, acomete cerca de 8% a 10% dos casos de neoplasias em crianças (um caso a cada sete mil nascidos vivos) (DYEL et al., 2008; INCA, 2018). Mais de 95 % dos casos são diagnosticados em crianças até os 10 anos de idade, e mais de 50% destas tem doença metastática na ocasião do diagnóstico. O neuroblastoma se origina de células da crista neural que formam a medula da glândula adrenal e os gânglios simpáticos. Os tumores podem ocorrer em qualquer lugar ao longo do tronco simpático, incluindo pescoço, tórax, retroperitônio, pelve ou glândula adrenal. A variedade de localização onde estes tumores podem surgir e o espectro de sua diferenciação resultam em uma grande diversidade de manifestações e comportamentos biológicos (DYEL et al., 2008).

Os tumores neuroblásticos apresentam um espectro histológico de maturação e diferenciação subdivididos em 3 tipos: neuroblastoma, ganglioneuroblastoma e ganglioneuroma. Esses tumores podem apresentar regressão espontânea, diferenciação em tumores benignos ou exibir comportamentos malignos. A idade média de diagnóstico é de 22 meses, sendo que mais de 90% dos casos diagnosticados ocorrem em crianças com até 5 anos de idade (PAPAIOANNOU, MCHUGH, 2005).

O NB pode surgir das glândulas suprarrenais, órgão de Zuckerkandl ou alguma parcela dos gânglios simpáticos ao longo das áreas paraespinhais do pescoço até a pélvis. O local mais comum para o desenvolvimento do NB é o retroperitônio, medula suprarrenal (35% dos casos) e os gânglios para espinhais extra adrenais (30% - 35% dos casos), seguidos pelo mediastino (20% dos casos). Ainda podem ocorrer, com baixa frequência, em locais como pélvis (2% - 3% dos casos) e pescoço (1% - 5% dos casos) (PAPAIOANNOU, MCHUGH, 2005). Os tumores tendem a metastatizar para ossos,

medula óssea, fígado, linfonodos e pele, estatisticamente pelo menos 70% dos pacientes têm doença disseminada no momento do diagnóstico (RHA et al., 2003).

As opções para tratamento da doença são: cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Entretanto, a escolha depende de diversos fatores, como idade do paciente e localização do tumor. De maneira geral, os tumores que apresentam características biológicas favoráveis, a tendência têm sido aplicar um tratamento mais conservador e menos agressivo. Em contraste, a abordagem a tumores com características prognósticas adversas têm sido, nas últimas duas décadas, intensificar a quimioterapia (MARIS, 2010).

2.3 Elementos químicos em células neurais

O cérebro regula o transporte e o metabolismo de íons metálicos para manter sua atividade fisiológica normal. Assim, um desequilíbrio neste processo pode ter efeitos prejudiciais em todo o funcionamento do cérebro. Portanto, as alterações nas concentrações de biometais têm sido relatadas associadas a distúrbios neurodegenerativos e neuropsicológicos. Oligoelementos não são sintetizados pelo organismo e a disponibilidade depende da dieta do indivíduo ou no caso de um embrião, através da alimentação da mãe. Elementos traço são considerados essenciais se desempenharem um papel no funcionamento normal do corpo, como crescimento, desenvolvimento e fisiologia de determinado organismo, os quais podem ser classificados como deficiente, adequado ou excessivo para determinado indivíduo. No entanto, mesmo elementos essenciais podem levar à toxicidade dependendo de sua concentração, em parte por perturbar o equilíbrio de outros íons metálicos. Para além disso, sabe-se que íons metálicos podem ser utilizados no tratamento de distúrbios neurológicos. O lítio (Li), por exemplo tem se mostrado eficaz no tratamento de transtornos bipolares e pode apresentar efeitos na doença de Alzheimer. Além disso, sulfato de zinco e acetato são substâncias chave na doença de Wilson, esta sendo uma doença autossômica recessiva rara, caracterizada por excesso de cobre em órgãos e no cérebro (PFAENDER, GRABRUCKER, 2014).

Nos últimos anos relata-se um número crescente de evidências sugerindo que íons metálicos endógenos, particularmente os que possuem atividade redox, tais como cobre (II) e ferro (III), além de certos íons não redox-ativos, como zinco (II), podem

contribuir na evolução de doenças neurodegenerativas. Estes biometais induzem o aumento do estresse oxidativo no interior do cérebro, devido a sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Tanto o cobre quanto o zinco aumentam a velocidade de agregação do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) em meio aquoso, bastante relatado em doenças de Alzheimer, particularmente presentes no hipocampo e nas amídalas (DE FALCO et al., 2016). Alguns tipos de células apresentam maior resistência as alterações tóxicas nas concentrações de metais traço em cultura de células, como exemplo, as células gliais. Em contrapartida, na literatura é mostrado que células neurais hipocampais de ratos apresentaram morte celular quando submetidas a tratamento com metais traço, especialmente Zn (HAGMEYER et al., 2015).

Quando a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas) é que se desencadeia o processo de estresse oxidativo, comprometendo assim o funcionamento celular estimulando-a a morte por apoptose ou necrose (HALLIWELL, 2001).

No caso particular do Zn, que possui ligação com diversas metaloenzimas em diversas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (VALLEE, 1993; BERG, 1996), este torna-se essencial em funções estruturais, regulando processos bioquímicos, bem como síntese de DNA, apoptose, proliferação e estresse oxidativo (OTEIZA, et al., 2005). Assim, o Zn possivelmente atua como neuromodulador do SNC alterando a função de vários receptores e canais, inclusive de N-metil D-Aspartato (NMDA), receptores de Ácido gama-aminobutírico (GABA), receptores de glicina, receptores de trifosfato de adenosina (ATP), além de canais de sódios (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}). Alguns estudos mostram que a deficiência de zinco pode resultar em estresse oxidativo em macromoléculas e no aumento de produtos de lipoperoxidação. Além disso, também há relatos que sugerem que o zinco exógeno apresenta ação de neuroproteção no cérebro por antagonismo da ativação de NMDA (CIPRIANO, 2014). Em condições específicas como quando ocorre alteração do metabolismo energético celular, há a excessiva ativação dos receptores NMDA podendo alterar a homeostase do cálcio e degeneração neuronal (DE FALCO, et al., 2016).

As propriedades antioxidantes do zinco estão atreladas a diversos mecanismos indiretos associados a proteínas. Estudos mostram que o zinco e o cobre competem

pelos mesmos resíduos de A β , tendo o zinco uma maior relevância na rápida agregação do peptídeo do que o cobre, o qual por sua vez, induz mudanças conformacionais do peptídeo mostrando a participação dos metais na doença de Alzheimer (DA) (DE FALCO, et al., 2016).

Além do zinco, o cobre tem um papel essencial para o funcionamento celular, pois participa dos processos de transferência eletrônica. No entanto, falhas nos processos de transporte e armazenamento podem ser danosos devido a ligações que este íon possui com enzimas e proteínas. De certa forma, algumas anomalias relacionadas ao metabolismo e transporte do Cu podem se tornar um poderoso catalisador de danos mediados pelas EROs, convertendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em radicais hidroxilas (OH), catalisando a oxidação e causando danos ao DNA. Sendo assim, as alterações na homeostase de íons metálicos de transição, podem participar do processo de formação de espécies oxidantes, fortalecendo a hipótese de que a morte celular pode ser associada ao estresse oxidativo (CIPRIANO, 2014).

Evidências mostraram que o uso de Cu²⁺ e Fe³⁺ durante a superprodução de radicais livres são possíveis causais para a morte de células nigrais associadas à Doença de Parkinson (DP). Foram encontrados depósitos de Fe envolvendo seletivamente a neuromelanina em neurônios dopaminérgicos (*substantia-nigra neurons*) com DP. Marcadores de oxidação aumentados e mecanismos de transporte de elétrons mitocondriais prejudicados parecem estar intimamente relacionados a interações entre ferro e neuromelanina resultando em acúmulo de ferro e uma produção contínua de espécies citotóxicas, levando a morte neuronal (JELLINGER, 1999).

Uma grande quantidade de ferro está armazenada no sistema nervoso pela neuromelanina. Majoritariamente, o ferro está alocado dentro das células gliais, ligado à ferritina (Fe³⁺) na sua forma solúvel, protegendo as células do dano oxidativo causado pelo ferro livre (Fe²⁺). Entretanto, o ferro pode migrar progressivamente para o citosol durante a patogênese da DP, aumentando assim a EROs, fazendo com que os neurônios dopaminérgicos nigrais sejam susceptíveis ao stress oxidativo (AZZIZ, 2011).

De forma direta, a homeostase do ferro também está relacionada à Ataxia de Friedrich (FA). Esta doença é caracterizada pela neurodegeneração e cardiomiopatia, causada pela mutação da frataxina. A frataxina é uma proteína mitocondrial envolvida na homeostase do ferro e na função respiratória. Ela por sua vez exporta o ferro heme

não ligado da mitocôndria, essa mutação aparenta estar relacionada a perda da frataxina elevando os níveis de ferro mitocondrial. A mitocôndria é essencial para a geração de ATP, sendo assim, ocorre um decaimento na produção de ATP e os tecidos que dependem de altos níveis de ATP, como o cérebro, são afetados (RADISKY, et al., 1999; BUSH, 2000).

A alteração no metabolismo energético celular, pode ocorrer pela excessiva ativação dos receptores de NMDA podendo alterar a homeostase do cálcio. O processo neurodegenerativo também pode ser influenciado devido a despolarização parcial da membrana plasmática da célula por meio da entrada de íons de Na^+ e Ca^{2+} , removendo o bloqueio exercido pelos íons Mg^{2+} dentro do canal do receptor de NMDA. Este processo contribui para a excitotoxicidade do glutamato-dependente podendo constituir um dos mecanismos patogênicos necessários para manter e amplificar a neurodegeneração (DE FALCO et al., 2016).

De maneira geral, há diversos elementos traço que contribuem durante o funcionamento celular, bem como da manutenção das concentrações a nível celular. O enxofre, como exemplo, integra proteínas através de aminoácidos e ligações de dissulfeto de metionina e cisteína (SARTORE et al., 2017). Os proteoglicanas de condroitina e heparan sulfato são os principais constituintes da matriz extracelular e da superfície celular no cérebro. Sendo assim, os proteoglicanos neuronais atuam como receptores diretos para fatores de crescimento de ligação à heparina que podem induzir migração neuronal (MAEDA, 2015). Além disso, foi demonstrado que o enxofre inibe a proliferação de células prostáticas cancerígenas em modelos de xenoenxerto (DUAN et al., 2015).

Para além do enxofre, há outros elementos que contribuem para o funcionamento celular a nível molecular. O fósforo está correlacionado na proliferação e diferenciação neuronal em células pluripotentes embrionárias, devido a sua componente de contribuição a fatores estruturais. Atuando em biomoléculas, como nucleotídeos e fosfolipídios, o fósforo pode contribuir para mudanças intensas na produção de DNA para uma fase migratória e de diferenciação (SARTORE et al., 2017).

Os elementos traços desempenham papel vital para a compreensão do funcionamento, crescimento e homeostase celular, tendo sido tema de grande interesse nos estudos relacionados a bioquímica celular. Embora essenciais, estes não possuem

vastos relatos na literatura relacionando-os aos processos de carcinogênese em células neurais, justificando a investigação feita por este trabalho em cultura em 3D de células de neuroblastoma humano.

2.4 Cultura de células em 3D

A cultura de linhagem de células cancerosas é amplamente explorada com intuito de mimetizar as condições fisiológicas e patológicas disponibilizando informações sobre a estrutura e o comportamento metastático de tumores *in vivo*. Muitos estudos foram realizados para investigar a essencialidade e toxicidade dos metais traço, usando células em cultura (HAGMEYER et al., 2015).

A linhagem celular é formada à medida que a cultura primária é imortalizada. As linhagens celulares também guardam as características do tecido de origem e possuem alta capacidade de expansão. Assim, linhagens celulares são muito utilizadas em pesquisas, pois podem ser mantidas em culturas por um grande período (quando comparado às células primárias) e ainda retém grande parte de suas características do tecido de origem. Muitas linhagens celulares podem ser propagadas sem perder suas características por muitas passagens (MOLINARO et al., 2010).

Estudos envolvendo a radioterapia forma uma das primeiras linhas de pesquisa bastante exploradas por meio de cultivo celular em 3D. As diferenças entre o ambiente 2D e 3D, foram mostradas principalmente no que se refere à resistência das células, e direcionaram esta abordagem experimental para diversas linhas de pesquisas, como estudos relacionados à radiação ionizante, geração de radicais livres, inibição da respiração celular e toxicidade preferencial em regiões de hipóxia (AMARAL, 2010). A toxicidade e a segurança de novos medicamentos anticancerígenos são avaliadas principalmente em monocamadas de células cancerígenas (2D) *in vitro*, enquanto estes modelos não recapitulam a complexidade, a fisiologia e o microambiente do tumor no corpo (BERTHIER, et al., 2017).

Os métodos tradicionais de cultura celular utilizam uma monocamada bidimensional (2D). Com melhorias contínuas sendo feitas, este método tornou-se uma tecnologia padrão em ciências da vida atualmente. No entanto, devido às falhas inerentes da cultura 2D tradicional, ela não consegue mimetizar corretamente a arquitetura e os microambientes *in vivo*, o que torna as células cultivadas em 2D diferentes das células

que crescem *in vivo* em termos de morfologia, proliferação, contacto célula-célula e em termos de matriz de interconexões celulares. A fim de melhorar as simulações de microambientes celulares *in vivo*, a cultura 3D tornou-se a próxima fronteira da pesquisa em biologia celular (DONGLAI, et al., 2017).

Neste contexto, crescentes evidências têm mostrado que células arranjadas em culturas 3D, principalmente as localizadas no interior destes agregados celulares, são mais resistentes a agentes citotóxicos do que as células em culturas 2D (AMARAL, 2010). Os esferoides, que são agregados tridimensionais de células tumorais provenientes de um ou vários clones celulares, mimetizam a estrutura de micro tumores e algumas de suas propriedades, como gradiente de oxigênio, pH e nutrientes, tornando-se um poderoso modelo de cultura para estudos em radiobiologia e ciências biológicas (DUBESSY et al., 2000). Alguns aspectos relevantes da cultura em 3D:

- a) O arranjo 3D possibilita melhor interação das células com o microambiente;
- b) O arranjo tridimensional possibilita que as células migrem para todas as direções;
- c) O sistema 3D possibilita aumento do contato da superfície celular com o microambiente.

2.5 Fluorescência de Raios X

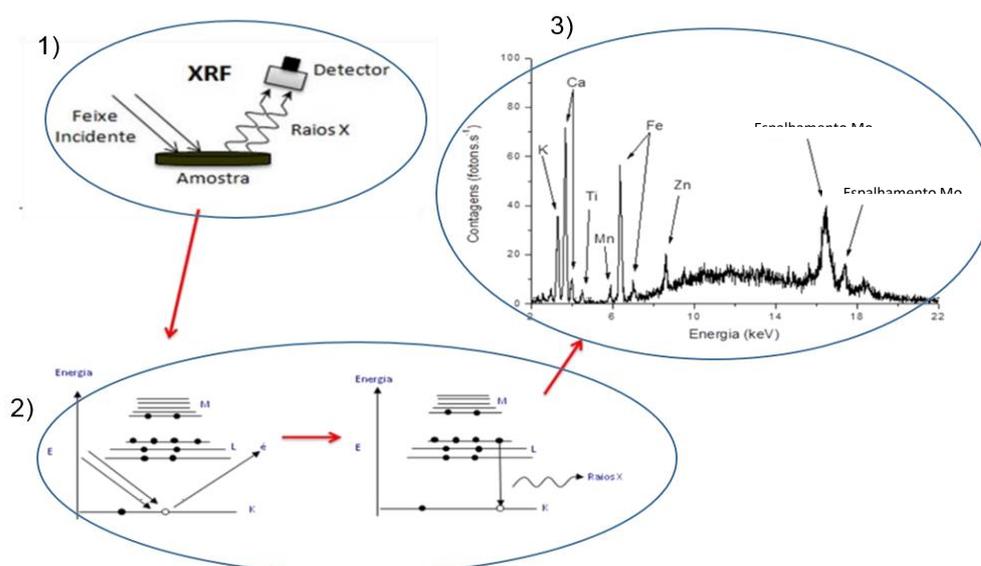
A técnica de fluorescência de raios X (XRF) é amplamente utilizada em diversas áreas da ciência e tecnologia, como arqueometria, ciência dos materiais, química e na área biomédica, em pesquisas que envolvem o uso de material biológico. O uso da XRF apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas analíticas: análise não destrutiva, nenhuma ou simplicidade na preparação de amostras, baixo limite de detecção e não produz danos térmicos. Assim, se apresenta como uma importante técnica para análise de amostras biológicas, pois é um método não destrutivo para análises de elementos com número atômico acima de 13 (ou menores, se a análise for realizada em vácuo), em uma ampla faixa de concentrações (VAN GRIEKEN, MARKOWICS, 1992). Além disso, é uma técnica multielementar de tal forma que todos os elementos podem ser analisados simultaneamente (PESSANHA, et al., 2015).

A técnica baseia-se na excitação de uma amostra a partir de um feixe incidente de raios X, ocasionando uma probabilidade de ejeção dos elétrons dos orbitais mais internos. Quando ocorre uma vacância, elétrons de orbitais mais energéticos realizam uma transição eletrônica para preencher a vacância do elétron ejetado. Com a transição para um menor nível de energia, o elétron emite radiação eletromagnética (fótons) com energia que representa a diferença de energia entre dois níveis (transição entre os dois estados de energia). A radiação eletromagnética emitida na transição entre os dois estados é denominada de raios X característicos ou fluorescência de raios X. Cada elemento químico emite raios X característicos próprios, sendo assim, identificar os raios X característicos emitidos por um elemento químico é o mesmo que determinar a sua identidade. Os raios X característicos podem ser entendidos como as assinaturas dos elementos químicos presentes numa amostra.

A fluorescência de raios X pode ocorrer através da excitação por partículas carregadas ou por radiação eletromagnética. De maneira geral, pode-se considerar que o processo de excitação da amostra pode ser dividido em três etapas (figura 1):

- 1) Incidência de raios X sobre a amostra e excitação dos elementos químicos presentes,
- 2) Produção de raios X característicos emitidos pelos elementos químicos,
- 3) Detecção dos raios X característicos a partir dos espectros de XRF.

Figura 01 – Representação esquemática da XRF



2.5.1 Emissão de raios X característicos

Para o cálculo da energia emitida em forma de radiação eletromagnética devido a diferença de energia entre os dois estados quânticos no processo de produção de XRF, é necessário introduzir o conceito do modelo atômico mais aceito atualmente, o modelo quântico. Neste modelo o elétron não está em uma órbita circular previamente definida, tendo a necessidade de ser representado através de uma função de onda (ψ). A função de onda (ψ) pode fornecer informações como a densidade de probabilidade de encontrar o elétron em uma região do espaço, bem como a probabilidade de transição eletrônica entre níveis. Entretanto, através da teoria atômica de Bohr para o átomo de hidrogênio pode-se calcular, de modo aproximado, o valor esperado da energia de ligação para elétrons dos níveis K e L.

Sendo assim, a o valor aproximado da energia para os níveis K e L de determinado átomo pode ser obtida como:

$$E = \frac{me^4(Z-b)^2}{8\varepsilon_0^2h^2n^2} \quad (1)$$

E = energia de ligação;

m = massa de repouso do elétron;

e = carga elementar do elétron;

Z = número atômico do elemento emissor de raios X;

b = constante de Moseley, com valor iguais a 1 e 7,4 para as camadas K e L, respectivamente;

ε_0 = permissividade elétrica no vácuo;

h = constante de Planck;

n = número quântico principal do nível eletrônico.

A equação 1 pode ainda ser expressa em elétron volts (eV) a partir da substituição das constantes físicas descritas acima:

$$E = 13,65 \frac{(Z-b)^2}{n^2} \quad (2)$$

Como exemplo, temos que, as energias para as linhas K associadas aos átomos de P, K e Fe são 2,14 keV, 3,59 keV e 7,11 keV respectivamente.

Para que ocorra a XRF devido a uma transição eletrônica, é necessário que um elétron seja ejetado do átomo. A energia mínima necessária para este evento é conhecida como função trabalho (W), estando essa relacionada a energia de excitação da radiação incidente na amostra. A explicação do efeito está baseada nas ideias de Planck para a energia dos osciladores na cavidade de corpo negro e no efeito fotoelétrico, posteriormente explicado por Einstein. Logo, a radiação incidente na amostra deve possuir energia maior ou igual que a energia de ligação do átomo para aquele nível E_a . Se a energia da radiação incidente for superior a energia de ligação para o nível K (E_K), então há a probabilidade de o elétron ser ejetado do átomo e produzindo assim, raios X característicos. O mesmo acontece para as outras energias de ligação dos níveis L, podendo produzir espectros de emissão E_{L1} , E_{L2} e E_{L3} . A energia dos fótons emitidos será igual a diferença entre os dois estados quânticos envolvidos. Por exemplo: a transição entre um elétron do subnível L3 para o nível K, resulta na emissão de fótons chamado K-L3. A energia deste fóton é expressa como:

$$E_{K-L3} = E_K - E_{L3} \quad (3)$$

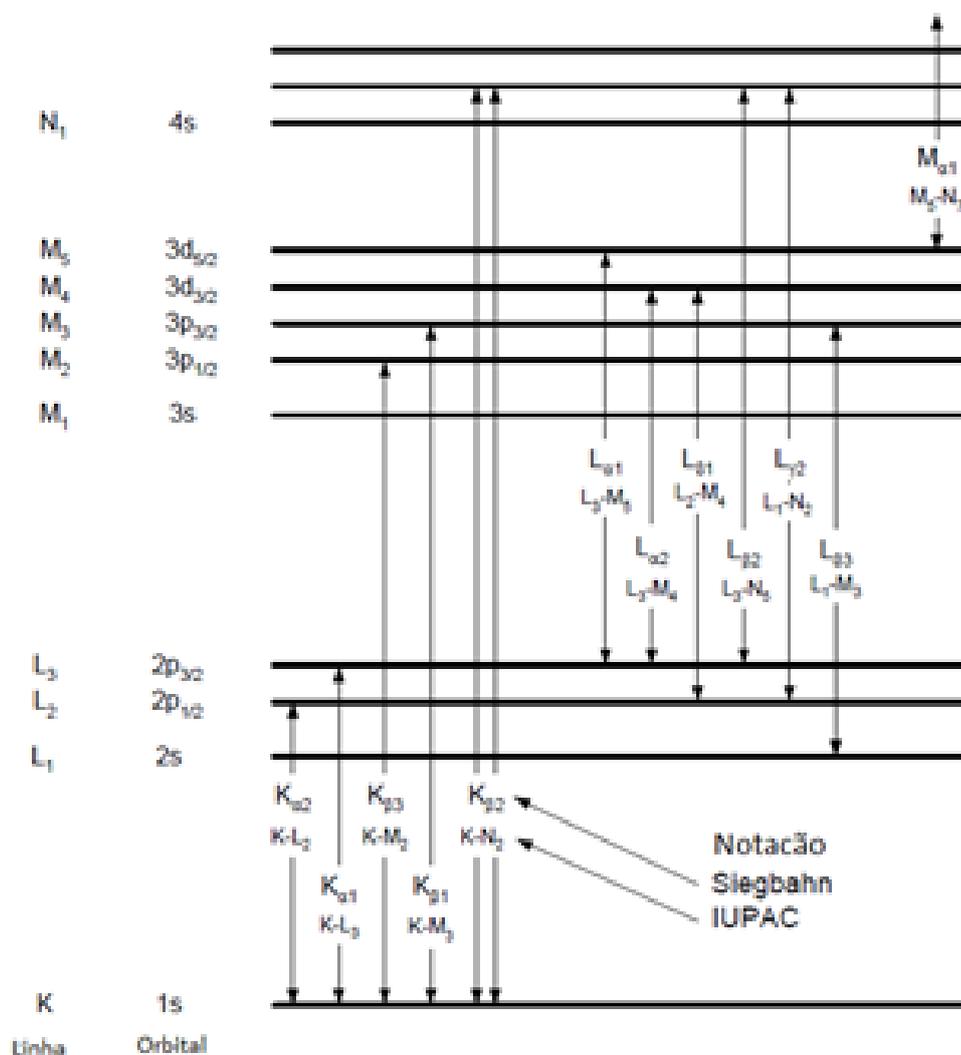
Os raios X emitidos por um elemento são reunidos sob a denominação $K\alpha$ e $K\beta$, devido às transições $L \rightarrow K$ e $M \rightarrow K$, respectivamente, e os raios X devido à transição $M \rightarrow L$ são denominados de $L\alpha$ e $L\beta$, etc.

Suponha que durante o processo de interação da radiação com a matéria um elétron do nível K seja inicialmente removido do átomo, produzindo uma vacância. No processo de desexcitação, um elétron do nível L realizará uma transição eletrônica para um nível de menor energia (K) para suprir a vacância no orbital K, produzindo assim uma vacância em L, que será preenchida por um elétron do nível M, e assim sucessivamente. Quando a vacância atinge o nível de mais baixa energia (banda de valência), ela é preenchida por um elétron livre do material, tornando o átomo eletricamente neutro e no estado fundamental.

As transições entre os níveis eletrônicos podem ser representadas através

de um diagrama de níveis de energia, como mostrado na figura 02.

Figura 02: Diagrama de níveis eletrônicos e principais transições de raios X.



Fonte: VAN GRIEKEN ; MARKOWICZ, 1992, p. 10. Adaptado pelo autor.

Nem todas as transições entre estados quânticos ocorrem, uma vez que existem transições proibidas (EISBERG, 1988). As transições devem seguir as regras de seleção. O nível L, por exemplo, possui 3 subníveis L₁, L₂ e L₃. Apenas as transições K-L₂ e K-L₃ ocorrem. A transição K-L₁ é proibida.

A fração da radiação incidente que leva a emissão de uma determinada linha de raios X característico é determinada por uma probabilidade de excitação

que é produto de três outras probabilidades (LACCHANCE e CLAISSE, 1995):

$$P_{Ei} = P_{nível} \times P_{linha} \times P_{fluorescência} \quad (4)$$

Na equação 4, temos:

- a) P_{Ei} a probabilidade que a radiação incidente retire elétrons de um dado nível quântico;
- b) P_{linha} é a probabilidade que uma determinada linha seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado do nível K pode-se ter as seguintes transições do nível L: K-L₂ e K-L₃;
- c) $P_{fluorescência}$ é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X a partir de uma transição entre dois estados quânticos ao invés de emissão de elétron Auger.

2.5.2 Limite Mínimo Detectável (LMD)

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade (concentração, massa, volume etc.) que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao *background* de uma medida. Os limites de detecção foram calculados como estabelecido por CURRIE (1968) e posteriormente por KUMP (1997).

A equação que representa o LD é dada por:

$$LD = \frac{3\sqrt{NB}}{N_i} W_i \quad (5)$$

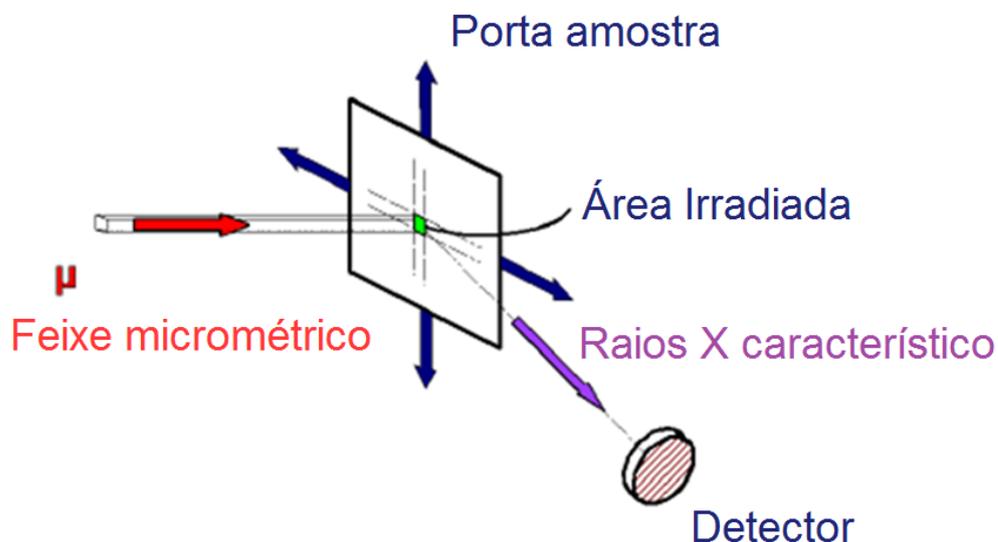
Onde: W_i é a concentração do elemento numa amostra certificada; N_i é a intensidade da radiação fluorescente relativa ao elemento i e NB é a intensidade da radiação relativa do background.

2.6 A Microfluorescência de Raios X

A microfluorescência de raios X (microXRF) é uma variação da XRF convencional, e uma das diferenças está associada às dimensões do feixe incidente que estão da ordem de micrômetros. Um dos diferenciais desta técnica é a sua capacidade de análise espacial, que consiste em dividir a superfície a ser mapeada em pixels (áreas), onde as dimensões desses pixels são determinadas pela dimensão do feixe incidente na ordem de micrômetros. A figura 03 representa um esquema do feixe incidente sobre a amostra e a emissão dos raios X característico, e na figura 09 mostra a fotografia do porta amostra dentro do espectrômetro M4 Tornado.

A análise de distribuição bidimensional pode ser realizada por repetidas medidas em linhas e colunas, geralmente equidistantes, varrendo toda a amostra. Pode-se realizar a coleta de intensidades dos elementos pré-selecionados e exibir suas distribuições de intensidade ou salvar o espectro completo para cada pixel, permitindo um pós-processamento de dados muito mais abrangente (HASCHKE, 2014).

Figura 03: Esquema de área irradiada para análise por microXRF.



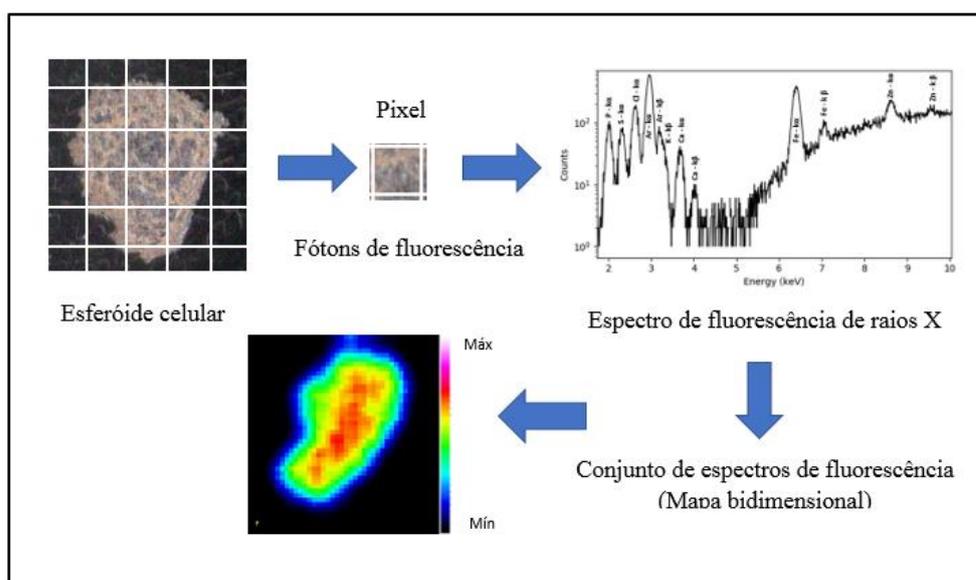
Fonte: LEITÃO, 2013, p. 25.

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

- Informação pontual: Fornece rápida comparação de materiais heterogêneos através da análise de uma área da amostra;
- Perfil: É uma análise sequencial de vários pixels, e consequentemente, vários espectros alinhados verticalmente ou horizontalmente na amostra fornecendo informação sobre a homogeneidade.
- Mapas elementares: É uma varredura da amostra através de uma matriz em 2D. O mapeamento é feito em repetidas linhas equidistantes permitindo a análise da composição elementar de uma superfície inteira. É uma representação visual qualitativa da distribuição dos elementos e corresponde a máxima e mínima intensidade relativa de cada pixel convertido em um mapa de cores em 2D (HASCHKE, 2014).

A figura 04, mostra uma representação esquemática do procedimento de obtenção de uma imagem elementar por microXRF. A amostra é dividida em uma matriz com vários pixels. O número de linhas e colunas definem o tamanho da matriz a ser analisada. Para cada pixel é obtido um espectro de XRF que mostra todos os elementos detectados naquele pixel. Analisando-se todos os pixels da matriz pode-se montar uma imagem para cada elemento presente na amostra analisada. Essa imagem representa a distribuição do elemento em toda a superfície da amostra.

Figura 04: Processo para obtenção da imagem.



Na XRF a relação que permite determinar a concentração W_i de um elemento i presente numa amostra pode ser dada por (anexo A):

$$I_i = S_i \cdot W_i \cdot \frac{[1 - e^{-(\chi_i \cdot \rho_0 \cdot D)}]}{\chi_i} \quad (6)$$

Onde:

- a)** I_i é intensidade da linha $K\alpha$ de um elemento i presente na amostra (obtido experimentalmente a partir da área sob o pico no espectro de XRF);
- b)** S_i é a sensibilidade do espectrômetro de raios X para o elemento i (engloba os parâmetros fundamentais K_i , a geometria do arranjo experimental G e a eficiência de detecção ϵ_i na energia da linha $K\alpha$ do elemento i). A sensibilidade pode ser obtida para alguns elementos a partir de padrões e por interpolação para todos os elementos de interesse;
- c)** χ_i é um termo que depende da geometria e dos coeficientes de atenuação de massa da matriz da amostra para as energias do feixe incidente (E_0) e da energia da linha $K\alpha$ do elemento i (E_i),
- d)** $\rho_0 D$ é a densidade superficial de massa da amostra (g/cm^2).

No caso da microXRF as amostras analisadas podem ser consideradas “finas” (amostras onde os efeitos de absorção da radiação incidente e da fluorescência de raios X podem ser desconsiderados). Assim, a equação (6) pode ser reescrita como:

$$I_i = S_i \cdot W_i (\rho_i D) \quad (7)$$

A equação (7) mostra que em “amostras finas”, onde a absorção da radiação é muito pequena, a intensidade da radiação de XRF para um elemento i presente na amostra analisada depende apenas da Sensibilidade do sistema de XRF (S_i), da concentração elementar (W_i) e da densidade superficial de massa do elemento i ($\rho_i D$).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo foram apresentados os processos de preparação de amostras, análises realizadas por microfluorescência de raios X e a metodologia para tratamento dos dados.

3.1. Cultura de células e esferoides celulares

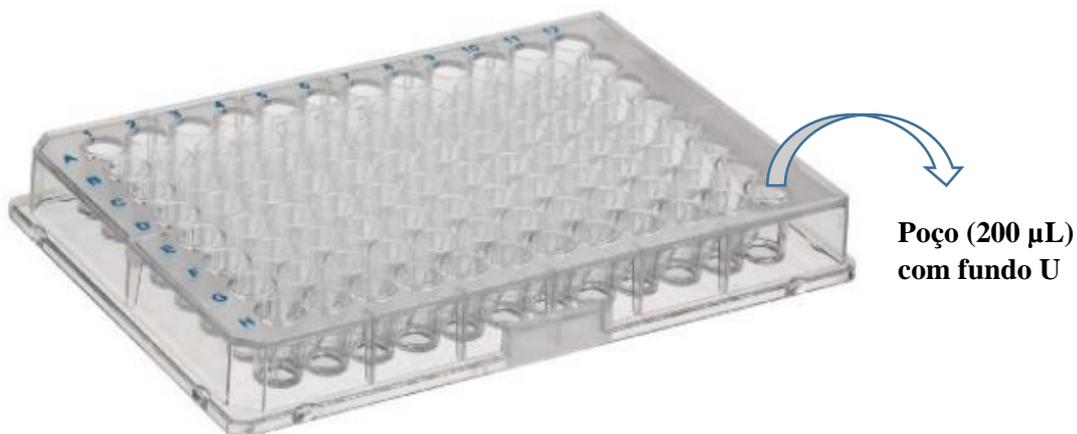
A linhagem celular tumoral SH-SY5Y é originalmente derivada de uma biópsia de tumor ósseo metastático de uma sub-linha clonada pela terceira vez da linhagem parental SK-N-SH estabelecida em junho de 1970 por L. Biedler. A mesma foi extraída da medula óssea de indivíduo fêmea de 4 anos de idade e apresenta morfologia epitelial (ATCC CRL-226). Em contrapartida, a linhagem de celular SK-N-BE (2) apresenta morfologia de células neuroblásticas, e foi extraída paciente de sexo masculino, de 2 anos de idade e estabelecida em novembro de 1972. A linhagem celular de neuroblastoma SK-N-BE (2) é originalmente derivada de metástase de medula óssea após repetidas sessões de quimioterapia e radioterapia (ATCC HTB-1).

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura específico, enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e antibióticos, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma Aldrich*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). A troca do meio de cultura ocorreu a cada 48 horas, onde durante este período a cultura celular permaneceu em estufa, à 37° C em atmosfera controlada de 5% de CO₂.

Todo o procedimento de produção dos esferoides celulares foi realizado no Laboratório de Interações Celulares – LABIC/CCS/UFRJ. O procedimento para obtenção dos esferoides celulares (figura 7) sofreu adaptação de acordo com cada linhagem celular. Para a linhagem celular humana SH-SY5Y, os esferoides foram estabelecidos através do depósito de 5000 células por poço em uma placa de 96 poços com fundo U (figura 5), cada um com 5 mm de diâmetro e volume máximo de 200 µl. Para a linhagem celular SK-N-BE (2), foram depositados 3000 células por poço em uma placa de 96 poços. Cada poço foi revestido previamente com gel agarose 1% com a finalidade de evitar a aderência das células no fundo dos poços. Após o período de incubação (6 dias para as células SH-SY5Y e 5 dias para as células SK-N-BE (2)) à

37°C e 5% CO₂ há a formação de estruturas tridimensionais com diâmetro médio final de 300 a 600 µm de diâmetro.

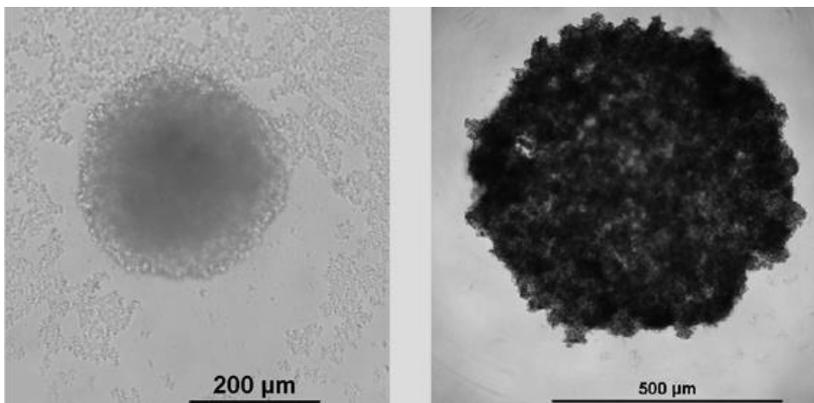
Figura 05 - Placa de cultura de 96 poços com fundo U.



Fonte: Brandtech Scientific, 2019.

Na figura 6 é possível observar as fotografias dos esferoides celulares em suspensão em meio de cultura ao final do período de incubação, obtidas com microscópio confocal (Olympus, modelo IX71S8F-3) através de luz visível nos aumentos de 40x e 100x.

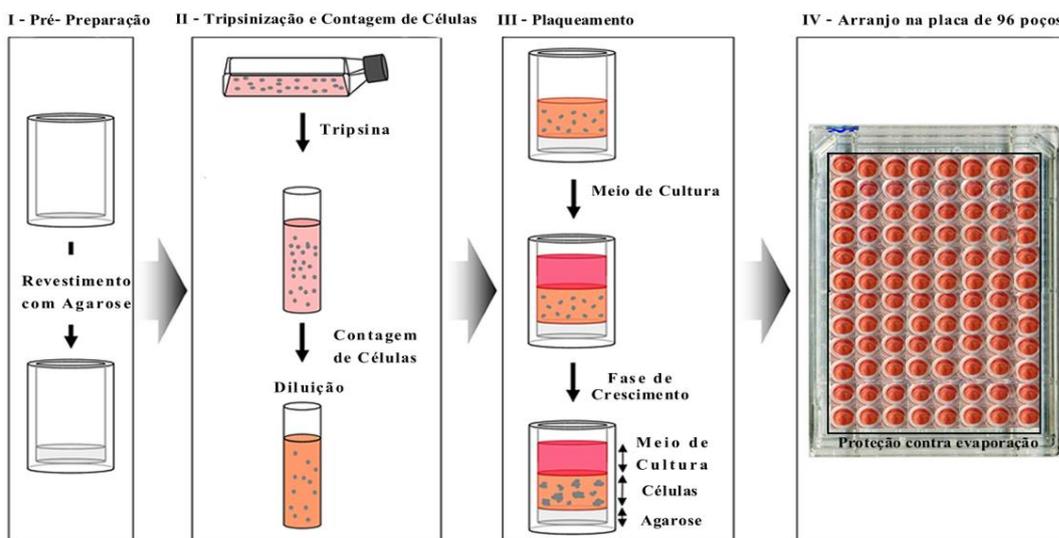
Figura 06 – a) Esferoide SH-SY5Y, b) Esferoide SK-N-BE (2). As células SH-SY5Y e SK-N-BE (2) foram cultivadas em densidade de 5×10^3 células/poço por período de incubação de 6 e 5 dias, respectivamente, na presença de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB.



Fonte: O autor, 2019.

O processo de fixação do esferoide foi realizado através imersão em paraformaldeído (PFA) 4% durante 20 minutos e em seguida lavados 3 vezes durante 5 minutos com solução tampão fosfato (PBS) 0,1 M com pH 7,4. Antes de iniciar a análise por microfluorescência de raios X os esferoides foram lavados 3 vezes com água Mili-Q e em seguida depositados em filme ultralene de 4 μm de espessura em porta amostra e deixados secar a temperatura ambiente.

Figura 07 – Representação esquemática do processo de plaqueamento e formação do esferoide celular.

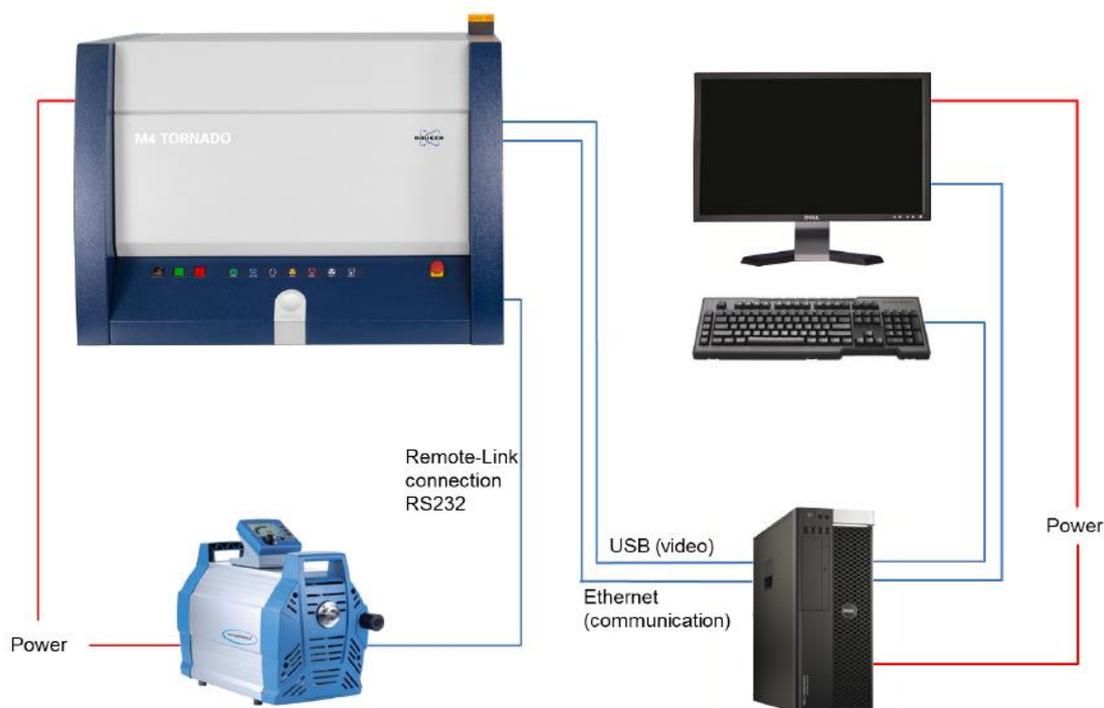


Fonte: EKE, 2015, p. 318. Adaptado pelo autor.

3.2. Análise por microXRF

As análises dos esferoides foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas – LIETA/DFAT/UERJ através da técnica de Microfluorescência de Raios X utilizando o Espectrômetro M4 Tornado (Bruker Nano GmbH). A figura 8 mostra o arranjo experimental interligado por comunicação Ethernet e controlado através de computador. As amostras ficaram posicionadas em suportes com geometria triaxial através de motor de passo (X, Y, Z). O ângulo entre o feixe incidente e o detector foi de aproximadamente 30°.

Figura 08 – Interface de comunicação do arranjo experimental entre espectrômetro, bomba de vácuo e conexão via RS-232.



Fonte: Manual M4 Tornado, 2015.

O tubo de raios X é composto por um ânodo de Ródio (Rh) com potência máxima de 30 W (50 kV e 600 μ A). O feixe incidente de raios X foi focalizado através de policapilares com ponto focal sobre a amostra de aproximadamente 25 μ m.

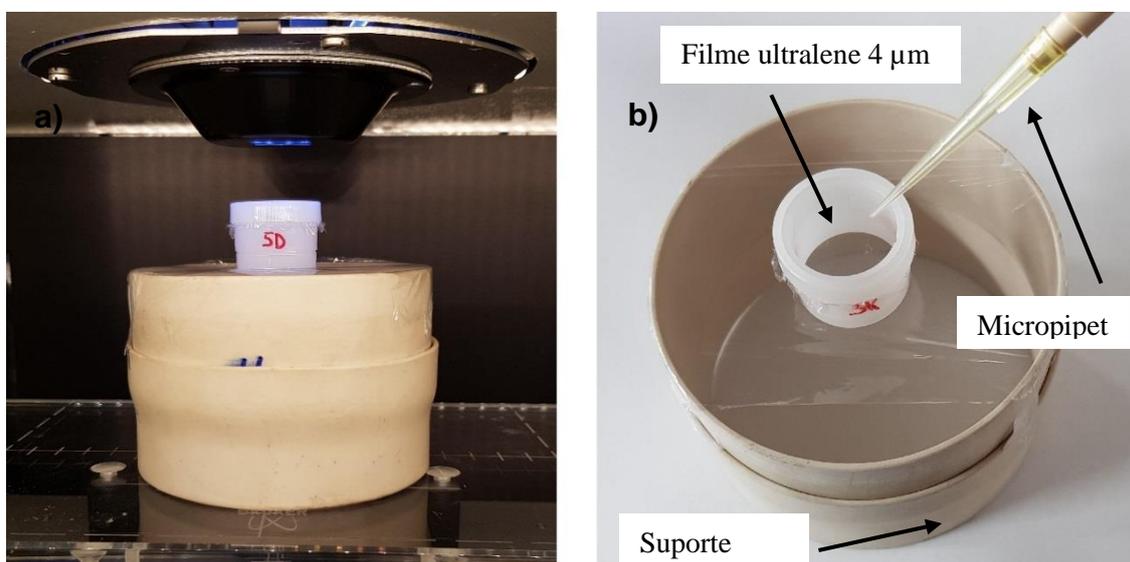
A detecção do Raios X característico ocorreu através de um detector semicondutor de Silício (detector SDD) com área efetiva 30 mm². A resolução em energia < 145 eV com 250.000 cps para a linha K α do Manganês (Mn). O sistema disponibiliza cinco modelos de filtros com diferentes espessuras: Alumínio (12,5 μ m), Alumínio (100 μ m), Alumínio (630 μ m), Alumínio (100 μ m) / Titânio (25 μ m) e Alumínio (100 μ m) / Titânio (50 μ m) / Cobre (25 μ m). A tabela 1 mostra as condições experimentais utilizadas neste estudo.

Tabela 1 – Condições experimentais para as análises de microXRF.

Condições experimentais para análises de microXRF		
	Distribuição espacial	Concentração
Equipamento:	Espectrômetro M4 Tornado	
Feixe:	Branco ($E_{\text{máx}} = 40 \text{ keV}$)	
Tensão:	40 kV	
Corrente:	600 μA	
Geometria:	ângulo entre o feixe incidente e emergente = 30°	
Filtro:	Alumínio 100 μm	Alumínio 12,5 μm ($E \leq 6 \text{ keV}$) Alumínio 630 μm ($E > 6 \text{ keV}$)
Detector de Raios X:	Si com resolução $\leq 145 \text{ eV}$ para Mn $K\alpha$	
Sistema óptico:	policapilar	
Ponto focal	25 μm	
Tempo aquisição	1300 ms/pixel	100 s ($E \leq 6 \text{ keV}$) e 250 s ($E > 6 \text{ keV}$)
Quantidade	-	20 pontos por amostra
Passo	15 μm – 3 ciclos	-
Validação do sistema	-	Amostra certificada (NIST test #822/275197-07)

Fonte: O autor, 2019.

Figura 09 – a) Vista interna do M4 Tornado com suporte de PVC e as amostras. b) Fotografia ampliada com suporte PVC, ultralene e micropipeta.



Fonte: O autor, 2019.

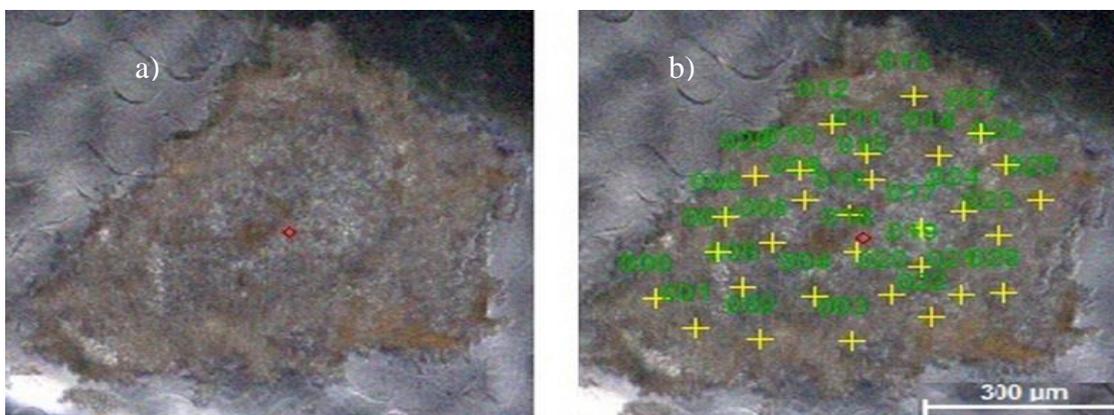
Os espectros de XRF foram avaliados através do *software* PyMCA versão 3.9.4 distribuído pela European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), específico para processamento de dados de fluorescência de Raios X (SOLÉ et al., 2007).

O limite de detecção (LD) foi determinado para os elementos presentes na amostra certificada e depois, por extrapolação (curva do limite de detecção), determinou-se o limite de detecção para os elementos de interesse. Os valores apresentados na tabela 2, são os limites mínimos detectáveis para as linhas $K\alpha$, dos seguintes elementos P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn. O tempo de aquisição para o cálculo do limite de detecção (LD) foi de 40 s/pixel. Foram selecionados 8 pontos distintos ao longo da amostra para obtenção dos espectros, nas seguintes condições experimentais: 40 kV, 600 μ A e filtro de Al de 630 μ m de espessura.

Os mapas bidimensionais foram obtidos utilizando feixe branco com *spot* aproximado de 25 μ m x 25 μ m com filtro de Al (100 μ m), através do *software* do espectrômetro M4 Tornado (ESPIRIT). O tempo de aquisição foi de 1300 ms/pixel repetidos em 3 ciclos com passo de 15 μ m.

Para as análises quantitativas foram selecionados 20 pontos distribuídos ao longo da amostra, foi utilizado o filtro de Al (12,5 μ m) para análise dos elementos com $Z \leq 20$ e o filtro Al (630 μ m) para análise dos elementos com $Z > 20$. A figura 10 mostra uma fotografia com aumento de 100 x obtida através do equipamento M4 Tornado de um dos esferoides analisados. O tempo de aquisição foi de 100 s/ponto para os elementos P, S, K, Ca e 250 s/pixel para os elementos Fe, Cu e Zn. A quantificação dos esferoides baseou-se nos métodos de parâmetros fundamentais, levando em consideração o modelo de tecido mole estabelecido pela ICRU44 (ICRU, 1989).

Figura 10 – a) Imagem obtida com aumento de 100 X através do M4 Tornado. b) Imagem com as demarcações utilizadas para cálculo de concentração elementar.



Fonte: O autor, 2018.

A validação da metodologia utilizada foi verificada através da análise de uma solução multielementar produzida em laboratório e certificada pelo NIST (NIST test #822/275197-07) que possui 23 elementos. A solução foi diluída em água Mili-Q até uma concentração final de $10 \mu\text{g g}^{-1}$: Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl e Zn. As condições experimentais para validação do sistema foram as mesmas utilizadas para as quantificações dos esferoides.

4. ANÁLISE DE RESULTADOS E DISCUSSÃO

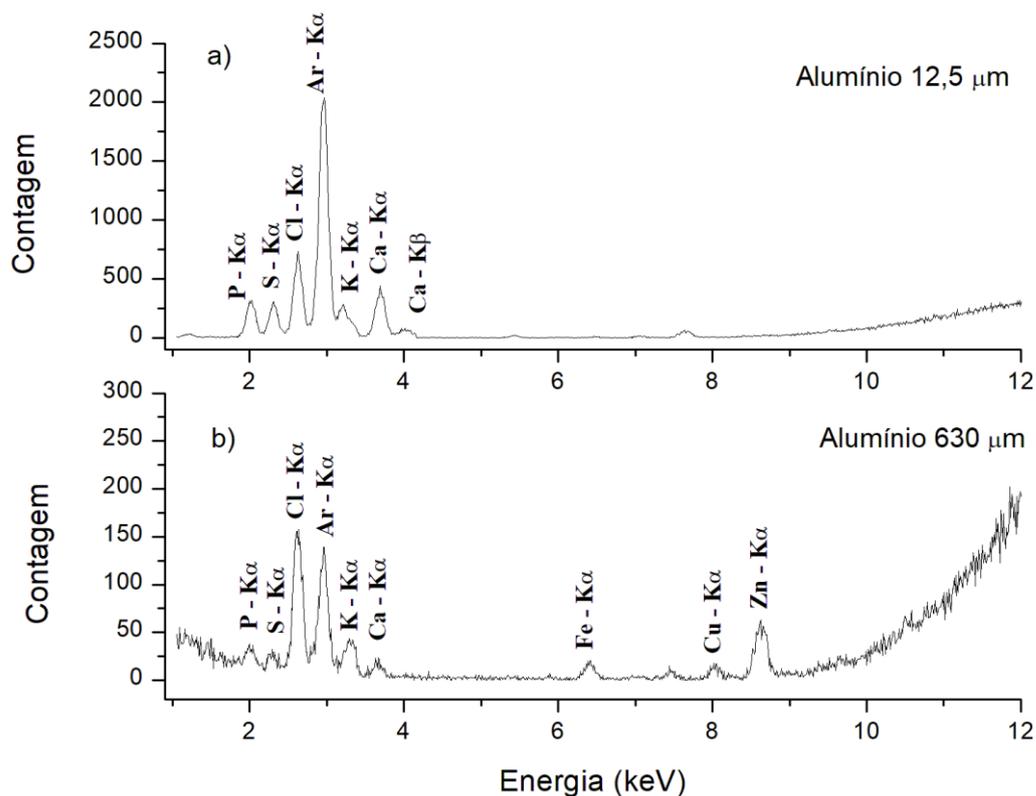
Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos através das análises por XRF: os mapas bidimensionais e os valores das concentrações encontrados.

4.1. Análise dos esferoides celulares através da microXRF

Através da técnica utilizada foi possível detectar os elementos: P, S, Cl, Ar, K, Ca, Fe, Cu e Zn. A figura 11 mostra dois espectros de XRF, em um mesmo ponto da amostra, com a utilização de filtros de Alumínio (12,5 μm e 630 μm) de um esferoide celular de neuroblastoma humano. Pode-se observar que o filtro de alumínio com 12,5 μm de espessura (figura 11a) favorece a excitação de elementos com números atômicos baixos ($Z \leq 20$). O filtro com essa espessura atenua a linha L ($\sim 2,8$ keV) do anodo do tubo de raios X (Ródio) devido a borda de absorção da linha $K\alpha$ do Alumínio ($K_{\text{edge}} = 1,6$ keV), evitando desta forma, a superposição de linhas de XRF na região de 1,7 keV – 4,0 keV. Além disso, permite uma excitação mais eficiente para os elementos de baixo número atômico, porque devido a espessura do filtro, este permite a passagem de uma parcela significativa dos fótons de baixas energias do feixe incidente. Por outro lado, o filtro de 630 μm (figura 11b) favorece os elementos com números atômicos maiores do que 20 ($Z > 20$). Isto ocorre porque no filtro de 630 μm os fótons de baixas energias são atenuados (retirados do feixe incidente) e como consequência ocorre uma menor contribuição do espalhamento nesta região, o que formará uma linha de base mais baixa e com pouca contribuição da radiação de fundo. Portanto, a utilização deste filtro favorece a detecção de elementos com baixas concentrações nesta região (3,0 keV – 10 keV).

Nos espectros de XRF, embora os elementos Cloro e Argônio tenham sido detectados, não foram considerados para análises quantitativas. O elemento Cl não é descrito na literatura como elemento traço de células de neuroblastoma. Além disso, o meio de cultura (DMEM) possui elevada concentração de Cl, aproximadamente 6600 mg/L, de forma que os valores encontrados nos esferoides podem ter sido influenciados pela presença do mesmo no DMEM. O elemento Ar está presente no espectro devido ao fato das medidas não terem sido realizadas em vácuo, a concentração de Ar é cerca de 1,0% em atmosfera padrão.

Figura 11: Espectros em escalas diferentes para análise, apenas qualitativa, dos elementos encontrados na amostra com dois filtros distintos. a) Espectro de XRF com filtro de Al de 12,5 μm de espessura e tempo de aquisição de 100 s nas condições experimentais citadas. b) Espectro de XRF com filtro de Al de 630 μm de espessura e tempo de aquisição de 250 s nas condições experimentais citadas.



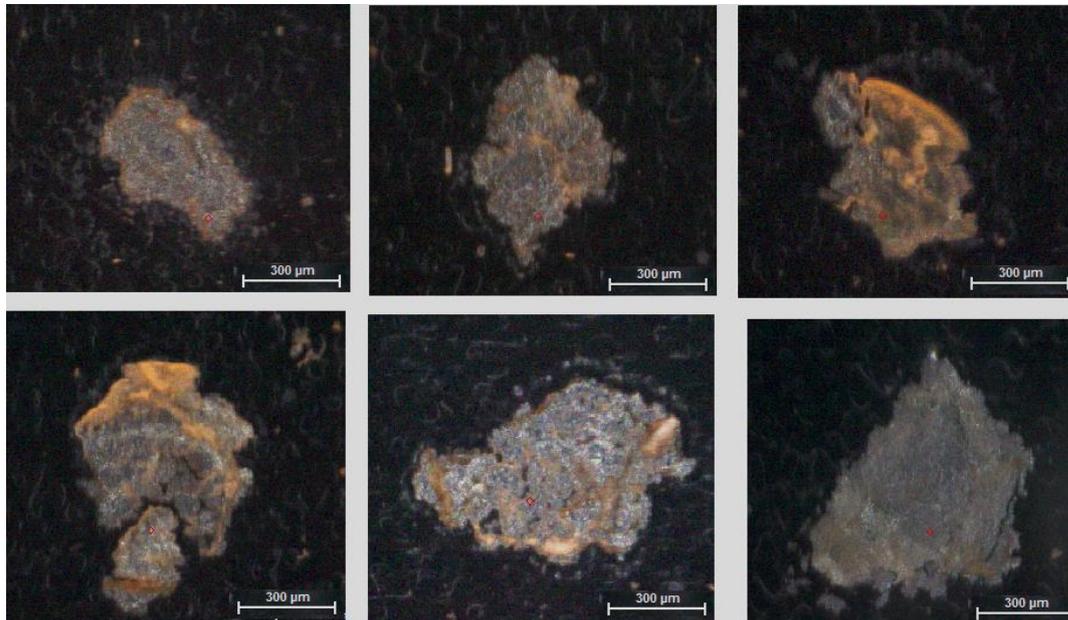
Fonte: O autor, 2019.

4.1.1 Análise qualitativa dos mapas bidimensionais

Foram analisados cinco esferoides da linhagem celular SH-SY5Y e cinco esferoides da linhagem SK-N-BE (2).

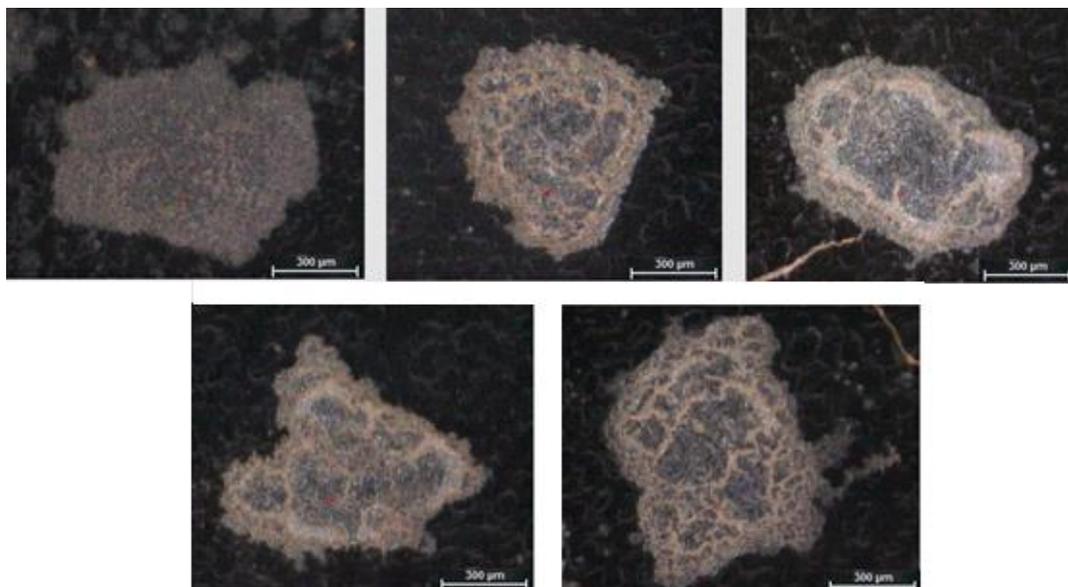
As figuras 12 e 13 mostram as fotografias obtidas pelo programa do espectrômetro M4 Tornado, de cada um dos esferoides (SH-SY5Y e SK-N-BE (2)) utilizados nas análises, respectivamente.

Figura 12: Imagens dos esferoides SH-SY5Y obtidas através do M4 Tornado com ampliação 100x.



Fonte: O autor, 2019.

Figura 13: Imagens dos esferoides SK-N-BE (2) obtidas através do M4 Tornado, com ampliação 100x.



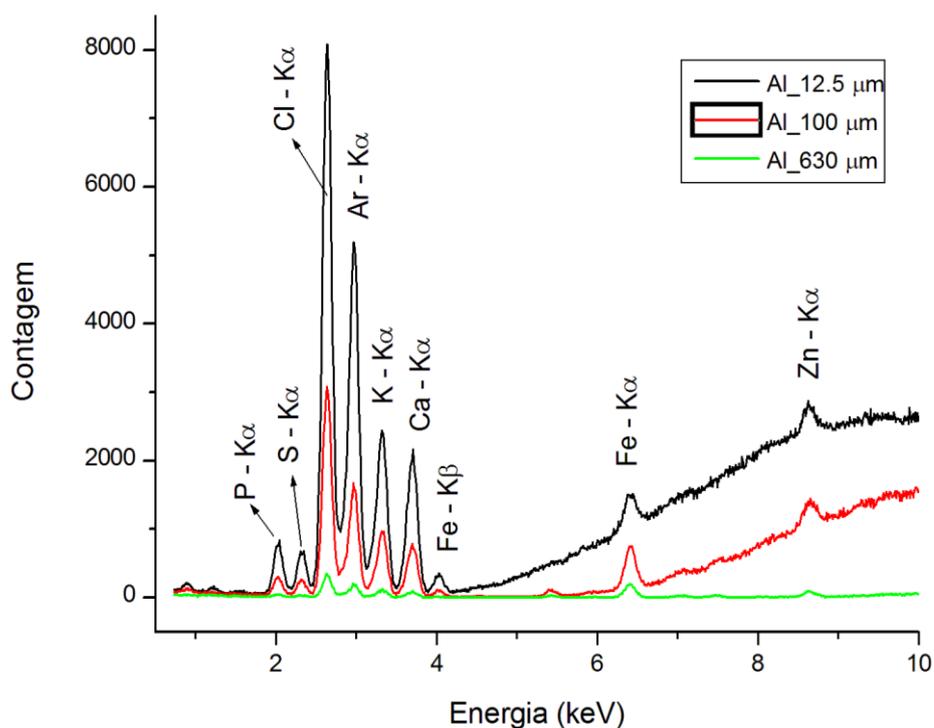
Fonte: O autor, 2019.

A partir da análise do espectro mostrado na figura 11b, observa-se a baixa intensidade relativa dos picos característicos para os elementos Fe, Cu e Zn. A figura 14, mostra que para detecção desses elementos foi necessário o uso de um filtro que não

prejudicasse a fluorescência dos elementos de baixas energias. Além disso, o uso do filtro contribui para a não sobreposição das linhas do ânodo de Ródio do tubo de raios X (energias $L\alpha = 2,69$ keV e $L\beta = 2,83$ keV) com elementos de baixo número atômico, como P, S e K.

As figuras 15 e 16, mostram as imagens resultantes dos mapas bidimensionais da intensidade de cada um dos elementos dos esferoides das linhagens SH-SY5Y e SK-N-BE (2) nas condições descritas no capítulo 3. Todos os cinco esferoides analisados para a linhagem SH-SY5Y, mostraram distribuições semelhantes para um mesmo elemento em cada amostra. Por exemplo, o elemento P se distribuiu igualmente em cada um dos cinco esferoides, bem como o S, K, e assim sucessivamente. O mesmo aconteceu para os esferoides da linhagem SK-N-BE (2). As figuras 15 e 16 representam a distribuição de intensidades de apenas um único esferoide.

Figura 14: Uso de filtros de Al com diferentes espessuras



Fonte: O autor, 2019.

Analisando a figura 15, observamos que tanto o fósforo quanto o zinco estão distribuídos por todo esferoide, apresentando menor intensidade nas zonas periféricas. Em contrapartida, tanto o ferro quanto o potássio não estão distribuídos por todo o esferoide, apresentando regiões de maior intensidade. É notório o acúmulo pontual de potássio no esferoide da linhagem SH-SY5Y em relação ao esferoide da linhagem SK-

N-BE (2). O cálcio apresenta distribuição heterogênea ao longo do esferoide com regiões pontuais de maiores intensidades.

Através da figura 16, pode-se observar de maneira qualitativa a heterogeneidade das distribuições elementares através dos esferoides, o mesmo observado para os esferoides da SH-SY5Y. Tanto o ferro quanto o potássio apresentam regiões de maior intensidade. O zinco e fósforo estão distribuídos pela amostra com maior intensidade no centro e menor intensidade nas regiões periféricas. De maneira geral, todos os elementos demonstraram distribuição heterogênea ao longo da amostra.

Figura 15: Distribuição elemental bidimensional normalizado de intensidade para os elementos P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn de um esferoide da linhagem celular SH-SY5Y. A escala representa os valores máximos e mínimos para cada elemento.

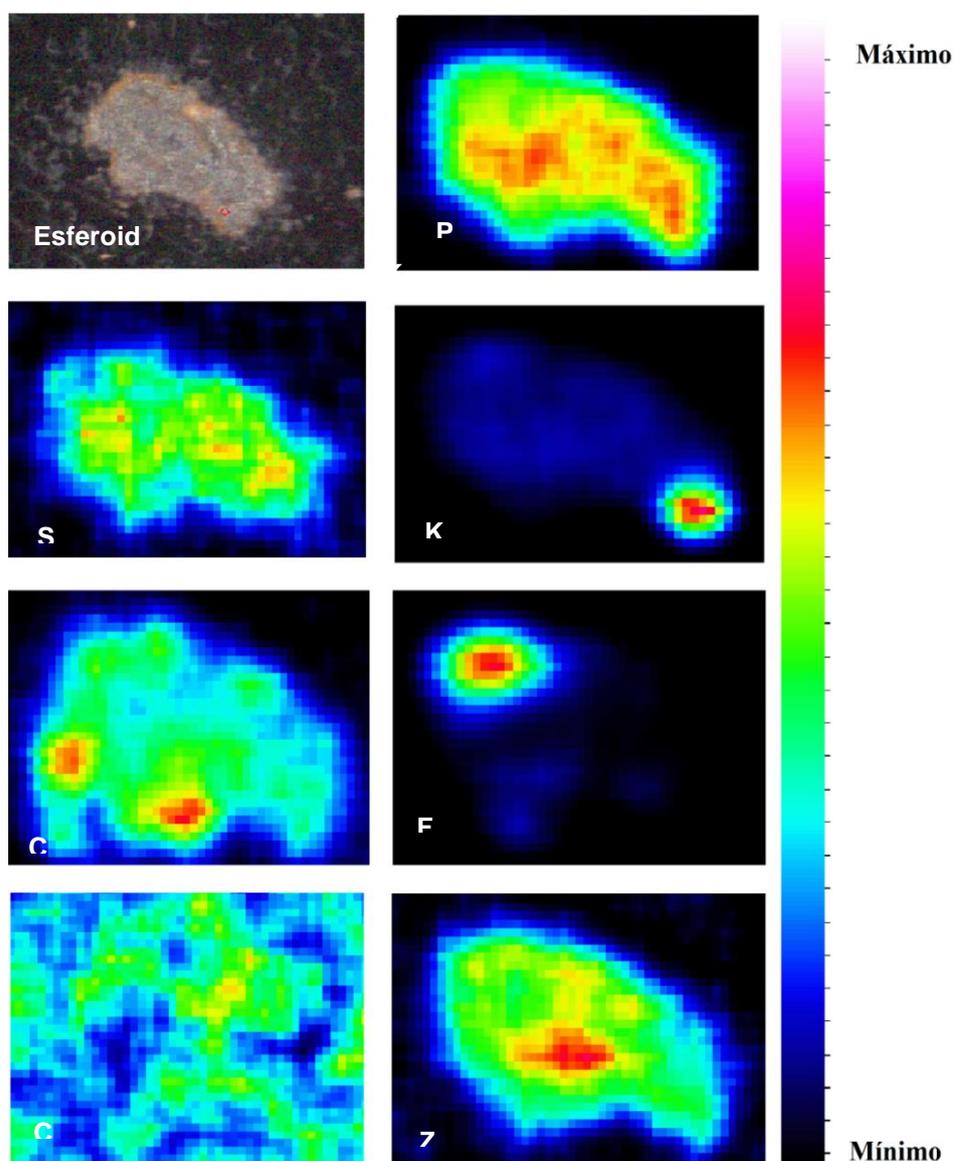
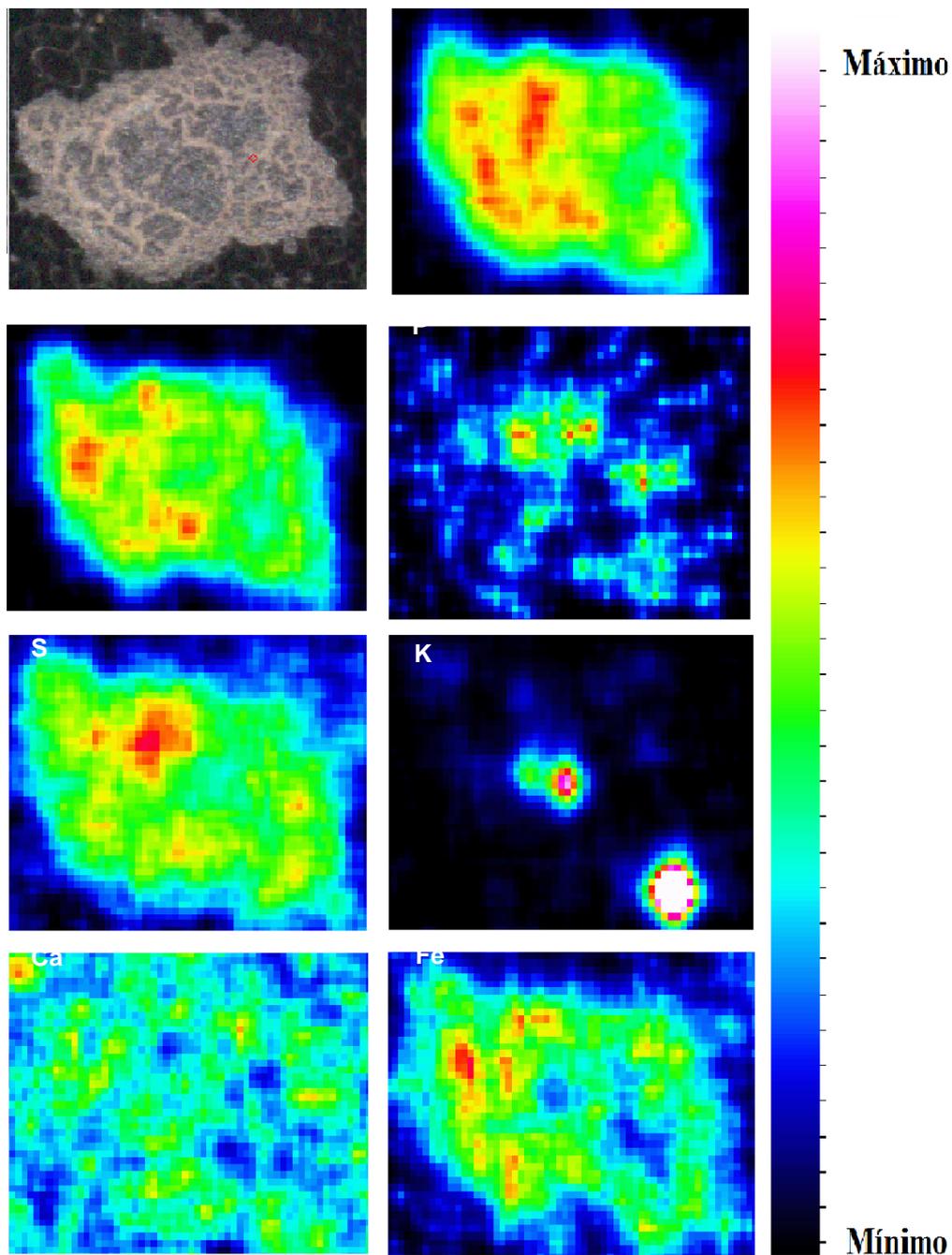


Figura 16: Distribuição elemental bidimensional normalizado da intensidade para os elementos P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn de um esferoide da linhagem celular SK-N-BE (2). A escala representa os valores máximos e mínimos para cada elemento.



Fonte: O autor, 2019.

Os mapas bidimensionais do cobre não puderam ser avaliados, provavelmente devido à baixa concentração deste elemento nas amostras analisadas (as concentrações estão próximas do limite de detecção do sistema de XRF)

O fósforo é um elemento de fundamental importância devido a sua função em biomoléculas estruturais e a sua relação com as nucleoproteínas, fosfolipídios e a molécula de trifosfato de adenosina (ATP) no funcionamento celular (SARTORE et al., 2017). Durante o funcionamento celular, o zinco desempenha importante função na síntese proteica e no papel estrutural do dobramento adequado das proteínas e, portanto, assume-se que poderia desempenhar funções controladoras como neuromodulador nas sinapses glutamatérgicas (TAPIERO, TEW, 2003). As análises dos mapas bidimensionais para esses elementos revelaram semelhança quanto à distribuição elementar, sugerindo que estes elementos possam ter correlação.

A distribuição do enxofre ao longo de todo esferoide, para ambas linhagens celulares, reforça a hipótese do enxofre estar correlacionado com proteínas, como aminoácidos metionina e cisteína e em pontes de dissulfeto (SARTORE et al., 2017). Os proteoglicanos neuronais, que são os principais constituintes da matriz extracelular do SNC, funcionam como receptores diretos para fatores de crescimento de ligação à heparina que induzem migração neuronal (MAEDA, 2015).

O potássio torna-se essencial para o funcionamento celular, pois este regula o equilíbrio iônico, o transporte transmembrana e a síntese de proteínas (SARTORE et al., 2017). Assim, presume-se que a função dos canais de potássio seja um requisito chave para a proliferação adequada de células progenitoras e essenciais para a diferenciação neuronal funcional (Yasuda et al., 2008).

A expressão de fatores de transcrição que regulam a sobrevivência e diferenciação neuronal durante a neurogênese pode ser controlada através do cálcio (LECLERC et al., 2012). O cálcio também executa funções como cofator enzimático e na liberação de vesículas sinápticas que podem estar relacionadas as concentrações de zinco. Em solução fisiológica contendo vários milimolares de Ca^{2+} , o Zn^{2+} pode produzir um forte bloqueio da corrente pré-sináptica de Ca^{2+} , inibindo assim a liberação de neurotransmissores (WINEGAR, LANSMAN, 1990).

Na literatura, o ferro é conhecido por ter uma função essencial durante o desenvolvimento do câncer, influenciando o metabolismo energético, metaloproteínas e atividades enzimáticas. Pacientes com NB em estágio avançado mostram níveis anormalmente elevados de ferritina sérica, que é uma proteína de armazenamento de

ferro e muito provavelmente secretada por tumores de neuroblastoma (HANN et al., 1985). Foi relatado, através de microscopia eletrônica, que não há acúmulo de ferro na ferritina de células em culturas de neuroblastoma (GOUGET et al., 2000). Níveis de ferro podem estar presente durante a cultura de células, mas pode ter sido secretada durante os processos *in vitro*, justificando assim os baixos e pontuais níveis de ferro nas amostras analisadas neste estudo.

O zinco é conhecido por ser intermediador de aproximadamente 300 enzimas. Níveis baixos de zinco cerebral podem inibir o crescimento e a divisão celular, enquanto altos níveis de zinco são tóxicos. Assim, as funções que o zinco exerce durante a síntese de proteínas e síntese do DNA podem ser prejudicados devido a sua concentração (FREDERICKSON, 1989). Para além disso, o zinco contribui para a neurogênese no desenvolvimento do cérebro juntamente com o potássio, de forma que a toxicidade devido a concentrações alteradas pode influenciar a atuação de outros elementos.

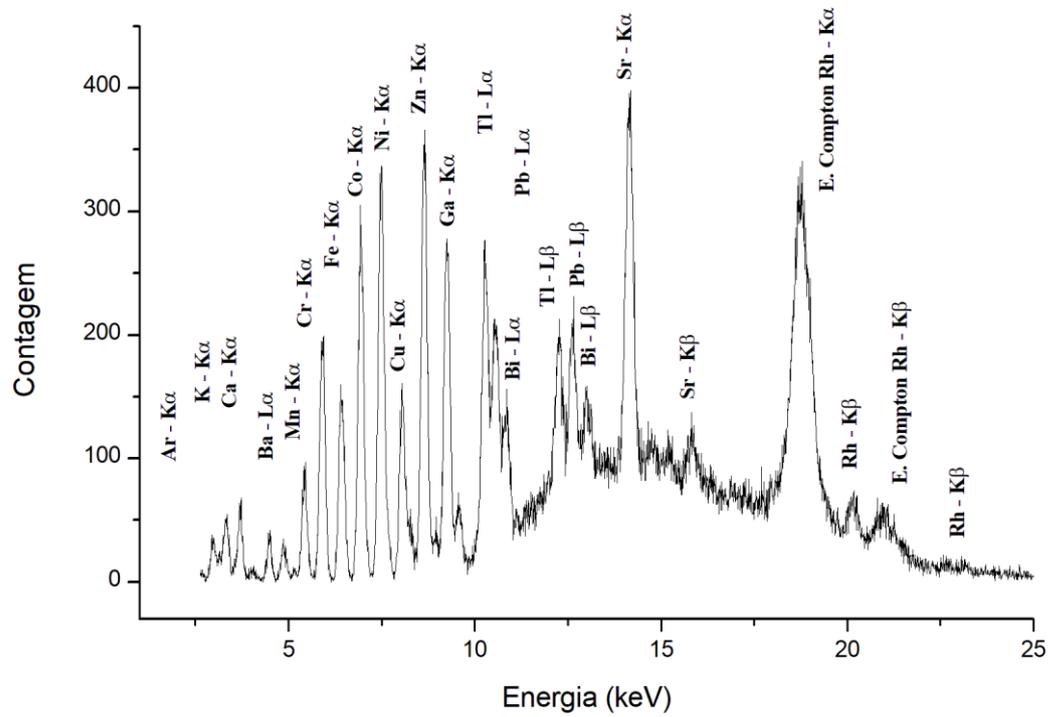
4.1.2 Validação do sistema

Para a validação do sistema utilizou-se uma amostra multielementar certificada, possibilitando assim a detecção e comparação com valores de referência padrão dos seguintes elementos: K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Ba, Tl, Pb e Bi. A figura 17 mostra o espectro de XRF obtido na análise da amostra certificada. A incerteza relativa variou de 1,0 % para o Ca até 20 % para Bi e Tl.

O coeficiente de variação mostrou que a dispersão obtida em relação ao valor médio foi de aproximadamente 9,0 % para Ca, Cr, Fe e Zn até 22 % para Ba. O coeficiente de variação elevado para o bário provavelmente está associado a linha de XRF que foi usada para quantificação (Ba-L α). Pode-se observar na figura 17 que as linhas L do bário apresentam baixa estatística (área sob o pico da linha Ba-L α pequena).

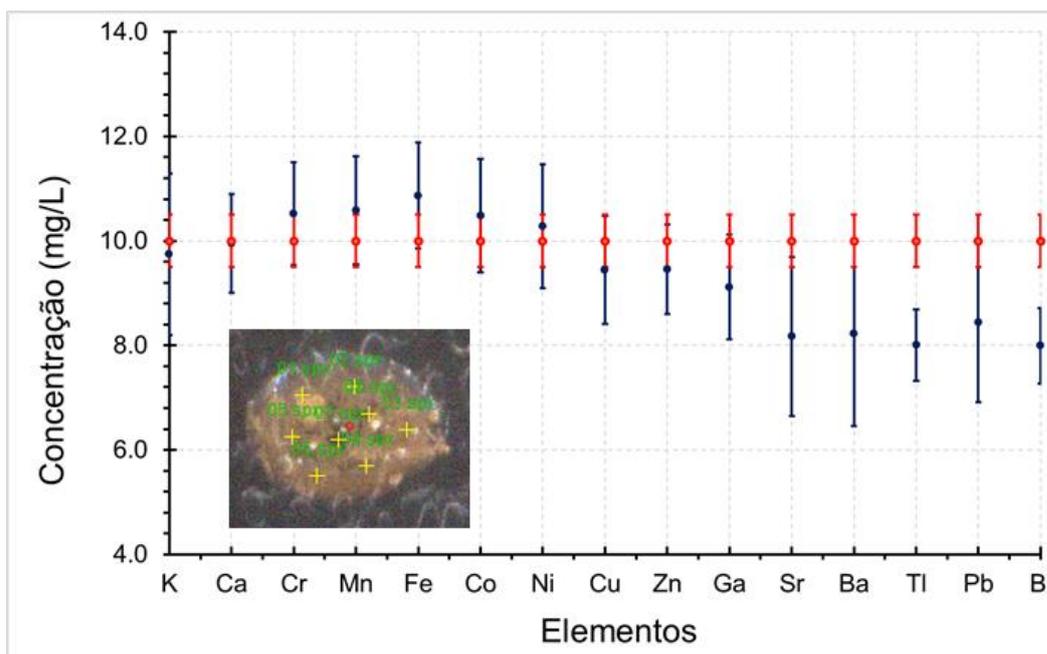
A figura 18 mostra a comparação entre os valores obtidos por XRF e os valores certificados. Os resultados mostram boa acurácia para os elementos analisados neste trabalho.

Figura 17: Espectro dos elementos químicos presentes na amostra certificada



Fonte: O autor, 2019.

Figura 18: Comparação entre valores obtidos por XRF (linha azul) e valores certificados (linha vermelha).



Fonte: O autor, 2019.

As medidas de XRF podem sofrer alterações devido a efeitos de absorção na amostra. Para a correção de efeitos de absorção utilizou-se um modelo de tecido mole estabelecido pela Comissão Internacional de Unidades e Medidas de Radiação (ICRU 44). O modelo assume que matrizes de tecido biológico são constituídos por 4 elementos: H (10,1%), C (11,1%), N (2,6%) e O (76,2%) com densidade de 1,0 g/cm³. Sendo assim, o modelo utilizado visa corrigir estes efeitos de absorção, fornecendo maior precisão as medidas efetuadas.

4.1.3 Análise quantitativa

Para a quantificação dos elementos presentes nas amostras utilizou-se dois filtros distintos. O filtro de alumínio com espessura de 12,5 µm para as análises dos elementos de menor número atômico, como P, S, K e Ca. E o filtro de alumínio com espessura de 630 µm para elementos Fe, Cu e Zn.

As tabelas 2 e 3 mostram os valores das medianas dos 20 pontos analisados em cada esferoide e o limite de detecção de cada elemento. O tratamento de dados foi realizado através do programa GraphPad Prism 6.

Tabela 2: Concentração elementar de cada esferoide da linhagem celular SH-SY5Y usando microXRF.

Amostra	Concentração elementar in µg.g ⁻¹						
	P	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn
Esferoide 1	4128	870	311	40	6,8	< LD	3,4
Esferoide 2	4257	736	486	196	4,8	< LD	3,5
Esferoide 3	2413	424	665	143	11,3	0,8	3,0
Esferoide 4	3812	531	574	156	7,2	1,3	3,6
Esferoide 5	5090	1283	54	39	4,6	< LD	3,0
LD¹⁾	7,2	6,4	4,2	3,1	1,2	0,8	0,8

1) LD = Limite de detecção.

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 3: Concentração elementar de cada esferoide da linhagem celular SK-N-BE (2) usando microXRF.

Amostra	Concentração elementar in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$						
	P	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn
Esferoide 1	1064	113	20	19	< LD	< LD	1,5
Esferoide 2	4183	707	17	54	< LD	1,6	2,4
Esferoide 3	3846	721	149	137	1,9	2,2	4,2
Esferoide 4	3486	700	20	23	< LD	< LD	2,0
Esferoide 5	3253	616	17	22	< LD	0,8	1,7
LD¹⁾	7,2	6,4	4,2	3,6	1,2	0,8	0,8

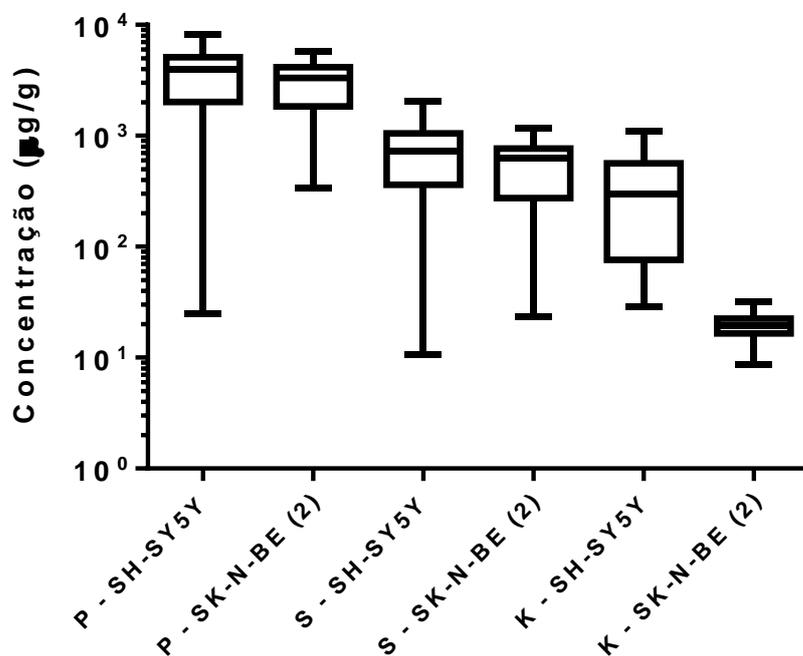
1) LD = Limite de detecção.

Fonte: O autor, 2019.

Os resultados mostram que a quantificação dos elementos ferro e cobre foram prejudicados para o esferoide da linhagem celular SK-N-BE (2) e o cobre para a linhagem celular SH-SY5Y, visto que estes estão próximos do limite de detecção experimental do equipamento. As figuras 19 e 20 mostram, em escala logarítmica, os gráficos de caixa para os elementos P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn para os dois tipos de linhagens celulares analisadas (SH-SY5Y e SK-N-BE (2)). Os bigodes inferior e superior representam respectivamente os valores mínimo e máximo após a exclusão dos outliers pelo método de ROUT. Pode-se observar pelas figuras 19 e 20 a grande dispersão dos valores em relação a mediana, possivelmente, devido a heterogeneidade das amostras.

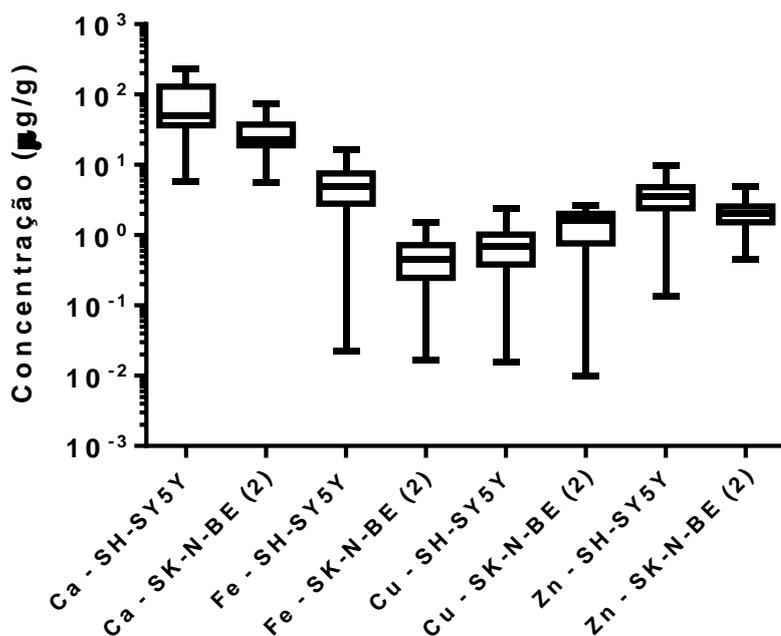
A Tabela 4 apresenta a comparação entre SH-SY5Y E SK-N-BE (2) através do teste não paramétrico Mann Whitney com nível de significância de 5% para todos os elementos avaliados. A comparação entre os dois tipos de esferoides foi realizada a fim de verificar a relação das concentrações dos elementos com a progressão do neuroblastoma.

Figura 19: Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de P, S e K nos esferoides celulares a partir de linhagens celulares de neuroblastoma humano.



Fonte: O autor, 2019.

Figura 20: Comparação da concentração ($\mu\text{g/g}$) de Ca, Fe, Cu e Zn nos esferoides celulares a partir de linhagens celulares de neuroblastoma humano.



Fonte: O autor, 2019.

Tabela 4: Comparação da concentração elementar ($\mu\text{g/g}$) entre os esferoides celulares das linhagens SH-SY5Y e SK-N-BE (2) usando o teste não paramétrico Mann-Whitney

Elemento	Teste Mann Whitney	
	P valor	Significante? (P < 0,05)
P	0,007	Sim
S	0,01	Sim
K	< 0,0001	Sim
Ca	< 0,0001	Sim
Fe	< 0,0001	Sim
Cu	< 0,0001	Sim
Zn	< 0,0001	Sim

Fonte: O autor, 2019.

Nota-se nas figuras 19 e 20 que os elementos P, S, K, Ca, Fe e Zn apresentaram um declínio nos valores das concentrações na linhagem SK-N-BE (2) quando comparados à linhagem SH-SY5Y. A redução nos valores das concentrações de determinados elementos encontrados neste estudo pode estar associada a progressão do neuroblastoma.

As linhagens analisadas apresentam diferentes vulnerabilidades ao estresse oxidativo devido à amplificação ou não de MYCN (oncogene viral relacionado à mielocitomatose v-myc, derivado do neuroblastoma). A linhagem SK-N-BE (2) são células amplificadas por MYCN, enquanto a linhagem celular SH-SY5Y são células não amplificadas por MYCN. Tem sido amplamente relatado na literatura que a amplificação do MYCN é um fator de prognóstico importante no NB. A identificação desta amplificação em NB está associada com a rápida progressão do tumor, mau prognóstico e resistência terapêutica no neuroblastoma (TUDELA et al., 2010; PARODI et al., 2011; SHUANGSHOTI et al., 2012). Amplificação MYCN confere resistência celular à apoptose induzido pela necrose tumoral, enquanto o silenciamento do MYCN promove a redução da proliferação, da diferenciação e apoptose de células de NB humanas (KANG et al., 2006; NARA et al., 2007). Aproximadamente 20% dos tumores de NB têm amplificação MYCN, sendo ainda mais comum (aproximadamente 40%) em tumores de estágio avançados 3 e 4 e incomum (cerca de 5%-10%) em tumores de estágio 1, 2 e 4S (SHUANGSHOTI et al., 2012). Estudos mostraram que

com MYCN amplificado as células possuem alta resistência contra o dano oxidativo. Em contraste, as células de NB com MYCN não amplificadas possuem maior vulnerabilidade ao dano oxidativo (TUDELA, et al., 2010).

As reações de oxidação e redução são catalisadas por metais de transição como o cobre e o ferro (AZZIZ, 2011). A excessiva formação de peróxidos, bem como a deficiência de glutatona (principal agente antioxidante e protetor) gera um aumento na reatividade do ferro, estimulando a formação de oxi-radicais tóxicos (TEIVE, 2005).

As EROs geradas no organismo podem provir de diferentes locais, sendo a principal fonte a mitocôndria, devido ao O_2 que escapou da cadeia de transporte de elétrons. A geração dessas espécies é associada ao metabolismo do O_2 mitocondrial, cuja fosforilação oxidativa resulta na formação de adenosina trifosfato (ATP) (FINLAND, LAC e FILAIRE, 2006). A formação de EROs pela mitocôndria é proporcional à atividade da cadeia de transporte de elétrons, mas esta não é proporcional ao consumo de O_2 . Um desequilíbrio entre a produção e a remoção dessas espécies, podem levar a eventos nocivos, como apoptose de células saudáveis e alteração da função celular (AZZIZ, 2011).

Íons metálicos, como o ferro, podem gerar EROs e catalisar reações de oxidação das biomoléculas (MANCÍA et al., 2010). O Fe apresenta dois estados de oxidação mais comuns, o Fe (III) e o Fe (II). As concentrações de Fe elevadas podem favorecer a lipoperoxidação e a autooxidação de neurotransmissores através do radical hidroxila formado na reação de Fenton, este sendo tóxico às células (MANCÍA, et al., 2010). Na oxidação do Fe (II) ao estado do Fe (III), o O_2 dissolvido na solução é reduzido a radical superóxido (SEQUEIRA, ALMEIDA E ARRUDA, 2006). Nessa reação, uma mistura de H_2O_2 e de Fe (II) reage com moléculas orgânicas devido a formação do radical hidroxila podendo promover uma série de reações com radicais livres (GROTTO, 2008).

O cobre, elemento que participa do processo de transferência eletrônica, apresenta dois estados de oxidação mais comuns, Cu (I) e Cu (II), os quais podem participar de reações com o radical superóxido (AZZIZ, 2010). Estudos relataram que a linhagem celular SH-SY5Y quando expostas ao sulfato de cobre induziu acúmulo de cobre na mitocôndria celular, gerando a formação de EROs e estimulando a morte celular (ARCIELLO et al., 2005).

Estudos mostraram que a deficiência de zinco leva a um rápido aumento dos oxidantes celulares. Níveis aumentados de oxidantes globais e espécies reativas de nitrogênio (RNS) foram observados em associação com a deficiência de Zn em células de neuroblastoma e glioma. Um aumento acentuado na liberação de H_2O_2 foi observado após a incubação das células de neuroblastoma humano (IMR-32) em meio deficiente de Zn (OTEIZA et al., 2000; ZAGO et al., 2001). Este aumento nas EROs celulares foi evitado pela incubação simultânea de células de neuroblastoma deficientes de Zn na presença de catalase. Além disso, um estudo mostrou que a exposição ao excesso de zinco em células SH-SY5Y pode induzir a citotoxicidade e a morte celular em concentrações acima de 200 μM . Assim, a citotoxicidade do Zn está intimamente relacionada à falha de energia causada pela diminuição de NAD^+ intracelular, este sendo um substrato chave na glicólise para produção de ATP. A diminuição da produção de ATP pode levar a morte celular. Além disso, essa perda de ATP intracelular está intimamente associada a distúrbios da função mitocondrial, que é frequentemente acompanhada pela geração de EROs nas mitocôndrias (SHIMOJI et al., 2017).

Os níveis de alguns metais, como Cu, Fe e Zn devem ser controlados rigorosamente pelo organismo, não permitindo acumulação em níveis tóxicos. A administração de complexos de cobre a tecidos tumorais mostrou-se eficiente no controle da morte celular das células cancerosas por meio do estresse oxidativo (TARDITO E MARCHIO, 2009). O fato de o Cu atuar como cofator da enzima oxidase permite a conversão do íon férrico Fe (III) citosólico na forma ferrosa Fe (II), que posteriormente será incorporado a ferritina. A ferritina é uma importante proteína no armazenamento de ferro e é secretada pelas células cancerosas, induzindo que a relação entre Cu e Fe possuem correlação (MILLS, 1981). Além disso, foi relatado que a diminuição dos níveis da expressão de ferroportina nas células cancerígenas, reduz a exportação de Fe intracelular, causa sobrecarga de Fe intracelular, ativa a EROs e consequentemente o dano ao DNA, favorecendo a tumorigênese e/ou promoção tumoral (XUE, et al., 2015).

Mesmo durante o desenvolvimento tumoral o ATP desempenha a manutenção dos processos celulares para proliferação celular e geração de energia para agregação de biomassa ao tumor (CAIRNS et al., 2011). Espécies reativas também podem se formar excedendo significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do

organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas) desencadeando o processo de estresse oxidativo, comprometendo assim o funcionamento celular estimulando-a a morte por apoptose ou necrose (HALLIWELL, 2001). As EROs são espécies nocivas para as células devido à sua alta reatividade, seus alvos biológicos são representados por ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. O dano ao DNA induzido por EROs requer a ativação de mecanismos de reparo para a sobrevivência celular. Quando a reparação não acontece é que a indução a carcinogênese se inicia, sendo uma das consequências associadas a um ambiente pró-oxidante no interior das células, e sugere também que a progressão tumoral possa ser sustentada pela ativação de vias celulares reguladas por oxidação. Por outro lado, o estresse oxidativo poderia ser útil no tratamento do câncer, já que a produção de EROs poderia ser menos tolerada pelo delicado equilíbrio redox das células tumorais em relação às células normais (TARDITO e MARCHIO, 2009).

O ferro tem sido relatado em estudos relacionados a distúrbios neurodegenerativos e em especial ao estresse oxidativo visto a sua capacidade de migrar entre os estados ferroso e férrico, respectivamente Fe (II) e Fe (III) (LAVENUS S. et al., 2010). Células de neuroblastoma humano (IMR-32), quando expostas ao citrato de amônio férrico acumularam ferro e mostraram aumento nos níveis de oxidantes celulares dependente do tempo e da concentração. A incubação com amônio férrico causou aumento da intensidade do teor de ferro celular e conseqüentemente aumento de células oxidantes, ativando sinais que são sensíveis ao redox e a apoptose (SALVADOR e OTEIZA, 2011).

Foram relatados experimentos realizados com a linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano que indicaram que o ferro regula a densidade de A_{2A}R no nível celular, e também que parece haver uma relação fisiológica íntima entre o status de ferro celular e a densidade do A_{2A}R, demonstrado pela forte correlação com a densidade do receptor de transferrina (TfR) (GULYANI et al, 2009). Quando expostas a concentrações variáveis de ferro férrico e ferroso, as células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com a forma ferrosa exibiram uma toxicidade significativamente maior quando comparadas com as tratadas com o estado iônico férrico de maior concentração, levando à desintegração celular (VIKRAN, A. et al, 2015).

As concentrações entre os elementos não se dão de forma isolada, o cobre por exemplo, é um componente fundamental das metaloenzimas ativas, onde participa de reações redox nos ciclos de estados de oxidação +1 e +2. Exemplos destas

metaloenzimas são citocromo oxidase, tirosinase e Zn-Cu superóxido dismutase. Bem como a relação entre ferro e cobre, que em pacientes com neuroblastoma, apresentam altos níveis de ferritina e mau prognóstico da doença (MILLS, 1981).

Estudos relatados na literatura com células neuronais em cultura de, mostraram que os níveis de ferro podem exacerbar a toxicidade redutora do cobre aumentando a produção de radicais livres e ainda que a toxicidade pode promover a redução do Cu (II) ou Fe (III) (WHITE, et al., 2004). Esse fato pode justificar as diferenças observados nos níveis de cobre e ferro nos esferoides analisados. Os níveis de Fe encontrados na linhagem SH-SY5Y são superiores aos encontrados na linhagem SK-N-BE (2).

Na literatura, foi relatado que o Zinco desloca o cobre e o ferro redox na membrana plasmática prevenindo a oxidação e a morte celular (ZAGO et al., 2001). O nível de Zn encontrado na linhagem SK-N-BE (2) é inferior ao encontrado na SH-SY5Y. Em contrapartida, o nível de cobre apresentou-se superior na linhagem SK-N-BE (2), este fato pode estar relacionado ao deslocamento do cobre e ferro relatado na tentativa de prevenção aos danos na mitocôndria devido ao estresse oxidativo.

De maneira geral, as concentrações desses elementos não possuem um valor preciso descrito na literatura. As concentrações alteradas entre os elementos traço na amostra podem tornar o ambiente tóxico ou não para a célula, desencadeando assim uma reação em cadeia podendo gerar a morte celular, seja por apoptose ou necrose. Estudos descritos na literatura indicam que níveis elevados de cobre podem induzir diminuições nas concentrações de ferro e zinco. Há relatos que os níveis de zinco alterados podem funcionar como neuromodulador devido a sua correlação com diversas metaloenzimas (HARRISON, GIBBONS, 1994; SMART, XIE, KRISHEK, 1994).

Uma característica interessante dos tumores de NB é que, mesmo em estágios avançados da doença, os tumores primários são sensíveis à quimioterapia, embora a progressão clínica inevitavelmente ocorra. As diversas linhagens de NB geneticamente modificadas são ferramentas valiosas para investigar fatores importantes na progressão do NB. Assim, os diferentes processos biológicos apresentados pelas células, os quais estão relacionados de certa maneira com as concentrações elementares, sugerem importantes resultados nas pesquisas de terapias específicas nas células de NB.

A técnica de microXRF mostrou-se eficaz para as análises qualitativas e quantitativas de elementos traço em amostras biológicas. A técnica pode ser utilizada

como aliada na compreensão da relação dos níveis de elementos traço com patologias associadas aos processos biológicos em células de neuroblastoma.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, a técnica de microXRF demonstrou ser eficiente para análise de esferoides celulares tumorais das linhagens SH-SY5Y e SK-N-BE (2). O presente estudo foi capaz de analisar a composição elementar, distribuição espacial e as concentrações de esferoides de neuroblastoma humano. Foi possível, através da XRF, a identificação de elementos traços em esferoides derivados de duas linhagens celulares de neuroblastoma humano os seguintes elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn.

A distribuição espacial elementar nos esferoides mostrou a não uniformidade dos elementos químicos ao longo das amostras, evidenciando regiões de maiores e menores intensidades. A distribuição espacial do cobre não pode ser avaliada devido as concentrações estarem próximas do limite de detecção do sistema de XRF.

Através de amostra certificada foi possível validar a metodologia e calcular os limites de detecção do equipamento para os elementos: P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn. Os valores obtidos variaram desde $0,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ para Cu e Zn até $7,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ para P.

A análise quantitativa mostrou que as concentrações entre os elementos identificados nos esferoides da linhagem SK-N-BE (2) são menores do que os da linhagem SH-SY5Y.

As concentrações obtidas para as linhagens celulares SH-SY5Y e SK-N-BE (2) apresentaram grande dispersão, essa dispersão pode ser justificada devido a heterogeneidade das amostras analisadas e a superfície não plana dos esferoides celulares.

Com a utilização da microXRF foi possível analisar as distribuições elementares e quantificar múltiplos elementos simultaneamente e de forma não destrutiva. Tendo em vista a importância dos elementos traço na evolução do neuroblastoma, como foi demonstrado, o nosso estudo pode representar uma ferramenta importante para a compreensão da patologia associada a este tipo de tumor.

O desdobramento deste estudo poderá guiar futuros estudos utilizando cultura de células em 3D, bem como análises de células de neuroblastoma humano por microXRF.

Em estudos futuros nesta área, pode-se sugerir:

- a) Realizar novas análises usando microXRF com radiação Síncrotron para melhorar a análise do cobre,
- b) Realizar tratamentos suplementados com elementos importantes no estresse

oxidativo, tais como: Fe, Cu e Zn,

- c) Realizar testes de biológicos paralelamente as análises de MicroXRF,
- d) Desenvolver um protocolo para comparação dos resultados obtidos com MicroXRF com um grupo controle.

REFERÊNCIAS

- AL-SANDAQCHI, A. T. et al. Metallome of cerebrovascular endothelial cells infected with *Toxoplasma gondii* using μ -XRF imaging and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Metallomics*, Austrália, v.10, p. 1401-1414, sep. 2018.
- AMARAL, J. B. *Células MCF-7 como modelo 3D no estudo de câncer de mama humano*. 2010. 43 f. Tese (Doutor em ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ANJOS, M. J. et al. Quantitative Analysis of Metals in Soil Using X-ray Fluorescence. *Spectrochimica Acta. B*, [S. 1], v. 55, p. 1189-1194, 2000.
- ANDERSON C. P. Depletion of glutathione by buthionine sulfoxine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis. *Experimental cell Research*, [S. 1], v. 246, p. 183–192, 1999.
- ARCIELLO, M.; ROTILIO G.; ROSSI, L. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Journal of bacteriology*, Bethesda, [S. 1], v. 327, p. 454-459, 2005.
- ATCC – *American Type Culture Collection*. Virginia: Estados Unidos, 2019. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2266.aspx>. Acesso em: 10 abr. 2019. Base de dados.
- ATCC – *American Type Culture Collection*. Virginia: Estados Unidos, 2019. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2271.aspx>. Acesso em: 10 abr. 2019. Base de dados.
- AZZIZ, Y. B-H. *O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson*. 2011.74 f. Dissertação (Mestre em ciências farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.
- BELTRÁN-GARCIA. et al. Development of an iron-selective antioxidante probe with protective effects on neuronal function. *PLOS ONE*. Estados Unidos, v.12, p.12, dez. 2017.
- BERG. J. M., SHI, Y. The galvanization of biology: A growing appreciation for the Roles of Zinc. *American Association for the Advancement of Science*, [S.1], v.271, p. 1081-1085, set. 1996.
- BERTHIER, S. et al. Anticancer properties of sodium selenite in human glioblastoma cell cluster spheroids. *Journal of trace elements in medicine and biology*, [S.1], v. 44, p. 161-176, abr. 2017.
- BISHOP, M. et al. Accumulation of Non-Transferrin-Bound Iron by Neurons Astrocytes, and Microglia. *Neurotox Research*, [S.1], v.19, p. 443-451, mar. 2011.
- BRANDTECH – Scientific Industry. *Fornecedor de produtos científicos*. Essex: Estados Unidos: BRANDTECH, c2019. Disponível em: <https://www.brandtech.com/>. Acesso em: 02 jul. 2019.

- BUSH, A. I. Metals and neuroscience. *Chemical biology*, [S.l.], v. 4, p. 184-191, mai. 2000.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, [S. l.], v. 11, p. 85-95, mar. 2011.
- CHOWANNDISAI, W. et al. A zinc transporter gene required for development of the nervous system. *Communicative & Integrative biology*, v. 6, e26207-1 2013. DOI 10.4161/cib.26207. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925451/>. Acesso em: 11 jul. 2019
- CIPRIANO, S. *Verificação da concentração e consequência da variação da homeostase de cobre e zinco em células de neuroblastoma através da comparação de quelantes específicos*. 2014. 28 f. Monografia de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014.
- CUNHA, L. C. *Interferência de RNA direcionada ao canal de potássio Eag1 – efeitos sobre a expressão gênica e viabilidade celular do glioma*. 2012. 59 f. Dissertação (Mestre em ciências da saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- CURRIE, L. A. Limits for Quantitative Detection and Quantitative Determination. *Analytical Chemistry*, [S.l.], v. 40, p. 586-593, 1968.
- DE FALCO, A. et al. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Química nova*, [S.l.], v.39, p. 63-80, set. 2016.
- DELONCLE, R. et al. Copper brain protein protection against free radical-induced neuronal death: Survival ratio in SH-SY5Y neuroblastoma cell cultures. *Journal of trace elements in medicine and biology*, [S.l.], v. 39, p. 50-53, jul. 2017.
- DEYL, R. T. et al. Retroperitoneal Neuroblastoma in Children: case report and literature review, *Revista brasileira de Oncologia Clínica*, Porto Alegre, v. 5, p.21-28, mai./ago. 2008.
- DONGLAI, L.V. et al. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug Discovery. *Oncology letters*, [S.l.], v.14, p. 6999-7010, jul. 2017.
- DUAN, F. et al. Sulfur inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer in vivo. *Oncology letters*, [S.l.], v.9, p. 437-441, set. 2015.
- DUBESSY C. et al, Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Critical Reviews in Oncology: Hematology*, [S.l.], v. 36, p. 179–192, 2000.
- EHRMAN, J. K., et al. *Livro de fisiologia do exercício clínico*. 1 ed. Bela Vista: Phorte Editora, 2017. 832 p.
- EKE, I., et al. 3D matrix-based cell cultures: Automated analysis of tumor cell survival and proliferation. *International Journal of oncology*, [S.l.], v.48, p. 313-321, ago. 2015.
- EPAULE, C. et al. X-ray microfluorescence for biodistribution studies of nanomedicines. *Internacional journal of pharmaceuticals*, [S.l.], v.531, p. 343-349, Ago. 2017.
- EISBERG, R.; RESNICK, R. *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*, 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1979. 936 p.

- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Soucer, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Internacional journal of câncer*, [S.I], v.136, ago. 2014.
- FINLAND, J., LAC, G., FILAIRE, E. Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports medicine*, [S.I], v. 36, p. 327-358, set. 2006.
- FREDERICKSON, C. J., KOH, J-Y., BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Neurobiotex, Texas*, v.6, p. 449-462, jun. 2005.
- GOUGET, B. et al. N-myc oncogene amplification is correlated to trace metal concentrations in neuroblastoma cultured cells. *Nuclear instruments and methods in physics research B*, [S.I], v. 170, p. 432-441, 2000.
- GROTTO, H. Z. W. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, [S.I], v. 30, p. 390-397, mar. 2008.
- GRZEGORZ, J. L. et al. Distribution of selected elements in calcific human aortic valves studied by microscopy combined with SR-XRF: influence of lipids on progression of calcification. *Micron*, Hamburgo, v. 67 p. 141–148, ago. 2014.
- GULYANI, S. et al. Diminished iron concentrations increase adenosine A2A receptor levels in mouse striatum and cultured human neuroblastoma cells. *Experimental Neurology*, [s. l.], v. 215, p. 209 -404, nov. 2009.
- HAGMEYER, S. et al. Effects of Trace Metal Profiles Characteristic for Autism on Synapses in Cultured Neurons. *Neural Plasticity*, [S.I], v.2015, jan. 2015.
- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging, Singapura*, [S.I], v. 18, p. 685, 2001.
- HANN H. W. L. et al. Prognostic importance of Serum Ferritin in patients with III and IV neuroblastoma: The childrens cancer study group experience. *Cancer Research*, [S.I], v. 45, p. 2843-2848, 1985.
- HARRISON, N. L., GIBBONS, S. J. Zn²⁺: An endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology*, [S.I], v. 33, p. 935-52, 1994.
- HUA-WEI, L. et al. Study on Zn relative concentration and chemical state in broilers duodenum by micro-X-ray fluorescence and micro-X-ray absorption fine structure. *Livestock Science*, [S.I], v.161, p. 101-108, dez. 2014.
- ICRU. Tissue substitutes in radiation dosimetry and measurement. *ICRU Report 44*. International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, MD, 1989.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. *Neuroblastoma – versão para profissionais de saúde*. Rio de Janeiro: RJ: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil/neuroblastoma/profissional-de-saude>. Acesso em: 13 mai. 2019.
- KANG, J. et al. MYCN silencing induces differentiation and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, [S.I], v. 351, p. 192-197, 2006.

- KUMP, P. Some Considerations on the Definition of the Limit of Detection in X-Ray Fluorescence Spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, [S.l.], v. 52, p. 405-408, 1997.
- 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*, [S.l.], v.111, p. 15-22, jun. 2015.
- LACHANCE, G. R.; CLAISSE, F. Quantitative X-ray Fluorescence analysis: Theory and Application. 1 ed. New York: John Willey & Sons, 1995. 424 p.
- LECLERC C. et al. The calcium: an early signal that initiates the formation of the nervous system during embryogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, [S.l.], v. 5, p. 3, 2012.
- LEITÃO, R. G. *Distribuição elementar química em esferoides celulares de próstata usando microfluorescência de raios X*, 2014. 116 f. Tese (Doutorado em energia Nuclear) – Instituto Alberto Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- MAEDA, N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Frontiers in Neuroscience*, [S.l.], v.9, p. 98-112, mar. 2015.
- MILLS C. F. Interactions between elements in tissues: studies in animal models. *Federation Proceedings*, [S. l.], v. 40, p. 2138-2143, 1981.
- MANCÍA, R. S. et al. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico biological interactions*, [S.l.], v. 189, p. 184-199, 2010.
- MARENGO B. et al. Mechanisms of BSO (L-buthionine-S, R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free radical biology medicine*, [S.l.], v. 44, p. 474–482, 2008.
- MARIS, J. M. Recent advances in Neuroblastoma. *New England Journal Medicine*, Londres, Londres, v. 362, p. 2202-2211, jun. 2010.
- MOLINARO E.M. et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, *EPSJV*, Rio de Janeiro, v.2, p. 219, 2010.
- NAIDU, B. G. et al. Multivariate analysis of trace elemental data obtained from blood serum of breast cancer patients using SRXRF. *Results in Physics*, [S.l.], v.12, p. 673-680, dez. 2019.
- NARA, K. et al. Silencing of MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification. *International journal of oncology*, [S.l.], v. 30, p. 1189-1196, 2007.
- OTEIZA, P. I., MACKENZIE, G. G. Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. *Molecular aspects of medicine*, [S.l.], v.26, p. 245-255, jul. 2005.
- PAPAIOANNOU G., MC-HUGH, K. Neuroblastoma in childhood: Review and radiological findings. *Cancer imaging*, [S.l.], v. 5, p. 116-127, mai. 2005.
- PARODI F. et al. Identification of novel prognostic markers in relapsing localized resectable neuroblastoma. *OMICS*, [S.l.], v.15, p. 113-121, 2011.

PAULSEN, B. S. et al. Valproate reverts zinc and potassium imbalance in schizophrenia-derived reprogrammed cells. *Schizophrenia Research*, [S.1], v. 154, p. 30-35, mar. 2014.

PESSANHA S. et al. Quantitative analysis of human remains from 18th-19th centuries using X-ray fluorescence techniques: The mysterious high content of mercury in hair. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, [S.1], v.33, p. 26-30, fev. 2015.

PFAENDER, S., GRABRUCKER, A. Characterization of biometal profiles in neurological disorders. *Metallomics*, [S.1], v.6, p. 960-978, fev. 2014.

POLUCENO, G. G. *Guanosina e canais de potássio (BK): Efeitos sobre a toxicidade glutamatérgica*. 2016. 54 f. Monografia de conclusão de curso (Bacharel em ciências biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

RHA, S. E. et al. Neurogenic tumors in the abdomen: Tumor types and imaging characteristics. *Radiographics*, [S.1], v. 23, p. 29-43, jun. 2003.

ROCHA, K. A. M. *Análise da distribuição de zinco em células tumorais prostáticas DU145 utilizando microfluorescência de raios X*. 2016. 86 f. Dissertação (Mestre em energia nuclear) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

ROSA, J.E.P. *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*. 2019. 91 f. Tese (Doutorado em física) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

SALVADOR G.A., OTEIZA, P. I. Iron overload triggers redox-sensitive signals in human IMR-32 neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, [S.1], v.32, 2011.

SANTOS, R. S. *Análise multielementar em folhas de Nerium oleander L. usando fluorescência de raios X por dispersão em energia*. 2014. 139 f. Dissertação (Mestrado em Física) Instituto de Física Aramando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SARTORE, R. C. et al. Trace elements during primordial plexiform network formation in human cerebral organoids. *PeerJ*, [S.1], v.1, p. 20-48, fev. 2016.

SIQUEIRA, E., ALMEIDA, S. G., ARRUDA, S. The adverse role of iron in the organism. *Comum ciência saúde*, [S.1], v. 17, p. 229-236, 2006.

SHUANGSHOTI S. et al. Natural course of low risk neuroblastoma. *PediatrIC Blood Cancer*, [S.1], v. 58, p. 690-694, set. 2012.

SHIMOJI M. et al. Hydrogen sulfide ameliorates zinc-induced cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Free Radical Research*, [S. 1.], v. 51, p. 978-985, 2017.

SMART, T. G.; XIE, X.; KRISHEK, B. J. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Progress in Neurobiology*, [S.1], v. 42, p. 393-441, 1994.

STONE, T.W. et al. Tryptophan, adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. *Metabolism Brain Discover*, [S.1], v. 22, p. 337–352, 2007.

SOUZA, L. F. *Efeitos do zinco sobre os sistemas de degradação de peróxidos de células neurais*. 2012. 66 f. Dissertação (Mestre em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of câncer Science & therapy*, [S.l.], v.1, jul. 2009.

TARDITO S., MARCHIO L. Copper compounds in anticancer strategies. *Current Medicinal Chemistry*, [S. l.], v. 16, p. 1325-1348, 2009.

TEIVE, A. G. H. Etiopathogenesis of Parkinson Disease. *Revista neurociências*, [S.l.], v. 13, p. 201-214, 2005.

TUDELA M. V.P. et al. Human neuroblastoma cells with MYCN amplification are selectively resistant to oxidative stress by transcriptionally up-regulating glutamate cysteine ligase. *Journal of neurochemistry*, [S.l.], v. 113, p. 819–825, 2010.

URIU-ADAMS, J. Y., KEEN, C. L. Zinc and reproduction: Effects of zinc deficiency on prenatal and early postnatal development. *Birth defects research (Part B)*, [S.l.], v.89, p. 313-325, jul. 2010.

VALLEE, B., FALCHUK, K. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews, USA*, v.73, ago. 1993.

VAN GRIEKEN R., MARKOWICZ A. *Handbook of X-Ray Spectrometry: Methods and Techniques*. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1992, 1016 p.

WHITE, A. R. et al. Iron inhibits neurotoxicity induced by trace copper and biological reductants. *Journal biological inorganic chemistry*, [S.l.], v. 9, p. 269-280, fev. 2004.

WINEGAR, B. D., LANSMAN, J. B. Voltage-dependent block by zinc of single calcium channels in mouse myotubes. *The journal of physiology*, [S.l.], v. 425, p. 563-578, nov. 1990.

WRÓBEL P. M. et al. Combined micro-XRF and TXRF methodology for quantitative elemental imaging of tissue samples. *Talanta Journal, Bruxelas*, [S.l.], v. 162, p. 654-659, jun. 2017.

XUE, D. et al. Decreased expression of ferroportin in prostate cancer. *Oncology letters*, [S.l.], v.10, p. 913-916, 2015.

YASUDA T. et al. K(ir) and K(v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells. *Molecular Cell Neuroscience*, [S.l.], v. 37, p. 284 – 297, 2008.

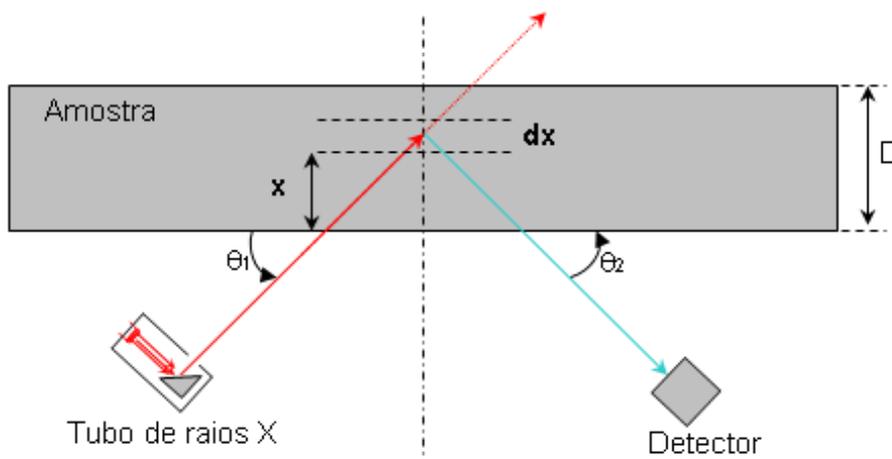
ZHANG K., MACK P., WONG K. P. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *International journal of oncology*, [S.l.], v. 12, p. 871–882, 1998.

ANEXO A

A.1. Análise quantitativa em fluorescência de raios X

Na XRF a relação entre a quantidade de um elemento i presente numa amostra e a intensidade da radiação de fluorescência de raios x produzida pelo elemento i (normalmente linha $K\alpha$) depende de vários fatores: o espectro de energia do feixe incidente, geometria fonte-detector, tipo de detector, características da amostra, condição de excitação (vácuo ou atmosfera normal), interferência entre linhas e qualidade do espectro de XRF. Assim, a análise quantitativa não é uma tarefa simples. Para chegarmos a uma relação que possa considerar todos estes fatores é necessário partir de um modelo simples de análise. A figura 21 representa um modelo bastante simplificado de uma amostra com espessura D sendo irradiada por um feixe monocromático com energia E_0 e incidindo num ângulo θ_1 em relação a superfície da amostra. O feixe incidente excita um elemento i numa camada dx numa profundidade x . O elemento i excitado emite fluorescência de raios X com energia E_i . A XRF é isotrópica, entretanto, parte do feixe de XRF vai na direção do detector que está posicionado num ângulo θ_2 em relação a superfície da amostra. Assim, a relação entre a intensidade da radiação fluorescente e a concentração W_i de um elemento i presente na amostra pode ser obtida seguindo as seguintes etapas (ANJOS, 2010; SIMABUCO, 2000):

Figura 21. Geometria para a análise quantitativa da fluorescência de raios X



Fonte: SANTOS, 2014, f. 56.

Vamos supor que a distribuição do elemento i na amostra é, assim, a intensidade da linha $K\alpha$ de um elemento i numa camada dx a uma profundidade x (figura 21) pode ser representada como o produto de três eventos:

- a)** a probabilidade de a radiação de excitação atingir a camada dx a uma profundidade x :

$$P_1 = e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \sin \theta_1} \quad (8)$$

Onde: μ_0 é o coeficiente de absorção de massa da matriz ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) na energia do feixe incidente (E_0), ρ_0 é a densidade da matriz ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) e θ_1 é o ângulo de incidência entre a direção do feixe incidente e a superfície da amostra.

- b)** a probabilidade de a radiação de excitação produzir uma vacância no orbital $1s$ (camada K) no elemento i presente em dx , resultando na produção de raios X característicos associado a linha de emissão $K\alpha$:

$$P_2 = \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot dx \quad (9)$$

Onde: τ é o coeficiente de absorção de massa para efeito fotoelétrico associado elemento i ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) na energia de excitação (E_0), ω é o rendimento de fluorescência da camada K , j é a razão de salto $K \rightarrow L$, f é a fração de fótons K emitidos como raios $K\alpha$ característicos e ρ é a densidade ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Os termos τ , ω , j e f são chamados de parâmetros fundamentais dependem do número atômico do elemento i e da energia de excitação. Estes termos podem ser agrupados em um único termo, denominado constante dos parâmetros fundamentais (K) e então, a equação 9 pode ser reescrita como:

$$P_2 = K \cdot \rho \cdot dx \quad (10)$$

$$\text{Onde: } K = \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f$$

- c) a probabilidade dos raios X $K\alpha$ produzido na camada dx não serem absorvidos na espessura x e, conseqüentemente, podem chegar ao detector, sendo detectados como fótons associados a fluorescência de raios X:

$$P_3 = e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta_2} \cdot \varepsilon \quad (11)$$

Onde: μ é o coeficiente de absorção de massa da matriz ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) para a energia $K\alpha$, ε é a eficiência do detector na energia $K\alpha$ e θ_2 é o ângulo de emergência (entre a superfície da amostra e a direção do feixe emergente).

A intensidade da radiação fluorescente dI produzida pelo elemento i contido na camada dx é o produto das três probabilidades P_1 , P_2 e P_3 e de um fator de geometria G (LACHANCE & CLAISSE, 1995). Assim, a intensidade I pode obtida como:

$$dI = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot \rho \cdot e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta_1} \cdot e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta_2} dx \quad (12)$$

Onde: $G = I_0 \cdot \Omega_1 \Omega_2$

O termo G , denominada fator de geometria, é uma constante de proporcionalidade e depende apenas da geometria do sistema de excitação-deteccção, da intensidade da fonte de excitação.

Os coeficientes de absorção de massa para as energias dos feixes incidente (E_0) e emergente (E_i) podem ser agrupados da seguinte forma:

$$\chi_i(E_0, E_i) = \frac{\mu_M(E_0)}{\text{sen}\theta_1} + \frac{\mu_M(E_i)}{\text{sen}\theta_2} \quad (13)$$

$\chi_i(E_0, E_i)$ pode ser interpretado como um parâmetro associado a absorção de massa total da amostra.

A equação 12 pode ser integrada em toda a espessura da amostra D . Assim, determinar a intensidade da fluorescência de raios X, I_i (fótons. s^{-1}), emitida por um elemento i , com concentração W_i , na amostra pode ser obtida como:

$$I_i = G \cdot K_i \cdot \varepsilon_i(E_i) \rho_i \cdot \frac{1 - e^{-\chi_i \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi_i \cdot \rho_0} \quad (14)$$

Onde: $\rho_0 \cdot D$ é a densidade superficial de massa da amostra, medida em g/cm²;

$\frac{\rho_i}{\rho_0} = W_i$, é a concentração do elemento i na amostra, medida em µg/g ou em g/kg,

Logo podemos reescrever a equação (14) como:

$$I = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot W \cdot \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi} \quad (15)$$

O produto que envolve os parâmetros fundamentais K_i , a geometria do arranjo experimental G e a eficiência da detecção $\varepsilon_i(E_i)$ representam a sensibilidade do espectrômetro de raios X para o elemento i na amostra, sendo representado por S_i .

$$S_i = G \cdot K_i \cdot \varepsilon_i(E_i) \quad (16)$$

Fazendo a substituição na equação (15), temos:

$$I_i = S_i \cdot W_i \cdot \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi_i} \quad (17)$$

Na equação (17) pode-se observar que a concentração W de um elemento i em uma amostra, pode ser efetuada através da medida da intensidade da radiação fluorescente, da sensibilidade do sistema S_i e da absorção da radiação incidente com energia E_0 e da energia da radiação de fluorescência de raios X, E_i , emitida pelo elemento i.

1. Amostras com absorção total muito grande

Quando a absorção da radiação é muito grande, o termo $\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D$ na equação (17) tende para valores muito altos, assim, temos:

$$\lim_{\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D \rightarrow \infty} A(E_0, E_i) = \frac{1}{\chi_i(E_0, E_i)} \quad (18)$$

Nesse caso, temos:

$$I_i = \frac{S_i \cdot W_i}{\chi_i(E_0, E_i)} \quad (19)$$

2 Amostras com absorção total muito pequena

No caso de amostras finas a absorção total na amostra é muito pequena, o termo $e^{-(\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)}$, da equação (17) pode ser expandido por uma série de potência. Chamando de u o expoente da base:

$$u = \chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D$$

$$e^u = 1 - u + \frac{u^2}{2!} - \frac{u^3}{3!} + \frac{u^n}{n!} \quad (20)$$

Assim, temos:

$$e^{(-\chi_i \cdot \rho_i \cdot D)} = 1 - \chi_i \cdot \rho_i \cdot D + \frac{(\chi_i \cdot \rho_i \cdot D)^2}{2!} + \dots \dots + \frac{(\chi_i \cdot \rho_i \cdot D)^n}{n!} \quad (21)$$

Usando apenas o primeiro termo da expansão da série e substituindo na equação 19, temos:

$$I_i = S_i \cdot W_i \cdot \rho_i \cdot D \quad (20)$$

A equação 20 mostra que em “amostras finas”, onde a absorção da radiação é muito pequena, a intensidade da radiação de XRF para um elemento i presente na amostra analisada depende apenas da Sensibilidade do sistema de XRF (S_i), a concentração elementar (W_i) e da densidade superficial de massa do elemento i na amostra ($\rho_i D$).

ANEXO B – Trabalhos publicados

Radiation Physics and Chemistry xxx (xxxx) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Radiation Physics and Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/radphyschem

Micro X-ray fluorescence elemental analysis of spheroid cultures of human neuroblastoma cells

G.C. Ferreira^a, D.F. Oliveira^b, R.G. Leitão^b, J.E.P. Rosa^a, C. Palmero^c, E.G. Oliveira-Barros^c, M.A. Oliveira^c, L.E. Nasciutti^c, R.T. Lopes^b, M.J. Anjos^{a,b,*}

^a Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, R. São Francisco Xavier, 524, 20550-900 Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Nuclear Instrumentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Herculano Macedo 2030, 21945-970 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, 21941-590 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Micro X-ray fluorescence
Trace elements
Neuroblastoma, Cancer

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is a malignancy of the sympathetic nervous system that almost exclusively occurs during infancy and early childhood. NB is responsible for 8–10% of all childhood cancers. More than 50% of the diagnosed cases have metastatic disease at the time of diagnosis. Trace elements are extremely important in biological processes, including reactions involving metabolic enzymes and gene expression. Micro X-ray fluorescence (μXRF) is an important tool since it is a non-destructive technique for the analysis of sample composition. Elemental distributions in spheroids of human neuroblastoma cells were investigated using a commercial μXRF system, which detected seven elements: P, S, Cl, K, Ca, Fe and Zn. Mapping by μXRF was performed to investigate the spatial distribution of all detected elements. Results of μXRF revealed a non-uniform distribution of elements in all the spheroids analyzed. The results of this work can serve as a baseline for studies investigating the role of trace elements in NB.

1. Introduction

Neuroblastoma is an embryonal tumor of the autonomic nervous system, meaning that the cell of origin is thought to be a developing and incompletely committed precursor cell derived from neural-crest tissues (Hoehner et al., 1996). Like most human cancers, this embryonal malignancy can be inherited, but the genetic etiology of familial and sporadically occurring neuroblastoma are largely unknown (Mossé et al., 2008). The tumors arise in tissues of the sympathetic nervous system, typically in the adrenal medulla or paraspinal ganglia, and thus can present as mass lesions in the neck, chest, abdomen, or pelvis (Maris, 2010).

According to London et al. (2005), neuroblastomas generally occur in very young children with the median age at diagnosis being 17 months. Unfortunately, more than 50% of diagnosed cases end up developing metastatic disease even with prior diagnosis during fetal growth or in the first years of life.

According to Donglai et al. (2017), cancer 3D cell culture is extensively explored because it mimics physiological and pathological

conditions. Indeed, the approach provides information about the structure and metastatic behavior of tumors *in vivo*. Spheroids (3D Cell culture) are tridimensional aggregates of tumor cells originating from either one or several cell clones. Moreover, this model mimics the structure of micro-tumors and some of their properties, such as radiation responses of spheroid populations, individual responses and the responses of different cell populations composing each spheroid (Dubessy et al., 2000).

The present study aimed to investigate the elemental composition of neuroblastoma (NB) culture cells. Trace elements play fundamental roles in cellular processes, including gene expression and reactions involving metabolic enzymes, and are present in trace amounts in organisms (Paulsen et al., 2014).

Analyses were carried out using X-ray Fluorescence (μXRF), a widely used and fully developed instrumental analytical method. The method is important for analyzing biological samples because it is a non-destructive method for analyzing all elements with an atomic number greater than 13 (or even less in a vacuum), at a wide range of concentrations (Van Grieken and Markowicz, 1992). Moreover, it is a

* Corresponding author.

E-mail addresses: gabriel.cferreira@hotmail.com (G.C. Ferreira), davifoliveira82@gmail.com, davi@lin.ufrj.br (D.F. Oliveira), roberta.leitao@uerj.br (R.G. Leitão), jeduirid@hotmail.com, jose.gduardo@cp2.g12.br (J.E.P. Rosa), celiapalmero@gmail.com (C. Palmero), eligouveab@gmail.com (E.G. Oliveira-Barros), maria_aparecida_ufrj@yahoo.com.br (M.A. Oliveira), luiz.nasciutti@histo.ufrj.br (L.E. Nasciutti), ricardo@lin.ufrj.br (R.T. Lopes), marcelin@uerj.br (M.J. Anjos).

<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.02.049>

Received 14 December 2018; Received in revised form 25 February 2019; Accepted 26 February 2019

Available online 27 February 2019

0969-806X/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article as: G.C. Ferreira, et al., Radiation Physics and Chemistry, <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.02.049>